

Perfil hematológico de bovinos experimentalmente inoculados com veneno de *Bothrops alternatus*

(Blood profile cattle experimentally inoculated with *Bothrops alternatus* venom)

Neide Judith Faria de Oliveira,* Eduardo Lara Ribeiro,* Maria Lúcia,** Marília Martins Melo*

Resumo

Apesar de ser alto o número de acidentes ofídicos em bovinos, as alterações hematológicas e bioquímicas séricas são pouco estudadas, especialmente nas três primeiras semanas após o envenenamento. Diante deste contexto, objetivou-se nesta pesquisa caracterizar o perfil hematológico e bioquímico sérico de bovinos após a inoculação experimental do veneno de *Bothrops alternatus*. Cinco novilhas mestiças de peso corporal entre 188 e 278kg e idade de 12 a 18 meses receberam na altura média da face cranial do membro anterior direito, entre as articulações umerorradioulnar e do carpo, por via intramuscular superficial, 0,15mg/kg de veneno de *Bothrops alternatus* diluído em salina. Coletou-se sangue de todos os animais antes (tempo zero) e as 3, 8, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 405 e 576 horas após inoculação do veneno para avaliação do hemograma, coagulograma e dosagem de proteína total, albumina, globulinas, ureia, creatinina, creatina fosfotransferase, aspartato aminotransferase e gama glutamiltransferase. O veneno de *B. alternatus* causou intoxicação grave nos bovinos, e foi letal para dois animais às 53 horas e 78 horas. As alterações hematológicas observadas foram: anemia normocítica normocromica, leucocitose com neutrofilia com desvio para esquerda regenerativo, linfocitose, aumentos dos tempos de coagulação, de protrombina e de tromboplastina parcial ativada, trombocitopenia e elevação da ureia e das enzimas CPT e AST.

Palavras-chave: bovino, *Bothrops alternatus*, perfil hematológico, bovinos, envenenamento.

Abstract

Despite the high number of *Bothrops* envenomation in cattle, the hematological and biochemical changes are poorly known mainly in the first few weeks after the poisoning. In this context, the aim of this study was to evaluate the bovine blood profile after *B. alternatus* envenomation. Five crossbred heifers were inoculated with *B. alternatus* venom (0.15mg/kg) diluted in saline solution, by intramuscular injection, in the mean height of the cranial side of right forelimb, between the joints umer-radio-ulnar and carpus. The blood was collected before the beginning of the experiment (zero time) and at 3, 8, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 405 e 576 hours after inoculation, in order to evaluate the hemogram, coagulogram, total protein, albumine, globulins, urea, creatinine, creatinine phosphokinase (CPT) and aspartate aminotransferase. The *B. alternatus* venom caused a serious envenomation in cattle and was lethal for two animals at 53 and 78 hours. The blood profile alterations were normocytic and normochromic anaemia, leucocytosis with neutrophilia, lymphocytosis, coagulation time increased, thrombocytopenia and elevation in the urea, CPT and AST enzymes.

Keywords: *Bothrops alternatus*, bovine, blood profile, envenomation.

Introdução

A serpente *Bothrops alternatus*, conhecida como urutu cruzeira ou boicotiara possui um dos venenos botrópicos mais letais, sendo o terceiro mais tóxico entre as serpentes, após *Crotalus durissus terrificus* e *B. jararaca* (Roodt et al., 2000).

Existem poucos estudos epidemiológicos na Medicina Veterinária (Ferreira Jr. e Barraviera, 2004) e as espécies de animais domésticos mais sensíveis ao veneno botrópico são, em ordem decrescente: bovinos, equinos, ovinos, caninos, suínos e felinos (Araújo e Belluomini, 1960-62). Bovinos

adultos são mais resistentes que os jovens e as picadas de serpentes ocorrem com maior frequência nos membros e na região da cabeça (Biondo et al., 1993; Menezes, 1995).

Venenos botrópicos alteram o hemograma, como consequência da ação trombina-símile, da atuação sobre a agregação plaquetária, da ativação dos fatores da coagulação e da toxicidade vascular de frações do veneno, ocorrendo hemoconcentração transitória. Porém, devido à diátese hemorrágica instalada local e sistemicamente, é evidente a anemia severa que ocorre posteriormente (Theakston e Kamiguti, 1998).

* Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais. Caixa Postal 567 – 30123-970 – Belo Horizonte, MG.

** Departamento de Biologia – UNIFENAS – Alfenas, MG

O veneno botrópico causa hemólise *in vitro* (Kellen et al., 1960-62; Rosenfeld et al., 1960-62) e as fosfolipases A₂ (PLA₂) presentes no veneno, além da citotoxicidade vascular e coagulação intravascular disseminada (CID) podem predispor a hemólise descrita em camundongos (Chaves et al., 1992) e cães (Santos et al., 2003).

A extensa inflamação local causada no envenenamento botrópico influencia o leucograma de cães, resultando em leucocitose, neutrofilia e desvio a esquerda regenerativo (Santos et al., 2003, Ferreira Jr. e Barraviera, 2004).

O veneno botrópico ativa a hemostasia, provocando coagulopatia e trombopatia (Tanjoni et al., 2003), mais severas em picadas de serpentes jovens. Os acidentes botrópicos provocam incoagulabilidade sanguínea, hipofibrinogenemia, aumento dos produtos de degradação da fibrina e fibrinogênio (PDFs) e redução da antiplasmina; prolongamentos dos tempos de protrombina (TP), de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e de coagulação (TC), além do consumo dos fatores de coagulação V e VIII (Bogarín et al., 2000, Jácome et al., 2002).

Os efeitos locais e sistêmicos do veneno botrópico em diferentes órgãos e tecidos determinam as alterações bioquímicas séricas (Otero et al., 2002).

Apesar de existirem diversas pesquisas sobre as frações dos venenos e seus efeitos (Oliveira et al., 2007), a literatura é escassa quanto aos achados laboratoriais dos envenenamentos ofídicos, especialmente nos bovinos. Provavelmente, nesses, a maioria dos acidentes ofídicos seja causada por serpentes do gênero *Bothrops* (Ferreira Jr. e Barraviera, 2004).

Considerando que o bovino é uma das espécies mais sensíveis ao veneno ofídico, e que a sua taxa Mielóide: Eritróide é menor que 1, buscou-se nesta pesquisa caracterizar o perfil hematológico e bioquímico de bovinos após a inoculação experimental do veneno de *Bothrops alternatus*.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG onde os animais ficaram alojados em galpão de alvenaria, contidos num sistema tipo *tie stall*, recebendo dieta balanceada composta por ração comercial para novilhas¹ e silagem de milho, água e mistura mineral² *ad libitum*.

Foram utilizadas cinco novilhas mestiças das raças Holandês/Zebu, peso corporal entre 188 a 278kg e idade de 12 a 18 meses, previamente desverminadas com ivermectina³ e vacinadas contra febre aftosa,⁴ raiva⁵ e clostridioses⁶ com as doses determinadas pelo fabricante.

O veneno cristalizado da serpente de *B. alternatus* foi armazenado a -20°C e ressuspendido em solução salina

(0,9%)⁷ para a inoculação nos bovinos. Injetou-se 0,15mg/kg do veneno por kg de peso corporal segundo Araújo e Belluomini (1963), por via intramuscular superficial, na face cranial do membro anterior direito, entre as articulações umerorradiulnar e do carpo. Para garantir a penetração exata em todos os animais, as agulhas foram introduzidas na profundidade de 6mm, usando dispositivo de esparadrapo adaptado à agulha, conforme técnica utilizada por Lago et al. (2001).

Nos tempos antes (0h) e depois da inoculação do veneno (3, 8, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 408 e 576 horas) coletou-se sangue por punção da veia jugular, com agulha e tubos tipo *vacutainer* que foi acondicionado em: (a) tubo contendo sal dissódico do ácido etileno diaminotetracético (EDTA) a 10% para realização do eritrograma e da contagem do número de leucócitos; (b) tubo contendo citrato de sódio a 10%, para realização do Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) e fibrinogênio; (c) tubo sem anticoagulante para avaliar o Tempo de Coagulação (TC) a 37°C e (d) tubo sem anticoagulante para a obtenção do soro destinado às análises bioquímicas.

A contagem de eritrócitos leucócitos totais, dosagem de hemoglobina, determinação do volume globular e cálculo dos índices hematimétricos: volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) foram realizadas em contador eletrônico.⁸

As plaquetas (método indireto de Fonio) e a contagem diferencial de leucócitos foram feitas nos esfregaços sanguíneos depois de fixados e corados por May Grunwald-Giemsa. Utilizou-se a colorimetria⁹ para a dosagem de asparto aminotransferase (AST), creatina fosfotransferase (CPT), gama glutamiltransferase (GGT), proteína total (PT) e albumina, e por diferença entre a PT e albumina, obtiveram-se as globulinas (Thrall, 2003).

Mediram-se TP e TTPA pela coagulação do plasma nos métodos de Quick modificado¹⁰ e pela formação do coágulo plasmático na presença de ativador e fosfolípidos recalcificados com cloreto de cálcio,¹¹ respectivamente. Estimou-se por colorimetria o fibrinogênio, pelo método de Ratnoff e Menzie (1959) modificado e o TC, segundo Lee e White (1913).

O experimento, delineado em blocos ao acaso, teve no tempo zero uma linha basal de referência, sendo os animais (blocos) seus próprios controles e os horários antes e depois da inoculação, os tratamentos, numa resposta de fluxo continuado. Todos os dados obtidos foram submetidos a análise de variância normal e de regressão, utilizando-se os sistemas para análises estatísticas com o *Softwear* SAS e SAEG. As médias foram comparadas utilizando-se os testes de Student-Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade conforme Sampaio (2007).

¹ Ração Novilhas Itambé® 16%PB

² Fosbovi 20®, Tortuga.

³ Ranger® - Vallée S A – Produtos Veterinários.

⁴ Bovicel® - Vallée S A – Produtos Veterinários.

⁵ Raivacel® - Vallée S A – Produtos Veterinários.

⁶ Polistar® - Vallée S A – Produtos Veterinários.

⁷ Cloreto de sódio 0,9% – Hypofarma.

⁸ VET ABX™ - Diagnostics.

⁹ Bioclin- Kits comerciais

¹⁰ Fischer Diagnostics

¹¹ Human In vitro Diagnóstica/SA

Resultados e discussão

Observou-se hemólise macroscópica às 24 e 48 horas após a inoculação experimental do veneno de *B. alternatus* em todos os bovinos deste experimento. A hemólise também foi descrita em cães (Sano-Martins et al., 1995; Takahira, 1999; Santos et al., 2003) e em ratos expostos ao veneno botrópico (Chaves et al., 1992). O aumento da fragilidade eritrocitária e a hemólise indireta no envenenamento botrópico podem ser causados pela PLA₂, como ocorre em acidentes com outras serpentes (Segev et al., 2004), alterações vasculares tóxicas, distúrbios hemodinâmicos da coagulação intravascular disseminada (CID) e ativação do sistema do complemento (Farsky et al., 2000), apesar de o efeito hemolítico direto ser comprovado apenas *in vitro* (Kellen et al., 1960; Rosenfeld et al., 1960-62).

Dois animais vieram a óbito às 53 e 78 horas após a inoculação do veneno de *B. alternatus*. Verificou-se anemia severa em dois dias e normalização dez dias depois do envenenamento. Conforme Feldman et al. (2000) este tempo é necessário para maturação das células vermelhas do bovino. Nos primeiros dias, como esperado após a anemia aguda regenerativa, foram vistas policromasia e macrocitose.

Ocorreu pequena elevação no número de eritrócitos até 24 horas e queda significativa 48 horas após a inoculação do veneno (Tabela 1). Este aumento relaciona-se ao estresse e a dor local, devido à ação de catecolaminas, indicando policitemia relativa nas primeiras horas do envenenamento botrópico. Relatou-se hemoconcentração transitória em diferentes envenenamentos ofídicos em vários estudos (Franceschi, 1990; Lago et al., 2001; Segev et al., 2004). Posteriormente, no tempo 72 horas, há indicativo da perda de sangue abrupta e exaustão das reservas esplênicas e medulares (Chen et al., 2004).

Os menores valores de eritrócitos, volume globular e concentração de hemoglobina foram observados às 96 horas pós inoculação. A redução persiste nos tempos 168 e 240 horas, e há aumento significativo às 240 horas, porém, o retorno aos níveis basais de eritrócitos acontece somente no 17^o dia (408 horas).

As maiores médias do VGM foram observadas às 168 horas, permanecendo elevadas ($P \leq 0,05$) até 576 horas (Tabela 1). Este resultado demonstra a macrocitose a partir de 168 horas, achado comum nas anemias regenerativas (Feldman et al., 2000). Houve redução da HGM até 96 horas pós-inoculação e aumento nos tempos seguintes até 240 horas. Sete dias após a inoculação do veneno (168 horas), houve nos animais diminuição significativa dos valores médios de CHGM. Posteriormente, a absorção de eritrócitos agregados nos trombos formados e a resposta regenerativa à perda sanguínea aguda mantém o CHGM em níveis mais elevados até 168 horas.

Apesar de terem sido verificadas variações nos índices hematimétricos, não foram observadas microcitose ou hipocromia nos esfregaços sanguíneos destes bovinos, caracterizando a anemia apresentada como normocítica e normocrômica até 96 horas, corroborando os achados de Takahira (1999) e Santos et al. (2003) em cães expostos a diferentes venenos botrópicos. Possivelmente houve proliferação eritróide medular, como resposta à hipóxia tecidual e ainda pode ter ocorrido estímulo eritropoético associado a frações do veneno botrópico, conforme descrito em camundongos por Maria et al. (2003).

Os resultados demonstram que nos bovinos expostos ao veneno de *B. alternatus* foi constatada redução ($P \leq 0,05$) da contagem de eritrócitos, volume globular e concentração de hemoglobina, de 48 horas a 168 horas após a inoculação (Tabela 1), comprovando a anemia grave, devido à perda sanguínea aguda provocada pela diátese hemorrágica instalada local e sistemicamente no envenenamento botrópico, como descrito em ratos (Pérez et al., 1998), seres humanos (Otero et al., 2002) e em cães (Santos et al., 2003; Ferreira Jr. e Barraviera, 2004).

Tabela 1: Valores médios do número de eritrócitos (/mm³), volume globular (%), hemoglobina (g/dl), volume globular médio (fl), hemoglobina globular média (pg) e concentração de hemoglobina globular média (%) em bovinos antes e após a inoculação do veneno de *B. alternatus* 0,15mg/kg do veneno por kg de peso corporal

Variáveis	Eritrócitos /mm ³	Volume globular %	Hemoglobina g/dl	VGM fl	VGM pg	CHGM %
Tempos						
T0h	6.610.000c	26,36c	8,89bc	40,23d	13,59cd	33,78a
T3h	7.790.000ab	29,70ab	9,77ab	38,67e	12,63e	32,80abc
T8h	7.450.000bc	28,33bc	9,20ab	38,33e	12,43e	32,40abc
T24h	8.410.000a	32,37a	10,50a	38,67e	12,57e	32,50abc
T48h	5.310.000d	20,33d	6,63d	38,67e	12,53e	32,63abc
T72h	4.030.000e	15,53e	5,23e	38,67e	12,93e	33,70ab
T96h	3.740.000e	14,57e	4,93e	38,67e	13,13de	33,87a
T168h	4.100.000e	20,80d	6,70d	50,67a	16,47a	32,40bc
T240h	5.590.000d	25,50c	8,07c	45,67b	14,50b	31,63cd
T408h	7.030.000bc	31,23ab	9,63ab	44,33bc	13,73c	30,90d
T576h	7.640.000ab	32,63a	9,60ab	43,00c	12,67e	29,30e

Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre os tempos (Teste SNK $P \leq 0,05$).

A perda sanguínea aguda grave observada no envenenamento botrópico ocorre devido à ação trombina símile do veneno (Kamiguti et al. 1994), alteração da agregação plaquetária reportada por Castro et al. (1998 e 1999) e da ação vasculotóxica sistêmica das hemorraginas e outras frações (Kamiguti et al., 1996; Tanjoni et al., 2003).

Na morfologia celular eritróide, o animal nº 1 evoluiu para a morte 53 horas pós-inoculação e apresentou anisocitose às 24 e 48 horas, sendo verificados macrocitose, policromasia, pontilhados basofílicos, corpúsculos de Howell Jolly, metarrubrócitos (2/100 leucócitos) e rubrócitos (2 /100 leucócitos) às 48 horas.

O animal nº 2 apresentou entre 24 a 72 horas anisocitose, policromasia, presença de corpúsculos de Howell Jolly e pontilhados basofílicos, além de rubrócitos (5/100 leucócitos), metarrubrócitos (11/100 leucócitos), rubiblasto e hematogônia e morreu às 78 horas. O bovino nº 3 apresentou anisocitose entre 8 a 576 horas, com presença de pontilhados basofílicos e corpúsculos de Howell Jolly de 48 a 168 horas e policromasia neste tempo.

No bovino nº 4 observou-se anisocitose de 8 horas até 576 horas. Entre 8 e 168 horas houve poiquilocitose e policromasia, corpúsculos de Howell Jolly e pontilhados basofílicos. Foram verificados rubrócitos (1/100 leucócitos às 8 e 24 horas, 2/100 leucócitos às 48 horas) e metarrubrócitos (1/100 leucócitos em 24 horas e 168 horas, 1/100 leucócitos em 48 e 96 horas e 4/100 leucócitos em 72 horas).

O animal nº 5 demonstrou anisocitose entre 48 e 576 horas, poiquilocitose e policromasia moderada, macrocitose, corpúsculos de Howell Jolly e pontilhados basofílicos de 48 a 168 horas. Entre 240 e 408 horas ocorreu poiquilocitose, policromasia, macrocitose e raros corpúsculos de Howell Jolly. Identificaram-se rubrócitos (2/100 leucócitos em 48 e 72 horas) e metarrubrócitos (3/100 leucócitos em 48 horas e 2/100 leucócitos em 72 horas).

O eritrograma indica que em três bovinos ocorreu liberação de células eritróides jovens para a circulação e destes, um sucumbiu, vítima dos efeitos deletérios do veneno botrópico. Dois animais não responderam a anemia e destes, um sobreviveu e outro veio a óbito. Pelo exame da extensão sanguínea, ocorreram diferentes respostas à anemia causada pelo envenenamento botrópico e os animais com cura espontânea demonstraram menos alterações ou resposta mais precoce. A presença de células jovens da linhagem eritróide indica que os bovinos apresentavam anemia, com resposta medular regenerativa e possivelmente, com a liberação de reticulócitos evidenciada pela policromasia, anisocitose, macrocitose e elevação do VGM entre 168 e 576 horas.

As médias de leucócitos totais/mm³ de sangue variaram entre 12.663 (0h) e 29.400 às 8 horas. Entre 3 às 48 horas os valores são superiores (P<0,05) aos

basais, igualando-se a este 72 horas após a inoculação do veneno de *B. alternatus* (Tabela 2). Especialmente em bovinos, este resultado indica que o veneno botrópico atua como um grande estímulo inflamatório, mobilizando as células brancas dos compartimentos marginais e de reserva (Arruda et al., 2003; Chacur et al., 2003).

A leucocitose no envenenamento botrópico pode ser resultante da ação da bradicinina,

das metaloproteínas do veneno, que potencializam a inflamação e relaciona-se ainda à dor e ao estresse, sendo também descrita em seres humanos (Barraviera et al., 1995) e em cães (Pérez et al., 1997; Jácome et al., 2002).

Os bovinos apresentaram contagens médias de neutrófilos bastonetes/mm³ de sangue entre 141,0 (0h) e 509,33 (24 horas), ultrapassando os limites superiores descritos por Feldman et al. (2000) entre 3 a 72 horas (Tabela 2). Foram identificadas células jovens da linhagem mielóide em todos os bovinos: no animal nº 3, 280 metamielócitos às 24 horas e 180 às 96 horas; no bovino nº 4, 816 metamielócitos às 3 horas e 888 às 24 horas; e no animal nº 5, 324 metamielócitos às 48 horas. Estes resultados indicam que a resposta mielóide foi menor e mais tardia nos bovinos que sucumbiram devido aos efeitos do veneno.

As médias de neutrófilos segmentados/mm³ de sangue oscilaram entre 3.032 (0h) e 15.800 (8 horas) e quintuplicaram-se em apenas 8 horas (Tabela 2). Os valores são superiores (P<0,05) ao tempo zero entre 3 às 24 horas e somente em 0, 408 e 576 horas encontram-se dentro do limite para a espécie (Feldman et al., 2000). Diagnosticou-se neutrofilia em bovinos até 10 dias depois da inoculação do veneno de *B. alternatus*, concordando com os achados em camundongos (Farsky et al., 1997 e 2000) e em cães (Sano-Martins et al., 1995; Takahira, 1999) submetidos ao envenenamento botrópico.

O número médio de linfócitos/mm³ de sangue variou entre 6.536 (96 horas) a 15.981 (3 horas) (Tabela 2), sendo os valores superiores (P<0,05) aos basais entre 3 às 24 horas (linfocitose) e similares após 48 horas. Entretanto, Sano-Martins et al. (1995), Takahira (1999) e Santos et al. (2003) encontraram linfocitopenia em cães expostos ao veneno botrópico.

As médias de monócitos, eosinófilos e basófilos/mm³ de sangue variaram entre 774 (8 horas) e 256 (168 horas), 174 (96 horas) e 447 (168 horas) e zero (3 horas) e 250,67 (24 horas) e todas se encontram dentro da faixa normal para a espécie (Feldman et al., 2000), de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2: Valores médios do número de leucócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos/mm³ em bovinos antes e após a inoculação do veneno de *B. alternatus* 0,15mg/kg do veneno por kg de peso corporal

Variáveis	Leucócitos/ mm ³	Bastonetes/ mm ³	Segmentados/ mm ³	Linfócitos/ mm ³	Monócitos/ mm ³	Eosinófilos/ mm ³	Basófilos/ mm ³
Tempo							
T0h	12.663c	141,00a	3032,00d	8678,67cd	539,00a	252,67a	2,67b
T3h	27.333a	459,33a	9698,67c	15981,33a	630,67a	168,00a	0,00b
T8h	29.400a	417,33a	15800,67a	12196,67b	774,00a	205,33a	0,00b
T24h	26.933a	509,33a	12450,67b	13128,00b	269,33a	269,33a	250,67a
T48h	17.933b	231,33a	6760,67d	10084,00c	371,33a	244,67a	101,33ab
T72h	15.367bc	351,00a	6338,00d	8055,67cd	461,00a	202,33a	204,67ab
T96h	14.767bc	121,33a	5969,33d	6536,00d	623,00a	147,67a	130,67ab
T168h	13.067c	102,33a	4115,67d	7893,33cd	256,00a	447,33a	70,00ab
T240h	13.200c	37,33	4144,33d	8108,33cd	563,67a	337,00a	76,33ab
T408h	12.800c	119,33a	3478,67d	8354,67cd	512,00a	297,67a	37,67b
T576h	14.200c	244,00a	3590,67d	9455,33cd	546,00a	174,67	0,00b

Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre os tempos (Teste SNK P<0,05).

A morfologia celular demonstrou alterações até 576 horas em todos os bovinos. Identificaram-se: neutrófilos segmentados com vacuolizações citoplasmáticas, citoplasma basofílico e corpúsculos de Döhle; linfócitos com citoplasma basofílico, granulações tóxicas e vacúolos citoplasmáticos e nucleares, além de sombras de Grumprecht, indicativas de degeneração leucocitária; linfócitos em divisão às 24 horas em dois bovinos. No bovino nº 1 às 72 horas diagnosticaram-se cariorrexe nuclear, granulações tóxicas, basofilia e vacúolos citoplasmáticos e nucleares em linfócitos.

Vacuolizações citoplasmáticas em megacariócitos foram relatadas em cães após envenenamento botrópico (Takahira, 1999) e metaloproteínas e PLA₂ do veneno são citotóxicas, justificando as alterações citotóxicas observadas nos leucócitos de bovinos expostos ao veneno de *B. alternatus*.

Apesar de diferenças individuais ocorrerem na resposta inflamatória frente ao veneno botrópico (Carneiro et al., 2002), as alterações discutidas anteriormente demonstram a toxicidade do veneno de *B. alternatus* sobre o leucograma bovino.

As médias de plaquetas/mm³ de sangue (Tabela 3) apresentaram-se entre 556.453 (240 horas) a 68.017 (24 horas), demonstrando trombocitopenia, com redução significativa às 3 horas e valores abaixo dos normais às 24 e 48 horas, com retorno aos níveis basais somente dez dias após, indicando a resposta medular de reposição apropriada nestes bovinos (Feldman et al., 2000).

A trombocitopenia também foi relatada nos acidentes botrópicos em seres humanos (Sano-Martins et al., 1997; Castro et al., 1999) e em cães (Santos et al., 2003). Os sangramentos nos locais de punção venosa, em mucosas e feridas cutâneas recentes, observados nestes bovinos estão relacionados com a trombocitopenia (Grubbs et al., 1997).

Ressalta-se que as serinoproteases (hemorraginas) e a PLA₂ presentes no veneno botrópico interferem na adesão e agregação plaquetária, provocando trombopatia e trombocitopenia (Sugiki et al., 1995; Francischetti et al., 1998).

Os valores médios do fibrinogênio nos bovinos são similares entre os tempos (Tabela 3), variam entre 491 (0h) e 775 mg/dL (240 horas) e estão dentro da faixa de referência para a espécie, de acordo com Kaneko et al. (1997). A tendência ao aumento no fibrinogênio 3 horas pós-inoculação confirma a hipercoagulabilidade inicial causada pela fração trombina símile do veneno botrópico. As médias reduzem às 8 e 24 horas, indicando consumo do fibrinogênio provocado pelo veneno botrópico (Pérez et al., 1997). Das 48 às 240 horas os valores elevam-se, demonstrando a recuperação da concentração de fibrinogênio.

Entretanto, hipofibrinogenemia foi descrita em seres humanos e animais expostos ao veneno botrópico (Cardoso, 1990; Pérez et al., 1997, Santos et al., 2003). Porém, no envenenamento botrópico, dois fatores paradoxais atuam sobre o fibrinogênio plasmático: a fração trombina símile do veneno induz a coagulação instável deste, consumindo-o e a síntese hepática e indução inflamatória (Murata et al., 2004), devido aos efeitos locais do veneno botrópico, justifica-se a ausência de hipofibrinogenemia nos bovinos submetidos ao veneno de *B. alternatus*.

Os valores médios da TTPA (seg) oscilaram entre de 52,67 (576 horas) e 196,33 (24 horas) (Tabela 3) e apenas nesse tempo o resultado foi diferente ($P \leq 0,05$), indicando o prolongamento do TTPA em bovinos, semelhante ao descrito no acidente botrópico em seres humanos (Holloway e Parry, 1989), devido à interferência nos fatores da coagulação causada por frações do veneno botrópico que induzem a formação de trombina intravascular e consumo da protrombina, fator X e outros (Markland, 1998), pois o TTPA prolongado indica defeitos no sistema intrínseco e via comum da coagulação (Grubbs et al., 1997).

Tabela 3: Valores médios do número de plaquetas (/mm³), fibrinogênio (mg/dl), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) em segundos, tempo de protrombina (TP) em segundos e tempo de coagulação (TC) em minutos e segundos, em bovinos antes e após a inoculação do veneno de *B. alternatus* 0,15mg/kg do veneno por kg de peso corporal

Variável	Plaquetas/m ³	Fibrinogênio mg/dl	TTPa segundos	TP segundos	TC minutos e segundos
Tempo					
T0h	411.950ab	491,00a	56,53b	22,50c	4min e 5s d
T3h	214.317cd	573,33a	65,67b	30,33cb	6min e 35s d
T8h	168.373d	526,67a	81,33b	42,33a	13min e 59s cd
T24h	68.017d	515,00a	196,33a	61,67b	18min e 33s bc
T48h	70.583d	603,33a	107,00b	42,67c	32min e 03s a
T72h	102.153d	607,33a	91,33b	29,33c	23min e 17s b
T96h	321.090bc	695,00a	62,67b	27,33c	30min e 45s a
T168h	482.533ab	628,33a	54,00b	24,33c	6min e 14s d
T240h	556.453a	755,00a	54,67b	29,00c	5min e 7s d
T408h	439.516b	563,33a	59,67b	25,67c	7min e 10s d
T576h	430.687ab	590,00a	52,67b	28,33c	6min e 2s d

Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre os tempos (Teste SNK $P \leq 0,05$)

Entre 8 às 72 horas as médias indicam prolongamento do TP e são superiores aos níveis basais ($P \leq 0,05$) nos bovinos submetidos ao veneno de *B. alternatus* (Tabela 3), achado também citado por Sano-Martins et al. (1995) no envenenamento botrópico em cães. O prolongamento de TP confirma a interferência sobre os fatores da coagulação provocada pelo veneno botrópico, devido à estimulação sistêmica desses e formação de trombina intravascular, causando coagulopatia de consumo (Markland, 1998; Theakston e Kamiguti, 1998), pois o teste de TP avalia o passo comum e sistema extrínseco da coagulação (Grubbs et al., 1997).

As médias do TC oscilaram entre 4 min e 5 seg (0h) até 32 min e 3 seg às 48 horas, sendo significativamente superiores ao valor basal entre 24 às 96 horas após a administração do veneno. O sangue foi considerado incoagulável em 3, 48 e 72 horas após a inoculação, pois quando o TC está acima de 20 ou 30 min há incoagulabilidade sanguínea em seres humanos (Andrade Filho et al., 2001). Este aumento do TC nos bovinos indica alterações provocadas por diversas frações do veneno botrópico que causam consumo de fatores da coagulação, interferência com a função e número de plaquetas, ruptura dos capilares sanguíneos, além de possível ativação do sistema fibrinolítico (Maruyama et al., 2002).

Este resultado em bovinos corrobora as observações feitas em cães expostos ao veneno botrópico por Takahira (1999) e Santos et al. (2003). O consumo de fatores da coagulação é provocado por diversas frações do veneno botrópico como botrocetina e bothrojaracina e alteração da função e número de plaquetas (Roodt et al., 2000).

A média da proteína total variou de 5,75 (0h) a 4,29g/dL, 8 horas pós-inoculação (Tabela 4). Os valores são inferiores ($P \leq 0,05$) nos tempos 3 e 8 horas, indicando perda de proteínas devido às hemorragias e edema agudo provocados pelo veneno botrópico. As médias são similares ao tempo zero entre 24 e 408 horas após a inoculação do veneno (Tabela 4). A redução de PT sérica após o envenenamento botrópico também foi relatada em seres humanos (Hudelson e Hudelson, 1995) e em cães (Ferreira Jr. e Barraviera, 2004).

Tabela 4: Valores médios da proteína total, albumina e globulinas (g/dl) séricas em bovinos antes e após a inoculação do veneno de *B. alternatus* 0,15mg/kg do veneno por kg de peso corporal

Variável	Proteína total (g/dl)	Albumina (g/dl)	Globulinas (g/dl)
Tempo			
T0h	5,75a	3,56a	2,20a
T3h	4,38b	2,71a	1,66a
T8h	4,29b	3,15a	1,14a
T24h	4,92ab	2,79a	2,12a
T48h	4,75ab	2,99a	1,75a
T72h	4,75ab	3,08a	1,67a
T96h	5,13ab	2,89a	2,23a
T168h	5,24ab	3,44a	1,80a
T240h	5,20ab	3,13a	2,07a
T408h	5,75a	3,43a	2,32a
T576h	5,59a	3,41a	2,18a

Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre os tempos (Teste SNK $P \leq 0,05$).

As médias da albumina sérica nos bovinos variaram entre 3,56 (0h) e 2,71g/dL, às 3 horas pós-inoculação, não ocorrendo diferença entre estas nos diferentes tempos (Tabela 4). Os valores médios das globulinas séricas foram de 1,14 a 2,32g/dL, às 24 e 48 horas respectivamente, após o envenenamento botrópico e foram semelhantes ($P \geq 0,05$) em todos os tempos.

Apesar de não ultrapassarem os limites de normalidade para a espécie (Kaneko et al., 1997), as médias de AST foram superiores ($P \leq 0,05$) entre 48 às 240 horas após a inoculação do veneno (Tabela 5), e estes resultados podem estar relacionados com a lesão hepática e/ou muscular provocada por ação direta de proteases e PLA₂ (Kini et al., 2002), metabolização hepática do veneno (Rocha, 1999) e pelo processo flogístico local extenso, descrito por Barraviera et al. (1995).

O aumento da AST nos bovinos inoculados com veneno de *B. alternatus* foi semelhante ao observado em seres humanos (Chaves et al., 1992) e em cães após envenenamento botrópico (Takahira, 1999; Ferreira Jr. e Barraviera, 2004).

Os maiores valores médios de CPT nos bovinos ocorreram entre 24 às 96 horas após a inoculação do veneno, igualando-se aos valores basais somente aos 10 dias (240 horas), indicando a precocidade da CPT quando comparada com a AST, na presença de lesão muscular provocada pelo veneno botrópico. Após 168 horas ocorreu redução gradativa das médias da CPT até 576 horas (Tabela 5). Dal Pai e Santo Neto (1994) e Takahira (1999) também observaram aumento nesta enzima em cães. Esta elevação pode ter sido causada pelos efeitos das PLA₂, proteases e metaloproteinases do veneno botrópico na musculatura local (Chaves et al., 2003; Nuñez et al., 2004), ou pode estar relacionada com a lesão muscular distante, provocada por PLA₂ de baixa afinidade sistemicamente.

As médias da GGT não apresentaram diferenças (Tabela 5) estatísticas entre os tempos, indicando que, apesar de o veneno botrópico ser metabolizado no fígado, este não foi capaz de causar alterações indicativas de obliteração de ductos biliares em bovinos, semelhante ao relatado em cães por Takahira (1999).

Tabela 5: Valores médios das enzimas (UI/l) aspartato aminotransferase (AST), creatina fosfotransferase (CPT) e gama glutamiltransferase (GGT) e compostos nitrogenados não proteicos séricos (mg/dl), ureia e creatinina em bovinos antes e após a inoculação do veneno de *B. alternatus* 0,15mg/kg do veneno por kg de peso corporal

Variável	AST UI/l	CPT UI/l	GGT UI/l	Ureia mg/dl	Creatinina mg/dl
Tempo					
T0h	30,96bc	24,06c	11,32a	27,94b	0,97a
T3h	26,40c	22,11bc	12,99a	24,38b	0,75a
T8h	25,90c	22,99bc	13,27a	25,91b	0,77a
T24h	30,00c	84,01a	10,68a	39,62b	0,77a
T48h	40,00ab	94,10a	11,58a	70,09a	0,70a
T72h	46,50a	95,86a	11,92a	39,62b	0,96a
T96h	45,83a	89,47a	9,60a	35,81b	0,73a
T168h	40,17ab	46,87b	14,52a	32,76b	0,91a
T240h	42,50a	38,91bc	10,68a	32,00b	0,73a
T408h	25,73c	32,40bc	11,50a	28,65b	0,82a
T576h	35,93abc	19,26c	12,93a	33,07b	0,90a

Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre os tempos (Teste SNK $P \leq 0,05$).

Observou-se elevação significativa da uréia sérica nos bovinos as 48 horas após o envenenamento botrópico experimental (Tabela 5), diferindo dos resultados observados por Takahira, (1999) em cães inoculados com veneno botrópico e tratados com soro antibotrópico. A grande

sensibilidade do bovino ao veneno botrópico, conforme Araújo e Belluomini (1960-62), quando comparado ao cão, poderiam explicar este resultado, além das diferenças entre protocolos experimentais. O aumento significativo da ureia às 24 e 48 horas indica uremia associada ao envenenamento botrópico, mesmo não havendo sinais clínicos de insuficiência renal aguda nestes bovinos.

Os valores aumentados de AST até sete dias e ureia às 48 horas pós-inoculação do veneno, demonstram a existência de lesão hepática e uremia pré-renal.

A creatinina sérica média oscilou entre 0,7 (48 horas) a 1,0mg/dl (0h) e não apresentou variação significativa entre os tempos antes e depois da administração do veneno botrópico em bovinos (Tabela 5). Esses resultados são semelhantes aos observados por Takahira (1999), quando

estudou cães inoculados com veneno botrópico. Entretanto, em seres humanos e animais de laboratório já foram descritas alterações renais (Barbosa et al., 2002).

Conclusões

O veneno de *B. alternatus* (0,15mg/kg de peso corporal) causa intoxicação grave em bovinos, podendo ser letal nesta dosagem para alguns animais.

Bovinos envenenados com 0,15mg/kg p.v. de veneno de *B. alternatus* apresentam anemia normocítica normocrômica, leucocitose com neutrofilia com desvio para esquerda regenerativo, linfocitose, aumentos dos tempos de coagulação, de protrombina e de tromboplastina parcial ativada, trombocitopenia e elevação sérica de ureia e das enzimas CPT e AST.

Referências

- ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B. Ofidismo. In: ____. *Toxicologia na prática clínica*. 2001, Belo Horizonte: Folium. Cap. 32, p. 229-262.
- ARAÚJO, P.; BELLUOMINI, E. Toxicidade de venenos ofídicos. I sensibilidade específica de animais domésticos e de laboratório. *Mem. Inst. Butantan*, v. 30, p. 133-142, 1960-62.
- ARAÚJO, P.; ROSENFELD, G.; BELLUOMINI, W. Toxicidade de venenos ofídicos. II- Doses mortais para bovinos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 30, p. 43-48, 1963.
- BARBOSA, P.S.F.; HAVT, A.; FACÓ, P.E.G. et al. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. *Toxicon*, v. 40, n. 10, p. 1427-1435, 2002.
- BARRAVIERA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A. et al. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 1, n. 1, p. 11-22, 1995.
- BIONDO, A.W.; BICUDO, P.L.; KOHAYAGAWA, A. Acidentes ofídicos em medicina veterinária-revisão de 1260 notificações do Instituto Butantan. In: *Jornada Científica da Associação de Docentes*, 28, Botucatu, 1993, *Anais...Botucatu*: UNESP, 1993, p. 159 (Resumo).
- CARDOSO, J.L.C. Bothropic accidents. *Mem. Inst. Butantan*, v. 52 (supl.), p. 43-44, 1990.
- CARNEIRO, A.S.; RIBEIRO, O.G.; FRANCO, M. et al. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon*, v. 40, n. 11, p. 1571-1579, 2002.
- CASTRO, H.C.; DUTRA, D.L.S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L. et al. Bothroalternin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*, v. 36, n. 12, p. 1903-1912, 1998.
- CASTRO, H.C.; FERNANDES, M.; ZINGALI, R.B. Identification of Bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. *Toxicon*, v. 37, n. 10, p. 1403-1416, 1999.
- CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G. et al. Hyperalgesia induced by Asp49 phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon*, v. 41, n. 6, p. 667-678, 2003.
- CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J.M.; BRENES, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon*, v. 30, n. 9, p. 1099-1109, 1992.
- CHAVES, F.; LORÍA, G.D.; SALAZAR, A. et al. Intramuscular administration of antivenoms in experimental envenomation by *Bothrops asper* comparison between Fab and IgG. *Toxicon*, v. 42, n. 2, p. 237-244, 2003.
- DAL PAI, V.; SANTO NETO, H. Ação dos venenos ofídicos sobre os tecidos animais. In: BARRAVIERA, B. *Venenos Animais: uma visão integrada*, Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994, Cap. 8, p. 97-105.
- FARSKY, S.H.P.; COSTA-CRUZ, J.W.M.; CURY, Y. et al. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicon*, v. 35, n. 2, p. 185-193, 1997.
- FARSKY, S.H.; GONCALVES, L.R.; CORREA, A.P. et al. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leukocyte recruitment. *Mediat. Inflamm.*, v. 9, n. 5, p. 213-221, 2000.
- FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (Ed). *Schalm's veterinary hematology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000. 1344 p.
- FERREIRA JR., R.S.; BARRAVIERA, B. Management of venomous snakebites in dogs and cats in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 10, n. 2, p. 112-132, 2004.
- FRANCESCHI, J.P. Systemic activities of *Bothrops* venoms. *Mem. Inst. Butantan*, v. 52 (supl.), p. 41-42, 1990.
- FRANCISCHETTI, I.M.B.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B. *Bothrops* sp. Snake venoms; comparison of some biochemical and physiochemical properties and interference in platelet functions. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 119c, n. 1, p. 21-29, 1998.
- GRUBBS, S.T.; OLCHOWY, T.W.J. Bleeding disorders in cattle: a review and diagnostic approach. *Vet. Med.*, v. 92, n. 8, p. 737-743, 1997.
- HOLLOWAY, S.A.; PARRY, B. Observations on blood coagulation after snakebite in dogs and cats. *Aust. Vet. J.*, v. 66, n. 11, p. 364-366, 1989.
- HUDELSON, S.; HUDELSON, P. Pathophysiology of snake envenomization and evaluation of treatments-Part I. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v.17, n. 7, p. 799-896, 1995.
- JÁCOME, D., MELO, M.M., SANTOS, M.M.B. et al. Kinetics of venom and antivenom serum and clinical parameters and treatment efficacy in *Bothrops alternatus* envenomed dogs. *Vet. Hum. Toxicol.*, v. 44, n. 6, p. 334-338, 2002.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Ed.). *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.
- KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; THEAKSTON, R.D.G. et al. Insights into the mechanism of haemorrhagic caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v. 34, n. 6, p. 627-642, 1996.
- KAMIGUTI, A.S.; SLUPSKY, J.; ZUZEL, M. et al. Properties of fibrinogen cleaved by jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Thromb. Haem.*, v. 72, n. 2, p. 244-249, 1994.

- KELLEN, E.M.A.; ROSENFELD, G.; NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venoms. II Variation in relation to erythrocyte species. *Mem. Inst. Butantan*, v. 30, p. 133-142, 1960-62.
- KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzyme. *Toxicon*, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2002.
- LAGO, L.A.; MELO, M.M.; FERREIRA, P.M. et al. Alterações hematológicas em bovinos submetidos ao envenenamento crocálico experimental (*Crotalus durissus terrificus*-crotamina positivo). *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* v. 1, p. 7-13, 2001.
- LEE, R.I.; WHITE, P.D. A clinical study of the coagulation time of blood. *Am. J. Med. Sci.*, v. 145, p. 495-503, 1913.
- MARIA, D.A.; VASSÃO, R.C.; RUIZ, I.R.G. Haematopoietic effects induced in mice by the snake venom toxin jararhagin. *Toxicon*, v. 42, n. 6, p. 579-585, 2003.
- MARKLAND, F.S. Snake venom and hemostatic system. *Toxicon*, v. 36, n. 12, p. 1-58, 1998.
- MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; ANAI, K. et al. N-terminal amino acid sequences and some characteristics of fibrinolytic/hemorrhagic metalloproteinases purified from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, v. 40, n. 8, p. 1223-1226, 2002.
- MENEZES, R.V. Ofidismo em bovinos. *Arq. Esc. Med. Vet. UFBA*, v. 18, n. 1, p. 224-231, 1995.
- MILLER, R.A.; TU, A.T. Factors in snake venoms that increase capillary permeability. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 41, p. 792-794, 1989.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. Journal*, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.
- OLIVEIRA, N.J.F., MELO, M.M., LARA, E.R. et al. Perfil clínico e imunológico de bovinos experimentalmente inoculados com veneno bruto e iodado de *Bothrops alternatus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, n. 3, p. 569-576, 2007.
- OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; MESA, M.B. et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium* and *Bothriehis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attendend in a university hospital. *Toxicon*, v. 40, n. 8, p. 1107-1114, 2002.
- PÉREZ, O.C.A.; KOSCINCZUK, P.; FLINTA, S.M. et al. *Bothrops alternatus* envenoming in young dogs. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 3, n. 1, p. 43-47, 1997.
- PÉREZ, O.C.A.; KOSCINCZUK, P.; TEIBLER, P. et al. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas em almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. *Toxicon*, v. 36, n. 8, p. 1165-1172, 1998.
- RATNOFF, M.D.; CALVIN MENZIE, A.B. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 37, p. 316-320, 1951.
- ROCHA, M.L. The distribution and elimination of *Bothrops erythromelas* venom labeled with I¹³¹ after intravenous injection in mice. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 5, n. 1, p. 99, 1999.
- ROODT, A.R.; DOLAB, J.A.; DOKMETJIAN, J.C.H. et al. A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. *Toxicon*, v. 38, n. 6, p. 865-873, 2000.
- ROSENFELD, G.; KELEN, M.A.; NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venoms. I-Classification in different types and activites. *Mem. Inst. Butantan*, v. 30, p. 103-116, 1960-62.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007, 264 p.
- SANTOS, M.M.B; MELO, M.M.; JACOME, D.O. et al. Hemograma de cães envenenados experimentalmente com *Bothrops alternatus* após diferentes tratamentos. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2003.
- SANO-MARTINS, I.S.; SANTORO, M.L.; MORENA, P. et al. Hematological changes induced by *Bothrops jararaca* venom in dogs. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 28, p. 303-312, 1995.
- SANO-MARTINS, I.S.; SANTORO, M.L.; CASTRO, S.C.B. et al. Platelet aggregation in the patients bitten by the Brazilian snake *Bothrops jararaca*. *Thromb. Res.*, v. 87, n. 2, p. 183-195, 1997.
- SEGEV, G.; SHIPOV, A.; HARRUS, S. et al. *Vipera palaestinae* envenomation in 327 dogs: a retrospective cohort study and analysis of risk factors for mortality. *Toxicon*, v. 43, n. 6, p. 691-699, 2004.
- SUGIKI, M.; MARUYAMA, M.; YOSHIDA, E. Enhancement of plasma fibrinolysis *in vitro* by jararhagin, the main haemorrhagic metalloproteinase in *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, v. 33, n. 12, p. 1605-1617, 1995.
- TAKAHIRA, R.K. *Perfil hematológico, hemostático, bioquímico e histopatológico do envenenamento experimental de cães por Bothrops alternatus (Duméril, 1854) e Bothrops moojeni (Hoge, 1966)*. 199f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L. et al. Snake venom metalloproteinases: structure/ function relationships studies using monoclonal antibodies. *Toxicon*, v. 42, n. 7, p. 801-808, 2003.
- THRALL, M.A. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 561 p.
- THEAKSTON, R.D.G.; KAMIGUTI, A.S. Viper envenoming: evaluation of treatment by restoration of haemostasis and venom clearance. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 4, n. 2, p. 94-111, 1998.