

**Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

**ESTUDO DA ATIVIDADE DO SORO ANTICROTÁLICO NA  
HEPATOTOXICIDADE PRODUZIDA PELO VENENO DE *Crotalus  
durissus terrificus***

KARINA BORTOLIN

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas, como  
complementação dos créditos  
necessários para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas.

São José dos Campos, SP

2005

**Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

**ESTUDO DA ATIVIDADE DO SORO ANTICROTÁLICO NA  
HEPATOTOXICIDADE PRODUZIDA PELO VENENO DE *Crotalus  
durissus terrificus***

KARINA BORTOLIN

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas, como  
complementação dos créditos  
necessários para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Ribeiro

São José dos Campos, SP

2005

Esta dissertação segue a Normalização de Dissertações e Teses da UniVap

B748e

Bortolin, Karina

Estudo da atividade do soro anticrotálico na hepatotoxicidade produzida pelo veneno de *crotalus durissus terrificus* / Karina Bortolin. São José dos Campos: UniVap, 2005. 123 p.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2005.

1. Venenos de cobra 2. Crotalus 3. Fígado – fisiopatologia 4. soros imunes I. Ribeiro, Wellington, Orient. II. Título

CDU: 616-001.49

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta Dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Aluna: Karina Bortolin



São José dos Campos 17 de Março de 2005

Karina Bortolin

Banca Examinadora:

Profa. Dra. CRISTINA PACHECO SOARES (UNIVAP)

Cristina Pacheco Soares

Prof. Dr. WELLINGTON RIBEIRO (UNIVAP)

Wellington Ribeiro

Prof. Dr. FRANCISCO OSCARDE SIQUEIRA FRANÇA (USP)

Francisco Oscar de Siqueira França

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D - UniVap  
São José dos Campos, 07 de abril de 2005.

**Agradeço ao professor Wellington Ribeiro, orientador do trabalho, as  
mais que amigas e colegas Rafaela, Andréa, Erika; aos colegas Pombo,  
Miné, Rodolfo, Margarida e Valeria pela contribuição genuína e voluntária.**

**Agradeço a todos da UNIVAP que fizeram parte da minha vida durante  
esses dois anos, que me acolheram em São José dos Campos e  
facilitaram muito minha vida de mestranda: Funcionários do IP&D, Dona  
Ivone, Anderson, Ricardo, Cláudio, Márcio, Cláudia, bibliotecárias, e  
professores do mestrado.**

**Agradeço especialmente aos professores Cristina Pacheco Soares,  
Newton Soares da Silva, Antônio Carlos Prianti, José Carlos Cogo,  
Rodrigo A. B. Lopes-Martins, Valeria A. P. Carvalho e Adriana A. H.  
Brandão.**

**Agradeço a Deus pela minha família maravilhosa, que incondicionalmente  
sempre me retribuiu muito amor, atenção e patrocínio, Pai, Mãe e Mano  
vocês são muito especiais, mesmo muito longe, vocês sempre estão  
comigo. Matheus você é compreensão, paciência, companheirismo,  
carinho e amo. Obrigado é uma palavra tão pequena para expressar esse  
sentimento de “Nunca Esquecerei”.**

**“Não tomes o veneno só porque sabes qual o antídoto.”**  
**(Anônimo)**

## RESUMO

O envenenamento humano pela serpente *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*) é caracterizado por distúrbios hemostáticos, renais, cardiovasculares e disfunção hepática. Neste estudo, examinamos o dano hepático causado pelo veneno de *C.d.t.* em ratos, e sua prevenção pelo soro anticrotálico. Ratos Wistar macho ( $200\pm 20$ g) foram divididos em 13 grupos (7 ratos/grupo) grupo não tratado (C, controle); veneno + soro (V + S, 200 $\mu$ g/Kg de veneno foram inoculados via i.m. e 3, 6, 9, 12 horas após, foram tratados com 13 $\mu$ g/Kg de soro anticrotálico via intraperitoneal (i.p.), veneno (V, 200 $\mu$ g/Kg Kg de veneno foram inoculados via i.m. e 3, 6, 9, 12 horas após, receberam solução w/v de salina 0,9% via i.p.), soro (S, os animais receberam solução w/v de salina 0,9% via i.p. e 3, 6, 9, 12 horas após, foram tratados via i.p. com 13 $\mu$ g/Kg de soro anticrotálico). Os animais foram sacrificados 48 horas após a administração do soro anticrotálico para determinar a atividade enzimática de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA). Fragmentos do tecido hepático foram processados para análise histológica. Alterações histológicas do tecido hepático como necrose, congestão dos sinusóides e presença de células inflamatórias foram acompanhadas de um aumento persistente da atividade sérica das enzimas ALT, AST GGT e FA em todos os tempos dos grupos veneno, soro e veneno + soro. Estes resultados indicam que houve uma significativa alteração bioquímica e histológica nos fígados dos ratos, induzidas pelo veneno da *C.d.t.* e que esta alteração não pode ser prevenida por soroterapia anticrotálica.

**Palavras-chave:** veneno / soro anticrotálico / hepatotoxicidade / *Crotalus durissus terrificus*

## ABSTRACT

Envenoming by the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*) is characterized by haemostatic disturbances, renal, cardiovascular and hepatic disjunction. In this study, we examined the hepatic damage caused by *C.d.t.* venom in rats and was assessed its prevention by antivenom. Male Wistar rats (200±20g) were divided into 13 groups (7 rats/group) that received no treatment (C, control), venom + antivenom (V + A, 200µg/Kg of venom inoculated via i.m. and 3, 6, 9, 12 hours after they were treated via intraperitoneal (i.p.) with 13µg/Kg of anticrotalic serumtherapy), venom (V, 200µg/Kg of venom injected via i.m. and 3, 6, 9, 12 hours after they received via i.p. saline 0.9% w/v solution), antivenom (A, the animals received via i.m. saline 0.9% w/v solution and 3, 6, 9, 12 hours after they were treated via i.p. with 13µg/Kg of anticrotalic serumtherapy). The animals were killed 48 hours after administration of antivenom to determine the enzymatic activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT) and alkaline phosphate (AP). Samples of hepatic tissue were also processed for histological analysis. Histological abnormalities of the liver tissue like cell necrosis, sinusoidal congestion and presence of inflammatory cells were accompanied by a persistent increase of serum activities of AST, ALT, GGT and AP in groups V, A and V + A in all the periods. Those results indicate that the significant biochemical and histological disturbances induced by *C.d.t.* venom in liver rats could not be prevented by anticrotalic serumtherapy.

**Key words:** venom / antivenom / hepatotoxicity / *Crotalus durissus terrificus*



# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	21
1.1 <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	22
1.1.1 Veneno Crotálico .....	23
1.1.2. Patogenia do Acidente Crotálico .....	25
1.4 Fígado .....	28
1.4.1 Avaliação do dano hepático .....	29
1.4.1.1. Avaliação bioquímica do fígado.....	29
1.4.1.2. Avaliação histológica do fígado .....	31
1.5. Soroterapia Heteróloga .....	32
2. OBJETIVOS .....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
3.1 Veneno .....	36
3.2 Solução salina .....	37
3.3 Soro anticrotálico .....	37
3.4 Animais.....	37
3.4.1. Controle .....	38
3.4.2. Veneno .....	38
3.4.3. Soro .....	39
3.4.4. Veneno + Soro.....	39
3.5 Anestesia .....	40
3.6 Procedimento cirúrgico .....	41
3.7 Coleta de sangue .....	41
3.8 Coleta do tecido hepático.....	42
3.9 Soluções .....	42
3.10 Análises bioquímicas .....	42
3.10.1 Aspartato aminotransferase (AST).....	43
3.10.2 Alanina Aminotransferase (ALT) .....	44
3.10.3 Gama - Glutamiltransferase (GGT).....	44
3.10.4 Fosfatase Alcalina (FA):.....	45

3.11 Análise histológica.....	45
3.12 Análise Estatística .....	47
4. RESULTADOS .....	48
4.1 Estudo Bioquímico.....	48
4.1.1. Avaliação da Alanina Aminotransferase .....	48
4.1.2 Avaliação da Aspartato Aminotransferase .....	53
4.1.3 Avaliação da Fosfatase Alcalina .....	58
4.1.4 Avaliação da Gama Glutamiltransferase .....	63
4.2 Estudo Histomorfológico.....	69
4.2.1. Avaliação Histomorfológica pelo método H.E. ....	69
4.2.1.1. Grupo Controle .....	69
4.2.1.2. Grupo Veneno 3 horas.....	71
4.2.1.3. Grupo Veneno 6 horas.....	73
4.2.1.4. Grupo Veneno 9 horas.....	75
4.2.1.5. Grupo Veneno 12 horas .....	77
4.2.1.6. Grupo Soro 3 horas .....	79
4.2.1.7. Grupo Soro 6 horas .....	81
4.2.1.8. Grupo Soro 9 horas .....	83
4.2.1.9. Grupo soro 12 horas .....	85
4.2.1.10. Grupo Veneno + Soro 3 horas .....	87
4.2.1.11. Grupo Veneno + Soro 6 horas .....	89
4.2.1.12. Grupo Veneno + Soro 9 horas.....	91
4.2.1.13. Grupo Veneno + Soro 12 horas .....	93
4.2.2. Avaliação Histológica Qualitativa .....	95
5. DISCUSSÃO.....	98
6. CONCLUSÃO.....	105
REFERÊNCIAS .....	106

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 01** - Atividade enzimática da **ALT** (U/L) em soro de ratos 48 horas seguidas da administração da soroterapia anticrotálica após 3, 6, 9 e 12 horas da inoculação de 200µg/Kg de veneno de *C.d.t.* .

**Tabela 02** - Atividade enzimática da **AST** (U/L) em soro de ratos 48 horas seguidas da administração da soroterapia anticrotálica após 3, 6, 9 e 12 horas da inoculação de 200µg/Kg de veneno de *C.d.t.* .

**Tabela 03** - Atividade enzimática da **FA** (U/L) em soro de ratos 48 horas seguidas da administração da soroterapia anticrotálica após 3, 6, 9 e 12 horas da inoculação de 200µg/Kg de veneno de *C.d.t.* .

**Tabela 04** - Atividade enzimática da **GGT** (U/L) em soro de ratos 48 horas seguidas da administração da soroterapia anticrotálica após 3, 6, 9 e 12 horas da inoculação de 200µg/Kg de veneno de *C.d.t.* .

**Tabela 05** - Classificação qualitativa dos aspectos histológicos : células de Kupffer, infiltrado inflamatório e congestão de vasos, encontrados no fígado de ratos Wistar dos grupos estudados.

**Tabela 06** - Classificação qualitativa dos aspectos histológicos : congestão de sinusóides, necrose e degeneração, encontradas no fígado de ratos Wistar dos grupos estudados.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 01** – Gráfico da atividade enzimática sérica da ALT em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 3 horas.

**Figura 02** – Gráfico da atividade enzimática sérica da ALT em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 6 horas.

**Figura 03** – Gráfico da atividade enzimática sérica da ALT em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 9 horas.

**Figura 04** – Gráfico da atividade enzimática sérica da ALT em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 12 horas.

**Figura 05** – Gráfico da atividade enzimática sérica da AST em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 3 horas.

**Figura 06** – Gráfico da atividade enzimática sérica da AST em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 6 horas.

**Figura 07** – Gráfico da atividade enzimática sérica da AST em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 9 horas.

**Figura 08** – Gráfico da atividade enzimática sérica da AST em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 12 horas.

**Figura 09** – Gráfico da atividade enzimática sérica da FA em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 3 horas.

**Figura 10** – Gráfico da atividade enzimática sérica da FA em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 6 horas.

**Figura 11** – Gráfico da atividade enzimática sérica da FA em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 9 horas.

**Figura 12** – Gráfico da atividade enzimática sérica da FA em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 12 horas.

**Figura 13** – Gráfico da atividade enzimática sérica da GGT em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 3 horas.

**Figura 14** – Gráfico da atividade enzimática sérica da GGT em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 6 horas.

**Figura 15** – Gráfico da atividade enzimática sérica da GGT em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 9 horas.

**Figura 16** – Gráfico da atividade enzimática sérica da GGT em ratos após inoculação de veneno de *C.d.t.* e administração de soro anticrotálico, com intervalo de 12 horas.

**Figura 17** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo controle (HE, 100x)

**Figura 18** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo controle (HE, 400x)

**Figura 19** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo controle (HE, 1000x)

**Figura 20** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno 3 horas (HE, 100x)

**Figura 21** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno 3 horas (HE, 400x)

**Figura 22** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno 3 horas (HE, 1000x)

**Figura 23** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno 6 horas (HE, 100x)

**Figura 24** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno 6 horas (HE, 400x)

**Figura 25** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno 6 horas (HE, 1000x)

**Figura 26** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno 9 horas (HE, 100x)

**Figura 27** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno 9 horas (HE, 400x)

**Figura 28** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno 9 horas (HE, 1000x)

**Figura 29** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno 12 horas (HE, 100x)

**Figura 30** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno 12 horas (HE, 400x)

**Figura 31** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno 12 horas (HE, 1000x)

**Figura 32** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo soro 3 horas (HE, 100x)

**Figura 33** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo soro 3 horas (HE, 400x)

**Figura 34** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo soro 3 horas (HE, 1000x)

**Figura 35** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo soro 6 horas (HE, 100x)

**Figura 36** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo soro 6 horas (HE, 400x)

**Figura 37** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo soro 6 horas (HE, 1000x)

**Figura 38** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo soro 9 horas (HE, 100x)

**Figura 39** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo soro 9 horas (HE, 400x)

**Figura 40** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo soro 9 horas (HE, 1000x)

**Figura 41** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo soro 12 horas (HE, 100x)

**Figura 42** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo soro 12 horas (HE, 400x)

**Figura 43** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo soro 12 horas (HE, 1000x)

**Figura 44** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno + soro 3 horas (HE, 100x)

**Figura 45** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno + soro 3 horas (HE, 400x)

**Figura 46** – Fotomicrografia de tecido hepático de rato Wistar, grupo veneno + soro 3 horas (HE, 1000x)

**Figura 47** – Fotomicrografía de tejido hepático de rato Wistar, grupo veneno + soro 6 horas (HE, 100x)

**Figura 48** – Fotomicrografía de tejido hepático de rato Wistar, grupo veneno + soro 6 horas (HE, 400x)

**Figura 49** – Fotomicrografía de tejido hepático de rato Wistar, grupo veneno + soro 6 horas (HE, 1000x)

**Figura 50** – Fotomicrografía de tejido hepático de rato Wistar, grupo veneno + soro 9 horas (HE, 100x)

**Figura 51** – Fotomicrografía de tejido hepático de rato Wistar, grupo veneno + soro 9 horas (HE, 400x)

**Figura 52** – Fotomicrografía de tejido hepático de rato Wistar, grupo veneno + soro 9 horas (HE, 1000x)

**Figura 53** – Fotomicrografía de tejido hepático de rato Wistar, grupo veneno + soro 12 horas (HE, 100x)

**Figura 54** – Fotomicrografía de tejido hepático de rato Wistar, grupo veneno + soro 12 horas (HE, 400x)

**Figura 55** – Fotomicrografía de tejido hepático de rato Wistar, grupo veneno + soro 12 horas (HE, 1000x)



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µm - micrômetro

µg - micrograma

µL - microlitro

ALT - alanina aminotransferase

AST - aspartato aminotransferase

*C.d.t.* - *Crotalus durissus terrificus*

CK -células de Kupffer

V – grupo veneno

S – grupo soro

V + S – grupo veneno mais soro

e.p.m. – erro padrão da média

E. P. – erro padrão

FA - fosfatase alcalina

DHL – desidrogenase láctica

IRA – insuficiência renal aguda

mm<sup>3</sup> – milímetro cúbico

GGT - gama glutamiltransferase

HE - hematoxilina -eosina

i.m. - intramuscular

i.p. - intraperitoneal

KCl – cloreto de potássio

µL/mL - microlitros por mililitros

$\mu\text{g/Kg}$  - micrograma por kilograma

$\text{mg/dL}$  – miligrama por decilitro

$\mu\text{mol/L}$  - micromol por litro

$\text{mmol/L}$  – milimol por litro

$\text{mol/L}$  – mol por litro

$\text{NaOH}$  – hidróxido de sódio

OMS - Organização Mundial de Saúde

P.A. - puro para análise

pH - potencial hidrogênio-iônico

r.p.m. – rotações por minuto

$^{\circ}\text{GL}$  – Grau Gay Lussac

U/L - unidades por litro

## 1. INTRODUÇÃO

Tradicionalmente o acidente ofídico é tema de estudo pela sua importância médica em virtude da gravidade dos casos e da frequência que ocorrem. No Brasil, a incidência deste tipo de acidente está relacionada a fatores climáticos e a atividade humana em áreas rurais, onde existe maior concentração destes animais. (AMORIN, BOHN, BONTA,1951; BARRAVIEIRA,1990; 1993; MINISTERIO DA SAUDE,2001)

A maioria dos acidentes ocorre entre os meses de Novembro a Abril, época de maior atividade das serpentes; coincidindo com o aumento das atividades de trabalhadores em áreas rurais na estação chuvosa e quente. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; PEREIRA, ARAKAKI, 1988; RIBEIRO, JORGE, IVERSSON, 1995; CAIFFA, 1997; BUCARETCHI et al., 2002, BARRAVIEIRA, 1990)

O grupo mais acometido é representado por homens trabalhadores rurais. Os membros inferiores e superiores são as regiões anatômicas mais atingidas. Em um estudo de caso com 322 pacientes que sofreram acidente ofídico, 69,4% destes estavam descalços ou apenas de sandália. (BARRAVIEIRA, 1992; 1993; FEITOSA et al., 1997)

Apesar das serpentes não terem por hábito atacar, é alto o índice de acidentes ofídicos no país. De janeiro de 1990 a dezembro de 1993, foram registrados pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) uma média de 20.000 casos por ano, sendo sua grande maioria procedentes das regiões Sul e Sudeste do país. Os acidentes envolvendo as serpentes do gênero *Crotalus* corresponderam a 7,7% dos casos, mostrando-se inferior ao índice de notificações se comparado aos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops* que foram de 90,5%. Todavia, os acidente envolvendo as serpentes do gênero *Crotalus*, dentre todas as espécies de cobras venenosas do Brasil, o acidente

crotálico tem a pior evolução, apresentando o maior índice de letalidade, onde nos 5.072 casos registrados, 95 evoluíram ao óbito. (BARRAVIEIRA,1990; 1991; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001, CARVALHO, NOGUEIRA, 1998)

### 1.1 *Crotalus durissus terrificus*

As serpentes compreendem cerca de 2.412 espécies, das quais aproximadamente 300 são venenosas. No Brasil, as serpentes podem ser encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas e estão distribuídas em quase todas as regiões do país, exceto em florestas, no Pantanal e raramente nas faixas litorâneas. (BARRAVIEIRA,1994; 1999; CAMPBELL, LAMAR, 1986; FEITOSA et al., 1997)

Das 69 espécies venenosas atualmente identificadas, 27 pertencem ao gênero *Crotalus*, sendo cinco sub-espécies encontradas no país. Dentre elas, a cobra cascavel ou boiquira; nomes populares dados a *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*), comumente encontrada no sul meridional do país, no estado de São Paulo, na região do Vale do Paraíba, e sul do estado de Minas Gerais. Taxonomicamente estas serpentes pertencem à classe *Reptiale*, subclasse *Lepdosauria*, ordem *Squamata*, subordem *Serpentes* grupo *Vertebrata* e família *Crotalidae*. (BARRAVIEIRA, 1994; 1999; FRANCO et al., 2001; MAGRO et al., 2001)

A *Crotalus durissus terrificus* é uma serpente de hábitos terrestres, com um comprimento que varia de 30 a 160 centímetros, de coloração variável do verde oliva ao marrom, com cabeça triangular, um par de fossetas loreais, olhos pequenos com pupilas em fenda, escamas na cabeça e guizo na ponta da cauda, característico do gênero pelo ruído de alerta produzido. Alimenta-se quase exclusivamente de mamíferos, especialmente roedores. Inocula nas vítimas, através de suas presas, secreção com atividade tóxica. (CAMPBELL,

LAMAR, 1986; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; MAGRO et al., 2001; CARVALHO, NOGUEIRA, 1998, BARRAVIEIRA, 1994)

### 1.1.1 Veneno Crotálico

A toxicidade do veneno crotálico é representada por uma mistura de componentes biologicamente ativos. Apresenta uma variação farmacológica, antigênica e bioquimicamente intraespecífica, estando muito relacionada com a idade da serpente, sua origem geográfica e sexo do animal. (FRANCISCHETTI et al., 2000; TROIANO et al., 2001;.BOGARIN et al., 2000; SANTORO et al., 1999; MAGRO et al., 2001)

Os venenos ofídicos são compostos de substâncias complexas que servem para imobilizar a presa e facilitar sua digestão, já que a serpente venenosa utiliza sua peçonha tanto para o ataque como para defesa. A partir da pesquisa destes compostos e suas respectivas atividades farmacológicas e biológicas, grandes avanços foram impulsionados na área médica. Dentre eles, a elucidação da cascata de coagulação sanguínea, a descoberta da inibição da enzima conversora de angiotensina, a descoberta da bradicinina e de estudos mais recentes. Em relação às propriedades analgésicas e anti-tumorais do veneno da cascavel. (FRANISCHETTI et al., 2000; TROIANO et al., 2001; BRIGATTE et al., 2001; LIPPS, 1999; MADY, 2002; MANCIN et al., 1998, SILVA, FECCHIO, BARRAVIEIRA, 1997)

O veneno da cascavel varia do incolor ou leitoso, e a cada extração produz em média, 30 mg a 60 mg de veneno seco bruto. É composta por água, carboidratos, amina biogênica, lipídeos e fundamentalmente constituído por frações de baixo peso molecular e proteínas polipeptídicas, que compõem cerca de 90% do seu peso seco. (SANTORO et al., 1999; THOMAZINI-SANTOS et al., 1998; KLAASSEN, WATKINS III, 1999)

Dentre os diferentes componentes aproximadamente identificados no veneno, a crotapotina, fosfolipase A<sub>2</sub>, enzima tipo-trombina, convulxina,

giroxina e crotamina são considerados os responsáveis pela ação tóxica, estando relacionados com as alterações hematológicas, renais, no sistema nervoso e outros órgãos tais como fígado, além de induzirem uma complexa série de eventos inflamatórios. (SANTORO et al., 1999; THOMAZINI-SANTOS et al., 1998; MATSUI, FUJIMURA, TITANI, 2000; THOMAZINI-SANTOS, 1998; FRANCISCHETTI et al., 2000)

A maior, e principal neurotoxina isolada do veneno da *C.d.t.* é a crotoxina, um complexo de duas subunidades; uma proteína básica com atividade fosfolipásica (fosfolipase  $A_2$ ) e outra fração enzimática não-tóxica denominada crotapotina, que agindo por sinergismo, potencializando sua ação tóxica. (VALENTE et al., 1998; AGUIAR et al., 1997; FAURE, 2000; MOREIRA et al., 1997; TROYANO et al., 2001)

A fosfolipase  $A_2$  atua nas terminações nervosas inibindo a liberação de acetilcolina, principal fator responsável pelo bloqueio neuromuscular desenvolvido após o acidente ofídico. Ela é responsável por algumas das reações características de um acidente crotálico, como as ações neurotóxicas, e miotóxica. (VALENTE et al., 1998; FAURE, 2000; SOARES et al., 2001; SILVA, 1994; BARRAVIERA, 1993; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A enzima com atividade tipo-trombina é outra toxina encontrada no veneno da *Crotalus durissus terrificus*. Trata-se de uma protease sérica que acreditam ser responsável pela transformação da molécula de fibrinogênio diretamente em fibrina, produzindo afibrinogenemia, e aumento no tempo de coagulação das vítimas. (THOMAZINI-SANTOS et al., 1998)

Outra fração do veneno, a convulxina, é uma lectina do tipo C-type de alto peso molecular, e liga-se fortemente aos receptores de glicoproteína tipo VI (GPVI), provocando alterações da hemostasia na vítima através da indução de agregação plaquetária. Quando administrada em camundongos por via intravenosa, a convulxina é capaz de provocar apnéia, perda de equilíbrio e

convulsões em menos de 30 minutos. (BARRAVIEIRA, 1994; POLGAR et al., 1997; KANAJI et al., 2003, ZHENG et al., 2001; JANDROT-PERRUS et al., 1997)

A gioxina é uma fração encontrada no veneno da *C.d.t.* que também contribui para as alterações hematológicas e cardiovasculares, sendo uma das responsáveis pela característica de incoagulabilidade provocada pela *Crotalus durissus terrificus* na vítima. (MAGRO et al., 2001; SANTORO et al., 1999)

A crotamina é o polipeptídeo do veneno da *C.d.t.* que está relacionada com os espasmos na musculatura esquelética em animais vítimas de acidente crotálico. O mecanismo de ação pelo qual a toxina age, está vinculado às atividades dos canais de sódio voltagem-dependente do músculo esquelético, induzindo a despolarização do potencial de membrana das células musculares e provocando, pelo influxo de sódio nas células musculares, o espasmo. (BONI-MITAKE et al., 2001; CHANG, TSENG, 1978; MANCIN et al., 1998)

### 1.1.2. Patogenia do Acidente Crotálico

As manifestações clínicas gerais nas vítimas de um acidente crotálico são mal-estar, prostração, sudorese, náusea, emese, salivação intensa, fácies miastênica com ptose palpebral bilateral, diplopia. O veneno também apresenta efeitos importantes sobre os músculos esqueléticos, sistema nervoso, rins, sangue e fígado. Em geral, não há relação entre os sintomas locais e a gravidade do envenenamento sistêmico. (FAURE, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; RIBEIRO, JORGE, IVERSSON, 1995; FONSECA et al., 2002, AMORIM, BOHM, BONTA, 1951; BARRAVIEIRA, 1993; EICHBAUM, 1974)

As alterações hematológicas verificadas no acidente crotálico estão relacionadas principalmente aos eritrócitos, leucócitos, plaquetas e ao fator de coagulação. O número de leucócitos em pacientes após o acidente crotálico está normalmente elevado acima de  $15.000/\text{mm}^3$ , e as plaquetas apresentam

alteração de agregação. Alterações como leucopenia e leucocitose foram observados 30 minutos após a inoculação do veneno em ratos Wistar por Costa et al. (1989). Estas alterações podem ser provocadas pela atividade das frações tipo-trombina e gioxina, que promovem uma afibrinogenemia, culminando com o aumento do tempo de coagulação. (JORGE, RIBEIRO, 1988; BARRAVIEIRA, 1993; GREGORY et a, 2000; MATSUI, FUGIMURA, TITANI, 2000; SANO-MARTINS et al., 2001)

A incoagulabilidade sanguínea é outra conseqüência desta alteração hematológica, e se manifesta em aproximadamente 40% dos pacientes atendidos em ambulatórios médicos após 8 horas do acidente. Neste sentido, Barravieira (1993) observou alterações hematológicas proporcional ao tempo do início do tratamento anticrotálico, relatando que, quanto maior o intervalo entre o acidente crotálico e o atendimento médico, pior o prognóstico da vítima. (JORGE, RIBEIRO, 1988; BARRAVIEIRA, 1993; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; GREGORY et a, 2000)

Outro distúrbio sistêmico relacionado ao veneno é a atividade miotóxica, que se caracteriza pela liberação de mioglobina na corrente sanguínea e lesão na musculatura estriada. A mudança da cor da urina dos pacientes, manifestação clínica mais evidente de rabdomiólise, é decorrente da mioglobinúria, podendo ser acompanhada de mialgia intensa e generalizada, edema muscular discreto até a necrose da musculatura estriada. (BARRAVIEIRA, 1993; 1994; SOARES et al., 2001; AZEVEDO-MARQUES, HERING, CUPO, 1987; CUPO, AZEVEDO-MARQUES, HERING, 1988; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; VALENTE et al., 1998 ; SOARES et al., 2001)

Da mesma forma, alterações histológicas no músculo esquelético de animais são observadas 24 a 48 horas após administração de veneno crotálico, destacando-se pelo edema mitocondrial, com elevada concentração de cálcio e grande alteração na membrana plasmática. O pico da atividade miotóxica ocorre 3 horas após a administração do veneno. Aumento dos níveis séricos de



creatino quinase, parâmetro de análise de rabdomiólise, é relatado entre 3 e 9 horas após a administração de veneno crotálico. (SANTORO et al., 1999; BARRAVIEIRA, 1994; SOARES et al., 2001; AZEVEDO-MARQUES, HERING, CUPO, 1987; VALENTE et al., 1998 ; SOARES et al., 2001)

A atividade neurotóxicas do veneno da *C.d.t.* produz efeitos tanto no sistema nervoso central quanto periférico e ocorrem poucas horas após o acidente. Fácies neurotóxicas de Rosenfeld ou fácies miastênica. Estas características nas vítimas de acidente crotálico decorrem principalmente das alterações provocadas pela fração crotoxina do veneno, ocasionando ptose palpebral bilateral, diplopia, plegia de músculos da pálpebra e midríase bilateral. (JORGE, RIBEIRO, 1992; BARRAVIEIRA, 1993; 1994; VALENTE et al., 1998; FRANCO et al., 2001; SAMPAIO, 2003)

Outro achado clínico nas vítimas, refere-se a inibição de neurotransmissores pela fosfolipase  $A_2$  presente no veneno, que interagem com os receptores específicos do nervo terminal da vítima, provocando este tipo de bloqueio neuromuscular e conseqüentemente, paralisias motoras e até mesmo respiratórias. As frações convulxina e giroxina também contribuem para produzir convulsões em experimentação animal, todavia, o mesmo não foi descrito para humanos. (JORGE, RIBEIRO, 1992; BARRAVIEIRA, 1993; 1994; VALENTE et al., 1998; FRANCO et al., 2001; SAMPAIO, 2003)

Dentre as alterações clínicas no acidente crotálico, a patogenia da falência renal aguda é considerada, atualmente, a que apresenta um mau prognóstico, sendo responsável pela maioria dos óbitos que acomete as vítimas. As alterações renais iniciam nas primeiras 48 horas nos pacientes que não recebem terapia antiofídica, podendo evoluir à insuficiência renal aguda (IRA) e morte. (MONTEIRO et al., 2001; AZEVEDO-MARQUES, HERING, CUPO, 1987; REZENDE et al., 1989; AMORIN, MELLO, 1952, 1954)

A falência renal provocada pelo veneno da *C.d.t.* provavelmente é desencadeada pela ação direta das toxinas ou pelos danos sistêmicos

associados. A ação direta do veneno nas células tubulares e glomerulares, a redução da permeabilidade vascular e a rabdomiolise estão associadas às alterações morfológicas diretas neste tipo de acidente, ou indiretamente pela liberação dos mediadores do endotélio, que desencadeiam as alterações renais. (MONTEIRO et al., 2001; AZEVEDO-MARQUES, HERING, CUPO, 1987; REZENDE et al., 1989; AMORIN, MELLO, 1952, 1954)

Enquanto a causa mais comum de morte no acidente crotálico continua sendo a IRA, os pacientes que sobrevivem ao trauma inicial podem evoluir com outras complicações inerentes às alterações induzidas pelo veneno crotálico em diversos órgãos. Este quadro de alterações renais, hepáticas e circulatórias, que com frequência está presente no acidente crotálico, correlaciona clinicamente com os achados histológicos e bioquímicos de alguns estudos de acidentes ofídicos. (BARRAVIEIRA, 1993; 1994; AMORIN, MELLO, SALIBA, 1969; PEREIRA, ARAKAKI, 1988, TEIXEIRA, 2003)

Dentre as manifestações hepáticas, destacam-se as aminotransferases com valores muito elevado 24 a 48 horas após o acidente. (BARRAVIEIRA, 1994; JORGE, RIBEIRO, 1988, AMORIM, 1954) Barravieira (1995) em estudo clínico com 15 pacientes hospitalizados após acidente com *C.d.t.*, também verificou aumento da AST em 86% e da ALT em 66% destes pacientes, admitindo decisivamente, implicações hepáticas agudas no acidente crotálico. (JORGE, RIBEIRO, 1988)

#### 1.4 Fígado

O fígado tem um papel central no metabolismo, tanto pelas conexões anatômicas com órgãos vizinhos, quanto por suas inúmeras funções de metabolização endócrina e exócrina. O fígado, é um dos órgãos com maior vascularização do corpo e sua irrigação sanguínea deriva de duas grandes ramificações arterial e venosa. A veia porta é responsável pela drenagem dos

nutrientes provenientes do intestino e a ramificação arterial provém da artéria hepática. (MATTOS, DANTAS, 2001; KALIL, COELHO, STRAUSS, 2001; ROSS, REITH, ROMRELL, 1993)

As funções metabólicas hepáticas incluem a regulação do metabolismo lipídico, síntese e degradação de carboidratos e proteínas. Da mesma forma, a manutenção dos níveis sanguíneos de aminoácidos e glicose está diretamente relacionada com a normalidade funcional do fígado, assim como a manutenção dos níveis de outros metabólitos, incluindo albumina, colesterol, proteínas da coagulação e enzimas séricas. No fígado, também ocorrem importantes fenômenos relacionados à defesa do organismo, através da atividade das células de Kupffer, que são os macrófagos residentes do órgão, e constituem aproximadamente 80% dos macrófagos do corpo. (KLAASSEN, WATKINS III, 1999; COELHO, 1990; BAYNES, DOMINICZAK, 2000)

#### 1.4.1 Avaliação do dano hepático

As alterações exercidas pelo veneno da *C.d.t.* atingem farmacologicamente varias propriedades biológicas essenciais a homeostasia e possivelmente são provocadas por vários agentes simultaneamente. De uma maneira geral é difícil identificar o alvo primário da lesão provocada por xenobióticos nas células hepáticas devido à interdependência dos hepatócitos. A injúria hepática, desta maneira, pode ter características muito distintas, com diferentes mecanismos bioquímico e histológico definidos. (MONTEIRO et al., 2001; KLAASSEN, WATKINS III, 1999; KUMAR, COTRAN, ROBBINS, 1994) KEDDERIS, 1996.

##### 1.4.1.1. Avaliação bioquímica do fígado

Diversas enzimas sintetizadas e armazenadas nos hepatócitos são liberadas para a circulação em condições patológicas. Os resultados das

análises bioquímicas destas enzimas são indiscutivelmente utilizados nos dias atuais para avaliar a condição do fígado, refletindo, naquele determinado momento, a integridade deste órgão. (MATTOS, DANTAS, 2001; MOTTA, 2003, COELHO, 1990; BAYNES, DOMINICZAK, 2000)

A avaliação e quantificações das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) têm demonstrado ser as melhores e mais amplamente provas bioquímicas usadas na detecção do dano hepático. (SCHAFFNER, 1969). As desordens hepatocelulares agudas apresentam um aumento significativo na atividade destas enzimas, principalmente naqueles causados por drogas ou na hepatite tóxica aguda. (MATTOS, DANTAS, 2001; MOTTA, 2003, COELHO, 1990, GAYOTTO, ALVES, 2001)

A maior concentração de aspartato aminotransferase encontra-se no fígado, estando também presente, porém em menor quantidade, no músculo cardíaco e rim. A AST está localizada em sua grande maioria nas mitocôndrias, todavia, as enzimas circulantes no soro provêm do citosol dos hepatócitos, e somente quando há necrose celular maciça, há liberação para o soro da AST mitocondrial. (MATTOS, DANTAS, 2001; MOTTA, 2003; KEW, 2000)

A fosfatase alcalina está amplamente distribuída nos tecidos humanos, principalmente no fígado, na mucosa intestinal e ossos. No fígado, esta enzima é sintetizada nos hepatócitos adjacentes aos canalículos biliares. A desordem hepatocelular, bem como a colestase induzida por xenobióticos, provocam aumento dos valores enzimáticos de fosfatase alcalina, e tem grande significado diagnóstico quando comparados a outros testes de avaliação de lesão hepática. Na obstrução do trato biliar, a atividade da fosfatase alcalina também eleva seus valores entre 3 a 10 vezes os níveis em relação aos valores de referência. Como seu aumento no soro, depende de que nova enzima seja sintetizada, é comum que este aumento ocorra somente 24 a 48 horas após a instalação de um quadro de lesão hepática aguda (MATTOS, DANTAS, 2001; GAYOTTO, ALVES, 2001; MOTTA, 2003)

A enzima gama glutamiltransferase é outra enzima utilizada em avaliação do dano hepático. É encontrada nos rins, pâncreas e predominantemente no fígado e está localizada na membrana dos hepatócitos e no retículo endoplasmático liso. É também suscetível ao aumento da sua atividade por compostos tóxicos, estando sua elevação relacionada a alterações hepatobiliares e nas colestases intra e extra-hepáticas. (MOTTA, 2003.)

#### 1.4.1.2. Avaliação histológica do fígado

Os principais componentes celulares do parênquima hepático são os hepatócitos; células que se dispõem organizadas em lâminas separadas por sinusóides, em forma de cordões celulares. (MATTOS, DANTAS, 2001; KALIL, COELHO, STRAUSS, 2001; ROSS, REITH, ROWRELL, 1993)

O fígado é formado além dos hepatócitos, por células não parenquimatosas, diferenciadas em células de Kupffer, células de Ito, lipócitos, miofibroblastos e células endoteliais. (MATTOS, DANTAS, 2001; KALIL, COELHO, STRAUSS, 2001). Todas elas são capazes de sintetizar eicosanóides, embora as células de Kupffer sejam quantitativamente as mais significativas, principalmente em relação à ativação tanto de fagócitos como de resposta inflamatória. As toxinas, os lipopolissacarídeos e as imunoglobulinas podem, desta forma, estimular as células hepáticas a sintetizarem prostaglandinas e leucotrienos como forma de proteger o organismo contra antígenos, iniciando uma resposta inflamatória aguda e danosa ao fígado. (TOLMAN, 2000; MANTOVANI et al., 2002; ROSS, REITH, ROWRELL, 1993; HAM, 1977)

As células do endotélio vascular representam outro importante componente responsável pela resposta inflamatória, e são coordenadas por um sistema de citocinas, ainda pouco conhecido, gerador de vários radicais livres e

mediadores celulares como o fator de necrose tumoral, interferon e interleucinas, que atuam nos hepatócitos iniciando o dano hepático pela coagulação intracelular e de sinusóides. (TOLMAN, 2000; MANTOVANI et al., 2002)

As membranas dos hepatócitos são formadas basicamente por bicamadas fosfolipídicas, cuja integridade e função podem ser modificadas pela ação de fosfolipases, que normalmente atuam na remoção de fosfolipídios da membrana de células lesadas. Desta forma, quando a fosfolipase residente, tem sua concentração elevada por mudanças não fisiológicas, provoca a alteração da sua permeabilidade para íons e água, contribuindo para a perda da homeostase celular, além de afetar várias organelas, como mitocôndrias, lisossomos e retículo endoplasmático, ou mesmo provocando a morte celular. (OGA, 1996; GAYOTTO, ALVES, 2001, HAM, 1977)

### 1.5. Soroterapia Heteróloga

A produção de soro antiofídico e os estudos epidemiológicos dos acidentes com répteis peçonhentos no Brasil tiveram início em São Paulo com o médico Vital Brazil. Desde então, várias técnicas de diagnóstico e tratamento das lesões provocadas pelo veneno destes animais estão sendo pesquisadas. A terapia sérica com anti-soro continua sendo o tratamento de escolha para envenenamento sistêmico por serpentes da família *Crotalidae*. (CLISSA, NASCIMENTO, ROGERO, 1999; RANGEL-SANTOS, MOTA, 2000; MINISTERIO DA SAUDE, 2001; BATINA, GICGLIO, SAMPAIO, 1997)

O soro utilizado na soroterapia anticrotálica contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados, geralmente eqüídeos, com veneno de *Crotalus durissus*. Este plasma, ao ser retirado do animal imunizado contém anticorpos específicos contra o antígeno

imunizante do veneno crotálico, bem como outras proteínas séricas. (CHIPPAUX, GOYFFON, 1998; BOGARIN et al., 2000)

A reatividade deste soro anticrotálico é bem conhecida, podendo ocorrer imediatamente após a administração intravenosa, ou desenvolver reações muitos dias após o término da terapia. As reações adversas relacionadas à administração dos soros, geralmente apresentam caráter agudo, instalando-se nas primeiras 24 horas após sua administração. (BARRAVIEIRA, 1992; 1994; 1999) Nas reações tardias, que ocorre de 5 a 24 dias após o contato da vítima com a solução antiofídica, podem ocorrer reações como exantema pruriginoso, angioedema, inflamação no local da administração, cefaléia, emese, linfadenopatia, artralgia e mialgia. Todavia, os acometimentos cardíacos e renais, não são freqüentes e as alterações hepáticas são na maioria das vezes transitórias, com elevação principalmente das transaminases. (BARRAVIEIRA, 1994, BARRAVIEIRA et al., 1995)

O diagnóstico do acidente ofídico depende, na maioria dos hospitais brasileiros, do reconhecimento do animal causador do acidente e as sintomatologias apresentadas pelos pacientes são os indicadores da conduta no tratamento hospitalar. Por outro lado, existem atualmente outros tipos de diagnósticos, realizados através da detecção do veneno circulante em amostras de soro ou do exsudado local, utilizando o método imuno-enzimático ELISA. Este método permite identificar, com maior precisão, o gênero da serpente, a concentração circulante de veneno e a quantidade de antiveneno a ser administrado, permitindo, desta forma, que a terapia de neutralização seja menos agressiva no que diz respeito ao volume de anti-soro administrado para neutralizar o veneno. Todavia, a técnica ainda está sendo avaliada, e apenas alguns hospitais de referência no país a estão utilizando. (BARRAVIEIRA, 1992; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; CHIPPAUX, GOYFFON, 1998)

Um dos desafios encontrados pelos clínicos na administração da soroterapia é determinar a quantidade exata de antiveneno requerido para

neutralizar os efeitos tóxicos do veneno, o que ocasionalmente leva à administração na vítima, de um volume de soro antiofídico muito superior ao volume necessário. Atualmente, recomenda-se que a quantidade de antiveneno a ser administrado na vítima de acidente crotálico, dependa da análise de fatores como gravidade, progressão dos sintomas e sinais de toxicidade, entretanto, a grande maioria ainda utiliza os parâmetros de neutralização fornecidos pelo fabricante do soro. (FERNANDES et al., 1997; THEAKSTON, KAMIGUTI, 1998)

Doses relativamente elevadas de soro anticrotálico foram detectadas por Theakston *et al.* (1998), até quarenta dias após a administração, demonstrando, o excesso de anti-soro comumente empregado na terapia de envenenamento por cascavel. Além disso, o excesso de componentes homólogo ao organismo humano, pode instaurar reações imunológicas de defesa contra alguns componentes do soro de eqüinos, que são estranhos ao organismo de outra espécie. Uma quantidade grande de proteínas que podem causar várias reações adversas, incluindo choque anafilático, ou mesmo podendo ser ineficiente em algumas lesões provocadas pelo veneno ofídico. (FERNANDES et al., 1997; THEAKSTON, KAMIGUTI, 1998; SANTORO et al., 1999)

Embora os testes que avaliam a letalidade do veneno crotálico e sua neutralização pelo soro anticrotálico já tenham sido bem estudas em animais e comprovados clinicamente, testes mais específicos para verificar as atividades lesivas em órgãos alvos ainda não foram totalmente demonstradas. O conhecimento das atividades biológicas do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, assim como a intensidade, o local de ação e a forma de neutralização de cada uma delas, pode auxiliar na utilização de terapias mais adequadas no tratamento de pacientes vitimas de acidentes crotálicos. (CHIPPAUX, GOYFFON, 1998)



## 2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo é verificar a hepatotoxicidade produzida por sub-dose do veneno de *Crotalus durissus terrificus* da região do Vale do Paraíba em fígado de ratos Wistars tratados com soro anticrotálico em diferentes tempos

- Estudar a evolução funcional do fígado frente à administração de veneno crotálico e soro anticrotálico, através de técnicas histológicas e análises bioquímicas;
- Verificar a ação de sub-dose de soro anticrotálico em fígados de ratos, através das determinações histológicas e bioquímicas de enzimas hepáticas;
- Verificar a possível neutralização do dano hepático causado pelo veneno da *C.d.t.* em diferentes intervalos de administração de soro anticrotálico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa experimental foi aprovada pela Comissão de Ética da Universidade do Vale do Paraíba (Anexo) e realizada de acordo com os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal -COBEA e com a lei federal 6.638 de 08 de maio de 1979. (COBEA, 1991; BARBOSA et al., 2003)

#### 3.1 Veneno

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* da região do Vale do Paraíba foi fornecido pelo Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) – São José dos Campos - SP, sob a responsabilidade do Dr. José Carlos Cogo.

Após a extração, o veneno foi dessecado e pulverizado. O veneno liofilizado foi acondicionado em frasco hermeticamente fechado a 4 °C. A via utilizada para inoculação do veneno foi intramuscular (i.m.). A dose utilizada foi de 200µg/Kg de veneno bruto, aproximadamente 1/6 da DL<sub>50</sub>. (FRANÇA, 2004)

Minutos antes da administração, o veneno foi solubilizado em solução fisiológica estéril 0,9%, na concentração de 0,04µL/mL, administrando-se um volume total de 100µL desta solução por animal.(BARRAVIEIRA, 1993)

### 3.2 Solução salina

A solução fisiológica estéril 0,9% (ASTER®) foi administrada pelas vias i.m. e intraperitoneal (i.p.), em um volume de 100 $\mu$ L por animal, conforme esquema posológico. (SHIBUTANI, 2000)

### 3.3 Soro anticrotálico

Foi utilizada a dose de 13 $\mu$ g/Kg de antiveneno obtidas do plasma de eqüídeos hiperimunizados com veneno de serpente do gênero *Crotalus*, produzido pela divisão de Produção de Imunobiológicos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) – Belo Horizonte – MG. Este soro foi purificado por digestão péptica e fracionamento salino, contendo fenol 0,25% como preservativo e conservado sob refrigeração até o momento da administração. (CHIPPAUX, GOYFFON, 1998; BARRAVIEIRA, 1993)

Para a diluição, foi utilizada solução fisiológica estéril 0,9%, na concentração de 0,0267 $\mu$ L/mL. A administração desta solução foi intraperitoneal em um volume total de 100 $\mu$ L por animal. A potência do soro determina que cada mililitro de soro anticrotálico neutralize no mínimo, 1,5 mg de veneno de *Crotalus durissus terrificus*. (BARRAVIEIRA, 1993)

### 3.4 Animais

Foram utilizados ratos machos do tipo Wistar, pesando aproximadamente entre 190 g e 220 g cada, com aproximadamente 3 semanas de vida, fornecidos pelo biotério da Fazenda Bem-te-vi, São Paulo-SP.

Os animais foram mantidos em ambiente limpo e seco, com luminosidade, temperatura e umidade relativa adequadas, com ração e água *ad libitum* e monitorados diariamente para troca de palha e água. Os animais foram acondicionados em grupos de 07 por caixas, em sala de contenção no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) – UNIVAP, São José dos Campos - SP, e passaram por um período de aclimação por aproximadamente sete dias, antes de iniciar os experimentos

Para este experimento, foram utilizados 91 ratos subdivididos em 13 lotes de 07 animais cada, nos seguintes grupos:

#### 3.4.1. Controle

01 – Grupo **controle**: administrou-se 100µL de solução fisiológica estéril 0,9% via i.m.. Após 3 horas os animais receberam 100µL de solução fisiológica estéril 0,9% via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

#### 3.4.2. Veneno

02 - Grupo **veneno 3 horas (V 3h)**: os animais foram inoculados com 0,04µL/mL do veneno via i.m.. Após 3 horas receberam 100µL de solução fisiológica estéril 0,9% via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

03 - Grupo **veneno 6 horas (V 6h)**: os animais foram inoculados com 0,04µL/mL do veneno via i.m. Após 6 horas receberão 100µL de solução fisiológica estéril 0,9% via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

04 - Grupo **veneno 9 horas (V 9h)**: os animais foram inoculados com 0,04µL/mL do veneno via i.m. Após 9 horas receberam 100µL de solução

fisiológica estéril 0,9% via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

05 - Grupo **veneno 12 horas (V 12h)**: os animais foram inoculados com 0,04 $\mu$ L/mL do veneno via i.m. Após 12 horas receberam 100 $\mu$ L de solução fisiológica estéril 0,9% via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

#### 3.4.3. Soro

06 - Grupo **soro 3 horas (S 3h)**: os animais receberam 100 $\mu$ L de solução fisiológica estéril 0,9% via i.m. e após 3 horas receberam 0,0267 $\mu$ L/mL de soro anticrotálico via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

07 - Grupo **soro 6 horas (S 6h)**: os animais receberam 100 $\mu$ L de solução fisiológica estéril 0,9% via i.m. e após 6 horas receberam 0,0267 $\mu$ L/mL de soro anticrotálico via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

08 - Grupo **soro 9 horas (S 9h)**: os animais receberam 100 $\mu$ L de solução fisiológica estéril 0,9% via i.m. e após 9 horas receberam 0,0267 $\mu$ L/mL de soro anticrotálico via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

09 - Grupo **soro 12 horas (S 12h)**: os animais receberam 100 $\mu$ L de solução fisiológica estéril 0,9% via i.m. e após 12 horas receberam 0,0267 $\mu$ L/mL de soro anticrotálico via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

#### 3.4.4. Veneno + Soro

10 - Grupo **veneno + soro 3 horas (V + S 3h)**: os animais foram inoculados com 0,04 $\mu$ L/mL do veneno vias i.m., após 3 horas receberam

0,0267 $\mu$ L/mL de soro anticrotálico via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

11 - Grupo **veneno + soro 6 horas (V + S 6h)**: os animais foram inoculados com 0,04 $\mu$ L/mL do veneno vias i.m., após 6 horas receberam 0,0267 $\mu$ L/mL de soro anticrotálico via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

12 - Grupo **veneno + soro 9 horas (V + S 9h)**: os animais foram inoculados com 0,04 $\mu$ L/mL do veneno vias i.m., após 9 horas receberam 0,0267 $\mu$ L/mL de soro anticrotálico via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

13 - Grupo **veneno + soro 12 horas (V + S 12h)**: os animais foram inoculados com 0,04 $\mu$ L/mL do veneno vias i.m., após 12 horas receberam 0,0267 $\mu$ L/mL de soro anticrotálico via i.p e foram sacrificados após 48 horas para coleta das amostras.

### 3.5 Anestesia

Considerando que o etoxietano (dietiléter) não provoca disfunção e toxicidade no tecido hepático, promovendo anestesia por ação depressora no SNC e tendo sido aplicado em diversos trabalhos nos quais estudou-se a função hepática, foi adotado como anestésico de escolha para a realização deste experimento (YAMANE, ABE, 1996; BARBOSA et al., 2003)

Utilizou-se um sistema fechado de câmara anestésica contendo etoxietano para indução anestésica por inalação. Todas as precauções recomendadas para manuseio de produto inflamável foram seguidas durante todo o experimento. (COBEA, 1991, BARBOSA et al., 2003, THEOCHARIS et al., 2001)

Os sinais de anestesia dos animais foram monitorados através de indicadores fisiológicos como perda do reflexo corneano (2 a 5 minutos), frequência respiratória, respostas reflexas, relaxamento da mandíbula e musculatura abdominal. Ainda sob efeito anestésico, os animais foram sacrificados, através da administração de cloreto de potássio (KCl) 20% intracardíaco. Os animais do grupo controle também sofreram o mesmo procedimento para não haver interferência nos resultados devido ao manuseio e técnicas com os animais. (COBEA, 1991; GUTIÉRREZ-SALINAS et al., 1999; THEOCHARIS et al., 2001, BARBOSA et al., 2003)

### 3.6 Procedimento cirúrgico

Após a indução anestésica, os animais foram imediatamente tricotomizados e colocados em posição supina sobre prancha para iniciar o procedimento cirúrgico. Com uma tesoura de ponta romba foi realizada uma incisão curta na linha longitudinal mediana com o prolongamento do final da parede abdominal à borda posterior do esterno, em seguida a parede ventral foi fixada na prancha para efetuar a coleta de sangue e tecido hepático. (THEOCHARIS et al., 2001, BARBOSA, 2003)

### 3.7 Coleta de sangue

Após laparotomia, as amostras de sangue foram imediatamente coletadas da veia cava inferior dos ratos com seringas de 5 mL e agulha calibre 25x7. O sangue coletado foi centrifugado a 4.000 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C em centrífuga refrigerada. Em seguida, foram separadas as amostras de soro do sangue de cada animal para as determinações das atividades enzimáticas da alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e gama glutamiltransferase. (THEOCHARIS et al., 2001)

### 3.8 Coleta do tecido hepático

O tecido hepático foi imediatamente removido após a coleta de sangue, limpo em solução fisiológica estéril 0,9% resfriada. Um fragmento do lóbulo direito do fígado foi prontamente depositado em solução de formol a 10% para a realização da análise histológica. (THEOCHARIS et al., 2001)

### 3.9 Soluções

- Solução fisiológica estéril 0,9% (Aster<sup>®</sup>).
- Solução de ácido acético 5% em água destilada (Synth<sup>®</sup>)
- Solução de ácido clorídrico 5% em água destilada (Synth<sup>®</sup>)
- Solução de álcool etílico: 50°GL, 60°GL, 70°GL, 95°GL (Synth<sup>®</sup>)
- Álcool etílico absoluto PA (Synth<sup>®</sup>)
- Dimetil benzeno- Xilol (Synth<sup>®</sup>)
- Solução de formol 10% em água destilada (Synth<sup>®</sup>)
- Solução de eosina 1%: 1 g de eosina amarelada PA para 30 mL de água destilada para 70 mL de álcool absoluto PA (Synth<sup>®</sup>).
- Hematoxilina: Hematoxilina (Doles<sup>®</sup>)
- Solução tampão fosfato 0,2 Molar
- Kits de análises bioquímicas (Labtest<sup>®</sup>)

### 3.10 Análises bioquímicas

As enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama-glutamilttransferase, foram analisadas pelo método descrito por



Bergmeyer (1986). A fosfatase alcalina foi analisada através de dosagem no soro do sangue do animal, pelo método colorimétrico Roy modificado.

As análises enzimáticas foram realizadas no soro sanguíneo dos ratos utilizando-se de Kits Labtest<sup>®</sup> e as leituras foram realizadas em um Espectrofotômetro Ultra-Violeta Shimadzu<sup>®</sup> 1650 PC, através da técnica de determinações colorimétricas, no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da UNIVAP, São José dos Campos – SP.

### 3.10.1 Aspartato aminotransferase (AST)

Princípio: A AST catalisa a transferência do grupo amina do aspartato para cetoglutarato, com a formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato formado reage com a 2-4 difenilhidrazina formando a hidrazona que adquire a coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração varia de acordo com a atividade enzimática e neste caso, uma vez que não obedece a Lei de Lambert-Beer, os cálculos são definidos através da curva padrão.

Metodologia: Reitman e Frankel.

Reagentes:

1 – AST Substrato: tampão fosfato 67 mmol/L pH 7,4; ácido alfacetoglutárico 2,0 mMol/L; ácido L aspartático 99 mmol/L e azida sódica 15,4 mmol/L.

2 – Reagente de cor: 2,4 dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e ácido clorídrico 1,0 mol/L.

3 – Solução de NaOH – estoque: hidróxido de sódio 10 mmol/L.

4 – Solução padrão: piruvato de sódio 22 mg/dL.

### 3.10.2 Alanina Aminotransferase (ALT)

Princípio: A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com a formação de glutamato e piruvato. O piruvato formado reage com a 2-4 difenilhidrazina formando a hidrazona que adquire a coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração varia de acordo com a atividade enzimática e, neste caso, uma vez que não obedece a Lei de Lambert-Beer, os cálculos são definidos através da curva padrão.

Metodologia: Reitman e Frankel.

Reagentes:

1 – ALT Substrato: tampão 50 mmol/L pH 7,4; ácido alfacetoglutárico 2,0 mmol/L; ácido alfacetoglutárico 2,0 mmol/L; L-alanina 100 mmol/L e azida sódica 15,4 mmol/L.

2 – Reagente de cor: 2,4 dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e ácido clorídrico 1,0 mol/L.

3 – Solução de NaOH – estoque: hidróxido de sódio 10 mmol/L.

4 – Solução padrão: piruvato de sódio 22 mg/dL.

### 3.10.3 Gama - Glutamiltransferase (GGT)

Princípio: A GGT catalisa a transferência do grupo glutamil da L-gama glutamil-p-nitroanilide para a glicilglicina, formando a gama glutamil glicilglicina e p-nitroanilina, de coloração amarela. A intensidade de coloração é proporcional a atividade enzimática.

Metodologia: Szasz modificado

Reagentes:

1 – Reagente 1: tampão tris 125 mmol/L, glicilglicina 187 mmol/L e azida sódica 12 mmol/L.

2 – Reagente 2: gama glutamil p-nitroanilide 14,5 mmol/L e azida sódica 3,0 mol/L.

3 – Padrão: p-nitroanilina 500  $\mu$ mol/L e azida sódica 15 mmol/L

#### 3.10.4 Fosfatase Alcalina (FA):

Princípio: A fosfatase alcalina do soro hidrolisa o substrato da timolftaleína monofosfato, liberando timolftaleína e fosfato inorgânico. Pela adição de álcali a ação enzimática é inibida e a timolftaleína adquire cor azul. A intensidade de coloração é proporcional a atividade enzimática.

Metodologia: Roy modificado; metodologia com especificidade para fosfatases de origem hepática, óssea e intestinal.

Reagentes:

1 – Substrato: timolftaleína monofosfato 23 mmol/L

2 – Reagente de Cor: carbonato de sódio 50 mmol/L e hidróxido de sódio 50 mmol/L.

3 – Tampão: solução tampão 300 mmol/L pH 10,1 e surfactante

4 – Padrão: padrão 45 U/L

#### 3.11 Análise histológica

As amostras de tecido hepático coletadas foram processadas no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da UNIVAP, São José dos Campos – SP, de acordo com a seguinte metodologia:

### Fixação

As amostras de tecido do fígado após o procedimento, foram imediatamente fixadas em solução de formol a 10% por 72 horas

### Retirada do Fixador

Para a retirada do agente fixador as amostras de tecido hepático foram lavadas em solução salina 0,4% por 15 minutos.

### Desidratação

A desidratação foi realizada com álcool, adicionando ao precipitado de células uma quantidade suficiente para cobri-lo segundo a seguinte ordem.

álcool 50%	2 horas
álcool 70%	2 horas
álcool 95%	2 horas
álcool absoluto PA	8 horas

### Diafanização

Em seguida as amostras de tecido hepático foram diafanizadas com dimetilbenzeno (xilol) por 4 horas.

### Inclusão

Para impregnação e inclusão, os fragmentos foram acondicionados por 48 horas em formas contendo parafina histológica fundida a 60°C em estufa histológica para polimerização da resina e formação do bloco. Após a impregnação de cada fragmento, estes foram colocados em um molde de metal para solidificar-se a temperatura ambiente

### Corte

A partir dos blocos contendo o tecido hepático, foram realizados cortes de 5 µm de espessura em micrótomo Leica® RM 2125 RT.

### Contrastação

Uma vez preparados, os cortes foram fixados em lâminas e corados pelo método Hematoxilina-Eosina Alcoólica (HE).

### Análise ao Microscópio

Após a coloração e preparo das laminas permanentes, os cortes foram analisados e fotografados em um microscópio óptico Leica® DML30 no laboratório de Cultura de Células da Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos - SP, sob a responsabilidade da Dra. Cristina Pacheco Soares.

A leitura das lâminas foi realizada de maneira aleatória, o resultado final da contagem dos parâmetros em cada corte, foi obtido pela média aritmética dos valores de semiquantificação entre 0 a 10, relativos à observação de 10 campos microscópicos, com aumento de 200 vezes de cada grupo. Foi utilizada a metodologia do Teste de Kruskal-Wallis, através de uma análise não paramétrica.

### 3.12 Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram armazenados em um banco de dados utilizando-se o programa Excel® – versão 2000 (Microsoft Co. USA), para computador pessoal. Nas comparações entre os grupos a significância estatística foi avaliada através da Análise de Variância (ANOVA). Na presença de diferenças entre os grupos, estas foram identificadas pelo método de Student-Newman-Kuels (teste T). A avaliação histológica qualitativa foi realizada através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foi adotado o nível de significância de 5% ( $p = 0,05$ ) (LAPPONI, 2000)

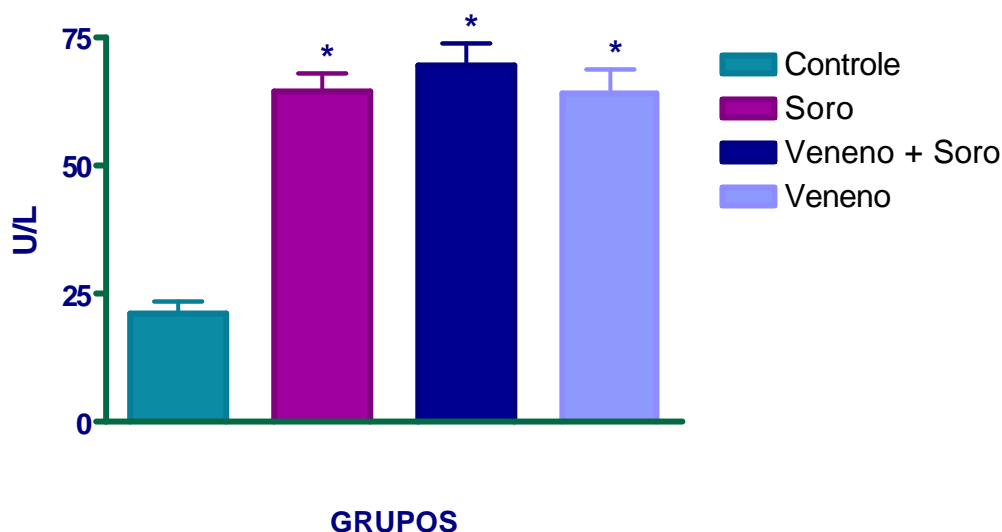
## 4. RESULTADOS

O estudo compreendeu a determinação das atividades enzimáticas através da realização de análises bioquímicas do soro de ratos Wistar e avaliação histológica por meio de microscopia óptica do tecido hepático dos mesmos. Os valores da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama glutamiltransferase e fosfatase alcalina encontram-se descritos nas figuras de 01 a 16, e nas tabelas de 01 a 04. Os resultados histológicos encontram-se nas figuras de 17 a 55 e na tabela 05.

### 4.1 Estudo Bioquímico

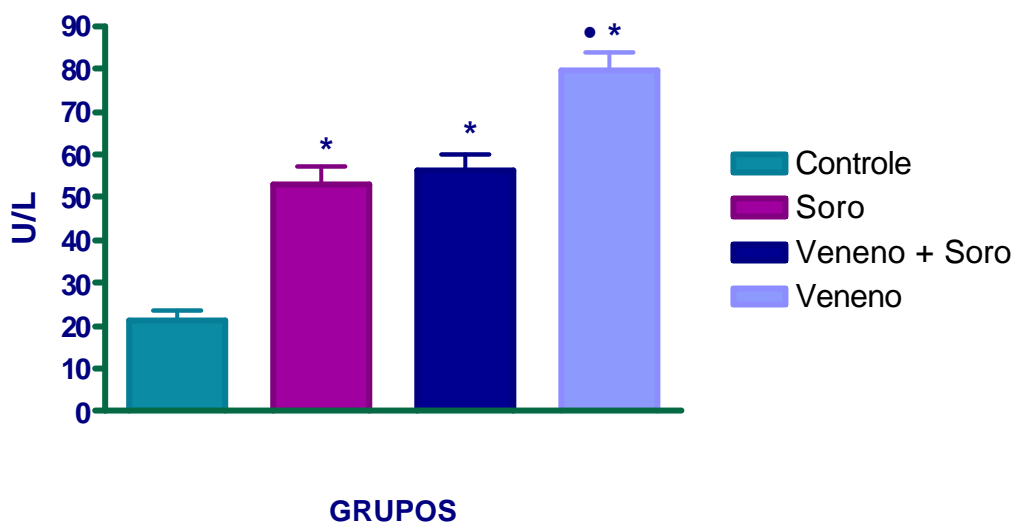
#### 4.1.1. Avaliação da Alanina Aminotransferase

As figuras 01, 02, 03 e 04 representam respectivamente, a atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) no soro de ratos em resposta a administração de soro anticrotálico 3, 6, 9 e 12 horas após a inoculação do veneno de *C.d.t.*. A média dos valores obtidos e o respectivo erro padrão deste intervalo de tempo está representada na tabela 01.



**Figura 01:** Atividade enzimática da **ALT** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13 $\mu$ g/Kg) após 3 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 3h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 3 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 3h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 3 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 3h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida no grupo: \* Controle (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

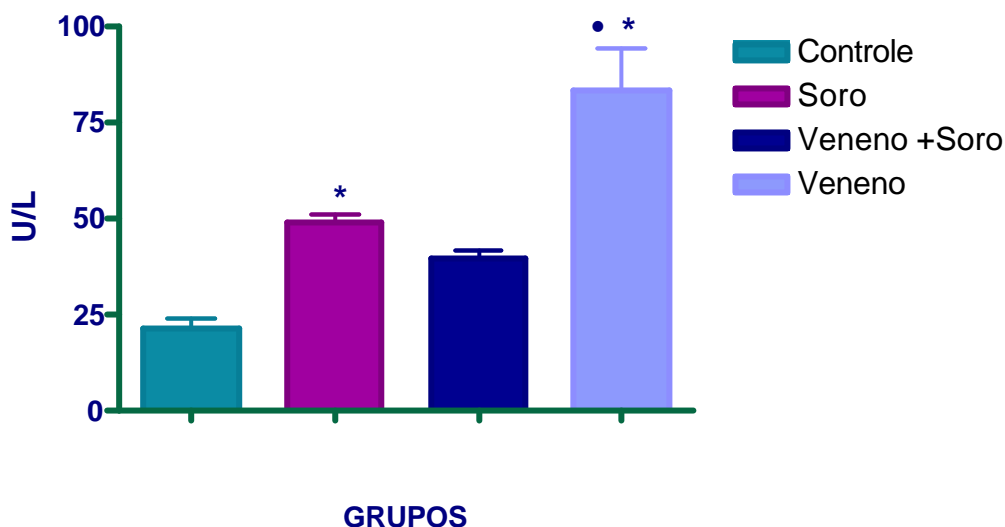
A **figura 01** ilustra a atividade enzimática da **ALT** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, do grupo submetidos à soroterapia, e ao grupo submetido à administração de soroterapia após **3 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. A observação da figura 01 permite considerar que houve aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle para todos os grupos estudados, até mesmo para o grupo que recebeu apenas a soroterapia, conforme representação da tabela 01. Pode-se dizer também, que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados entre si os grupos: veneno, veneno + soro e soro.



**Figura 02:** Atividade enzimática da **ALT** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13 $\mu$ g/Kg) após 6 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 6h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 6 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 6h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 6 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 6h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida nos grupos: \* Controle e ? veneno + soro (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

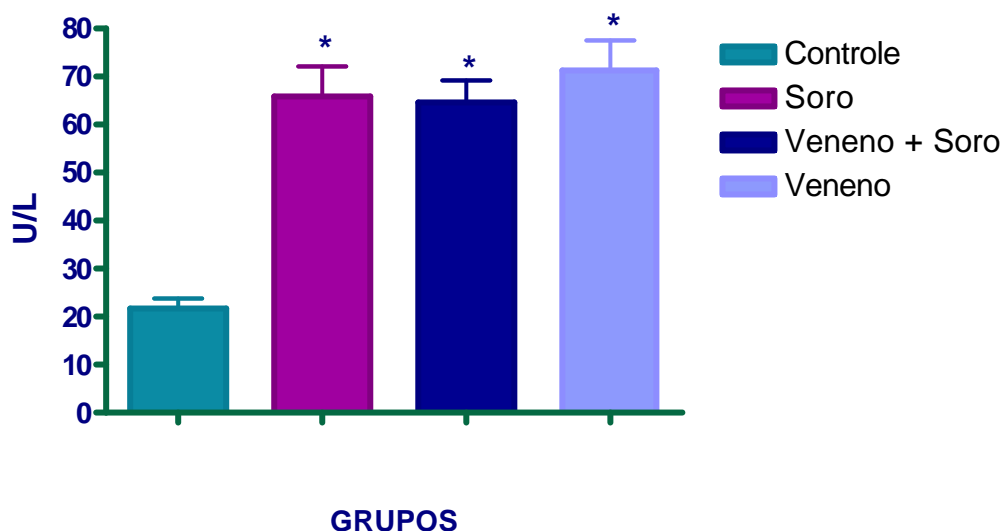
A **figura 02** representa a atividade enzimática da **ALT** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, do grupo submetido à soroterapia, e do grupo submetido à administração de soroterapia após **6 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. Ao analisar a atividade da ALT nos grupos veneno, veneno + soro e soro neste tempo, pode-se verificar aumento estatisticamente significativo da enzima alanina aminotransferase para todos os grupos quando comparados ao grupo controle. Quando comparado ao grupo veneno + soro, o grupo inoculado somente com veneno crotálico demonstrou aumento estatisticamente significativo.





**Figura 03:** Atividade enzimática da **ALT** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13 $\mu$ g/Kg) após 9 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 9h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 9 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 9h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 9 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 9h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7,  $p < 0,05$  quando comparados com a resposta obtida nos grupos: \* Controle e <sup>?</sup> veneno + soro (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

Na **figura 03** podemos observar a atividade enzimática da **ALT** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, do grupo submetido à soroterapia, e do grupo submetido à administração de soroterapia após **9 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. Comparando o grupo soro e o grupo veneno, podemos considerar que houve uma diferença estatisticamente significativa entre eles, houve também uma diferença significativa entre eles e o grupo controle. Comparando os valores evidenciados na tabela 01 para o grupo veneno + soro, podemos considerar que neste caso, não houve uma diferença significativa entre este e o grupo controle.



**Figura 04:** Atividade enzimática da **ALT** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13 $\mu$ g/Kg) após 12 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 12h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 12 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 12h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 12 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 12h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida no grupo: \* Controle (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

Na **figura 04** está ilustrada a atividade enzimática da **ALT** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, do grupo submetido à soroterapia, e do grupo submetido à administração de soroterapia após **12 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. A análise da figura 04 revela que houve uma diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle. A figura 04 permite considerar que comparando os valores enzimáticos do grupo veneno e do grupo veneno + soro, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

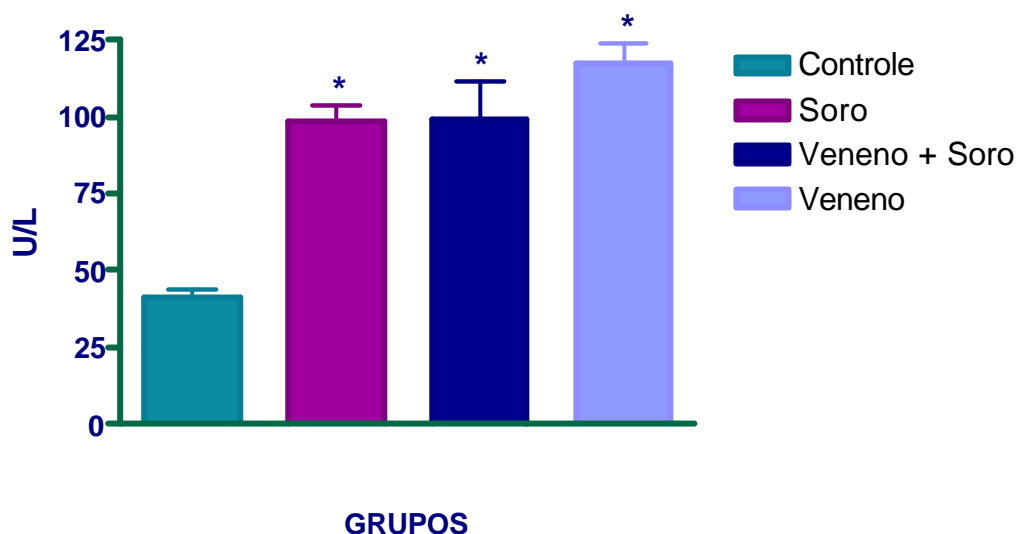
ALT	CONTROLE	SORO	VENENO + SORO	VENENO
3 h	21,367 ± 2,196	64,480 ± 3,824	69,631 ± 4,160	64,306 ± 4,597
6 h		53,171 ± 3,956	56,544 ± 3,727	79,631 ± 4,203
9 h		48,793 ± 1,913	39,507 ± 2,082	83,198 ± 10,944
12 h		65,997 ± 6,144	64,382 ± 4,796	71,201 ± 6,385

**Tabela 01:** Atividade enzimática da **ALT** (U/L) em soro de ratos 48 horas seguidas da administração da soroterapia anticrotálica após 3, 6, 9 e 12 horas da inoculação de 200 µg/Kg de veneno de *C.d.t.* .

Na **tabela 01** está ilustrada a atividade enzimática da **ALT** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo controle, e dos grupos inoculado somente com veneno crotálico (3, 6 9 e 12 horas, respectivamente), dos grupos inoculados somente com soro anticrotálico os grupos inoculado com veneno crotálico, do grupo submetido à soroterapia (3, 6 9 e 12 horas, respectivamente), e do grupo inoculado com veneno crotálico e soro anticrotálico (3, 6 9 e 12 horas, respectivamente). A análise da tabela 01 permite considerar que houve uma diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle. O menor valor obtido encontra-se no grupo veneno + soro no tempo de 9 horas, e o maior valor da ALT é do grupo veneno, no tempo de 9 horas.

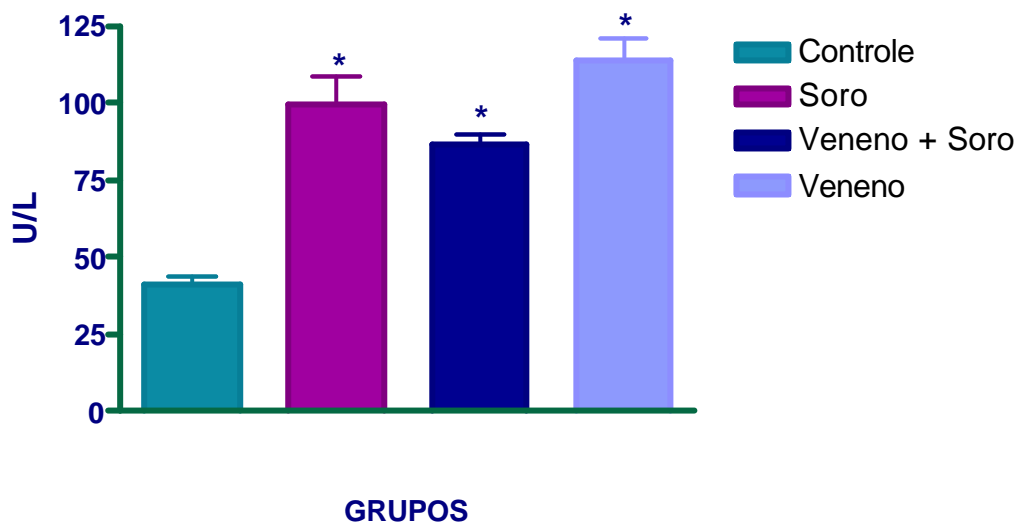
#### 4.1.2 Avaliação da Aspartato Aminotransferase

As figuras 05, 06, 07 e 08 representam a atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST) no soro de ratos em resposta a administração de soro anticrotálico 3, 6, 9 e 12 horas, após a inoculação do veneno de *C.d.t.*, respectivamente. A média dos valores obtidos e o respectivo erro padrão deste intervalo de tempo está representada na tabela 02.



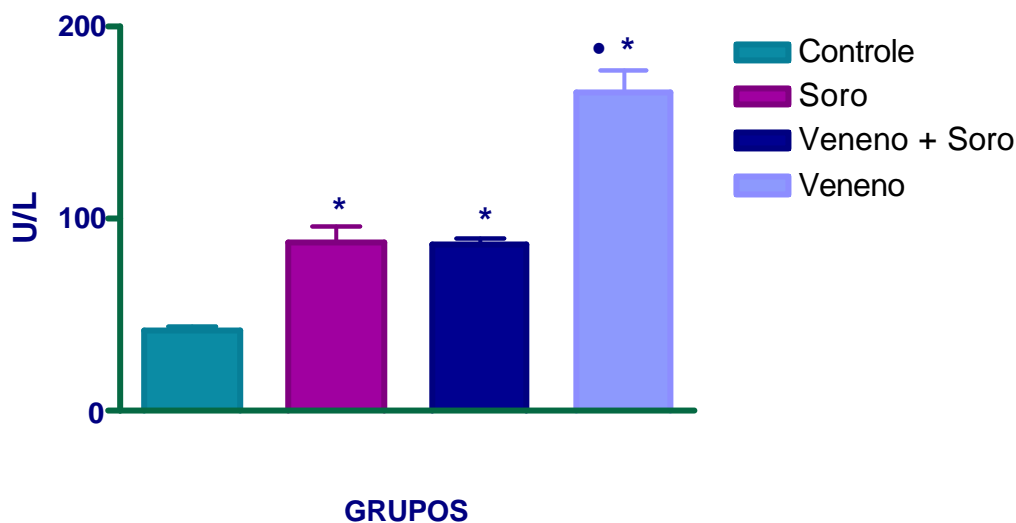
**Figura 05:** Atividade enzimática da **AST** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13µg/Kg) após 3 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 3h**). Submetidos à soroterapia (13µg/Kg) após 3 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 3h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 3 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 3h**). Os dados representam a média ± E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida no grupo: \* Controle (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

A **figura 05** representa a atividade da enzima **AST** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, do grupo submetido à soroterapia, e do grupo submetido à administração de soroterapia após **3 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. A figura 05 permite considerar que houve uma diferença significativa entre os valores do controle quando comparados aos valores obtidos nos outros grupos experimentais. Podemos observar conforme a representação da tabela 02 que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores dos grupos veneno, grupo veneno + soro e grupo soro.



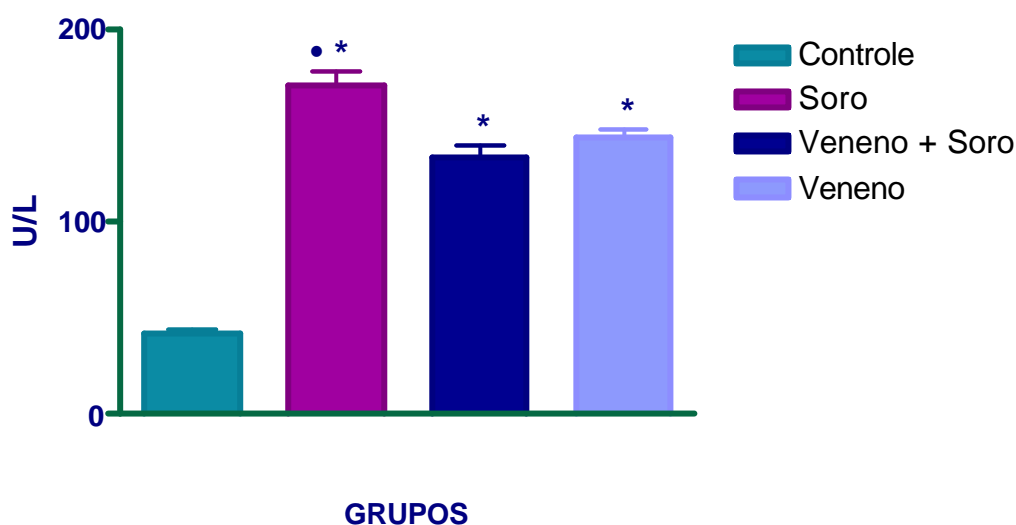
**Figura 06:** Atividade enzimática da **AST** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13µg/Kg) após 6 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 6h**). Submetidos à soroterapia (13µg/Kg) após 6 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 6h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 6 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 6h**). Os dados representam a média ± E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida no grupo: \* Controle (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

Na **figura 06** podemos observar a atividade enzimática da **AST** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, grupo submetido à soroterapia, e do grupo submetido à administração de soroterapia após **6 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. A análise da figura 06 permite considerar que houve aumento significativo da atividade enzimática da AST para todos os grupos estudados em relação ao grupo controle, principalmente em relação ao grupo veneno, conforme se observa na representação da tabela 02. Ao se comparar o grupo veneno, grupo veneno + soro e grupo soro, não é observado aumento estatisticamente significativo entre os valores da AST.



**Figura 07:** Atividade enzimática da **AST** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13 $\mu$ g/Kg) após 9 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 9h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 9 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 9h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 9 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 9h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida nos grupos: \* Controle e <sup>?</sup> veneno + soro (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

A **figura 07** ilustra a atividade enzimática da **AST** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, submetido à soroterapia, e submetido à administração de soroterapia após **9 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. Comparando o grupo soro, grupo veneno + soro e grupo veneno com o grupo controle, podemos considerar que houve uma diferença estatisticamente significativa, destacando-se a grande diferença entre os valores obtidos pelo grupo soro em relação ao grupo controle. Podemos observar uma diferença significativa entre o grupo veneno quando comparado ao grupo veneno + soro e ao grupo soro.



**Figura 08:** Atividade enzimática da **AST** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13µg/Kg) após 12 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 12h**). Submetidos à soroterapia (13µg/Kg) após 12 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 12h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 12 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 12h**). Os dados representam a média ± E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida nos grupos: \* Controle e ? veneno + soro (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

A **figura 08** ilustra a atividade enzimática da **AST** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, submetido à soroterapia, e submetido à administração de soroterapia após **12 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. A figura 08 permite considerar que houve uma diferença estatisticamente significativa entre os valores do grupo controle quando comparado aos valores obtidos no grupo veneno, grupo veneno + soro e grupo soro. Podemos observar conforme a representação da tabela 02 que houve diferença significativa entre os valores do grupo veneno + soro quando comparado ao grupo que recebeu apenas a soroterapia anticrotálica.

AST	CONTROLE	SORO	VENENO + SORO	VENENO
3 h	41,363 ± 2,643	98,299 ± 5,503	99,228 ± 12,303	117,333 ± 6,444
6 h		99,462 ± 9,305	86,585 ± 3,281	114,000 ± 7,192
9 h		87,644 ± 8,160	86,693 ± 3,528	165,289 ± 12,085
12 h		171,047 ± 7,291	133,951 ± 5,919	143,482 ± 4,042

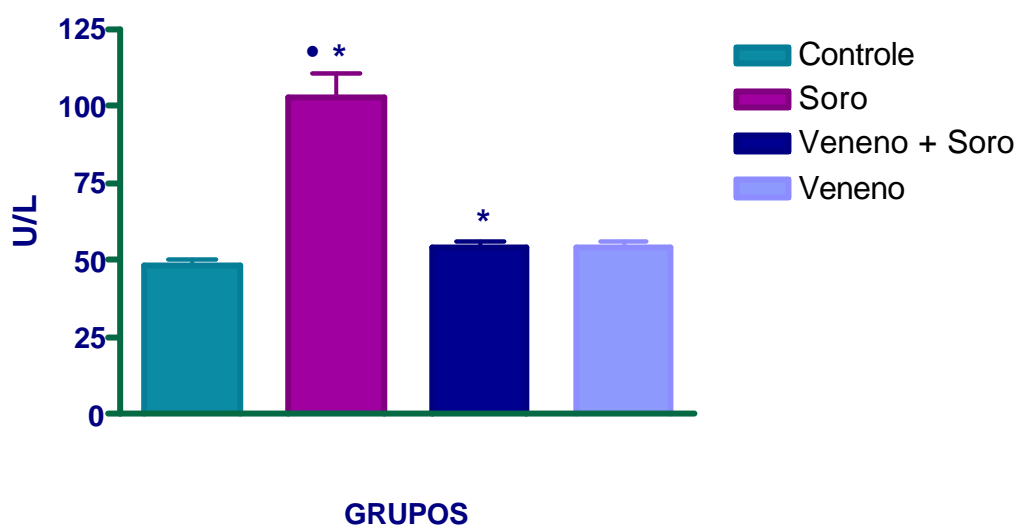
**Tabela 02:** Atividade enzimática da **AST** (U/L) em soro de ratos 48 horas seguidas da administração da soroterapia anticrotálica após 3, 6, 9 e 12 horas da inoculação de 200 µg/Kg de veneno de *C.d.t.*

Na **tabela 02** está ilustrada a atividade enzimática da **AST** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo controle, e dos grupos inoculado somente com veneno crotálico (3, 6 9 e 12 horas, respectivamente), dos grupos inoculados somente com soro anticrotálico os grupos inoculado com veneno crotálico, do grupo submetido à soroterapia (3, 6 9 e 12 horas, respectivamente), e do grupo inoculado com veneno crotálico e soro anticrotálico (3, 6 9 e 12 horas, respectivamente). A análise da tabela 01 permite considerar que houve uma diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle. O menor valor obtido encontra-se no grupo veneno + soro no tempo de 6 horas, com pequena diferença do tempo de 9 horas; o maior valor da AST é do grupo soro, no tempo de 12 horas.

#### 4.1.3 Avaliação da Fosfatase Alcalina

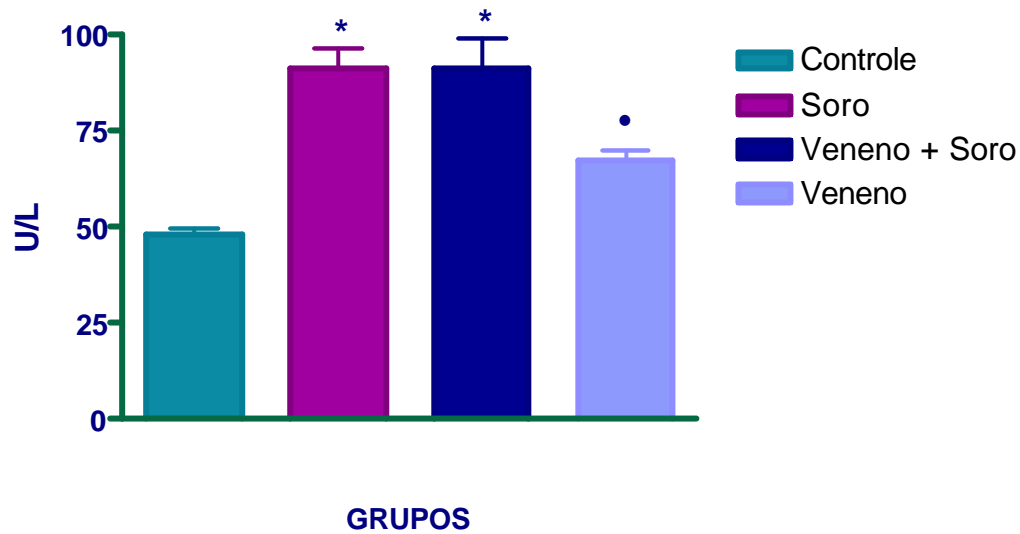
As figuras 09, 10, 11 e 12 representam a atividade enzimática da fosfatase alcalina (FA) no soro de ratos em resposta à administração de soro anticrotálico 3, 6, 9 e 12 horas, após a inoculação do veneno de *C.d.t.*, respectivamente. A média dos valores obtidos e o respectivo erro padrão deste intervalo de tempo está representada na tabela 03.





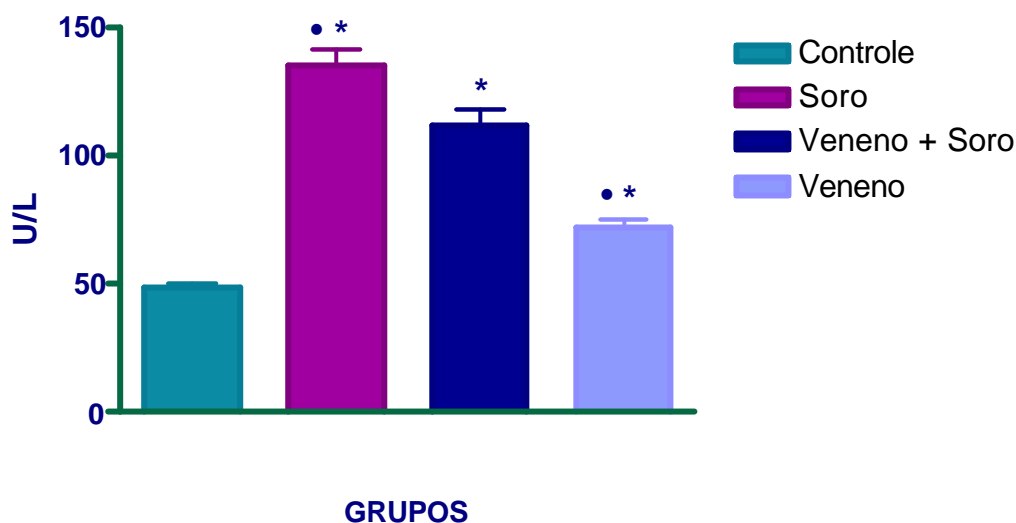
**Figura 09:** Atividade enzimática da FA (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotática (13 $\mu$ g/Kg) após 3 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 3h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 3 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 3h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 3 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 3h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida nos grupos: \* Controle e ? veneno + soro (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

A **figura 09** ilustra a atividade enzimática da FA (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, submetido à soroterapia, e submetido à administração de soroterapia após **3 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. A análise da figura 09 sugere um aumento significativo dos valores enzimático de FA para o grupo soro e o grupo veneno+ soro em relação ao grupo controle. Conforme a representação da **tabela 03**, não foi observado valor estatisticamente significativo do grupo controle em relação ao grupo veneno. Comparando o grupo veneno + soro com o grupo soro, pode-se observar um aumento estatisticamente significativo nos valores do grupo que receberam apenas soroterapia daqueles que foram inoculados com veneno e soro. Os valores do grupo soro também foram significativamente maiores quando comparados aos do grupo veneno.



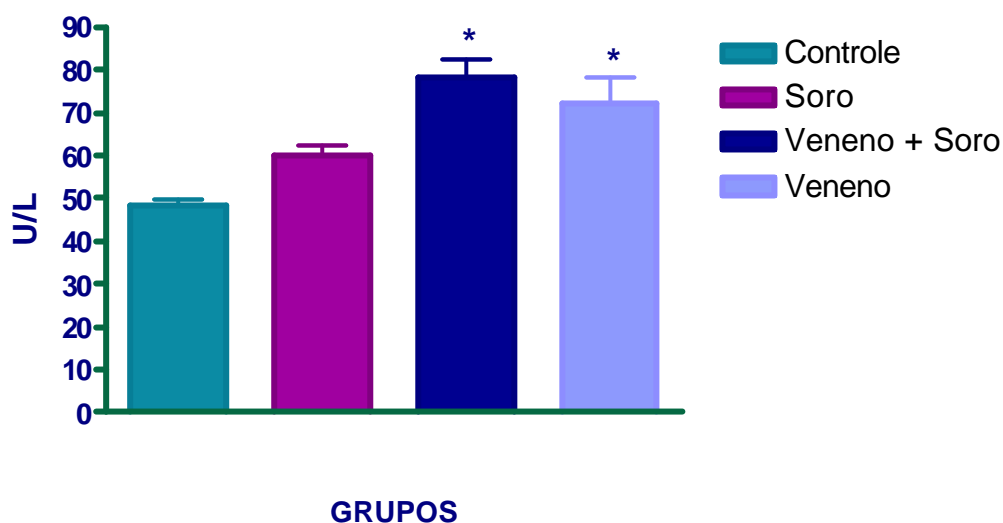
**Figura 10:** Atividade enzimática da **FA** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13 $\mu$ g/Kg) após 6 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 6h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 6 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 6h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 6 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 6h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida nos grupos: \* Controle e <sup>?</sup> veneno + soro (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

A **figura 10** ilustra a atividade enzimática da **FA** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, submetido à soroterapia, e submetido à administração de soroterapia após **6 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. A análise dos resultados ilustrados na figura 10 para o grupo veneno + soro quando comparado ao grupo inoculado com veneno, demonstra uma diferença estatisticamente significativa, o que também pode ser observado na comparação do grupo soro e do grupo veneno



**Figura 11:** Atividade enzimática da **FA** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13 $\mu$ g/Kg) após 9 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 9h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 9 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 9h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 9 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 9h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida nos grupos: \* Controle e ? veneno + soro (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

A **figura 11** ilustra a atividade enzimática da **FA** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, submetido à soroterapia, e submetido à administração de soroterapia após **9 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. Os resultados dos valores da atividade enzimática da fosfatase alcalina obtidos nos diferentes grupos experimentais em comparação aos valores enzimáticos do grupo controle foram significativamente. Conforme análise da tabela 03, houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo veneno + soro ao grupo soro e ao grupo veneno, sendo este último, o grupo que obteve a menor média de valor enzimático entre eles.



**Figura 12:** Atividade enzimática da **FA** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13 $\mu$ g/Kg) após 12 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 12h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 12 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 12h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 12 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 12h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida no grupo: \* Controle (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

A **figura 12** ilustra a atividade enzimática da **FA** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, submetido a soroterapia, e submetido a administração de soroterapia após **12 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. Ao analisarmos os valores da fosfatase alcalina na figura 12, podemos considerar que houve aumento significativo da atividade desta enzima para o grupo veneno + soro e para o grupo veneno em relação ao grupo controle. Conforme ilustra a figura 12, a diferença não foi estatisticamente significativa quando comparados o grupo controle com o grupo soro. Do mesmo modo, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos veneno, veneno + soro e soro entre si.

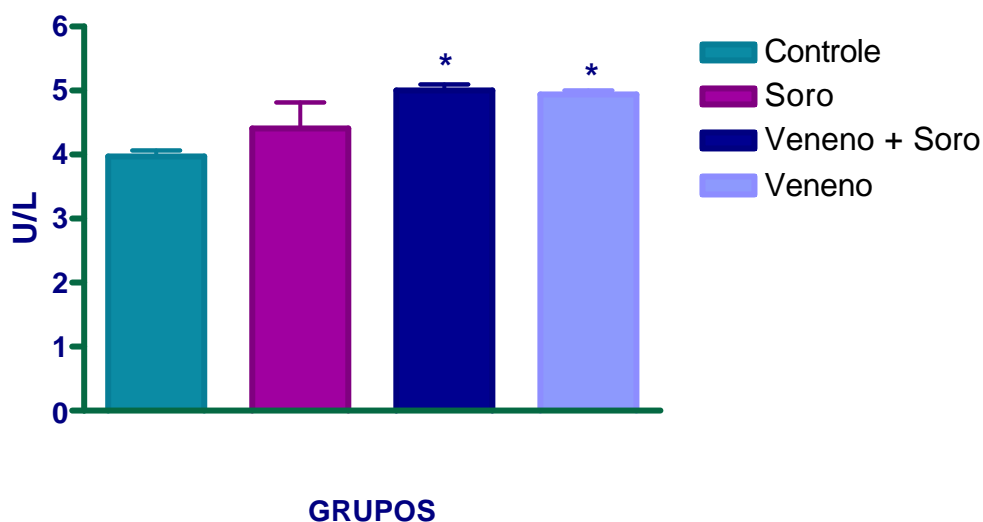
FA	CONTROLE	SORO	VENENO + SORO	VENENO
3 h	48,326 ± 1,584	102,638 ± 7,820	71,108 ± 5,624	54,223 ± 1,833
6 h		91,416 ± 4,853	91,489 ± 7,359	67,121 ± 2,748
9 h		135,265 ± 6,080	111,865 ± 6,251	71,686 ± 3,482
12 h		60,078 ± 2,169	78,453 ± 4,026	72,345 ± 5,911

**Tabela 03:** Atividade enzimática da **FA** (U/L) em soro de ratos 48 horas seguidas da administração da soroterapia anticrotálica após 3, 6, 9 e 12 horas da inoculação de 200 µg/Kg de veneno de *C.d.t.* .

Na **tabela 03** está ilustrada a atividade enzimática da **FA** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo controle, e dos grupos inoculado somente com veneno crotálico (3, 6 9 e 12 horas, respectivamente), dos grupos inoculados somente com soro anticrotálico os grupos inoculado com veneno crotálico, do grupo submetido à soroterapia (3, 6 9 e 12 horas, respectivamente), e do grupo inoculado com veneno crotálico e soro anticrotálico (3, 6 9 e 12 horas, respectivamente). A análise da tabela 01 permite considerar que houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle, exceto para os grupos veneno 3 horas, veneno 6 horas e soro 3 horas. O menor valor obtido encontra-se no grupo veneno no tempo de 3 horas, e o maior valor da FA é do grupo soro, no tempo de 9 horas.

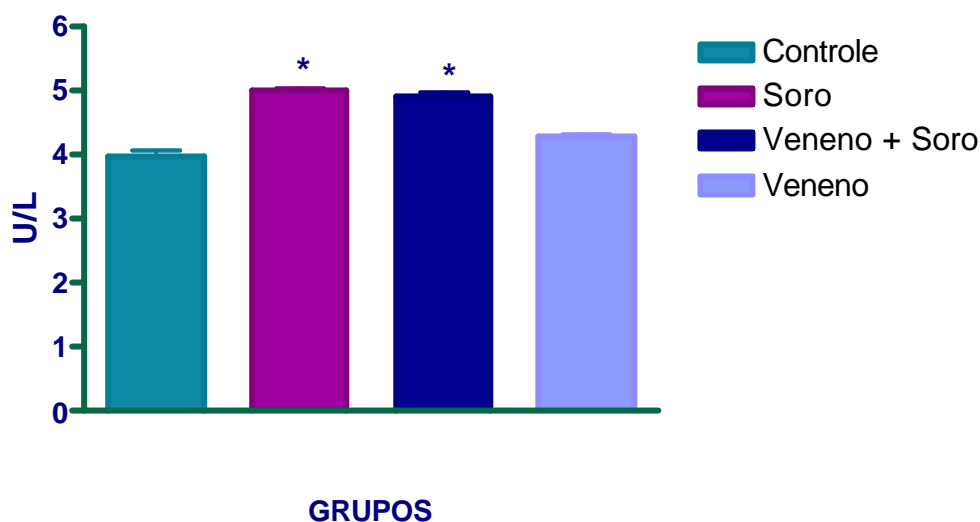
#### 4.1.4 Avaliação da Gama Glutamyltransferase

As figuras 13, 14, 15 e 16 representam a atividade enzimática da gama glutamyltransferase (GGT) no soro de ratos em resposta a administração de soro anticrotálico 3, 6, 9 e 12 horas, após a inoculação do veneno de *C.d.t.*, respectivamente. A média dos valores obtidos e o respectivo erro padrão deste intervalo de tempo está representada na tabela 04.



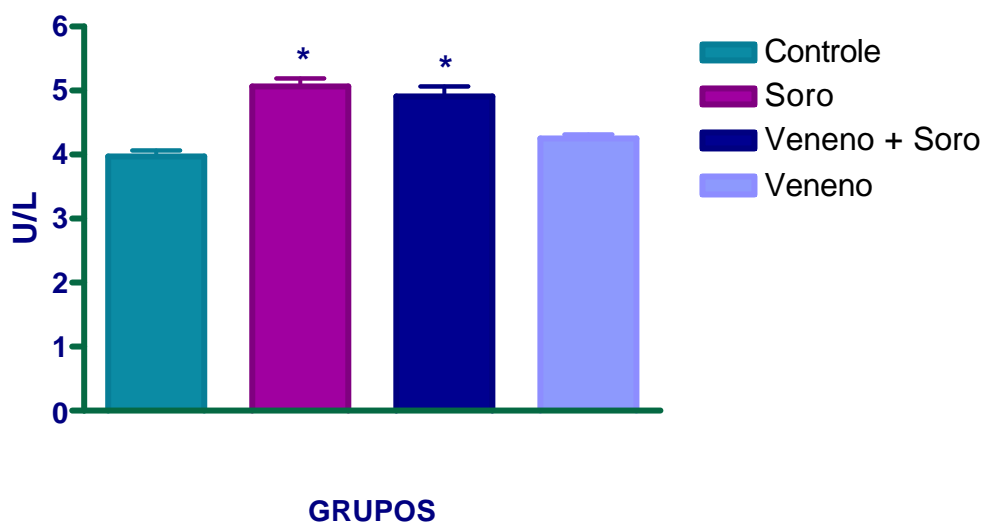
**Figura 13:** Atividade enzimática da **GGT** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13 $\mu$ g/Kg) após 3 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 3h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 3 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 3h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 3 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 3h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida no grupo: \* Controle (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

A **figura 13** ilustra a atividade enzimática da **GGT** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado veneno crotálico, submetido a soroterapia, e submetido a administração de soroterapia após **3 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. Ao analisar os valores da enzima GGT na figura 13, pode-se observar um aumento estatisticamente significativo do grupo veneno+soro e do grupo veneno em relação ao grupo controle. A diferença não foi estatisticamente significativa quando comparado o grupo controle com o grupo que recebeu soro anticrotálico. De acordo com a representação da tabela 04, não houve diferença significativa entre os valores de GGT dos grupos veneno, veneno + soro e soro quando comparados entre si.



**Figura 14:** Atividade enzimática da **GGT** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13 $\mu$ g/Kg) após 6 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 6h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 6 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 6h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 6 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 6h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida no grupo: \* Controle (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

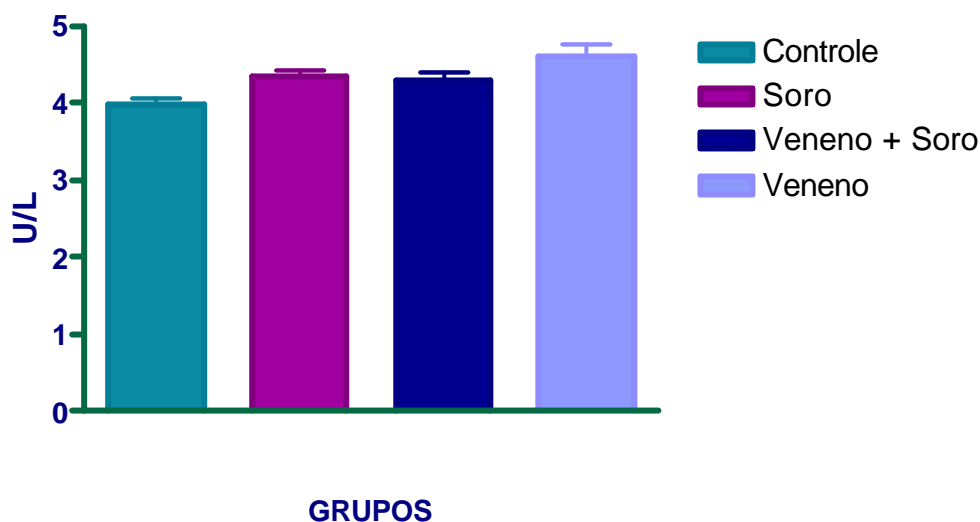
A **figura 14** ilustra os valores bioquímicos da atividade enzimática da **GGT** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, submetido a soroterapia, e submetido a administração de soroterapia após **6 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. Comparando os resultados da GGT obtidos no grupo soro e no grupo veneno + soro, podemos considerar que houve uma diferença estatisticamente significativa entre eles e também em relação ao grupo controle. Comparando o grupo veneno com o grupo controle, podemos considerar que neste caso, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre eles. Observou-se uma pequena diferença, porém não significativamente estatística, nos valores do grupo soro quando comparados aos grupo veneno.



**Figura 15:** Atividade enzimática da **GGT** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13 $\mu$ g/Kg) após 9 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 9h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 9 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 9h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 9 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 9h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida no grupo: \* Controle (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

A **figura 15** ilustra a atividade enzimática da **GGT** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, submetido a soroterapia, e submetido a administração de soroterapia após **9 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. A análise da figura 15 permite considerar que houve aumento estatisticamente significativo nos valores enzimáticos do grupo soro e do grupo veneno + soro em relação ao grupo controle. Foi observada uma diferença significativa entre o grupo veneno e o grupo soro, todavia, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos no grupo veneno em relação ao grupo controle.





**Figura 16:** Atividade enzimática da **GGT** (U/L) no soro de ratos Wistar administrados somente com solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**controle**). Submetidos à soroterapia anticrotálica (13 $\mu$ g/Kg) após 12 horas da administração de solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**S 12h**). Submetidos à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 12 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (**V + S 12h**). Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 12 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (**V 12h**). Os dados representam a média  $\pm$  E.P, n=7, p<0,05 quando comparados com a resposta obtida no grupo: \* Controle (ANOVA, seguido teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla).

A **figura 16** ilustra a atividade enzimática da **GGT** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo inoculado com veneno crotálico, submetido a soroterapia, e submetido a administração de soroterapia após **12 horas** da inoculação do veneno de *C.d.t.*. Ao compararmos os valores da atividade enzimática da gama glutamiltransferase do grupo veneno, grupo soro e grupo veneno + soro em relação aos valores enzimáticos obtidos no grupo controle, verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa desta enzima para os grupos experimentais em relação ao grupo controle. De acordo com a tabela 16, também não houve diferença significativa entre os valores de GGT para os grupos veneno, veneno + soro e soro quando comparados entre si.

GGT	CONTROLE	SORO	VENENO + SORO	VENENO
3 h	3,983 ± 0,090	4,422 ± 0,401	5,005 ± 0,098	4,953 ± 0,059
6 h		4,997 ± 0,049	4,923 ± 0,040	4,272 ± 0,055
9 h		5,052 ± 0,135	4,906 ± 0,167	4,246 ± 0,077
12 h		4,347 ± 0,071	4,310 ± 0,092	4,607 ± 0,158

**Tabela 04:** Atividade enzimática da **GGT** (U/L) em soro de ratos 48 horas seguidas da administração da soroterapia anticrotálica após 3, 6, 9 e 12 horas da inoculação de 200 µg/Kg de veneno de *C.d.t.* .

Na **tabela 04** está ilustrada a atividade enzimática da **GGT** (U/L) no soro de ratos Wistar do grupo controle, e dos grupos inoculado somente com veneno crotálico (3, 6 9 e 12 horas, respectivamente), dos grupos inoculados somente com soro anticrotálico os grupos inoculado com veneno crotálico, do grupo submetido à soroterapia (3, 6 9 e 12 horas, respectivamente), e do grupo inoculado com veneno crotálico e soro anticrotálico (3, 6 9 e 12 horas, respectivamente).

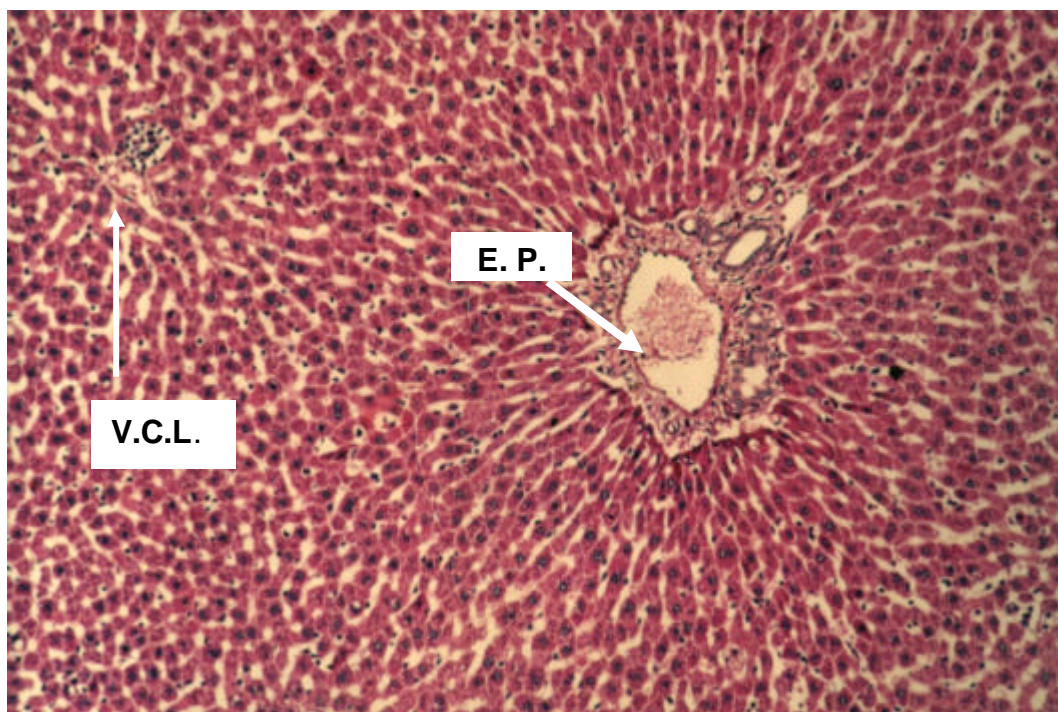
A análise da tabela 01 permite considerar que houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle, exceto para os grupos veneno 6 horas, veneno 9 horas, soro 3 horas os grupos veneno 12 horas, soro 12 horas e veneno + soro 12 horas. O menor valor obtido encontra-se no grupo veneno no tempo de 6 horas, e o maior valor da GGT é do grupo soro, no tempo de 9 horas.

## 4.2 Estudo Histomorfológico

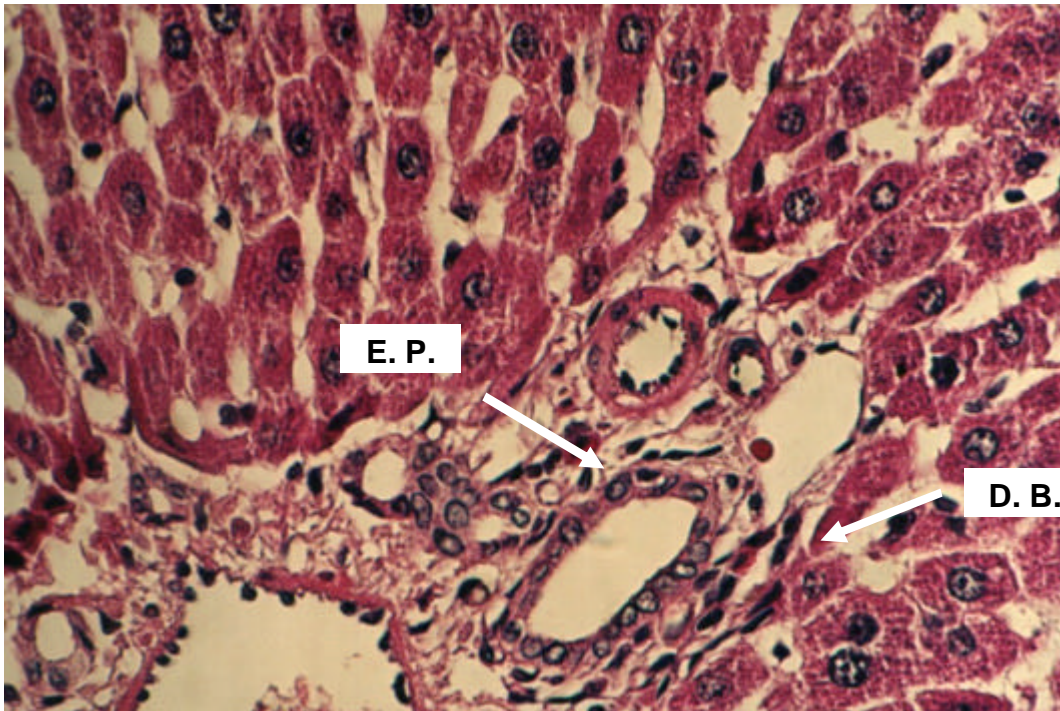
### 4.2.1. Avaliação Histomorfológica pelo método H.E.

#### 4.2.1.1. Grupo Controle

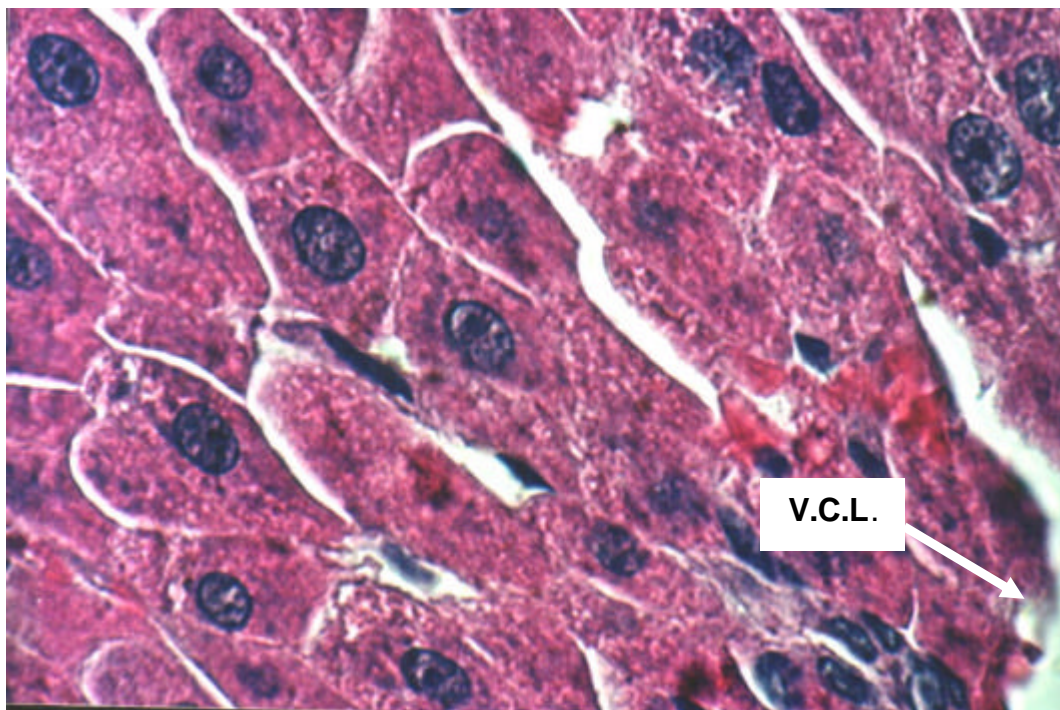
As **figuras 17, 18 e 19** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo controle, inoculado somente com solução fisiológica. A análise histológica destas fotomicrografias, demonstra a boa preservação da arquitetura celular, com núcleos ovóides aparentes e cordões celulares definidos em direção à veia centro lobular. Ausência de degeneração e necrose. Ductos biliares e veias hepáticas bem definidos e preservados.



**Figura 17:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **controle**, inoculados com 100µL solução fisiológica estéril 0,9% via i.p. após 3 horas da administração de 100µL de solução fisiológica estéril 0,9% via i.m. e sacrificados após 48 horas (HE 100X). V.C.L = Veia centro lobular; E.P. = Espaço porta.



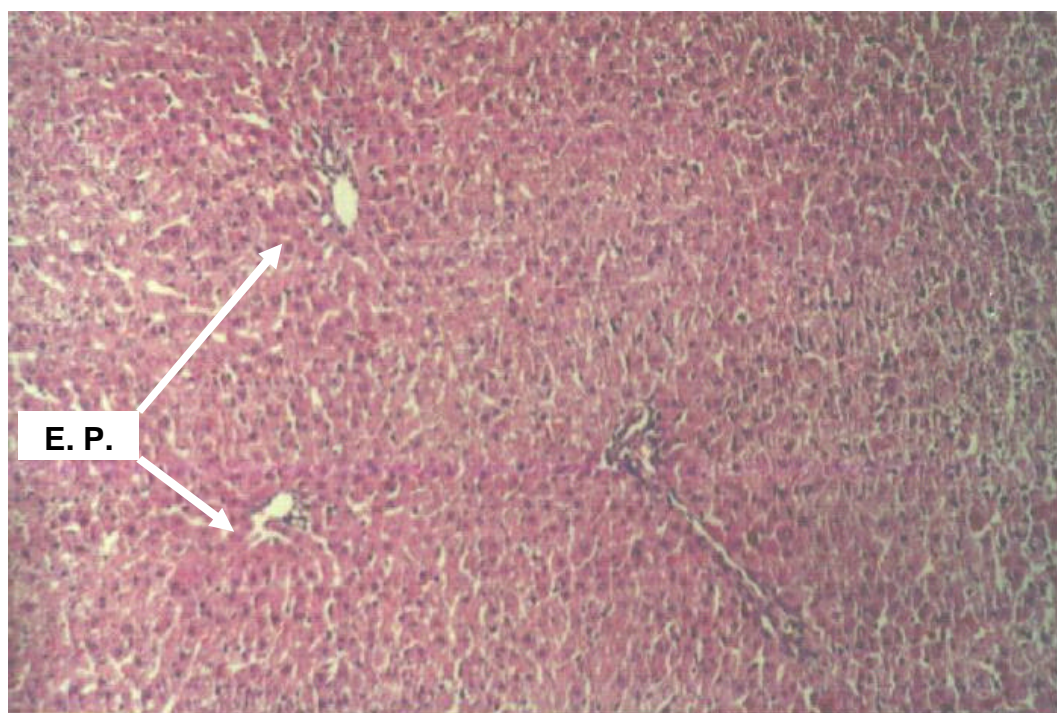
**Figura 18:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **controle**, inoculados com 100µL solução fisiológica estéril 0,9% via i.p. após 3 horas da administração de 100µL de solução fisiológica estéril 0,9% via i.m. e sacrificados após 48 horas (HE 400X). E.P. = Espaço porta; D.B. = Degeneração.



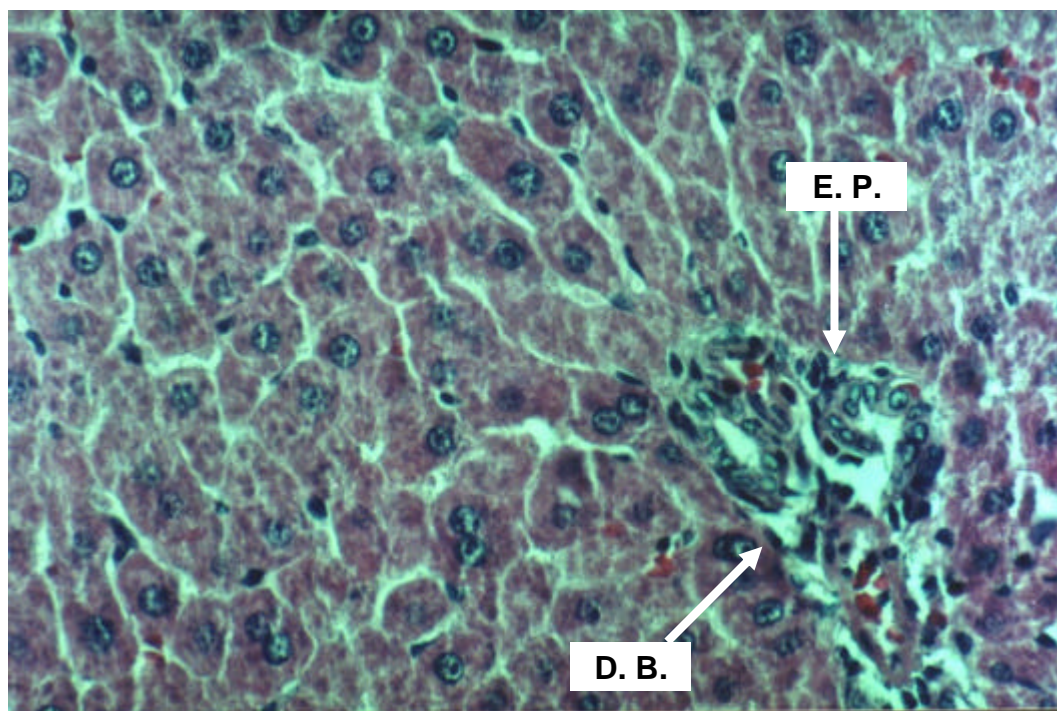
**Figura 19:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **controle**, inoculados com 100µL solução fisiológica estéril 0,9% via i.p. após 3 horas da administração de 100µL de solução fisiológica estéril 0,9% via i.m. e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). V.C.L. = Veia centro lobular.

#### 4.2.1.2. Grupo Veneno 3 horas

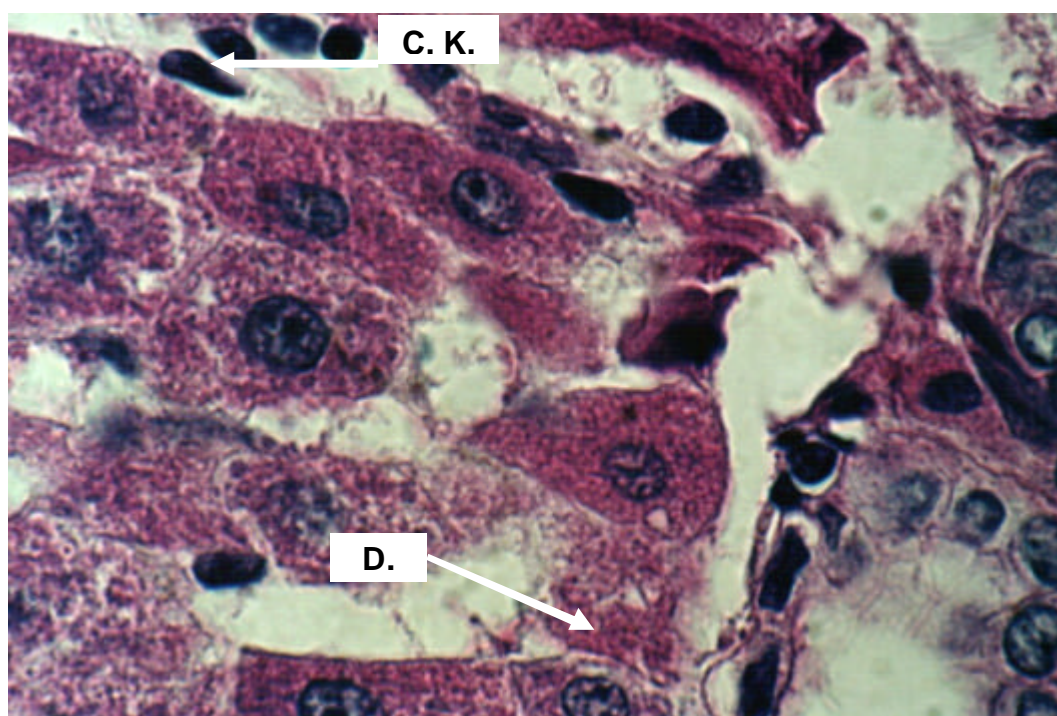
As **figuras 20, 21 e 22** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo veneno, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 3 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas . A análise histológica dos hepatócitos desta fotomicrografia, demonstra os cordões celulares definidos em direção à veia centro lobular. Ductos biliares e veias hepáticas bem definidos e preservados e pequenos focos de congestão de sinusóides e presença de algumas células de Kupffer.



**Figura 20:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V 3h**, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 3 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 100X). E.P. = Espaço porta



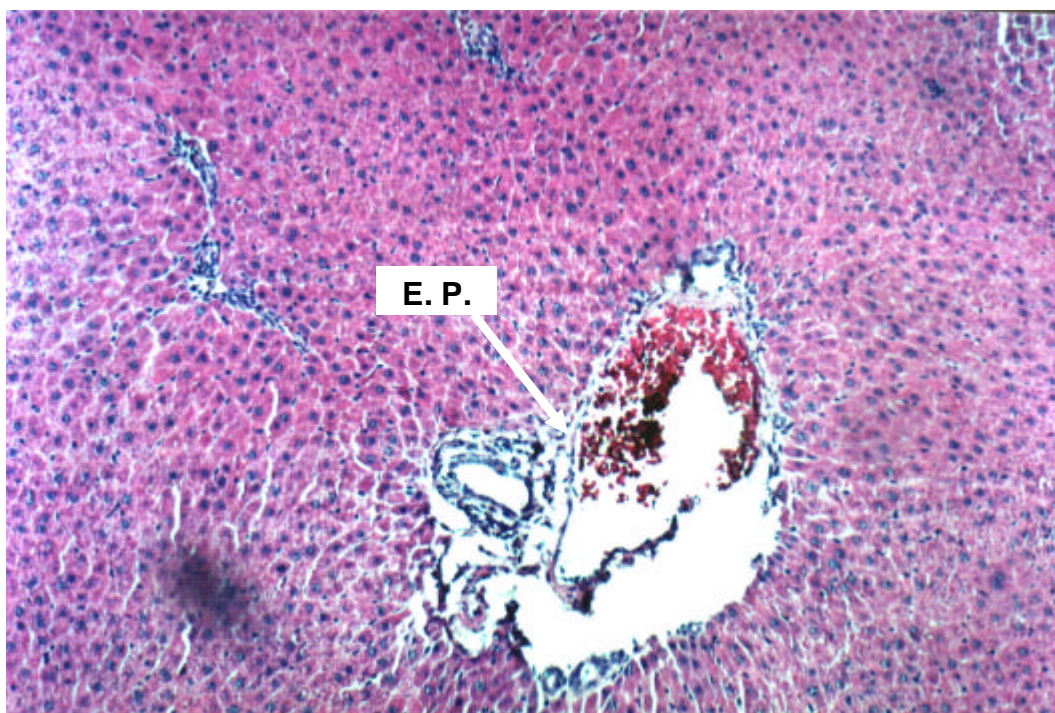
**Figura 21:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V 3h**, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 3 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 400X). E.P. = Espaço porta; D.B. = Ducto Biliar



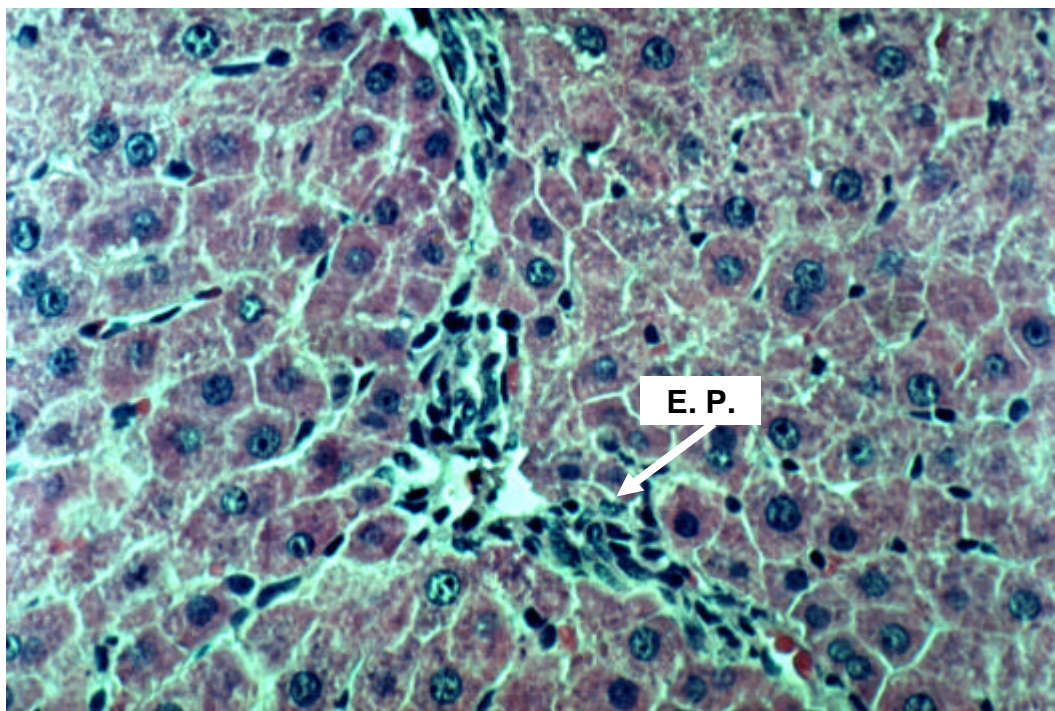
**Figura 22:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V 3h**, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 3 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). C.K. = Células de Kupffer; D. = Degeneração.

#### 4.2.1.3. Grupo Veneno 6 horas

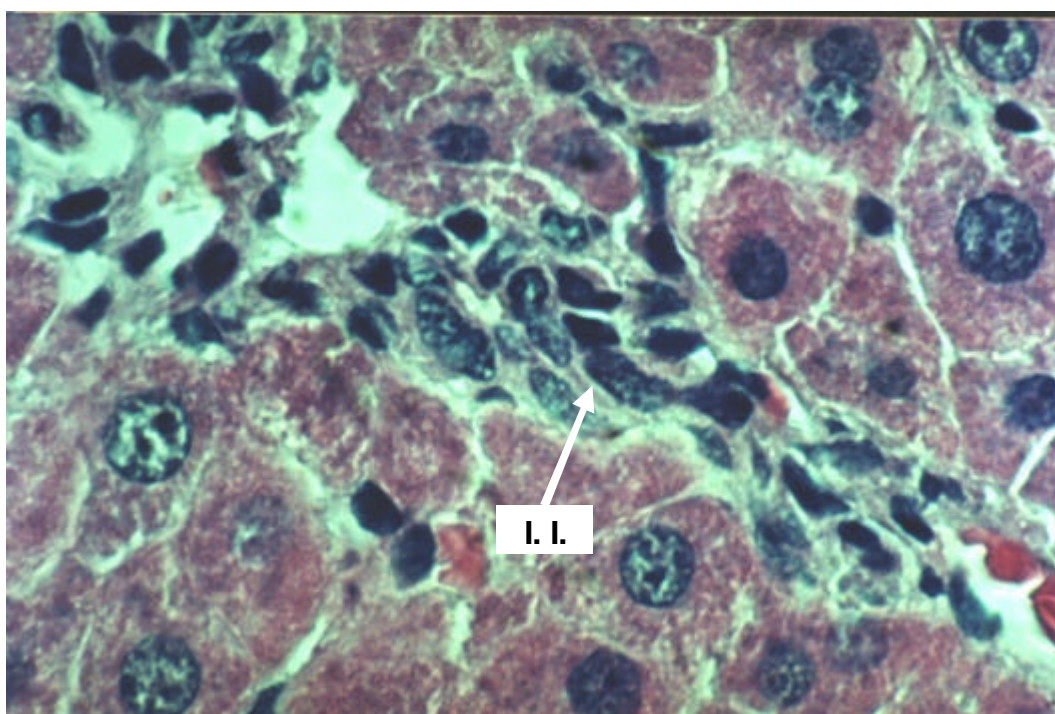
As **figuras 23, 24 e 25** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo veneno, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 6 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas . A análise das amostras histológica fotomicrografadas, revela expansão da área da tríade portal. Pequena quantidade de infiltrado inflamatório e degeneração celular. A fotomicrografia de maior aumento (1000X) revela a presença de algumas células de Kupffer.



**Figura 23:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V 6h**, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 6 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 100X). E.P. = Espaço porta.



**Figura 24:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V 6h**, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 6 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 400X). E.P. = Espaço porta.

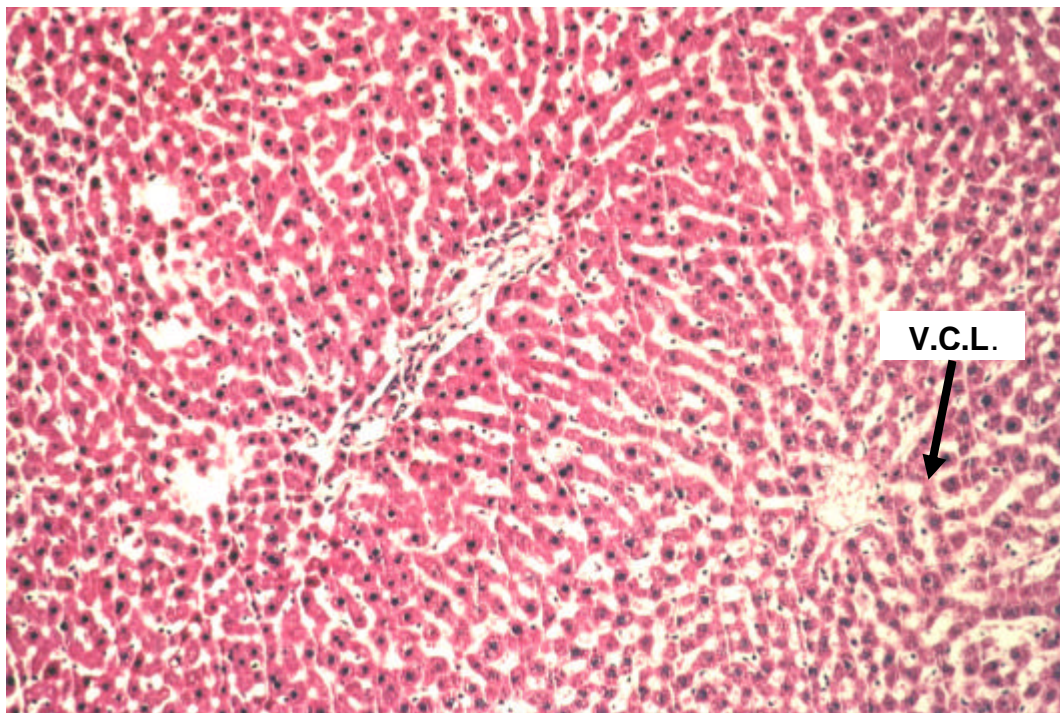


**Figura 25:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V 6h**, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 6 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). I.I. = Infiltrado inflamatório.

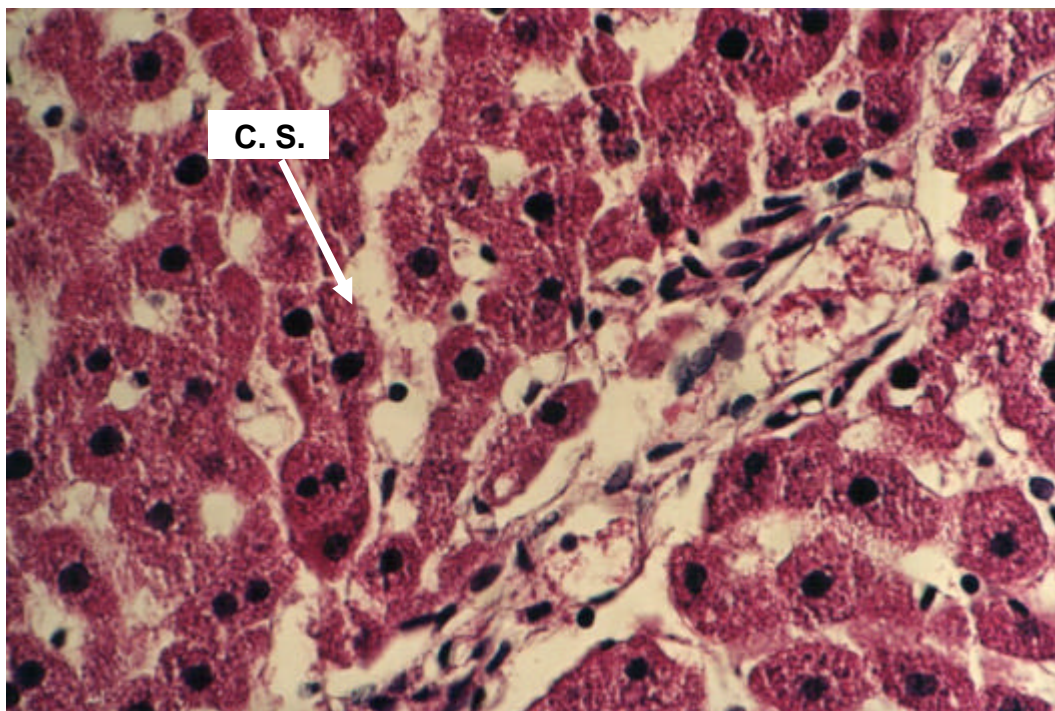


#### 4.2.1.4. Grupo Veneno 9 horas

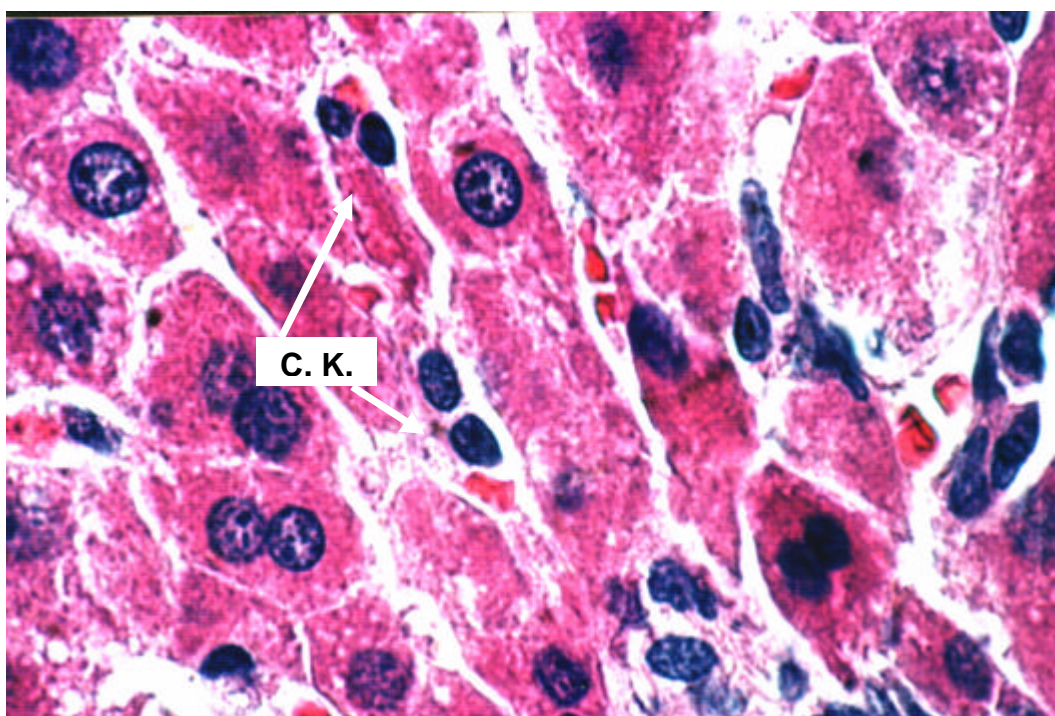
As **figuras 26, 27 e 28** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo veneno, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 9 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas . Nestes campos fotomicrografados, é nítida a expansão dos sinusóides e dilatação celular. Pode-se observar também a presença de células inflamatórias e o aumento do numero de células de Kupffer.



**Figura 26:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V 9h**, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 9 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 100X). V.C.L. = Veia centro lobular



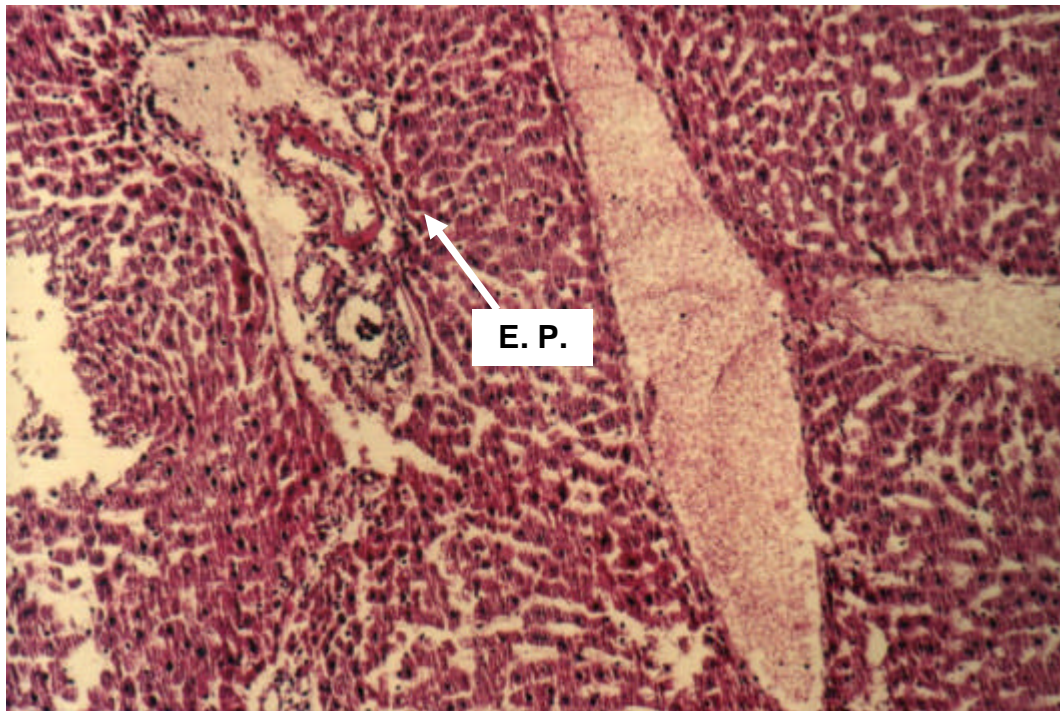
**Figura 27:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V 9h**, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 9 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 400X). C.S. = Congestão de sinusóides.



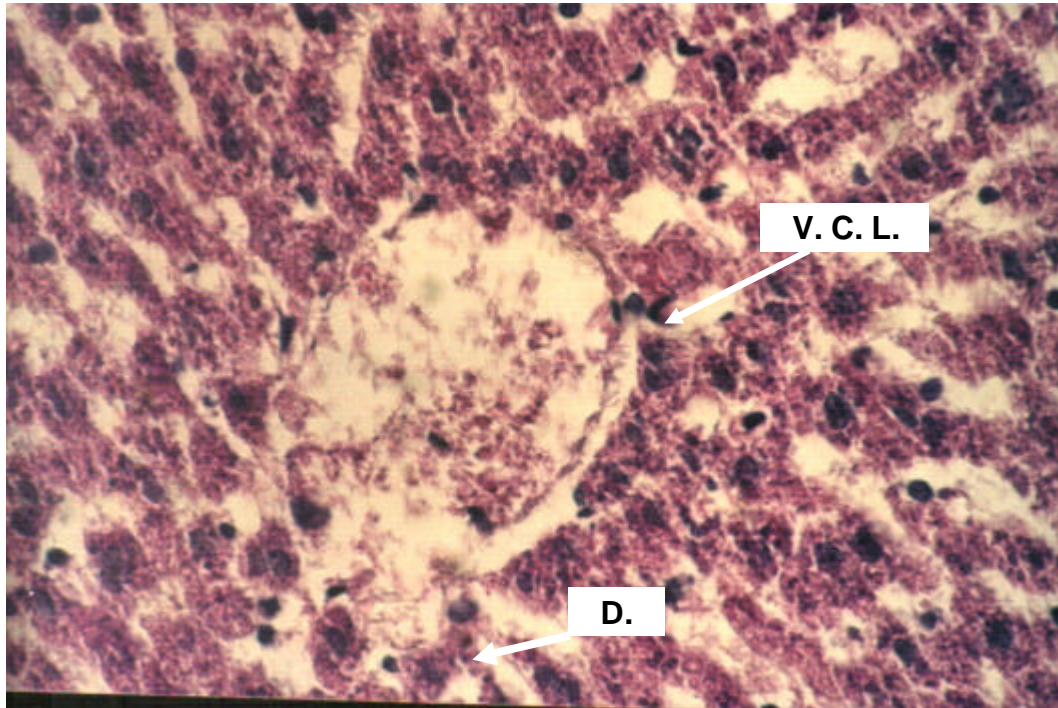
**Figura 28** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V 9**, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg), após 9 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). C.K. = Células de Kupffer.

#### 4.2.1.5. Grupo Veneno 12 horas

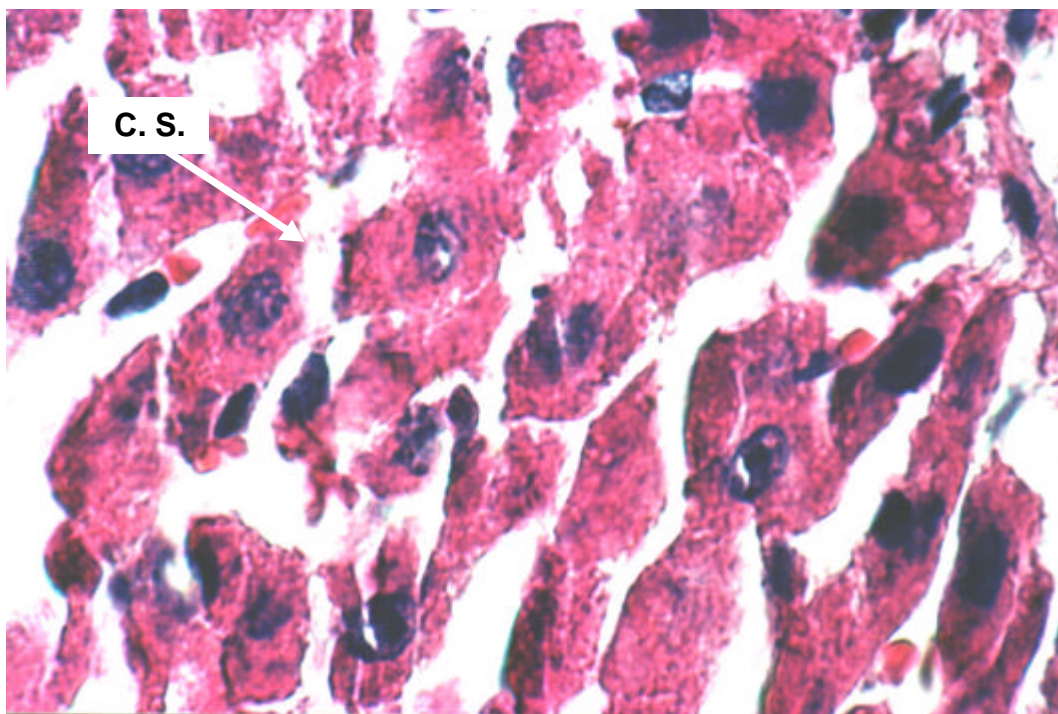
As **figuras 29, 30 e 31** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo veneno, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 12 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas . A análise histológica destas fotomicrografias, demonstra congestão em torno da tríade portal e veia hepática. .Este fragmento de tecido hepático demonstra, ainda, algumas células de Kupffer e também alguns focos de degeneração de células hepáticas em torno da veia centro lobular.



**Figura 29:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V 12h**, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 12 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 100X). E.P. = Espaço porta.



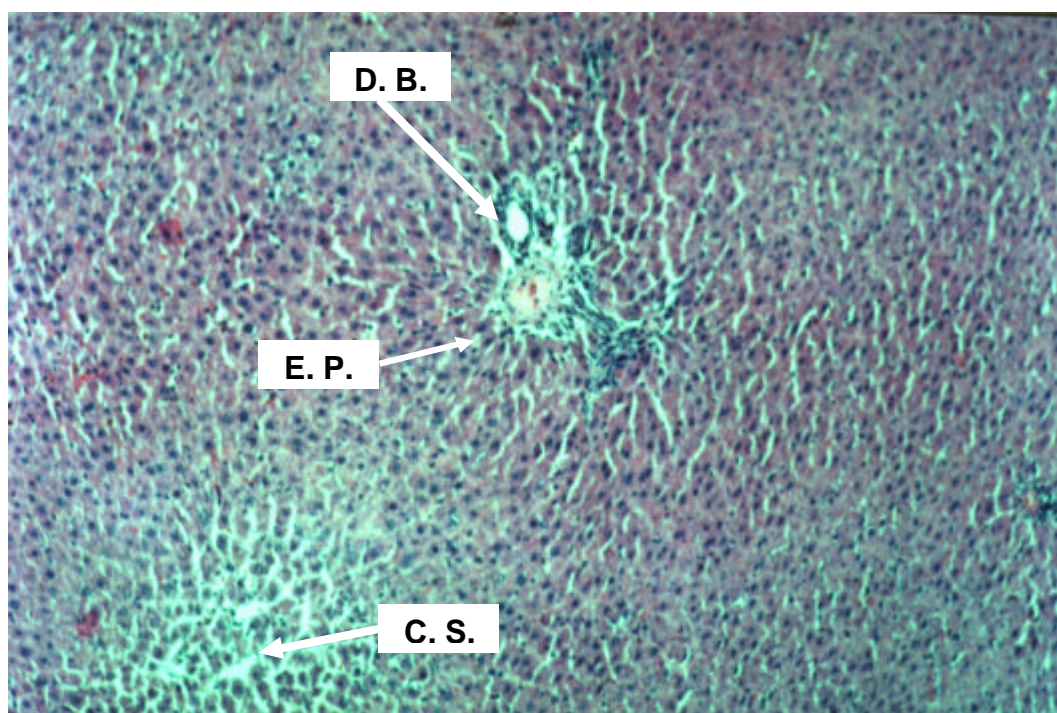
**Figura 30:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V 12h**, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 12 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 400X). V.C.L. = Veia centro lobular; D= Degeneração.



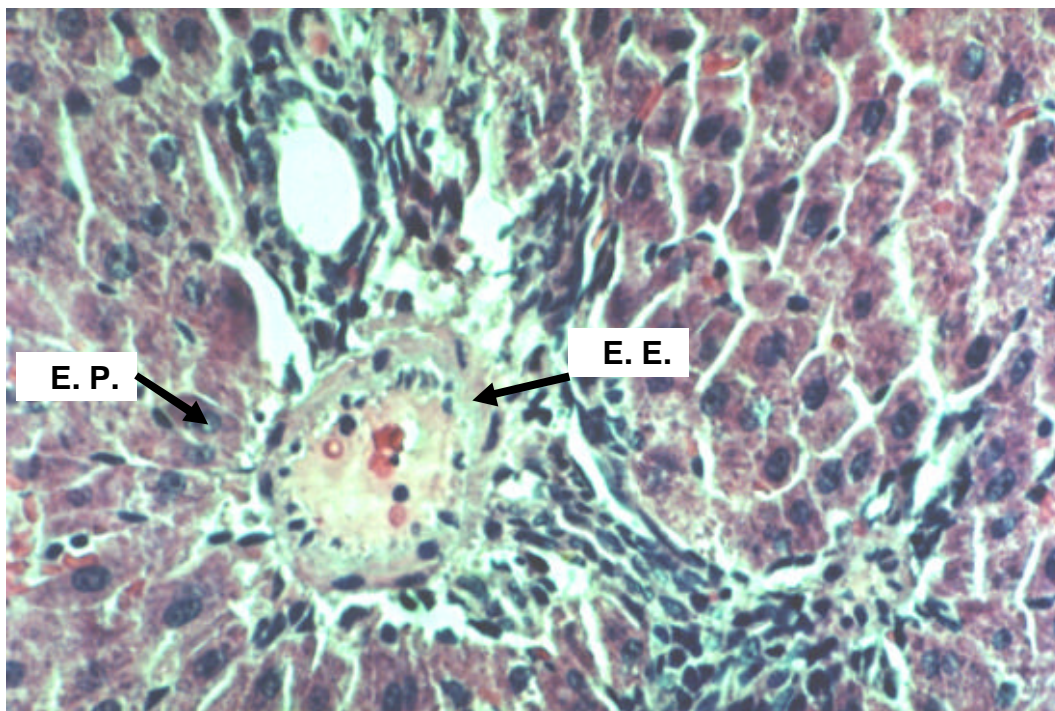
**Figura 31:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V 12h**, Inoculados com veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg), após 12 horas administrada solução fisiológica 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). C.S. = Congestão de sinusóides.

#### 4.2.1.6. Grupo Soro 3 horas

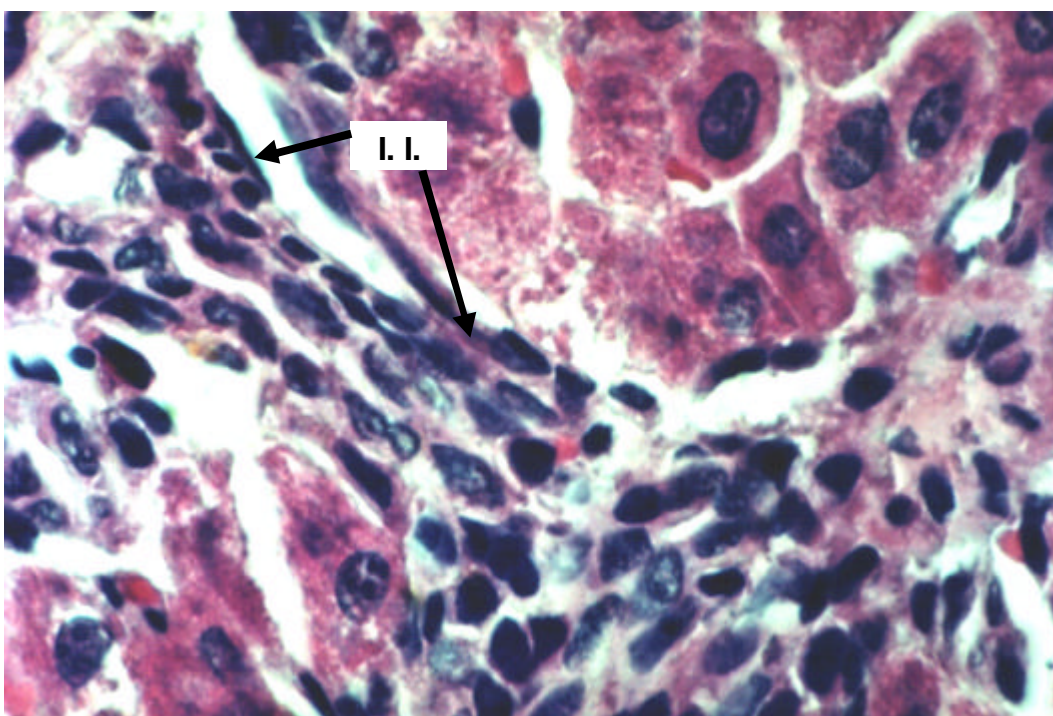
As **figuras 32, 33 e 34** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo soro, submetido à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 3 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas. A análise histológica destas fotomicrografias, demonstra pequenas áreas de congestão de sinusóides em torno da tríade portal além da congestão vascular e do espessamento do endotélio periportal. A presença de área inflamatória periportal também é evidenciada nas fotomicrografias de número 33 e 34. Nestas mesmas fotomicrografias, pode-se observar o aumento do número das células inflamatórias.



**Figura 32:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **S 3h**, submetido à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 3 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 100X). E.P. = Espaço porta; C.S. = Congestão de sinusóides; DB= Ducto biliar.



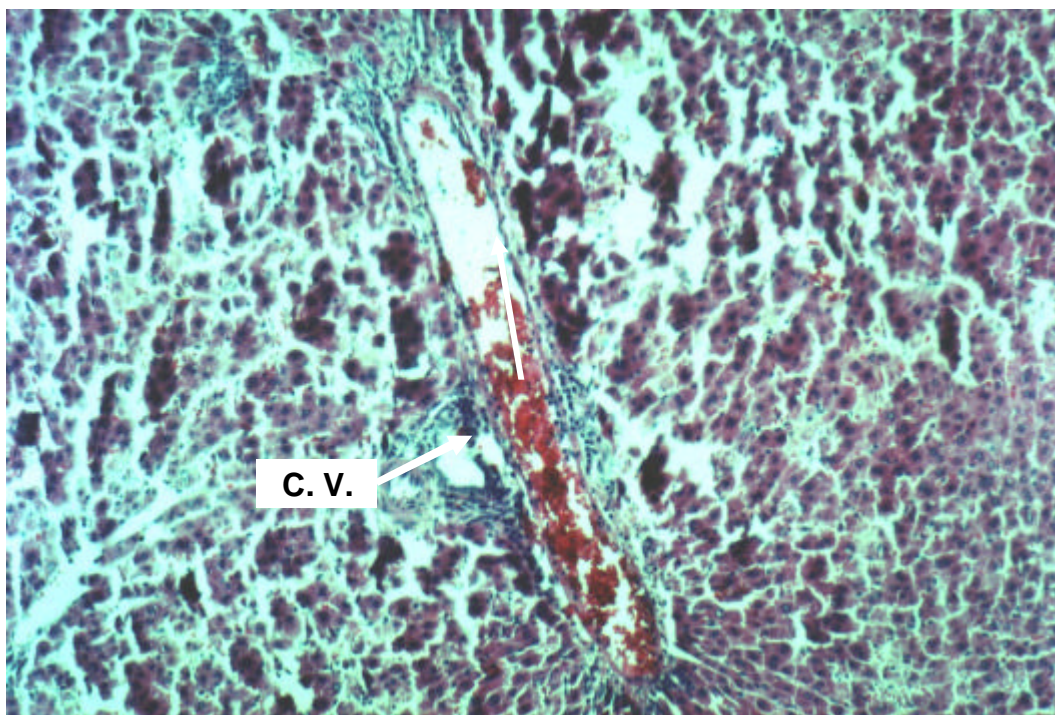
**Figura 33:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **S 3h**, submetido à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 3 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 400X). E.P. = Espaço porta; E.E. = Espessamento do endotélio.



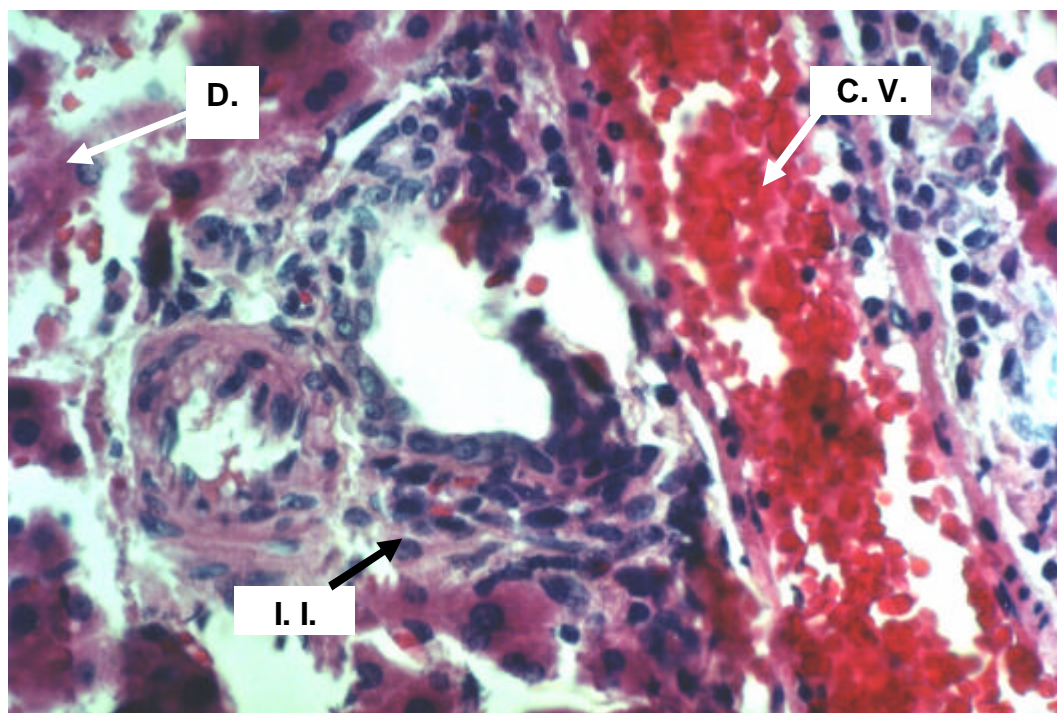
**Figura 34:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **S 3h**, submetido à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 3 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). I.I. = Infiltrado inflamatório.

#### 4.2.1.7. Grupo Soro 6 horas

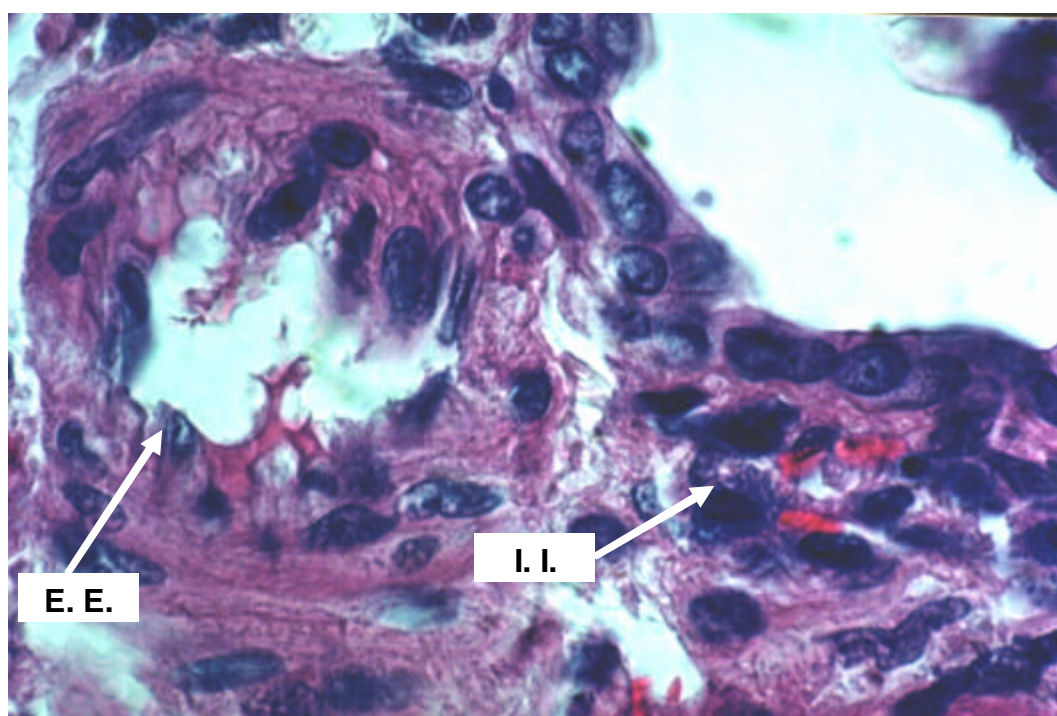
As **figuras 35, 36 e 37** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo soro, submetido à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 6 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas. A análise histológica destas fotomicrografias, apresenta congestão vascular e de sinusóides e quebra do cordão de hepatócitos. Área periportal com células inflamatórias, congestão vascular e degeneração celular e espessamento do endotélio vascular.



**Figura 35:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **S 6h**, submetido à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 6 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 100X). C.V. = Congestão de vasos.



**Figura 36:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **S 6h**, submetido à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 6 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 400X). I.I. = Infiltrado inflamatório; C.V. = Congestão de vasos; D. = degeneração.

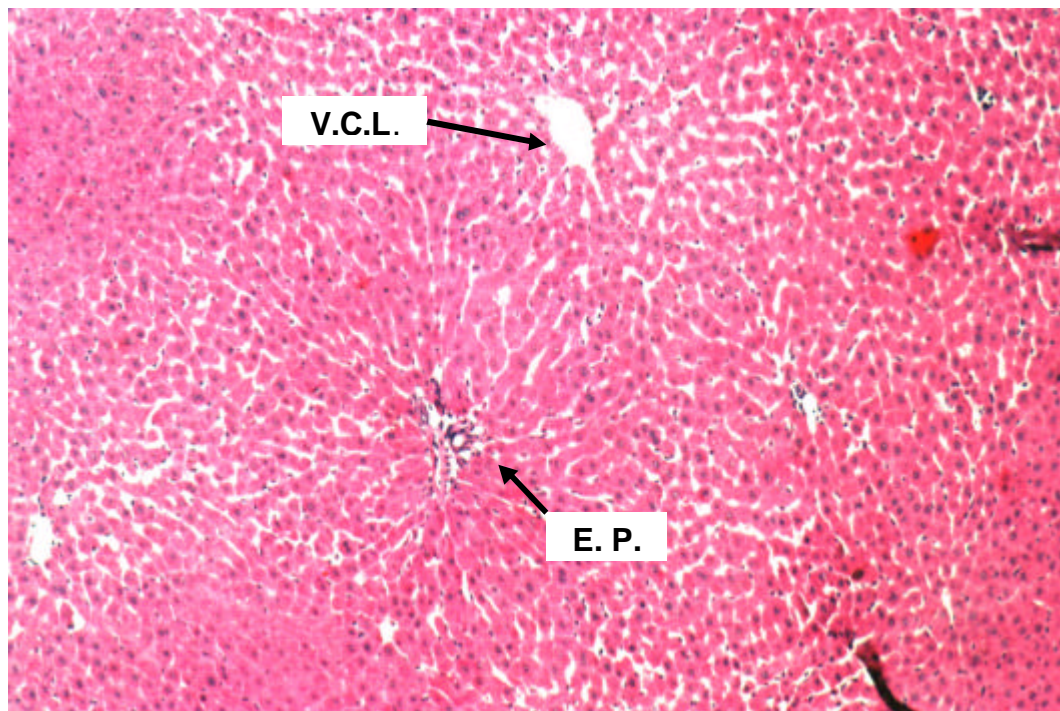


**Figura 37:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **S 6h**, submetido à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 6 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). I.I. = Infiltrado inflamatório; E.E.= Espessamento do endotélio.

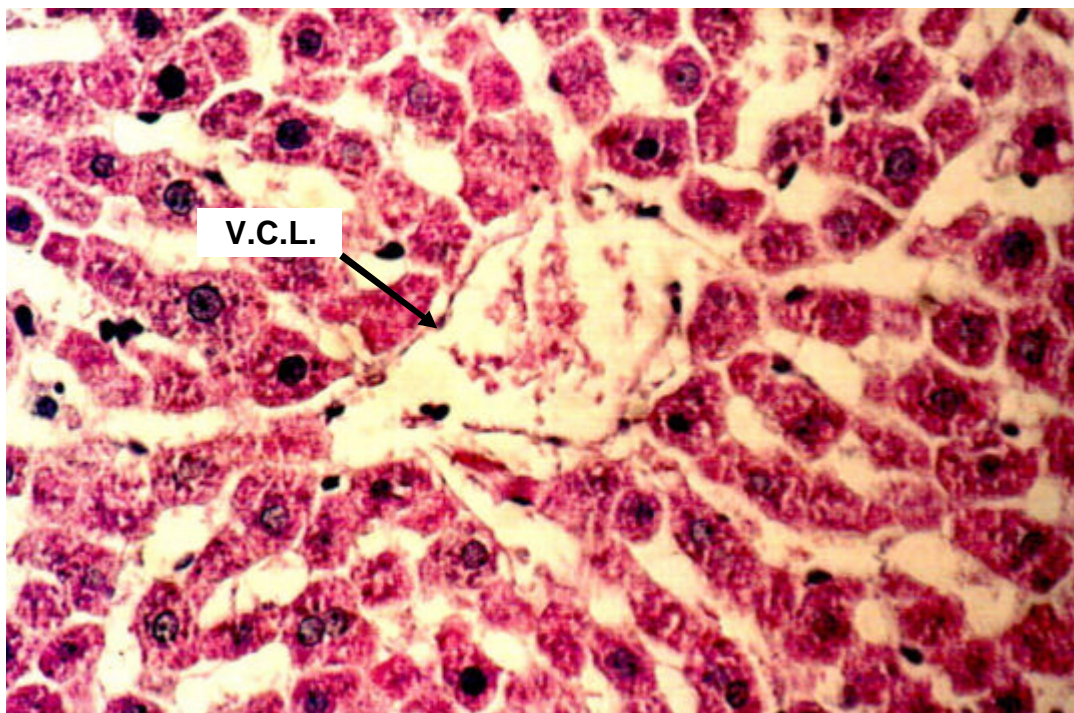


#### 4.2.1.8. Grupo Soro 9 horas

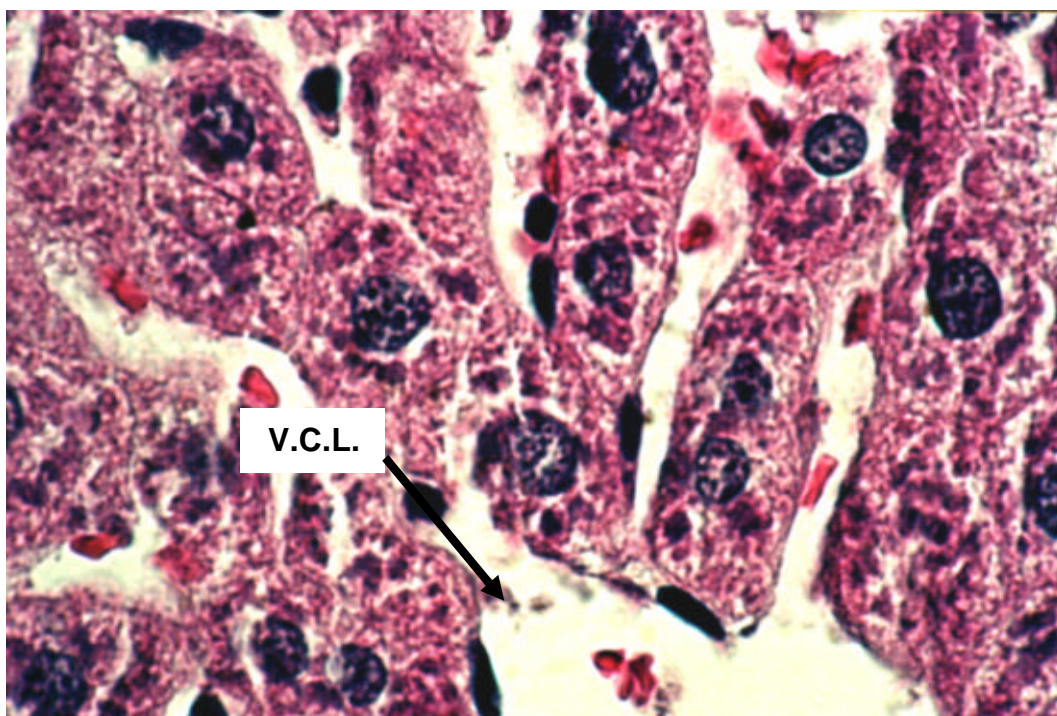
As **figuras 38, 39 e 40** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo soro, submetido à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 9 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas. A análise histológica destas fotomicrografias, demonstra congestão de sinusóides em torno da tríade portal e veias centro lobulares. Observar células inflamatórias e locais com degeneração celular na fotomicrografia número 40.



**Figura 38:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **S 9h**, submetido à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 9 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 100X). V.C.L. = Veia centro lobular; E.P. = Espaço porta.



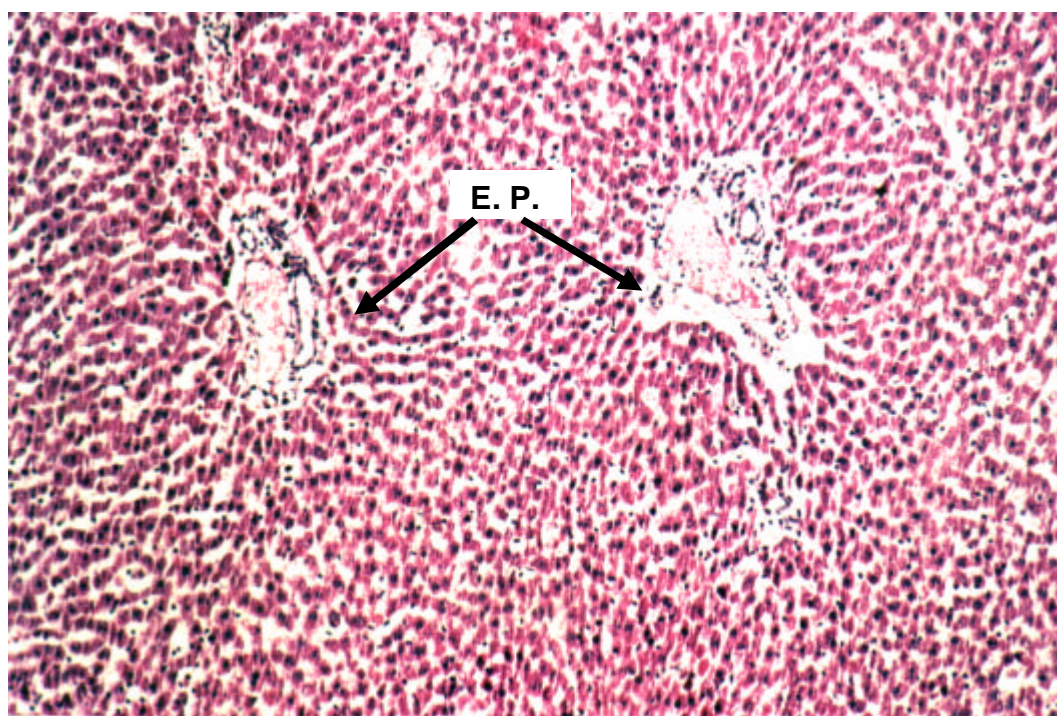
**Figura 39:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **S 9h**, submetido à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 9 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 400X). V.C.L. = Veia centro lobular.



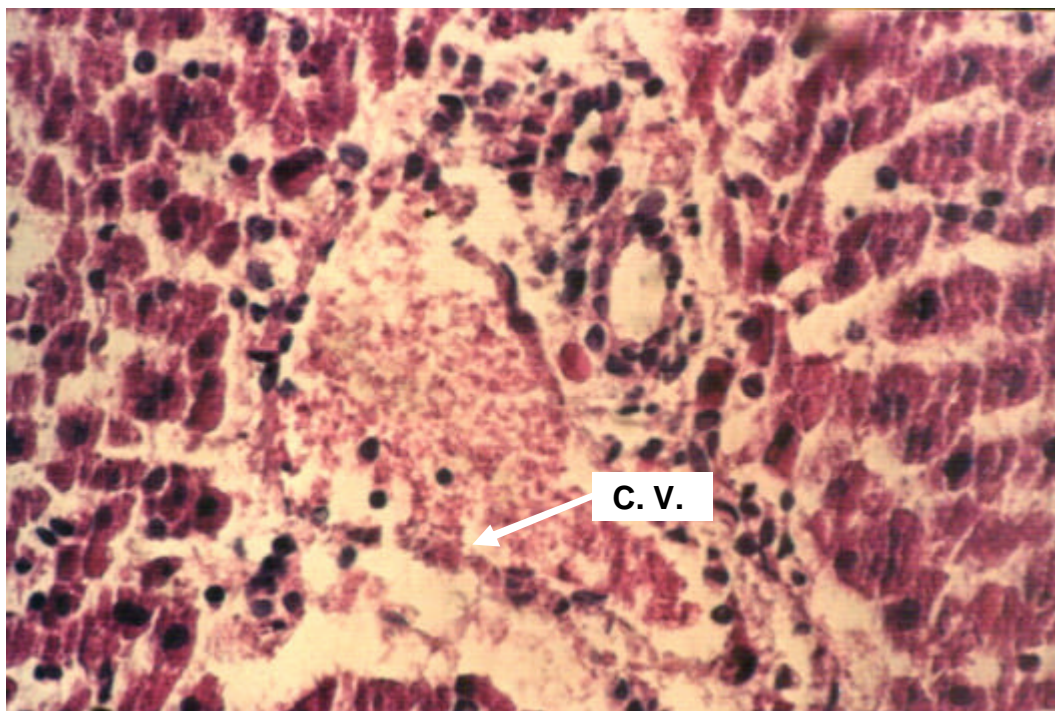
**Figura 40:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **S 9h**, submetido à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 9 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). V.C.L. = Veia centro lobular.

#### 4.2.1.9. Grupo soro 12 horas

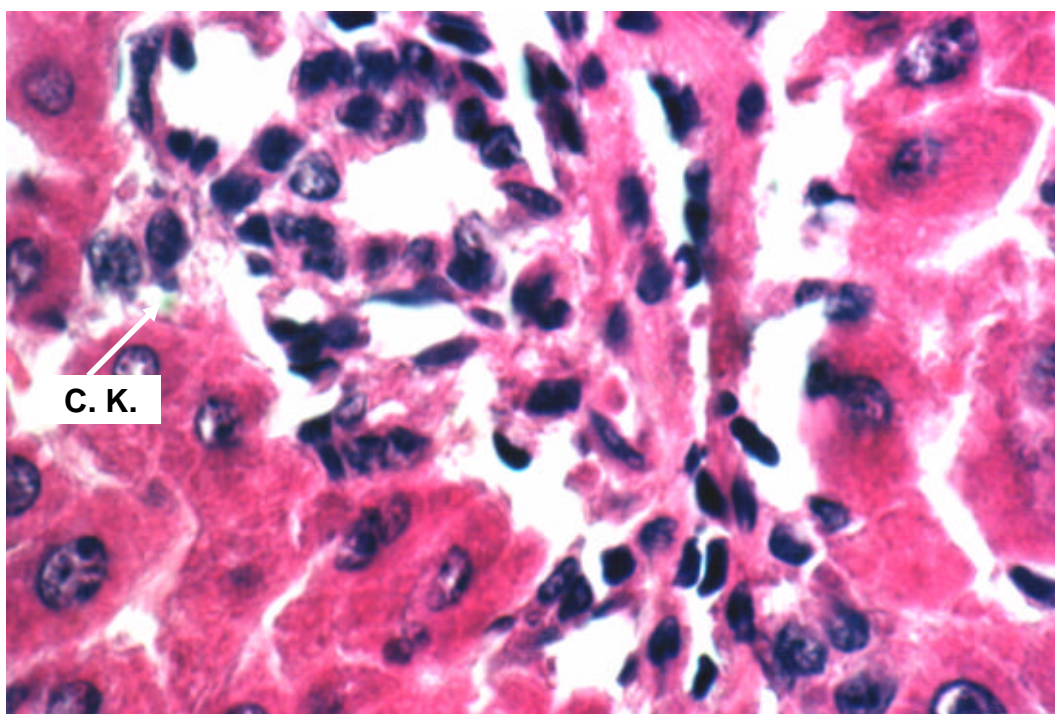
As **figuras 41, 42 e 43** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo soro, submetido à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 12 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas. Na análise histológica destas fotomicrografias, observa-se congestão dos sinusóides e degeneração celular próximo a tríade portal. As fotomicrografias de número 42 e 43 também demonstram alteração do endotélio vascular, necrose e desorganização do cordão de hepatócitos. No aumento de 1000X pode-se observar, também, infiltrado inflamatório discreto e fibrose .



**Figura 41:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **S 12h**, submetido à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 12 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 100X). E.P. = Espaço porta.



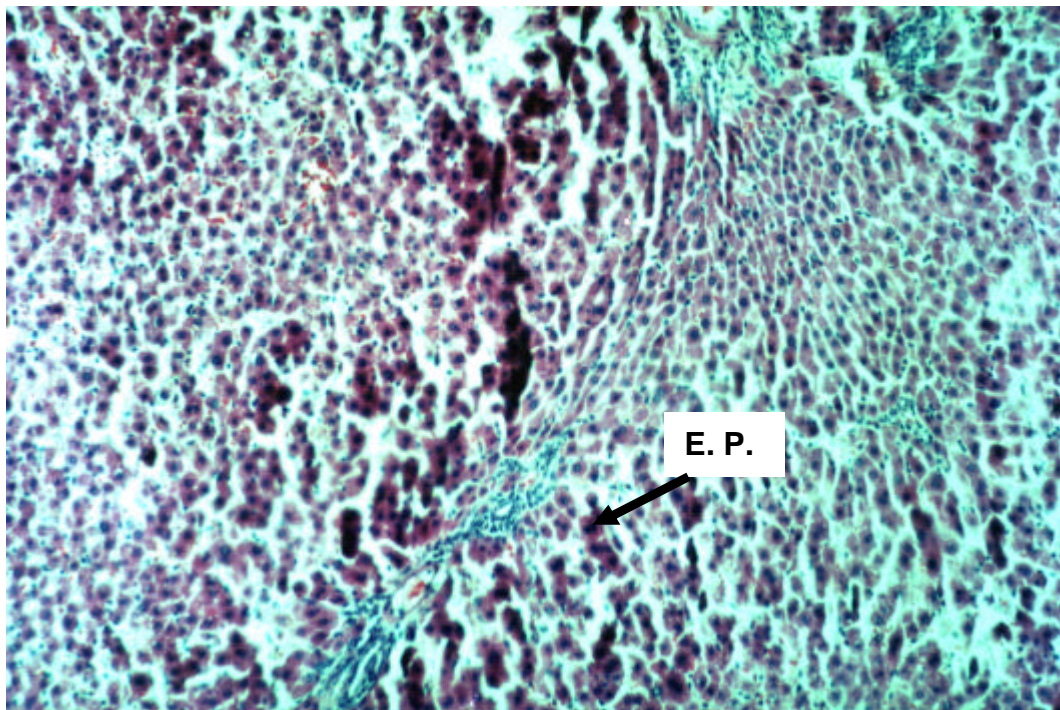
**Figura 42:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **S 12h**, submetido à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 12 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 400X). C.V. = Congestão de vasos.



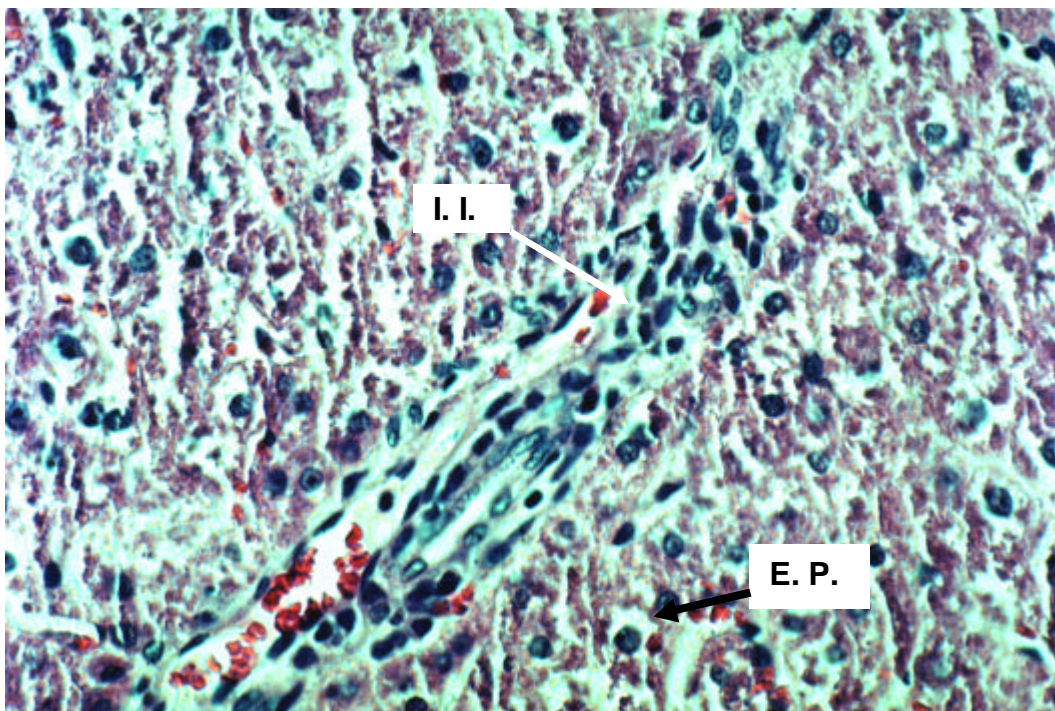
**Figura 43:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **S 12h**, submetido à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 12 horas da administração de salina 0,9% e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). C.K. = Células de Kupffer.

#### 4.2.1.10. Grupo Veneno + Soro 3 horas

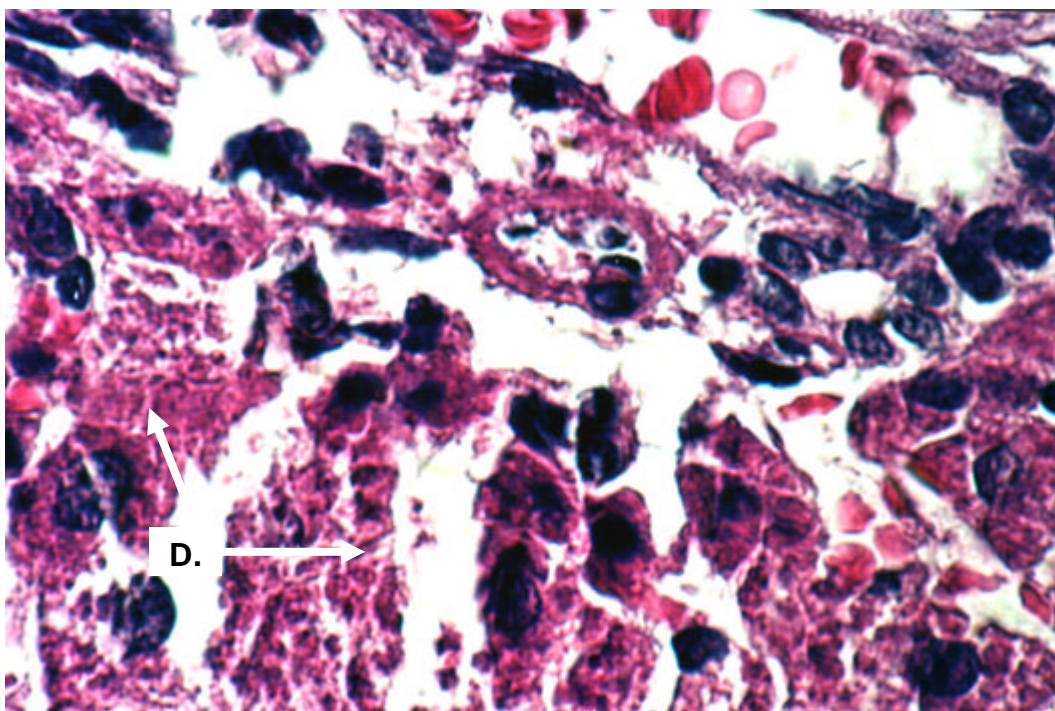
As **figuras 44, 45 e 46** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo veneno + soro, submetido à soroterapia (13µg/Kg) após 3 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg) e sacrificados após 48 horas. A análise histológica destas fotomicrografias, demonstra na maioria das áreas, quebra do cordão de hepatócitos e expansão dos sinusóides. Observa-se área inflamatória periportal, necrose dos hepatócitos e infiltrado inflamatório na fotomicrografia de número 46.



**Figura 44:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V + S 3h**, submetido à soroterapia (13µg/Kg) após 3 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg) e sacrificados após 48 horas (HE 100X). E.P.= Espaço porta.



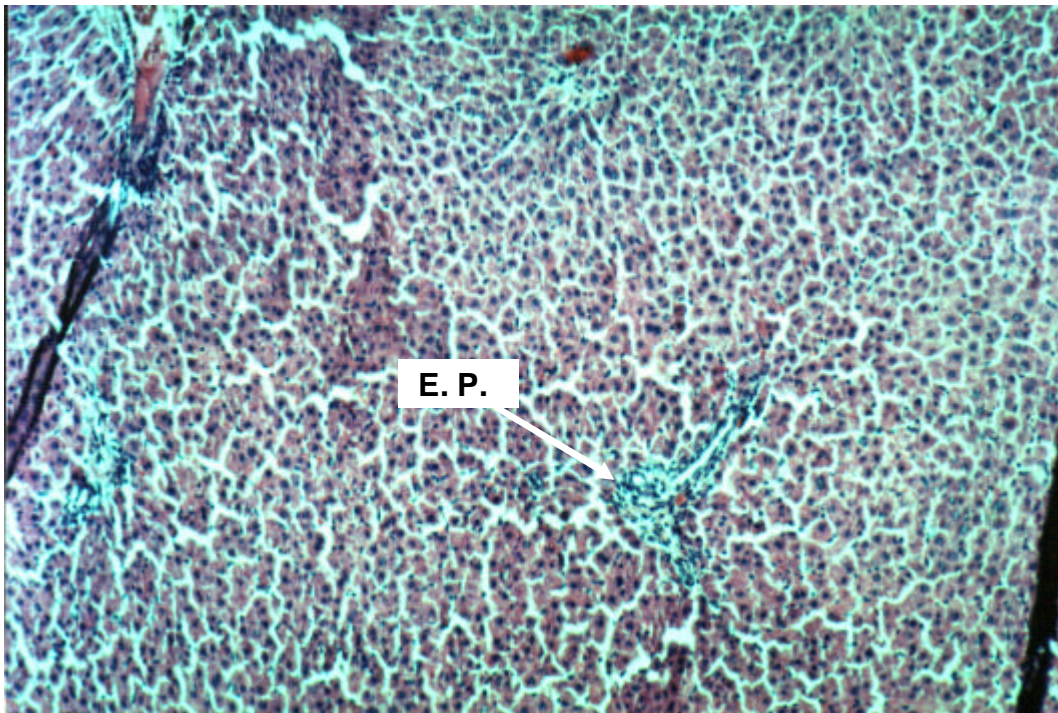
**Figura 45:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V + S 3h**, submetido à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 3 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* ( $200\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) e sacrificados após 48 horas (HE 400X). I.I. = Infiltrado inflamatório; E.P. = Espaço porta.



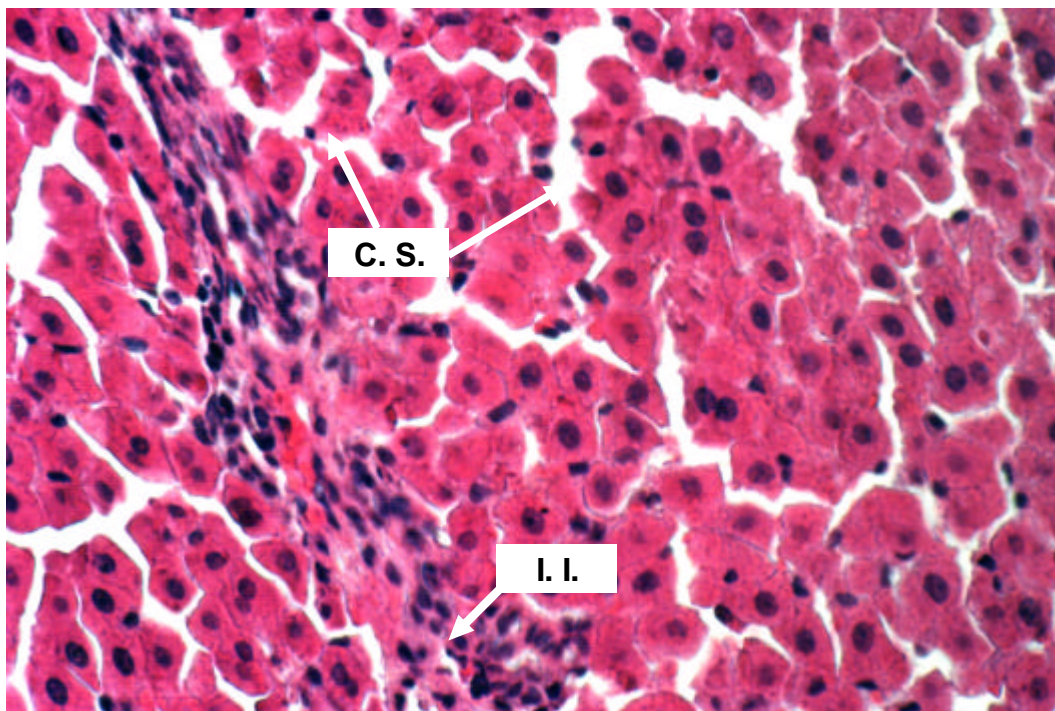
**Figura 46:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V + S 3h**, submetido à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 3 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* ( $200\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). D. = Degeneração.

#### 4.2.1.11. Grupo Veneno + Soro 6 horas

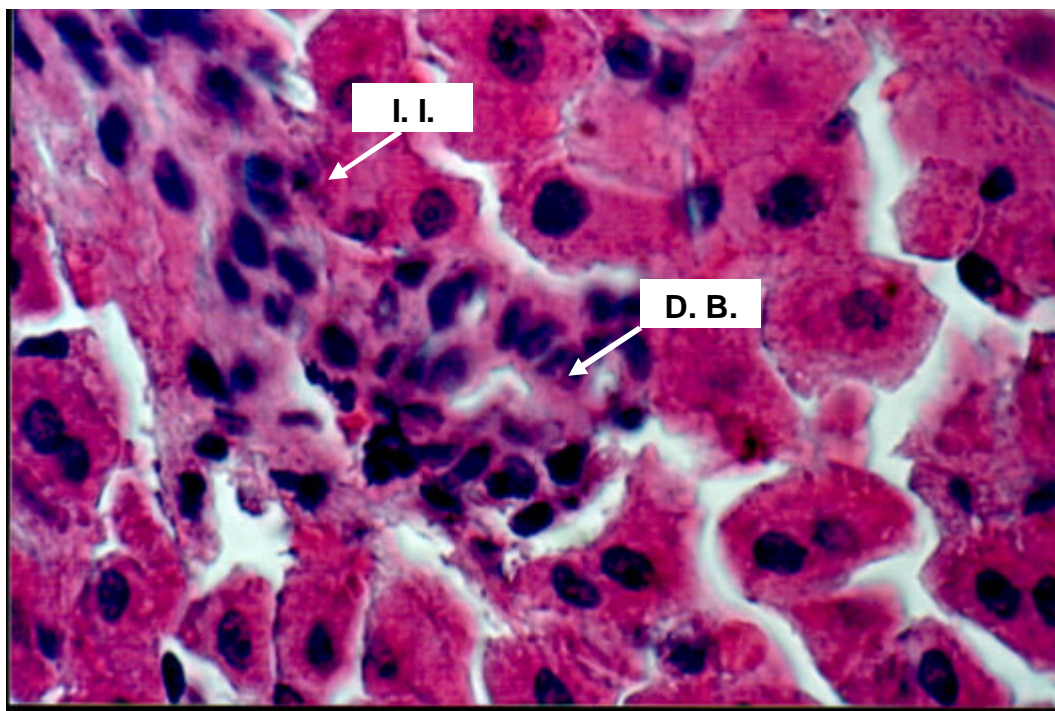
As **figuras 47, 48 e 49** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo veneno + soro, submetido à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 6 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas. A análise histológica destas fotomicrografias, demonstra expansão dos sinusóides e desordem na configuração dos hepatócitos, com algumas células de Kupffer e infiltrado inflamatório principalmente na região próxima ao ducto biliar.



**Figura 47:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V + S 6h**, submetido à soroterapia (13 $\mu$ g/Kg) após 6 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200 $\mu$ g/Kg) e sacrificados após 48 horas (HE 100X). E.P. = Espaço porta.



**Figura 48:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V + S 6h**, submetido à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 6 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* ( $200\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) e sacrificados após 48 horas (HE 400X). C.S. = Congestão de sinusóides; I.I. = Infiltrado inflamatório.

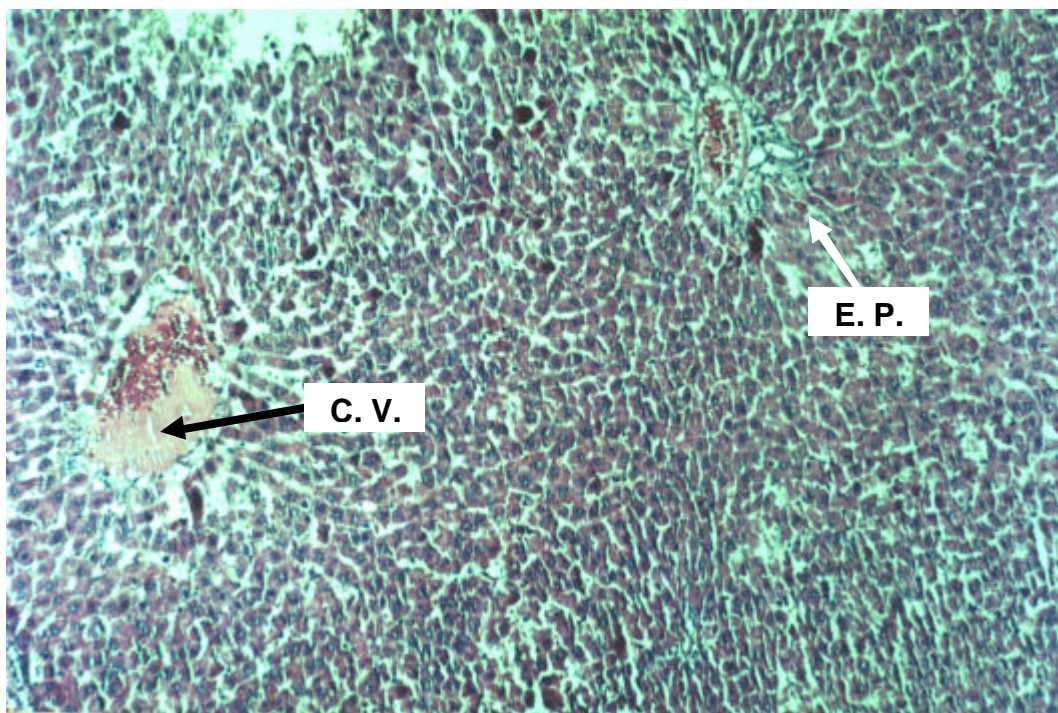


**Figura 49:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V + S 6h**, submetido à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 6 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* ( $200\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). I.I. = Infiltrado inflamatório; D.B.= Ducto Biliar.

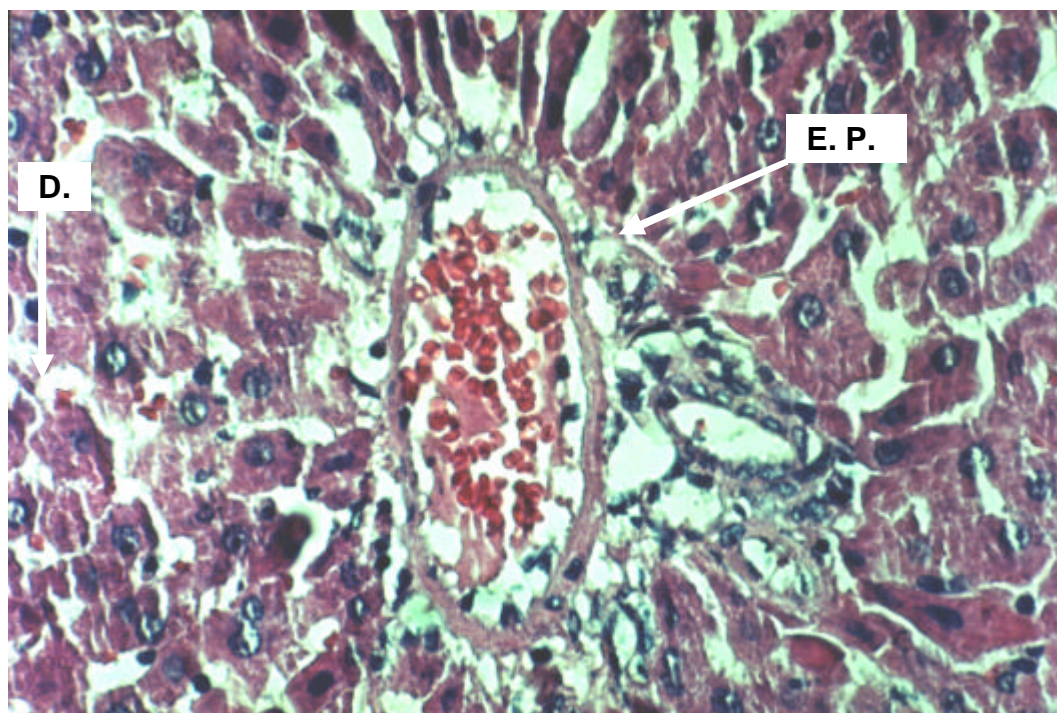


### .2.1.12. Grupo Veneno + Soro 9 horas

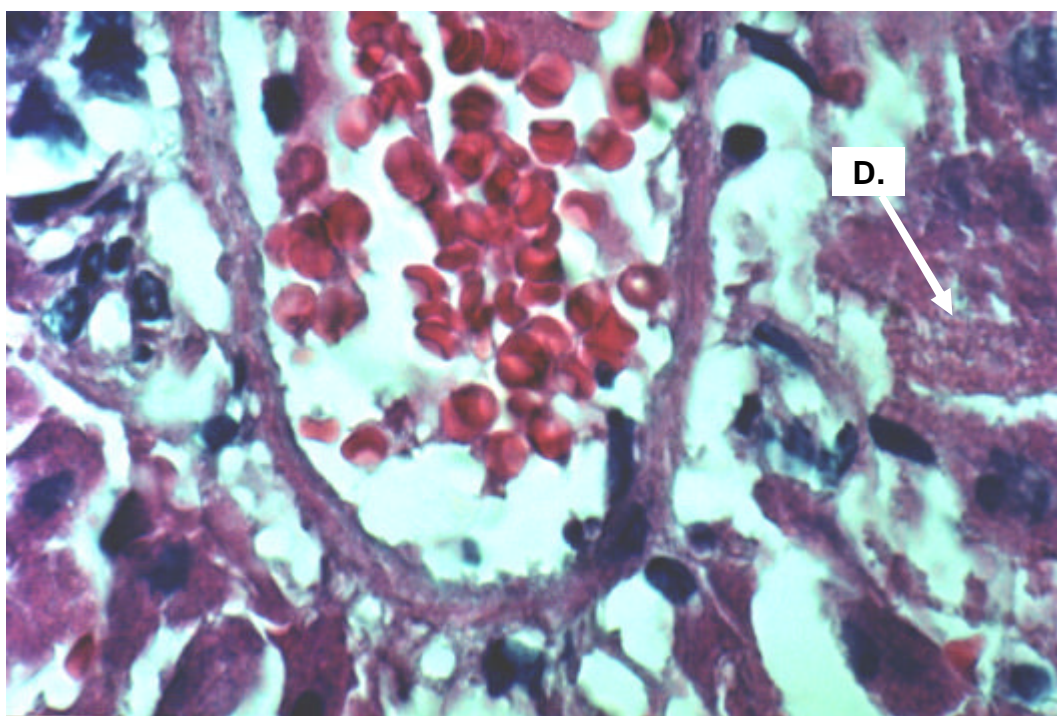
As **figuras 50, 51 e 52** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo veneno + soro, submetido à soroterapia (13µg/Kg) após 9 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg) e sacrificados após 48 horas. A análise histológica da fotomicrografia número 50, demonstra congestão dos vasos da tríade portal e congestão dos sinusóides nas áreas próximas ao espaço porta e veia centro lobular. As outras fotomicrografias revelam necrose, focos de degeneração, congestão do vaso, congestão dos sinusóides e algumas células de Kupffer.



**Figura 50:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V + S 9h**, submetidos à soroterapia (13µg/Kg) após 9 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg) e sacrificados após 48 horas (HE 100X). E.P. = Espaço porta; C.V.= congestão do vaso.



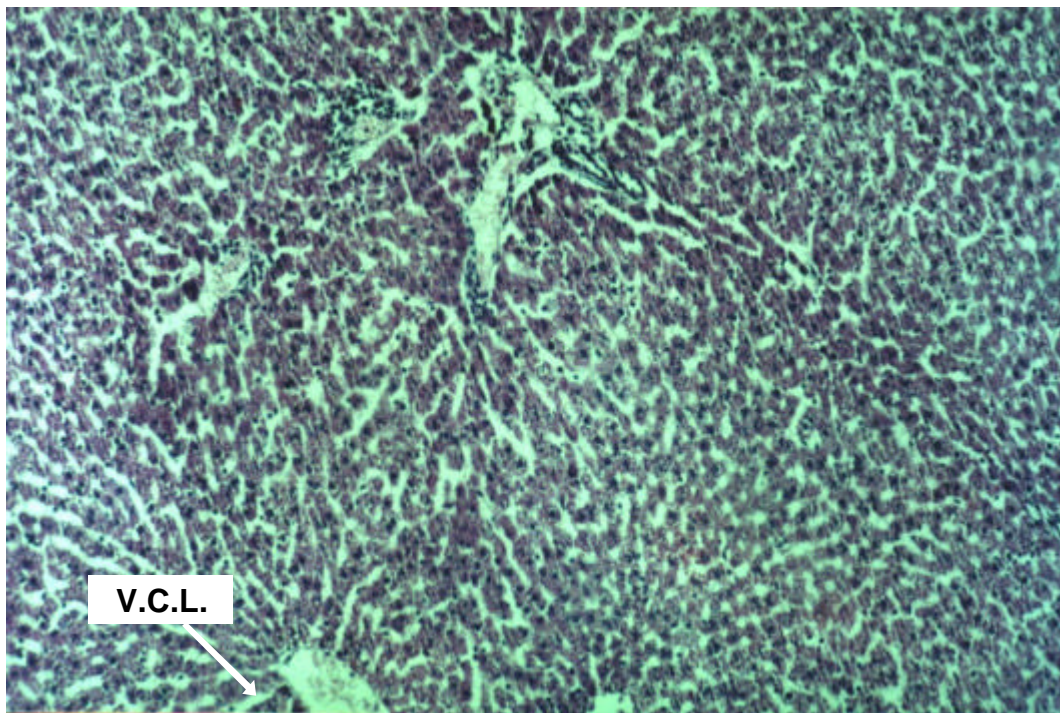
**Figura 51:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V + S 9h**, submetidos à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 9 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* ( $200\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) e sacrificados após 48 horas (HE 400X). E.P. = Espaço porta; D. = Degeneração.



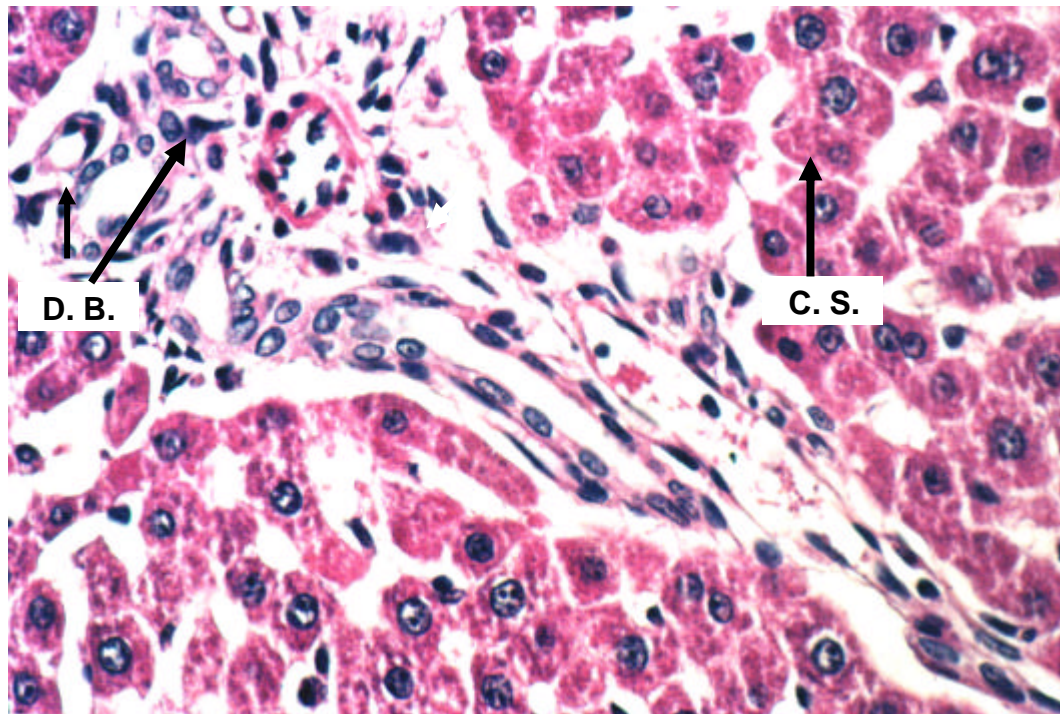
**Figura 52:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V + S 9h**, submetidos à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 9 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* ( $200\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). D. = Degeneração.

#### 4.2.1.13. Grupo Veneno + Soro 12 horas

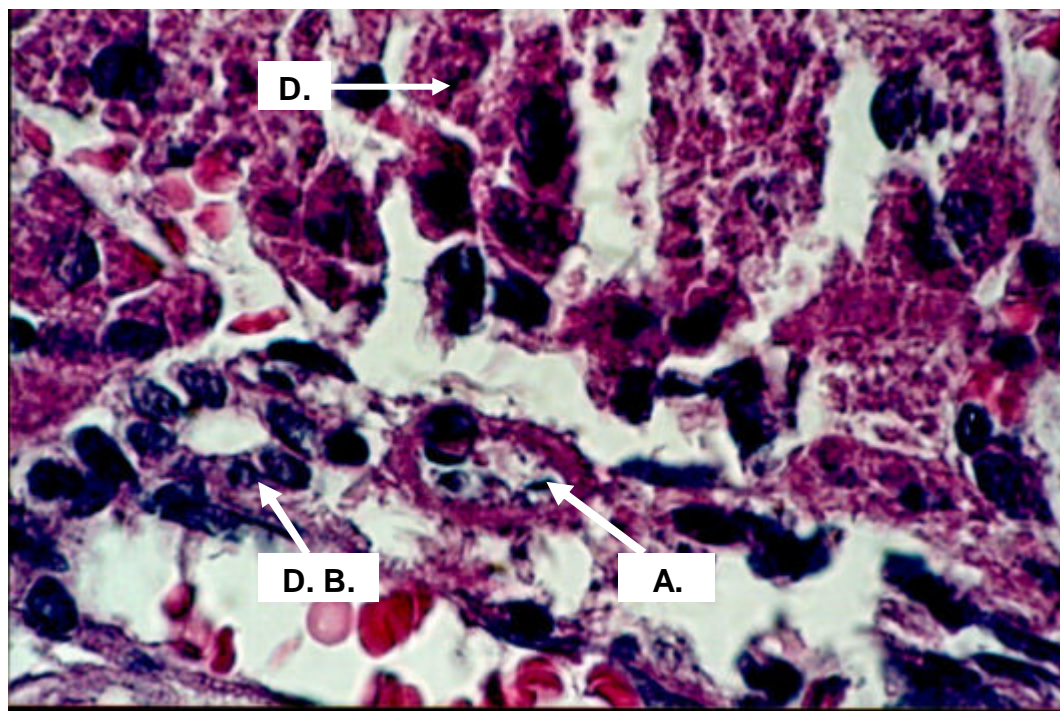
As **figuras 53, 54 e 55** ilustram a visão geral em fotomicrografia de três aumentos (100X, 400X e 1000X) respectivamente, do fígado de rato Wistar do grupo veneno + soro, submetido à soroterapia (13µg/Kg) após 12 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg) e sacrificados após 48 horas. As fotomicrografias revelam extensa congestão dos sinusóides, desorganização dos hepatócitos e vários focos de degeneração, vistos principalmente na fotomicrografia de número 55. Por outro lado, pode-se observar proliferação ductal com epitélio destes ductos biliares bem definidos.



**Figura 53:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V + S 12h**, submetidos à soroterapia (13µg/Kg) após 12 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* (200µg/Kg) e sacrificados após 48 horas (HE 100X). V.C.L. = Veia centro lobular.



**Figura 54:** Fotomicrografia de tecido hepático do grupo **V + S 12h**, submetidos à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 12 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* ( $200\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) e sacrificados após 48 horas (HE 400X). C.S. = Congestão de sinusóides; D.B. = Ducto Biliar



**Figura 55:** Fotomicrografia de tecido hepático de fígado do grupo **V + S 12h**, submetidos à soroterapia ( $13\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) após 12 horas da inoculação do veneno de *C.d.t.* ( $200\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) e sacrificados após 48 horas (HE 1000X). D. = Degeneração; D.B. = Ducto Biliar; A. = Artéria.

## 4.2.2. Avaliação Histológica Qualitativa

		<b>Células de Kupffer</b>	<b>Infiltrado inflamatório</b>	<b>Congestão de vasos</b>
controle		1,15 ± 0,976	1,45 ± 1,207	0,35 ± 0,239
<b>veneno</b>	<b>3h</b>	3,45 ± 1,839	2,60 ± 0,463	2,90 ± 1,042
	<b>6h</b>	4,35 ± 0,450	4,40 ± 0,568	3,90 ± 0,200
	<b>9h</b>	5,70 ± 0,852	3,40 ± 1,936	4,70 ± 0,431
	<b>12h</b>	5,05 ± 0,471	2,40 ± 0,989	5,20 ± 0,694
<b>soro</b>	<b>3h</b>	5,70 ± 0,852	2,50 ± 0,368	5,45 ± 0,576
	<b>6h</b>	6,40 ± 0,884	5,60 ± 1,094	6,55 ± 1,102
	<b>9h</b>	7,10 ± 1,989	6,55 ± 1,523	6,35 ± 1,397
	<b>12h</b>	7,05 ± 1,523	5,40 ± 0,673	6,50 ± 2,263
<b>veneno + soro</b>	<b>3h</b>	6,55 ± 1,628	4,70 ± 0,431	5,60 ± 1,094
	<b>6h</b>	8,05 ± 1,131	3,70 ± 1,168	6,85 ± 2,660
	<b>9h</b>	8,40 ± 1,621	4,60 ± 0,778	8,30 ± 0,957
	<b>12h</b>	7,15 ± 1,292	6,40 ± 2,357	10,0 ± 0

**Tabela 05:** Classificação qualitativa dos aspectos histológicos : células de Kupffer, infiltrado inflamatório e congestão de vasos, encontrados no fígado de ratos Wistar dos grupos estudados. Os dados representam a média ± e.p.m., n=20; p<0,05 quando comparados com o grupo controle. (Teste de Kruskal-Wallis).

		<b>Congestão de sinusóides</b>	<b>Necrose</b>	<b>Degeneração</b>
controle		0,15 ± 0,134	0,05 ± 0,050	0 ± 0
<b>veneno</b>	<b>3h</b>	3,55 ± 1,313	2,55 ± 0,365	2,80 ± 0,484
	<b>6h</b>	2,35 ± 0,450	1,00 ± 0,526	4,05 ± 0,997
	<b>9h</b>	1,35 ± 0,660	1,45 ± 0,471	5,00 ± 0,631
	<b>12h</b>	1,65 ± 1,344	1,05 ± 0,263	6,60 ± 1,094
<b>soro</b>	<b>3h</b>	2,10 ± 0,410	2,20 ± 0,905	5,70 ± 0,747
	<b>6h</b>	2,50 ± 0,894	1,70 ± 0,642	4,90 ± 0,936
	<b>9h</b>	1,90 ± 0,621	1,50 ± 0,789	5,25 ± 0,618
	<b>12h</b>	4,70 ± 0,642	2,60 ± 0,463	5,80 ± 2,589
<b>veneno + soro</b>	<b>3h</b>	3,60 ± 2,042	4,60 ± 0,778	7,60 ± 0,357
	<b>6h</b>	4,05 ± 1,523	4,70 ± 1,273	5,80 ± 0,800
	<b>9h</b>	4,50 ± 0,368	5,60 ± 1,831	7,60 ± 0,357
	<b>12h</b>	8,15 ± 0,871	8,15 ± 0,765	8,10 ± 0,936

**Tabela 06:** Classificação qualitativa dos aspectos histológicos :congestão de sinusóides, necrose e degeneração, encontrados no fígado de ratos Wistar dos grupos estudados. Os dados representam a média ± e.p.m., n=20; p<0,05 quando comparados com o grupo controle. (Teste de Kruskal-Wallis).

A análise histológica qualitativa demonstrou aumento significativo em quase todos os parâmetros e para todos os grupos em relação ao grupo controle. Os grupos inoculados com veneno e soro anticrotálico, em relação aos outros grupos, foram aqueles que no geral, obtiveram os maiores índices. O grupo veneno + soro 12 horas destaca-se entre todos por apresentar, em quase todos os parâmetros analisados, os valores mais elevados.

A degeneração e a necrose foram maiores nos grupos inoculados com veneno + soro em todos os tempos. Todos os grupos tratados mostraram fibrose, entretanto o grau pronunciado de fibrose é encontrado no grupo veneno +soro 12h, veneno + soro 6h e soro 12 horas.

Os grupos soro e veneno + soro em todos os tempos, demonstraram alta incidência de congestão de vasos quando comparados aos demais grupos. Esta característica, no entanto, ainda que ligeiramente mais pronunciada nos grupos citados, foi uma constante em todos os grupos inoculados com soro e anti-soro. A congestão de sinusóides foi maior nos grupos veneno + soro 12h, veneno + soro 9 horas e soro 12 horas.

Outra característica presente nos grupos foi a presença de infiltrado inflamatório. Conforme tabela 05, os grupos de receberam somente soro anticrotálico, em todos os tempos, foram aqueles que apresentaram maiores índices de infiltrado inflamatório.

A administração tanto do veneno quanto do soro promoveu aumento significativo das células de Kupffer em relação ao controle, principalmente nos grupos onde foram administrados soro e anti-soro.

## 5. DISCUSSÃO

A via, a dose, a composição e a forma pela qual o soro anticrotálico é administrado na vítima, podem afetar o tipo de resposta produzido no tecido lesado. (CHIPPAUX, GOYFFON, 1998; BOGARIN et al., 2000) Para mimetizar um acidente crotálico, o veneno utilizado foi obtido de serpentes *C.d.t.* da região do Vale do Paraíba, e o soro anticrotálico empregado é aquele utilizado pelos hospitais da mesma região geográfica e na mesma proporção de dose de neutralização. (BARRAVIEIRA, 1993, 1995)

A fim de avaliar a lesão ocasionada pela administração do soro e do veneno, sem comprometer a vida dos animais, a dose de veneno crotálico escolhido foi inferior a dose letal. A via intramuscular foi utilizada, uma vez que a *Crotalus durissus terrificus* atinge, na grande maioria das vítimas, a região intramuscular ou subcutânea para inocular o veneno. (BATINA, GIGLIO, SAMPAIO, 1997)

O veneno da maioria das espécies de serpentes, após a inoculação, atravessa rapidamente os tecidos superficiais. Em tecidos profundos, o maior nível de concentração é obtido em 2 a 4 horas. Isto explica, a instalação de problemas clínicos, incluindo o dano hepatocelular, na maioria dos experimentos com veneno crotálico, logo na primeira hora após a inoculação do veneno. (CHIPPAUX, GOYFFON, 1998; BOGARIN et al., 2000, BARRAVIEIRA, 1993, 1995)

Os danos hepáticos agudos estão associados a uma elevação das aminotransferases com elevação mínima da fosfatase alcalina, como ocorreu nos grupos experimentais onde foi administrado veneno crotálico, confirmando os achados de Barravieira (1993).



Confirmando os achados acima, as médias mais elevadas dos valores experimentais das aminotransferases nos ratos estudados, foram para os grupos onde foi inoculado veneno, entretanto o maior valor obtido da AST foi no grupo soro 12h ( $171,047 \pm 7,291$  U/L) quando comparados aos demais grupos. Os valores de AST também tiveram um aumento progressivo de acordo com o tempo de exposição do tecido com o veneno ou o soro antiofídico. Para ALT, o maior resultado obtido foi no grupo veneno 9h ( $83,198 \pm 10,944$  U/L).

Teoricamente no dano hepatocelular, quando a membrana dos hepatócitos está danificada, mais aminotransferases são liberadas no soro, estas elevações dramáticas e repentinas da aminotransferases podem acontecer após exposição a venenos. Dentre as aminotransferases, a aspartato aminotransferase é uma enzima particularmente mais sensível nas hepatopatias que a alanina aminotransferase. (GAYOTTO, ALVES, 2001; MOTTA, 2003)

Uma vez que os sinusóides hepáticos não têm membrana basal, e os endotélios apresentam vasta porosidade, as aminotransferases são liberadas destes hepatócitos para o sangue muito rapidamente. Esta disposição anatômica, particular do fígado, é provavelmente o motivo mais importante pelo qual, durante o dano hepatocelular, observa-se uma alteração precoce da concentração enzimática no plasma das aminotransferases, sinalizando o dano agudo causado pela administração do veneno. (GAYOTTO, ALVES; 2001; MOTTA, 2003)

Outro achado bioquímico está relacionado à elevação sérica da fosfatase alcalina depende que nova enzima seja sintetizada, e freqüentemente ocorrem somente 24 a 48 horas após a instalação de um quadro de lesão. (MATTOS, DANTAS, 2003) Desta forma, o aumento da FA, pode evidenciar também o aumento da síntese enzimática nos hepatócitos, na tentativa de restabelecer a homeostasia.

De acordo com Mattos e Dantas (2003), a enzima GGT, que também está relacionada ao dano hepático, tem seus níveis elevados em resposta à indução por medicamentos ou toxinas. Os valores obtidos neste experimento, demonstram que a fosfatase alcalina e a GGT, diferente dos valores das transaminases, teve seus maiores valores nos grupos onde foi administrado anti-soro, com exceção do maior resultado para GGT, que foi obtido pelo grupo veneno 12h ( $135,265 \pm 6,080$  U/L). Para fosfatase alcalina, o maior resultado obtido foi soro 9h ( $135,265 \pm 6,080$  U/L) quando comparados aos demais grupos, tendo a mesma elevação nas análises histológicas quando comparado aos outros tempos de administração; sugerindo um maior dano hepático.

Observando os resultados do experimento, pode-se sugerir que o dano hepático é tanto mais grave quanto maior sua alteração nas estruturas celulares. Na maioria das vezes, sua extensão é diretamente proporcional à concentração do agente tóxico e as anormalidades que envolvem outros sistemas biológicos importantes. (OGA, 1996, MATTOS, DANTAS, 2001; KALIL, COELHO, STRAUSS, 2001)

Avaliando as alterações do tecido hepático dos grupos inoculados com veneno crotálico, supõe-se que um dos mecanismos desencadeadores de lesão hepatocelular no caso de acidente crotálico, pode estar relacionado com a ação da fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno ativando a fosfolipase da membrana plasmática dos hepatócitos. Espécies reativas de oxigênio e toxinas podem interagir com os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidos da membrana dos hepatócitos, elevando a degradação destas membranas lipídicas. (GAYOTTO, ALVES, 2001)

A morte dos hepatócitos pelo mecanismo de necrose é comum em lesões agudas causada por toxinas, sua extensão e localização podem ser úteis na avaliação da intensidade do dano. Da mesma forma, a proliferação dos ductos biliar e alterações na circulação hepática, pode auxiliar no diagnóstico diferencial de várias doenças hepáticas. (MATTOS, DANTAS, 2001; KALIL, COELHO, 1990; ROSS, REITH, ROWRELL, 1993; GAYOTTO, ALVES, 2001)

As alterações do suprimento sanguíneo nos hepatócitos podem, igualmente, atuar como propagador de dano hepático. Algumas toxinas, como é o caso das metaloproteínas presentes no veneno crotálico, aumentam a permeabilidade vascular, uma vez que atua sobre a membrana basal dos vasos, desencadeando prolongamento do tempo de coagulação e alterando o fluxo sanguíneo hepático. (GAYOTTO, ALVES, 2001; MONTEIRO et al., 2001)

Esta alteração de fluxo sanguíneo pode ativar as células de Kupffer a produzirem mais eicosanóides como mecanismo de defesa hepático. Dentre as substâncias liberadas pela ativação das células de Kupffer, destacam-se as prostaglandinas, que podem agir como mensageiros pró-inflamatórios nas lesões provocadas pelo veneno ou pelo soro anticrotálico, desencadeando alterações como aquelas observadas nas figuras 34, 37 e 49. (GAYOTTO, ALVES, 2001; MOTTA, 2003)

Outro achado histológico importante nas lesões hepáticas agudas é o edema, que se origina das ações combinadas de proteases do veneno crotálico, é observado nas análises histológicas dos grupos veneno 3h, 6h, 9h e 12h, grupos veneno + soro 3h, 6h, 9h e 12h. Esta alteração pode estar diretamente relacionada à ação de frações fosfolipídicas que atuam na membrana celular e pela ativação da cascata do complemento, iniciando o processo edematoso no fígado.

Estudos comprovaram que as provas de atividade inflamatória se alteram rapidamente após o acidente ofídico tanto pelo veneno quanto pela administração do soro antiofídico, sugerindo a instalação do processo inflamatório agudo. (BARRAVIEIRA, 1994) Observando os achados histológicos na tabela 05 dos grupos veneno, veneno + soro e soro, pode-se destacar, deste modo, os horários em que o veneno ficou o maior tempo em contato com as células hepáticas, exceto para o grupo veneno 12h, que não apresenta aumento significativo em relação aos outros tempos de administração de veneno. (BARRAVIEIRA, 1993)

Devido à composição dos antivenenos ser basicamente de proteína não humana, o soro anticrotálico pode desencadear reações de hepáticas que causem pequenas alterações celulares, mas que por outro lado, não sejam suficientes para comprometer a homeostasia fisiológica, como a alteração renal provocada pelo veneno crotálico, que leva à insuficiência renal e óbito. Pois apesar dos hepatócitos serem células altamente especializadas, eles possuem uma singular capacidade de regeneração, quando submetidos a trauma por pequenas ressecções ou alterações metabólicas leves. (COELHO, 1990; FAUSTO, 2000) Esta habilidade faz com que os hepatócitos da zona periportal, precursores no processo de regeneração, consigam restabelecer lesões de pequenos traumas. (GAYOTTO, ALVES, 2001) Estas alterações podem ser observadas na histologia do grupo S 3h.

A soroterapia anticrotálica após a inoculação com o veneno da *Crotalus durissus terrificus* nos ratos estudados, proporcionou resultados com significativa diferença em comparação ao controle sem nada. Os mecanismos que eventualmente provocam hepatotoxicidade são diversos, e quando envolvem reação imunológica com anticorpos homólogos, sua fisiopatologia torna-se ainda mais complexa.

Estudos realizados para mensurar o efeito do veneno crotálico em nociceptores de ratos, comprovaram que a capacidade de analgesia do veneno é potencialmente ativa. Todavia, após a administração de soro anticrotálico nestes animais, o antiveneno não foi capaz de interromper a analgesia, supondo-se, desta forma, que qualquer que seja a toxina presente no veneno crotálico com atividade analgésica, não é a mesma que provoca o óbito na vítima de acidentes crotálico. (CHIPPAUX, GOYFFON, 1998; BOGARIN et al., 2000)

Da mesma forma, após a administração de soro anticrotálico foi demonstrada em um estudo envolvendo 112 casos de acidente ofídico, onde 45% destes, apresentaram coagulopatia recorrente mesmo após a

administração de soro anticrotálico. (THEAKSTON, KAMIGUTI, 1998; GREGORY et al., 2000)

Esta dificuldade do soro anticrotálico em neutralizar alguns tipos de ações do veneno pode estar relacionada com a variedade de compostos, o grau de purificação e principalmente os fragmentos de anticorpos presentes na solução, ou mesmo pelas variações intraespecíficas do veneno. (CHIPPAUX, GOYFFON, 1998)

O fato das toxinas do veneno distribuírem-se rapidamente tanto no plasma quanto através dos tecidos, e dos antígenos presentes no soro anticrotálico distribuírem-se fracamente nos tecidos, também pode estar ligada à possível incapacidade do soro antiofídico de neutralizar alguns tipos de lesões teciduais causadas pelo veneno crotálico. (CHIPPAUX, GOYFFON, 1998)

Outro achado relevante refere-se ao possível mecanismo de ação do veneno em relação ao soro anticrotálico, onde não foi observada a elevação dos níveis bioquímicos das enzimas quando associados veneno e soro. A hipótese observada nos resultados das análises bioquímicas, indicam que possivelmente o mecanismo de lesão do veneno não é o mesmo mecanismo de lesão que provoca alterações histológicas e bioquímicas pelo soro anticrotálico. Visto que a grande maioria dos grupos onde são administrados veneno e anti-soro, os valores foram menores ou iguais aos grupos onde foi inoculado somente veneno, como é o caso dos valores da alanina aminotransferase nos tempos 6 horas e 9 horas, que para todos os grupos, demonstrou valores do grupo veneno + soro menores ou iguais ao grupo que recebeu apenas veneno crotálico.

Teoricamente, qualquer toxina que provoque lesão aguda de padrão hepatocelular, utilizada em uma dose acima desta estudada, pode ser responsável pelo agravamento do estado patológico. Desta forma, pode-se dizer que o veneno crotálico bruto, mesmo inferior a dose letal, tem potencial de

desenvolver dano hepático. A elucidação destes mecanismos da toxicidade do veneno, assim como estudos sobre os fatores que modificam a intensidade dos seus efeitos tóxicos, são essenciais para a toxinologia. A utilização desses conhecimentos para o desenvolvimento de antídotos eficientes e das medidas preventivas eficazes, constitui as principais metas na investigação do veneno crotálico.(OGA, 1996)

Apesar da injúria hepática poder ser evidenciada por estudos bioquímicos e histológicos, a fisiopatologia da maioria destas lesões é conhecida de maneira incompleta, principalmente quando são agudas e causadas por um complexo de várias substâncias tóxicas como venenos ou drogas. (MATTOS, DANTAS, 2001; KALIL, COELHO, STRAUSS, 2001; GAYOTTO, ALVES, 2001)

O entendimento do mecanismo molecular e bioquímico de agentes tóxicos bem como o local específico de sua ação e de vital importância para a aplicação de medidas preventivas e terapêuticas nas intoxicações por venenos ofídicos.

## 6. CONCLUSÃO

Com este experimento, pode-se concluir que o veneno da *Crotalus durissus terrificus* frente à ação do soro anticrotálico:

- Tanto o veneno quanto o soro anticrotálico promovem alterações histológicas e bioquímicas no tecido hepático em todos os intervalos de tempo estudados
- O soro anticrotálico quando administrado isoladamente, causa alterações bioquímicas e histológicas
- O soro anticrotálico não impede a instalação da hepatotoxicidade nem promove a regressão do processo lesivo hepático em nenhum dos intervalos de tempo estudados, quando comparado às alterações hepáticas produzidas pelos grupos soro, soro+ veneno e veneno

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, P.; WILFRED, G.; RAMAKRISHNA, B. Oxidative damage to the hepatocellular proteins after chronic ethanol intake in the rat. **Clinica Chimica Acta.**, v. 325, p. 117-125, 2002.

ABRAHAM, P.; WILFRED, G.; RAMAKRISHNA, B. Plasma prolidase may be an index of liver fibrosis in the rat. **Clinica Chimica Acta** v. 295, p. 199-202, 2000.

AGUIAR A. S. et al. Single-step purification of crotopotin and croctactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 30, n. 1, p. 25-28, 1997.

AGUILERA, I. M.; VAUGHAN, R. S. Calcium and the anaesthetist. **Anaesthesia**, v. 55, n. 8, p. 799-790, 2000.

AMITRANO, L.; et al. Coagulation disorders in liver disease. **Seminars in Liver Disease** v. 22, n. 1, p.83-96, 2002.

AMITRANO, L.; et al. Coagulation disorders in liver disease. **Seminars in Liver Disease** v. 22, n. 1, p. 83-96, 2002.

AMORIM, M. F. Intermediate nephron nephrosis from snake poisoning in man. Histopathology Study. **American Journal of Pathology** v. 30, p. 479-499, 1954.

AMORIM, M. F.; BOHM, G. M.; BONTA, I. L. Envenenamento botrópico e crotálico. Contribuição para o estudo comparado das lesões. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 23, p. 63-108, 1951.



AMORIM, M. F.; MELLO, R. F. Nefrose do néfron intermediário no envenenamento crotálico humano. Estudo Anátomo-Patológico. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 24, p. 281-316, 1952.

AMORIM, M. F.; MELLO; R. F.; SALIBA, F. (1969). Lesões renais induzidas experimentalmente no cão pelo veneno crotálico. In: BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos - revisão. **Jornal Brasileiro de Medicina** v. 65, n. 4, p. 209-250, 1993.

ANDRADE, A. O bioterismo. In: **Manual para técnicos em animais de biotério**. Rio de Janeiro, Fiocruz, 1994.

ARAÚJO, M. Ofidismo. In: PITTA, G.B.B.; CASTRO, A. A.; BURIHAN, E. **Angiologia e cirurgia vascular – guia ilustrado** Maceió. UNICISAL/ECMAL p. 1-9, 2000.

AZEVEDO-MARQUES, M. M. et al. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* envenomation in Brazil. **Toxicon** v. 23, n. 4, p. 631-636, 1985.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (south american rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon** v. 25, n. 11, p. 1163-1168, 1987.

AZEVEDO-MARQUES, M. M. et al.. Rattlesnakes bites. Clinical features and complementary tests. **Memórias do Instituto Butantan** suppl. 52, 1990.

BANCHER, W.; ROSA, R. R.; FURLANETTO, R. S. Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervosos, renal, hepático e muscular de *Mus musculus* (Linneus, 1758). **Memórias do Instituto Butantan** v. 47, p. 139-148, 1973.

BARBOSA, R. C. C., et al. Efeitos metabólicos da glutamina em ratos submetidos à queimadura por água fervente (escaldadura) São Paulo: **Acta Cirúrgica Brasileira** v. 18, n. 6, nov./dec, 2003

BARRAVIERA B., et al. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by Bothrops and Crotalus snakes in Brazil. **Journal of Venomous Animals Toxins** v. 1, p. 11-22, 1995

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos - revisão. **Jornal Brasileiro de Medicina** v. 65, n. 4, p. 209-250, 1993

BARRAVIERA, B. Acidentes por animais peçonhentos. In: Meira, D. A.- **Terapêutica das doenças infecciosas e parasitárias**. EPUME, Rio de Janeiro, p. 33-41, 1987.

BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero Bothrops, Lachesis e Micrurus. **Arquivo Brasileiro de Medicina** v. 4, p. 345-355, 1991.

BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do Gênero Crotalus. **Arquivo Brasileiro de Medicina** v. 64, n. 1, p. 14-20, 1990.

BARRAVIERA, B. **Alterações hepáticas no envenenamento ofídico. Estudo clínico em acidentes por serpentes do gênero Bothrops e Crotalus. Estudo experimental em ratos inoculados com veneno de Crotalus durissus terrificus e soro anticrotálico**. Dissertação (Livre Docência) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de São Paulo - UNESP, 1993.

BARRAVIERA, B. et al. A retrospective study of 40 victims of Crotalus snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 22, n. 1, p. 5-12, 1989.

BARRAVIERA, B. et al. Acute - phase reactions, including cytokines, in patients bitten by Bothrops and Crotalus snakes in Brazil. **Journal of Venomous Animals Toxins** v. 1, n. 1, p. 11-22, 1995.

BARRAVIERA, B. et al. Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* snakes in Botucatu (state of São Paulo, Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v. 17, n. 1, p. 63-69, 1995.

BARRAVIERA, B. O ensino dos acidentes por animais peçonhentos nas Escolas Médicas brasileiras. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** p. 203-204, 1992.

BARRAVIERA, B. **Venenos Animais. Uma visão integrada.** São Paulo: Ed. EPUB. 1994

BARRAVIERA, B. **Venenos. Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos** São Paulo: Ed. EPUB, 1999

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P. C. M. Acidentes por serpentes dos gêneros Bothrops, Lachesis e Micrurus. **Arquivo Brasileiro de Medicina** v. 4, p. 345-355, 1991.

BARRIO, A.; BRAZIL, O. Neuromuscular action of the *Crotalus terrificus terrificus* poisons. **Encyclopedic of Pharmacology Therapy** v. 14, p. 145-157, 1972.

BATINA, M. de F. C.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO S. V. Methodological care in the evaluation of the LD50 and of the neutralization of the lethal effect of *Crotalus durissus terrificus* venom by the plant *peschiera fuchsiaefolia* (apocynaceae) **Journal of Venomous Animals Toxins** v. 3, n. 1, 1997

BAYNES, J.; DOMINICZAK M. H. **Bioquímica Médica** São Paulo: Manole, 2000.

BECKINGHAM, I. J.; RYDER, S. D., Investigation of liver and biliary disease. **British Medical Journal**. v. 322, p. 33-36, 2001.

BERCOVICI et al. A systemic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Memórias do Instituto Butantan** v. 49, n. 3, p. 69-78, 1987.

BERGMEYER, H. U. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic enzymes. Part 2: IFCC method for aspartate aminotransferase. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry** 24, 497–510, 1986

BERGMEYER, H. U. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic enzymes. Part 3: IFCC method for alanine aminotransferase. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry** 24, 481–495, 1986

BILZER, M.; GERBES, A. L. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies, **Journal of Hepatology**; v. 32, p. 508-515, 2000.

BOGARIN G. et al. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica **Toxicon** v. 38, p. 1429-1441, 2000.

BONI-MITAKE M. et al. Effects of <sup>60</sup>Co gamma radiation on crotamine **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 34, n. 1, p. 1531-1538, 2001

BRAZIL, V. Peçonhas. In: CORBETT, C. E. **Farmacodinâmica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., p. 1044-1074, 1982.

BRIGATTE P. et al. Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms **Toxicon** v. 39, p. 1399-1410, 2001.

BUCARETCHI F. et al. Snakebites by *Crotalus durissus ssp* in children in Campinas, Sao Paulo -Brazil **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v. 44, n. 3, 2002.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR W. W. **Venomous reptiles of Latin America**. New York: Cornell University Press, 425p, 1986.

CARVALHO M. A.; NOGUEIRA F. Serpentes da área urbana de Cuiabá, Mato Grosso: aspectos ecológicos e acidentes ofídicos associados **Caderno de Saúde Pública** v. 14, n. 4, oct/dec, 1998.

CHANG, C. C.; TSENG, K. H. Effects of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Brazilian Journal of Pharmacology** v. 63, p. 551-559, 1978.

CHIPPAUX, J.-P.; GOYFFON M. Venom, antivenoms and immunotherapy : Review article **Toxicon** v. 36, n. 6, p. 823-846, 1998.

CLISSA, P. B.; NASCIMENTO do N.; ROGERO, J. R. Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays **Toxicon** v. 37, p. 1131-1141, 1999.

COELHO, J. C. U. **Aparelho Digestivo : Clinica e Cirurgia** São Paulo: MEDSI, 1990.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). **Princípios Éticos na Experimentação Animal** São Paulo, 1991.

COSTA, P. I.; et al. Rattlesnake venom: Action upon erythrocytes and leucocytes of rats. **Acta Physiology and Pharmacology Latin-American** v. 39, p. 359-373, 1989

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M., HERING, S. E. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 924-929, 1988

CUPO, P.; et al. Reações de hipersensibilidade imediatas após o uso intravenoso de soros antivenenos: valor prognóstico dos testes de sensibilidade intradérmica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v. 33, p. 115-122, 1991.

EICHBAUM, F. W. Ação dermatotóxica dos venenos ofídicos e sua neutralização pelos antivenenos. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 79-94, 1974.

EVANS, J.; OWNBY C. L. Neutralization of Edema, Hemorrhage and Myonecrosis Induced by North American Crotalic Venoms in Simulated First-Aid Treatments **Toxicon** v. 37, p. 633-50, 1999

FAURE, G. Natural inhibitor of toxic fosfolipase A<sub>2</sub> **Biochimie** v. 82, p. 833-840, 2000.

FAUSTO, N. Liver regeneration **Journal of Hepatology** v. 32, n. 1, p. 19-31, 2000.

FEITOSA, R .F. G. et al. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no estado do Ceará – Brasil **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.30, n. 4, jul/ago, 1997

FERNANDES, H. A. et al. Neutralization of bothropic and crotalic venom toxic activities by IgG (T) and IgGa subclasses isolated from immune horse serum **Toxicon** v. 35, n. 6, p. 931-936, 1997

FLEMING, D. O.; HUNT D. L. **Biological Safety: Principles and practices** 3.ed., ASM Press: Washington, 2000.

FONSECA, M. G. et al. Local edema and hemorrhage caused by *Crotalus durissus terrificus* envenoming evaluated by magnetic resonance imaging (MRI) **Journal of Venomous Animals and Toxins** v. 8, n. 1, 2002

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. Intraespecific variation in the venoms of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 127, p. 23-36, 2000.

FRANCO, R. L. et al. Snakebites in Southern Minas Gerais State, Brazil **Journal of Venomous Animals and Toxins** v. 7 n. 1, 2001

FRANCO, Y. O. **Atividade neurotóxica e miotóxica dos venenos *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararaca* e de suas principais toxinas, perante antivenenos.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 1997.

FRANÇA, R. **Avaliação do efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e diltiazem em fígado de ratos Wistar. Estudo histopatológico e bioquímico.** Dissertação (mestrado) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba- UNIVAP, 2004

FREITAS, J.C. Nomenclatura em toxínologia. Relações com a comunicação química entre organismos e propriedades biológicas das toxinas. **Memórias do Instituto Butantan** v. 53, n. 2, p. 191-195, 1991.

FURTADO, M. F. D.; SANTOS, M. C.; KAMIGUTI, A. S. Age-related biological activity of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins** v. 9, n. 2, 2003.

GALLAGHER, P. G. et al. Use of microarrays for investigating the subtoxic effects of snake venoms: insights into venom-induced apoptosis in human vein endothelial cells. **Toxicon** v. 41, p. 429-440, 2003.

GAYOTTO, L. C. C.; ALVES, V. A. F.; MELLO, E. S. Fígado e Vias Biliares. In: BOGLIOLO. **Patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 643-699, 2001

GOODMAN, S. L.; GILMAN, A. **The pharmacology basis of therapeutics**. 9<sup>ª</sup> ed. 1436 p, 1996

GREGORY, M. B. et al. Recurrent coagulopathy after antivenom treatment of crotalic snakebite. **South Medical Journal** v. 93, n. 6, p. 562-566, 2000.

GUTIÉRREZ-SALINAS, J. et al. Redox state and energy metabolism during liver regeneration: alterations produced by acute ethanol administration **Biochemical Pharmacology** v. 58, p. 1831-1839, 1999.

- HAM, A. W. **Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7. ed, 1977.
- HODGSON, W. C.; WICKRAMARATNA, J. C. In vitro neuromuscular activity of snake venoms. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** v. 29, p. 807-814, 2002.
- JANDROT-PERRUS, M. et al. Adhesion and Activation of Human Platelets Induced by Convulxin Involve Glycoprotein VI and Integrin  $\alpha_2\beta_1$ . **Journal of Biological Chemistry** v. 272, n. 43, p. 27035-27041, 1997.
- JONES, L. M.; BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1000 p, 1987.
- JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Incoagulabilidade sangüínea no acidente crotalico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 21, suppl. 121, 1988.
- JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico por cascavel-sul-americana (*Crotalus durissus*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 1992.
- JUNGERMANN, K.; KATZ, N. Functional specialization of different hepatocyte populations. **Physiology Reviews** v. 69, n. 3, p. 709-764, 1989.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 8. ed, 1995.
- KALIL, A. N.; COELHO, J.; STRAUSS, E. **Fígado e Vias Biliares: Clínica e Cirurgia** Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter LTDA, 2001.
- KANAJI, S. et al. Convulxin binds to native, human glycoprotein Iba **Journal of Biological Chemistry** v. 278, n. 41, p. 39452-39460, 2003.
- KEDDERIS, G. L. Biochemical basis of hepatocellular injury. **Toxicological Phatology** v. 24, n. 1, p. 77-83, 1996.



KEW, M. C. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. **The Lancet** v. 355, p. 591-592, 2000.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poison**, 5. ed, New York: McGRAW-HILL, cap. 13 e 25, 1999.

KRIFI, M. N.; AYEB, M. EL; DELLAGI, K. The improvement and standarization of antivenom production in developing countries: comparing antivenom quality, therapeutical efficiency and cost **Journal of Venomous Animals and Toxins** v. 5, n. 2, 1999.

KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. **Patologia Básica** 5. ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1994

LAPPONI, J. C. **Estatística usando Excel**. São Paulo: Lapponi Treinamento e Editora, 2000.

**LEI nº 6638 de 8 de maio de 1979. Brasília, Diário Oficial da União de 10/5/79**, Estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseccção de animais e determina outras providências, 1979

LIMA, A. O. et al. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

LIPPS, B. V. Novel snake venom proteins cytolytic to cancer cells in vitro and in vivo systems **Journal of Venomous Animals and Toxins** v. 5, n. 2, 1999.

MADY, E. A. Antitumor and biochemical effects of Echis coloratus crude venom on ehrlich ascites carcinoma cells in vivo **Journal of Venomous Animals and Toxins** v. 8, n. 2, 2002.

MAGRO, J. A. et al. Intraspecific variation in the venom electrophoretic profile of recently captured *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7,n. 2, 2001.

MANCIN, C. A. et al. The analgesic activity of crotamine a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (south american rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study **Toxicon** v. 36, n. 12, p. 1927-1937, 1998.

MANDEBAUN, F. R.; REICHL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). **Toxicon** v. 20, p. 955-972, 1982.

MANTOVANI, M. et al. Isquemia e reperfusão hepática total associada ao estado de choque hemorrágico controlado: Efeitos no seqüestro de neutrófilos no pulmão do rato **Acta Cirúrgica Brasileira** v. 17, n. 1, 2002

MARTINS, A. M. C. et al. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon** v. 36, n. 10, p. 1441-1450, 1998.

MARTINS, A. M. C. et al. Renal effects of supernatant from macrophages activated by *Crotalus durissus cascavella* venom: the role of phospholipase A2 and cyclooxygenase. **Pharmacological Toxicology** v. 92, p. 14-20, 2003.

MARTINS, M. J.; NEGRÃO, M. R.; HIPÓLITO-REIS, C. Alkaline phosphatase from rat liver and kidney is differentially modulated. **Clinical Biochemistry** v. 34, p. 463-468, 2001.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1477, p. 146-156, 2000.

MATSUZAWA, T. et al. Microheterogeneity and intrahepatic localization of human and rat liver cytosolic alanine aminotransferase. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1340, p. 115-122, 1997.

MATTOS de, A. A.; DANTAS, W. **Compêndio de Hepatologia** São Paulo: Fundação Byk, 2. ed., 2001

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos** Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 131p., 2001.

MONTEIRO, H. S. A. et al. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 43, p.1347-1352, 2001.

MOREIRA, E. G. et al. Effect of gamma irradiation on the behavioral properties of crotoxin **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 30, n.2, p. 245-249, 1997

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: Métodos e Interpretações** 3 ed. Porto Alegre: Médica misiau, 2003.

NOGUEIRA, D. M. et al. **Métodos de Bioquímica Clínica - técnica e interpretação**. São Paulo: Pancast. p. 327-335, 1990.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia** São Paulo: Atheneu, 1996.

OLIVEIRA, I. M. V. et al. Relationship between liver GGT activity and glutathione content in chronic-malnourished pups of adolescent rats. **Nutrition Research** v. 20, n. 1, p. 103-111, 2000.

OWU, D. U.; OSIM, E. E.; EBONG, P. E. Serum liver enzymes profile of Wistar rats following chronic consumption of fresh or oxidized palm oil diets. **Acta Tropical** v. 69, p. 65-73, 1998.

PEREIRA, I. D.; PINHO, F. M. O. Ofidismo- revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira** v.47, n.1, p. 24-29, 2001.

PEREIRA, P. C. M.; ARAKAKI, D. Acidentes por serpentes venenosas. Estudo clínico e epidemiológico de 196 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 21, suppl. 117, 1988.

POLGÁR, J. et al. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor **Journal of Biological Chemistry** v. 272, n. 21, p. 13576-13583, 1997.

PRADO-FRANCHESCI, J. On the pharmacology of convulxin and gyrotoxin. **Memórias do Instituto Butantan** v. 52, p. 25-26, 1990.

RANGEL-SANTOS, A. C.; MOTA, I. Effect of heating on the toxic, immunogenic and immunosuppressive activities of *Crotalus durissus terrificus* venom **Toxicon** v. 38, p. 1451-1457, 2000.

REZENDE de, N. A. et al. South american rattlesnake bite (*Crotalus durissus terrificus* sp) without envenoming: insights on diagnosis and treatment **Toxicology** v. 36, n. 12, p. 2029-2032, 1998

REZENDE de, N. A. et al. Functional and histopatological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 22: p. 407-416, 1989.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T.; IVERSSON, L. B. Epidemiologia do acidente por serpentes peçonhentas: estudo de casos atendidos em 1988. **Revista de Saúde Pública** v. 29, n. 5, 1995

RODRIGUES, L. E. A. **Enzimologia Clínica**. Rio de Janeiro: Revinter, 157 p., 2001

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia : texto e atlas** Editora Panamericana: São Paulo, 2. ed, 1993

SAMPAIO, S. C. et al. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon** v. 41, n. 7, p. 899-907, 2003.

SANCHES, E. E. et al. The efficacy of two antivenoms against the venom of North American snakes **Toxicon** v. 41, n. 3, p. 357-365, 2003

SANO-MARTINS, I. S. et al. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) **Quarterly Journal of Medicine**, v. 94, p. 551-559, 2001.

SANTORO, M. L. et al. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*) **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 122, p. 61-73, 1999.

SCHAFFNER, J. A.; SCHAFFNER, F. Avaliação das condições do fígado. In: HENRY, R. J. **Bioquímica Clínica**. Barcelona: Ed. Jims, 1969.

SELLS, P. G. Animal experimentation in snake venom research and in vitro alternatives. **Toxicon** v. 42, p. 115-133, 2003.

SGARBI, L. P. S. et al. Human envenomations due snakebites in Marília, state of São Paulo, Brazil. A retrospective epidemiological study. **Journal of Venomous Animals and Toxins** v. 1, p. 71-74, 1995.

SHERLOCK, S. **Diseases of the liver and biliary system** London: Blackwell. p. 304-333, 1999

SHIBUTANI, M. Artificial Ventilation and Perfusion Fixation In The Laboratory Rat In: SHIBUTANI, M. **Anesthesia** London: Academic Press, 2000.

SILVA, R. J.; FECCHIO J. DA; BARRAVIEIRA, B. Effect of *Crotalus durissus terrificus* (LAURENTI, 1768) venom on the evolution of ehrlich ascites tumor **Journal of Venomous Animals and Toxins** v. 3, n. 2, 1997

SOARES, M. A. et al. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase  $A_2$  subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake

venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 33, p. 877-888, 2001.

SOKOL, R. et al. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. **Pediatric Research** v. 49, p. 519-531, 2001.

SRIBAR, J. et al. A high affinity acceptor for phospholipase A<sub>2</sub> with neurotoxic activity is a calmodulin **Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 16, p. 12493-12496, 2001.

SULKOWSKI, E.; BJÖRK, W.; LASKOWSKI, M. S. A specific and non-specific alkaline phosphatase in the venom of *Bothrops atrox* and their occurrence in the purified venom phosphodiesterase. **Journal of Biological Chemistry** p. 238: 2477, 1963.

TANIZAKI, M. M.; OLIVEIRA, E. P.; MANDELBAUN, F. R. Purification and specificity of protein inhibitor isolated from the plasma of *Bothrops jararaca*. **Archive of Biological Technology** v. 32, n.1, p. 146, 1984.

TEIXEIRA, G. N.; **Caracterização da hepatotoxicidade produzida pelo veneno da cascavel da região do Vale do Paraíba em fígado de ratos Wistar. São José dos Campos** Dissertação (mestrado) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP, 2003

THEAKSTON, R. D. G.; KAMIGUTI A. S. Viper envenoming: evaluation of treatment by restoration of haemostasis and venom clearance **Journal of Venomous Animals and Toxins** v. 4, n. 2, 1998.

THEAKSTON, R. D. G. et al. Snake venom antibodies in Ecuatorian Indians. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, p. 199-205, 1981

THEOCHARIS, E. S. et al. Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study **Toxicology** v. 161, p. 129-138, 2001.

THOMAZINI, I.; IUAN, F. C. Evaluation of platelet function and serum fibrinogen levels in patients bitten by snakes of genus *Crotalus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v. 33, n. 3, p. 219-220, 1991.

THOMAZINI-SANTOS, A. et al. The evaluation of clotting time in bovine thrombin, Reptilase® and thrombin-like fraction of *Crotalus durissus terrificus* venom using bovine, equine, ovine, bubaline and human **Journal of Venomous Animals Toxins** v. 4, n. 2, 1998

TOLMAN, K. G. Eicosanoids and the liver: Review article **Prostaglandins & other Lipid Mediators** v. 61, p. 163–174, 2000

TROYANO, J. C. et al. Blood biochemical profile of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) in captivity **Journal of Venomous Animals Toxins** v. 7, n. 2, 2001.

VALENTE, R. H.; et al. Mitochondrial swelling and oxygen consumption during respiratory state 4 induced by phospholipase A<sub>2</sub> isoforms isolated from the south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom **Toxicon** v. 36, n. 6, p. 901-913, 1998.

WAJCHENRG, B. L.; SESSO, J.; INAGUE, T. Feições clínico-laboratoriais do envenenamento crotálico humano. In: BARRAVIERA, B. et al.. Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (LAURENTI, 1768) snakes in Botucatu (state of São Paulo, Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v. 17, n. 1, p. 63-69, 1995.

YAMANE, M; ABE A. High-performance liquid chromatography-thermospray mass spectrometry of 5,6-dihydroxyeicosatrienoate-1,5-lactone from tissue homogenates **Journal of Chromatography** p. 678:339-343, 1996.

ZHENG, Y. M. et al. Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor  $\gamma$ -chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen **Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 16, p. 12999-13006, 2001.