

Rui Seabra Ferreira Junior

Comparação da resposta imune humoral, da capacidade de neutralização dos soros anticrotálicos produzidos em ovinos jovens, avaliação clínica e ponderal entre animais inoculados com veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* nativo ou irradiado com Cobalto-60.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Alves Meira  
Co-Orientador: Prof. Dr. Benedito Barraviera

Botucatu – SP  
2005.

Rui Seabra Ferreira Junior

Comparação da resposta imune humoral, da capacidade de neutralização dos soros anticrotálicos produzidos em ovinos jovens, avaliação clínica e ponderal entre animais inoculados com veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* nativo ou irradiado com Cobalto-60.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Alves Meira  
Co-Orientador: Prof. Dr. Benedito Barraviera

Botucatu – SP  
2005.

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios do Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo; no Laboratório de Estudos em Biotecnologia da Reprodução e Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Campus de Botucatu; no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN, São Paulo.

Há um ano, em minha Dissertação de Mestrado, escrevi:

Eu agradeço a Deus,  
por me dar forças para vencer mais esta batalha  
e por ver que quanto mais eu acredito Nele,  
mais Ele acredita em mim.

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor,  
E através do Céu, passavam cenas da minha vida.

Para cada cena que passava, percebi pegadas na areia.  
Uma era minha e a outra do Senhor.

Quando a última cena da minha vida passou diante de nós,  
Olhei para as pegadas na areia.

Notei que, muitas vezes no caminho da minha vida,  
Havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei que isso aconteceu  
Nos momentos mais difíceis da minha vida.

(...) – Senhor, não compreendo...  
Por que nas horas em que eu mais necessitava  
Vós me deixastes?

O Senhor respondeu:

Meu filho, Eu te amo e jamais te deixaria  
Nas horas da tua prova e do teu sofrimento.

Quando vistes na areia apenas um par de pegadas,  
Foi exatamente aí que Eu te carreguei em meus braços!

Hoje escrevo...

“O caminho é exigente.

Demanda humildade, simplicidade,

sinceridade, necessidade de se desfazer dos apegos.

Obriga-nos a ter que passar por grande número de provas,  
a fim de testar nossa coragem e determinação” .

Senhor, sei que esta é apenas mais uma  
etapa do caminho em que juntos cumprimos.

Hoje compreendo por que havia apenas um  
par de pegadas na areia!

Agradeço por ter me carregado até aqui,  
tendo a certeza que me levará por trilhas  
ainda mais prazerosas.

## Dedicatória

À minha esposa, Ana Silvia, amor de minha vida, de apoio fundamental e incentivos constantes, suas qualidades inestimáveis.

Aos meus pais, Rui e Emília, pela minha formação, caráter e incansável estímulo e paciência durante toda vida.

Aos meus irmãos, Milena e Danilo, pelo amor, confiança e sempre acreditar que é possível.

Ao meu sobrinho Vitor, pela alegria de ser criança.

Ao meu cunhado Alexandre, por fazer parte de minha família.

Ao meu avô, Joaquim Luís Neto (*in memorian*) por acreditar.

Ao meu sogro Benedito e minha sogra, Silvia, pelo apoio, crédito orientação e consideração durante este período.

E aos meus amigos, os cães Alf (Bigodão), Estrelinha (Vaca), Dolly (Lula) e Kika (Chico Amigo) por ouvir pacientemente as reclamações!

Não precisamos saber nem "como" nem "onde",  
mas existe uma pergunta que todos nós devemos  
fazer sempre que começamos qualquer coisa:  
"Para que tenho de fazer isto"?  
Hoje consegui finalmente encontrar a resposta...  
"Pelo prazer de fazer Ciência".

## Meus agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. Benedito Barraviera, liberdade orientada e compreensão foram suas atitudes para que um discípulo pudesse iniciar sua formação. Seus ensinamentos atingem apenas àqueles que estão aptos a recebê-los.

Criar é basicamente formar. É dar uma forma a fenômenos que foram relacionados de modo novo e compreendidos em termos novos. Nas perguntas que o homem faz sobre o mundo e nas soluções que encontra, nas suas ações, bem como na própria experiência do viver, o homem sempre forma.

À Prof. Dra. Nanci do Nascimento pelo apoio, participação, eterna disposição e alegria.

Se sua meta for clara e bem definida, se a lucidez a respeito de sua capacidade de alcançá-la for real, sua motivação e seus esforços vencerão as provações pelas quais você terá que passar

Ao Prof. Dr. Domingos Alves Meira, Mestre de todos os Mestres, pelo exemplo, sabedoria e prazer de sua orientação.

A verdade é o que resiste à prova da experiência.  
O verdadeiro cientista tem conhecimento quando  
pode enxergar implicações e chegar a conclusões.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, Prof. Dr. Domingos Alves Meira, Prof. Dr. Rinaldo Pôncio Mendes, Prof. Dr. Benedito Barraviera, Prof. Dr. Paulo Câmara Marques Pereira e Profa. Dra. Lenice Rosário de Souza, pela enorme contribuição para minha formação.

À Profa. Dra. Jussara Marcondes Machado, meus sinceros agradecimentos por suas batalhas frente à nossa Pós-Graduação.

Aos estatísticos Adriano Dias e José Eduardo Corrente, do Grupo de Apoio à Pesquisa da FMB, pelo interesse e competência com que orientou e aplicou a metodologia estatística empregada.

À Solange Sako Cagliari, secretária do Departamento de Doenças Tropicais, pelo carinho e atenção.

Ao Prof. Dr. Hélio Langoni, pelas primeiras orientações na minha carreira acadêmica.

À amiga Janaína Baptista Alves, por acreditar e participar.

Ao Dr. Patrick J. Spencer, pela amizade e prestação.

Aos docentes e residentes do Departamento de Patologia Veterinária da FMVZ, pela atenção na necropsia e análises histopatológicas.

Ao Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves e ao residente Eric do Departamento de Clínica Veterinária (Grandes Animais) da FMVZ, pelo apoio necessário.

À Profa. Dra. Kunie Iabuki Rabello Coelho, pela análise anatomopatológica das peças, o meu profundo agradecimento.

Aos funcionários do Departamento de Patologia da FMB, em especial ao Carlão, pela prestação na elaboração das lâminas para análise histopatológica.

À Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira, pelo apoio do Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ.

À amiga Renata Couto, pela realização dos exames laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo, pelas sugestões, contribuições e por ceder o espaço do Laboratório de Estudos em Biotecnologia da Reprodução da FMVZ.

Aos amigos do CEVAP, Marcos, Thomaz, Tatiana, Fabiana, Selma e Marli pelo auxílio.

Ao amigo André Trombeta, pela disponibilidade constante e cooperação diária.

À Karina Chama, pela amizade e inglês perfeito.

Ao amigo Paulo Sérgio Ferreira, pela imensa prestação e amizade.

Aos amigos Guilherme e Camilo, pelo companheirismo e amizade.

Ao amigo Edmílson, pela atenção e dedicação.

Aos amigos Cláudio e Fábio, pela paciência durante este período.

Aos funcionários do CEVAP, FMVZ, FMB e IPEN, pela atenção nos serviços prestados.

Ao Biotério da UNESP, pela prontidão em fornecer os animais utilizados.

Aos amigos do Núcleo de Ovinos de Botucatu Cláudia Borecinhas, Eduardo Faria, Ciro Procópio, Manoel Mendes e Cláudia Mendes, por acreditar e ceder os ovinos de suas criações particulares, em especial à Suely Zanluchi e ao Sidney Cora, pelo intenso apoio.

Ao amigo Mauro Onésimo de Araújo, por ajuda com a ração dos animais.

À minha querida prima, Alessandra, que não mediu esforços durante o trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca do Campus de Botucatu, em especial à Sra. Selma Maria, pela elaboração da ficha catalográfica.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – FMVZ/UNESP.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN, São Paulo.

À Fundação para o Desenvolvimento da UNESP – FUNDUNESP.

Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP/UNESP, em especial a Profa. Dra. Silvia Regina Sartori Barraviera pelo total apoio logístico para a realização deste trabalho.

Este trabalho recebeu auxílio financeiro da FUNDUNESP, Processo nº 00523/04-DFP.

## Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivos	10
3. Material e métodos	11
3.1 Material	11
3.1.1. Animais utilizados nos experimentos	11
3.1.1.1. Carneiros	11
3.1.1.2. Camundongos	11
3.1.2. Peçonha utilizada nos experimentos	12
3.1.3. Reagentes e fonte de irradiação	12
3.2 Métodos	13
3.2.1. Irradiação da peçonha	13
3.2.2. Atividade tóxica da peçonha	13
3.2.3. Processo de imunização dos carneiros	13
3.2.4 Titulação dos anticorpos séricos	14
3.2.5. Neutralização e potência do soro	16
3.2.5.1. Avaliação da capacidade de neutralização “in vitro”	16
3.2.5.2. Avaliação da potência “in vitro”	17
3.2.6. Avaliação clínica e ponderal dos carneiros	17
3.2.7. Colheita de material	18
3.2.7.1. Sangue total	18
3.2.7.2. Fezes	18
3.2.8. Exames laboratoriais	18
3.2.8.1. Hemograma, contagem de plaquetas, proteínas plasmáticas totais e fibrinogênio	18
3.2.8.2. Exames bioquímicos	19
3.2.8.3. Exames parasitológicos	20
3.2.9. Análise estatística	20

4. Resultados	21
4.1 – Método de Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	21
4.1.1. Resultados do método de ELISA para o soro produzido	21
4.2. Capacidade neutralizante e potência dos anticorpos antiveneno nativo e irradiado	32
4.2.1. Avaliação da capacidade de neutralização “in vitro” do antiveneno nativo e irradiado	32
4.2.2. Avaliação da potência “in vitro” do antiveneno nativo e irradiado	34
4.3. Avaliação clínica, laboratorial e ponderal dos carneiros	36
4.3.1. – Avaliação clínica	36
4.3.2- Avaliação laboratorial	39
4.3.2.1. Hemograma	39
4.3.2.1.1- Eritrograma	39
4.3.2.1.2. Leucograma	52
4.3.2.1.3. Exames bioquímicos	63
4.3.3. – Avaliação ponderal	74
4.3.3.1. Ganho de peso	74
4.3.3.2. Monitoramento parasitológico	77
4.3.4. Relato de caso	79
4.3.4.1. Resumo da história clínica	79
4.3.4.2. Exame físico	79
4.3.4.3. Exames laboratoriais	80
4.3.4.4. Evolução clínica e tratamento	82
4.3.4.5. Suspeitas diagnósticas	83
4.3.4.6. Relatório de necropsia	83
4.3.4.7. Determinação de metais pesados (Cobre)	90
5. Discussão	91
6. Considerações finais	109
7. Resumo	111
8. Summary	112
9. Referências bibliográficas	113
10. Apêndice	123

## 1. Introdução

As serpentes são animais vertebrados que têm corpo cilíndrico, alongado, flexível e coberto por escamas. Não apresentam patas, pálpebras móveis e ouvido externo (1). São capazes de produzir substâncias por uma glândula sero-mucosa que é inoculada por meio de aparelho especializado. Este consiste de dentes (presas) modificados os quais permitem a injeção do veneno sob pressão dentro dos tecidos (2).

Os venenos ofídicos são misturas complexas, constituídas principalmente por proteínas, peptídeos e em pequenas proporções carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos e componentes orgânicos. Os principais componentes tóxicos são proteínas e enzimas, as quais estão diretamente relacionadas com a alimentação e defesa da serpente, promovendo a imobilização e a morte da presa (3). Além disso, são descritas variações na composição dos venenos decorrentes da idade e do sexo do animal, da dieta alimentar, da distribuição geográfica e até da estação do ano (4, 5).

Apesar da longa tradição do Brasil no campo do ofidismo, somente há poucos anos foi definida uma política abrangente que enfocasse as múltiplas questões relacionadas aos acidentes humanos provocados por animais peçonhentos (6).

O sistema de produção de antivenenos no Brasil vinha passando por uma crise desde o início dos anos 80, que culminou em maio de 1986 com o óbito de uma criança, atribuído à “falta de soro”. Esta situação levou o Ministério da Saúde a implantar um Programa Nacional de Ofidismo na antiga Secretaria de Ações Básicas em Saúde. Tal programa é formado por grupos de Trabalho (GTs) composto por técnicos de diversas instituições científicas brasileiras, responsáveis por áreas específicas (6).

A instauração deste programa tornou obrigatória a notificação dos acidentes ofídicos ao Ministério da Saúde a partir de 1986, possibilitando assim estabelecer parâmetros quanto à ocorrência, mortalidade e evolução clínica dos acidentes, uma vez que estes possuem grande importância médica e epidemiológica no Brasil (7, 8).

No mundo existem cerca de 3.000 espécies de serpentes distribuídas em 430 gêneros. No Brasil, existem por volta de 256 espécies, sendo 69

venenosas e/ou peçonhentas e 187 não venenosas, distribuídas em 75 gêneros (1, 8, 9).

As 69 espécies de serpentes peçonhentas e/ou venenosas encontradas no território brasileiro, estão divididas em quatro gêneros principais distintos: *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus* e *Lachesis*. Os gêneros *Bothriopsis* e *Portidium* têm menor importância epidemiológica (8, 10). Algumas serpentes da família Colubridae, como os gêneros *Philodryas* e *Clelia*, podem ocasionar acidentes sem gravidade (10).

De modo geral, estas serpentes estão distribuídas por todo país e são responsáveis anualmente por 16 acidentes por 100.000 habitantes (7, 11).

A Organização Mundial da Saúde estima que picadas de serpentes resultam em aproximadamente 100.000 mortes por ano no mundo (2, 11).

Entre os quatro principais gêneros responsáveis por acidentes ofídicos no Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* causam o maior número de acidentes (88,3%), seguido pelas do gênero *Crotalus* (8,3%), *Lachesis* (2,7%) e *Micrurus* (0,7%) (7).

Com relação aos venenos, o crotálico tem composição complexa e é constituído de enzimas, toxinas e peptídeos. Possui ações neurotóxica, miotóxica, nefrotóxica, hematológica e hepatotóxica (12).

A miotoxicidade do veneno é evidenciada do ponto de vista clínico pela intensa mialgia generalizada, podendo ser acompanhada de edema muscular discreto. Em alguns casos, entretanto, pode ser assintomático. O veneno é capaz de liberar mioglobina para o sangue dos doentes. O diagnóstico de rabdomiólise pode ser comprovado por meio de biópsia muscular, pelo aumento de mioglobina sanguínea e urinária ou por meio da dosagem dos níveis séricos de creatinoquinase (CK), desidrogenase láctica (DHL) e aspartato aminotransferase (AST) (12,13).

As alterações renais observadas podem ser decorrentes da ação da mioglobina sobre o parênquima renal. Além disso, acredita-se que o veneno tenha ação direta na produção das lesões. A mioglobinúria, decorrente da rabdomiólise, parece contribuir na gênese das lesões renais. Entre os mecanismos propostos para explicá-la encontram-se a obstrução tubular por cilindros de mioglobina e a lesão tóxica direta sobre os túbulos pelo miopigmento. Outros fatores, tais como a desidratação, a hipotensão arterial, a

acidose metabólica e o choque podem estar associados à rabdomiólise e contribuem para a lesão renal (8, 14).

A fração crotóxina do veneno crotálico, atua bloqueando a junção neuromuscular. As paralisias motoras e respiratórias podem ser decorrentes da ação pré-sináptica da toxina ocorrendo inibição da liberação de acetilcolina na junção neuromuscular. Além disso, observam-se ptose palpebral bilateral, diplopia, plegia dos músculos das pálpebras, midríase bilateral e diminuição dos reflexos fotomotores (13, 15). A crotóxina induz ainda à injúria sistêmica e seletiva nos músculos ou grupos musculares compostos por fibras musculares oxidativas (13).

As alterações hematológicas encontradas estão relacionadas aos glóbulos vermelhos, aos brancos, às plaquetas e aos fatores de coagulação. O veneno crotálico causa hemólise “in vitro”, porém “in vivo” nunca foi demonstrado. A velocidade de hemossedimentação varia inversamente com o tempo de coagulação. Neste caso há evidente consumo de fibrinogênio e de outros fatores de coagulação tornando o sangue dos doentes incoagulável (8). Os glóbulos brancos encontram-se aumentados com valores em geral acima de 15.000 /mm<sup>3</sup> e com desvio à esquerda escalonado. Em relação às plaquetas, as alterações encontradas estão relacionadas com o número e com a agregação. Em geral o número pode estar normal ou diminuído, além de diminuição ou ausência de agregação plaquetária nos primeiros dias após o acidente (8, 15).

As alterações observadas nos fatores de coagulação estão relacionadas possivelmente com a enzima “tipo trombina”, sendo esta uma das frações do veneno que tem a capacidade de transformar fibrinogênio em fibrina “in vitro”. Isto acaba levando a consumo de fatores de coagulação e a incoagulabilidade sangüínea (8, 16).

Estudos realizados por Barraviera *et al.* (17, 18), realizados no fígado de ratos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus* foram observadas extensas áreas de degeneração hidrópica. Barraviera *et al.* (18), sugerem que os danos hepáticos podem ser induzidos pela ação direta do veneno ou pelo efeito das citocinas (IL1, IL6, IL8) nos hepatócitos (19).

Anteriormente à descoberta do soro antiofídico, os indivíduos picados eram tratados por curandeiros que os submetiam a simpatias, aplicações de

soluções preparadas a partir de inúmeros vegetais e álcool e também pelo uso de pedras porosas cuja função era retirar o veneno contido na ferida (20).

Atualmente, no tratamento dos acidentes por picadas de serpentes são utilizados soros heterólogos monovalentes ou polivalentes obtidos a partir do plasma de animais, geralmente eqüídeos e ovinos, hiperimunizados com venenos de serpentes (21).

Antivenenos preparados a partir de plasmas hiperimunizados de cavalos são considerados o único tratamento específico para envenenamento por serpentes no Brasil (10, 22).

O método correntemente utilizado para o preparo destes anti-soros são modificações do método originalmente desenvolvido por Pope em 1939. Ainda hoje, os antivenenos, usados na terapêutica dos acidentes ofídicos, são preparados a partir de plasma eqüino rico em anticorpos específicos. Para a obtenção de antivenenos ricos em anticorpos, mas relativamente pobres em proteínas não-imunoglobulinas, submete-se o plasma dos cavalos a variação não fisiológica de pH, temperatura e concentração da fração gama com sulfato de amônia (23).

A produção de soro hiperimune depende da imunogenicidade de cada veneno. Entende-se por imunogenicidade, a capacidade de uma molécula induzir resposta imune, sendo determinada tanto pela estrutura química intrínseca da molécula inoculada, como pela capacidade do animal hospedeiro em reconhecer ou não o composto injetado (24).

Para o acompanhamento da imunogenicidade e produção de anticorpos durante o processo de hiperimunização de animais, várias técnicas são utilizadas.

As técnicas de imunoensaio, utilizando reagentes marcados para a detecção de antígenos e anticorpos são extremamente sensíveis e econômicas. Os ensaios com anticorpo de fase sólida, utilizando ligantes marcados com isótopos radioativos ou com enzimas (imunosorbente enzima-ligado; ELISA) são, provavelmente, de todos os métodos imunológicos, os mais amplamente utilizados, pela possibilidade de se realizar vários testes simultaneamente em período de tempo relativamente curto (25, 26).

Durante as últimas duas décadas, numerosos métodos de ELISA têm sido descritos em várias partes do mundo com diferentes intenções. Entretanto,

estes novos métodos são similares ao desenvolvido anteriormente por Theakston *et al.* (27).

Ainda, para a obtenção de soros hiperimunes antiofídicos há a necessidade da mistura de adjuvantes aos venenos no processo de produção (1).

Adjuvantes são substâncias não específicas que estimulam a resposta imune. O uso de adjuvantes possibilita a liberação lenta dos antígenos (por formar uma capa protetora envolvendo o antígeno, protegendo-o contra o rápido catabolismo), além de estimular resposta imune não específica pelo aumento na liberação de linfocinas; estas estimulam diretamente a atividade de células processadoras de antígeno e causam reação inflamatória no local da injeção (24).

Os adjuvantes que vêm sendo utilizados na hiperimunização de cavalos com bons resultados são o Adjuvante de Freund Completo e Incompleto, que são administrados respectivamente no primeiro e segundo inóculos e o alginato de sódio ou hidróxido de alumínio nos demais. (28, 29).

Devido a algumas reações adversas causadas por estes adjuvantes, têm sido realizados esforços no sentido de identificar novos adjuvantes eficientes para a produção de antivenenos (29).

Na produção de soros antipeçonhentos, cada veneno é inoculado em cavalos que, pela facilidade de resposta ao estímulo da peçonha e pelo seu grande porte, favorecem a produção de grande volume de sangue rico em anticorpos (30).

Nos últimos cem anos o cavalo permaneceu como animal de escolha para a produção de antivenenos, pois normalmente é fácil de manusear e pode ser treinado para se manter parado, com mínimo de contenção, durante a sangria e plasmaferese. Também os métodos de purificação das antitoxinas obtidas a partir do sangue de eqüinos, são mais conhecidos e estudados em relação a outros animais (31, 32).

O alto custo, tanto do cavalo como o da sua manutenção, estimula à pesquisa de esquemas alternativos de hiperimunização que visam títulos elevados de anticorpos específicos nesses animais a partir da imunização básica (primeira imunização) (33).

Segundo Sjostrom *et al.* (32), os cavalos adaptam-se facilmente a vários climas, podem produzir antiveneno por 15 anos ou mais, e devido ao seu

tamanho, é possível coletar grandes volumes de sangue (acima de 10 litros) de uma só vez. Eles podem ser imunizados com um ou mais venenos, e métodos simples têm sido desenvolvidos para purificar imunoglobulinas eqüinas.

A despeito destas vantagens, existem importantes razões para considerar sua substituição para produção de antivenenos. Os cavalos não são amplamente disponíveis, são caros tanto para sua aquisição, quanto sua manutenção; e têm poderosa resposta imune mediada por células a qual pode resultar na formação de grandes abscessos no local da inoculação (32, 34).

Por outro lado, o problema da escolha de tratamento adequado, após os acidentes com animais peçonhentos, em pacientes sensíveis ao soro eqüino não é algo incomum. Nestes casos, são instituídas terapias alternativas que em geral são menos eficientes (35).

A administração de imunoglobulinas eqüinas concentradas ou  $F(ab)_2$  freqüentemente causa reação de hipersensibilidade tipo III mediada por imuno-complexos, provavelmente por causa da bivalência destas moléculas e das encontradas em cavalos que têm altos níveis de  $IgG_T$  circulante (32).

De acordo com Fan & França (30), reações à soroterapia constituem um processo imune no qual proteínas heterólogas são inoculadas dentro do organismo, iniciando o mecanismo de hipersensibilidade ao antídoto.

Para resolver este problema alguns pesquisadores (32, 35, 36, 37, 38, 39) optaram pela imunização de animais alternativos como coelhos, cabras e ovelhas, obtendo bons resultados na produção do soro.

Os cavalos têm sido substituídos por ovelhas para produção de antivenenos, por alguns Centros produtores, com o intuito de se obter um soro mais eficaz, seguro e barato, além da possibilidade do seu uso em pacientes sensíveis às proteínas eqüinas (40, 41).

As ovelhas estão amplamente distribuídas na maioria dos países e são relativamente baratas tanto para sua compra quanto para sua manutenção. Também não existem fatores emotivos contra seu uso para a produção de antivenenos (32, 42). Segundo os mesmos autores, estes animais são fáceis de manusear, podendo-se imunizá-los em múltiplos locais e a sangria pode ser feita pela veia jugular externa.

Dependendo do tamanho do animal e devido, em parte, a contração esplênica, entre 500 e 700 mL de sangue podem ser coletados mensalmente

por período maior que 6 anos, isto sem detrimento para a ovelha e nenhum risco de causar anemia por deficiência de ferro (32, 42).

A substituição de cavalos por ovelhas para a produção de antivenenos tem duas grandes vantagens: primeira, um pequeno número de animais (freqüentemente menos que 5%), que falham em desenvolver altos títulos de anticorpos, podem ser facilmente substituídos; segunda, e mais importante, cada ovelha no rebanho é imunizada somente com um veneno e portanto, produzem produto específico (32, 42).

É sabido que a mistura de antivenenos monoespecíficos é significativamente mais protetora que o produto poliespecífico obtido pela imunização de cada ovelha com dois ou mais venenos (32, 43).

Sjostrom *et al.* (32), produziram antivenenos em ovelhas e compararam então com o antiveneno eqüino comercial. As ovelhas apresentaram boa tolerância aos adjuvantes de Freund e outros adjuvantes, sem apresentarem lesões locais importantes. Altos títulos de anticorpos de alta afinidade eram rapidamente desenvolvidos, mas IgG<sub>T</sub>, observada nos eqüinos, não foi detectada.

Dart *et al.* (32, 44), testaram anti-soros, obtidos de carneiros, em pacientes humanos verificando que não havia desenvolvimento de reações alérgicas imediatas ou tardias e que estes se mostraram eficientes na soroneutralização.

Ariaratnam *et al.* (45), produziram um antiveneno em ovelhas contra *Daboia russelli russelli* e compararam ao antiveneno comercial produzido em eqüinos. Segundo os mesmos autores o antiveneno produzido em ovelhas mostrou-se mais seguro.

Netto *et al.* (46), compararam as alterações hematológicas do uso do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo e irradiado no processo de hiperimunização de ovelhas adultas. Verificaram que o veneno irradiado produz alterações hematológicas e bioquímicas menos intensas que o veneno nativo. Segundo os mesmos autores, as ovelhas são animais potenciais e alternativos para serem utilizados na produção de soro anticrotálico.

Para obtenção de plasmas hiperimunes antibotrópicos e anticrotálicos, os cavalos são inoculados com diversas doses de venenos dessecados que normalmente possuem atividade tóxica elevada. Com relativa freqüência são

observadas reações locais e sistêmicas que podem levar, inclusive o animal à morte (33).

A inoculação do veneno cru fornece títulos elevados; entretanto, o veneno total é freqüentemente mal tolerado pelo animal. Como resultado, toxóides têm sido preparados por detoxificação biológica do veneno com preservação da imunogenicidade (2)

Os raios cósmicos, a radiação gama, os raios X, a radiação ultravioleta, as microondas e as ondas de rádio fazem parte das radiações eletromagnéticas. Uma das características destas radiações eletromagnéticas é a alta energia associada à ausência de massa, o grande poder de penetração e a capacidade de promover ionizações e excitações no meio onde se propagam (47).

Dentro do espectro eletromagnético as microondas e as ondas de rádio são classificadas como não ionizantes. As radiações ultravioleta encontram-se em nível intermediário, entre as radiações ionizantes e não ionizantes, e os raios cósmicos, a radiação gama e os raios X são classificados como radiações ionizantes (47).

As radiações ionizantes recebem este nome porque provocam ionizações, ou seja, ao atravessarem uma substância (tecido biológico ou qualquer outro tipo de matéria) têm a propriedade de arrancar elétrons, em geral da camada periférica dos átomos, resultando na formação de pares de íons, positivo e negativo. Estes tipos de radiações eletromagnéticas causam também excitações, processos nos quais os elétrons das camadas externas do átomo-alvo absorvem energia suficiente para atingir estado energético mais elevado, permanecendo associados ao átomo e emitindo energia sob a forma de luz visível ou ultravioleta (48).

As proteínas são um dos principais constituintes de materiais biológicos, entre os quais se incluem os venenos de origem animal. A irradiação de proteínas no estado seco ou em solução leva a alterações químicas, físico-químicas e estruturais bastante significativas. Estas mudanças resultam em diminuição e inativação de algumas atividades biológicas destas proteínas, tais como atividade tóxica, enzimática e/ou imunológica (49).

O tratamento de materiais biológicos com a radiação ionizante está sendo aplicado em várias áreas, tais como esterilização de materiais hospitalares

(50), imobilização de enzimas (51), irradiação de alimentos (52), atenuação de toxinas (53), entre outros.

No Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), com a crise na produção de soros antiofídicos instalada no país no início da década de 80, iniciaram-se os estudos sobre a radiação ionizante como ferramenta na destoxicação de venenos ofídicos (53, 54, 55, 56, 57).

A radiação gama vem sendo bastante eficiente na atenuação de venenos ofídicos, sendo capaz de diminuir a toxicidade, sem alterar a imunogenicidade e sem adicionar nenhuma substância ao veneno, o que poderia interferir durante o esquema de imunização (58, 59, 60, 61, 62, 63).

Por fim, deve ser salientado que a elevada ocorrência dos acidentes ofídicos no Brasil, aliada a necessidade de otimizar a produção de soro específico a baixo custo, juntamente com as vantagens da irradiação ionizante como método de atenuação destas toxinas, justificam-se plenamente pesquisas relacionadas com o tema.

Além disso, a grande disponibilidade, fácil manuseio, baixos custos de aquisição e manutenção nos levam considerar o uso de ovinos como alternativa na produção de antivenenos.

## 2. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

- 1- Avaliar, acompanhar e comparar a resposta imune humoral de carneiros jovens inoculados com veneno obtido de *Crotalus durissus terrificus*, na forma nativa e irradiada com  $^{60}\text{Co}$ , utilizando o ensaio imuno enzimático de ELISA;
- 2- Determinar e comparar a potência e a capacidade de neutralização do soro obtido dos carneiros jovens inoculados com veneno obtido de *Crotalus durissus terrificus*, na forma nativa e irradiada com  $^{60}\text{Co}$  utilizando método “in vitro”;
- 3- Realizar avaliações clínicas, laboratoriais e ponderal dos carneiros jovens, inoculados com veneno nativo ou irradiado com  $^{60}\text{Co}$  durante todo o processo de hiperimunização;
- 4- Verificar se o crescimento e ganho de peso dos animais poderiam ser influenciados pelos esquemas de hiperimunização.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1 Material**

Para atingir os objetivos propostos no presente trabalho e para facilitar a compreensão serão descritos os animais, as peçonhas, os reagentes utilizados, bem como a fonte de irradiação.

##### **3.1.1. Animais utilizados nos experimentos**

###### **3.1.1.1. Carneiros**

Foram utilizados 18 carneiros, com 60 a 75 dias de idade, machos, das raças Santa Inês e Ile de France, mantidos no Laboratório de Estudos em Biotecnologia da Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP. Os animais foram gentilmente cedidos por criadores de ovinos da região de Botucatu.

Durante a realização dos experimentos, os animais foram mantidos em baias, divididos em quatro animais por baia. A limpeza era feita diariamente e a alimentação se deu à base de ração comercial para ovinos (Purina® e Nutrimin®), oferecida duas vezes ao dia. Receberam também feno, sal mineral (Purina®) e água *ad libitum*.

Antes do início dos experimentos, todos os animais foram submetidos à pesagem, vermifugados com Levamisol e colhida fezes para exame parasitológico.

###### **3.1.1.2. Camundongos**

Foram utilizados camundongos Swiss, com peso entre 18-22 gramas, criados e mantidos no Biotério do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, CEVAP-UNESP, no Campus de Botucatu, Estado de São Paulo.

Durante a realização dos experimentos, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno e divididos em oito animais por caixa. Para a forração

das caixas foi utilizada maravalha de pinho. A alimentação e a água foram disponibilizadas *ad libitum*.

Todos os procedimentos envolvendo os carneiros e camundongos foram conduzidos conforme legislação ética nacional e internacional e aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

### **3.1.2. Peçonha utilizada nos experimentos**

Foi utilizado um “pool” de peçonha obtido de serpentes adultas da espécie *Crotalus durissus terrificus*, mantidas no serpentário do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), localizado na UNESP – Campus de Botucatu, Estado de São Paulo.

A extração do veneno foi realizada segundo metodologia desenvolvida pela equipe técnica do Laboratório de Extração de Venenos do CEVAP (64). O veneno foi liofilizado após a extração e mantido em freezer a – 20 °C.

Uma parte dos venenos foi submetida à radiação gama no Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP, localizado no Campus da Universidade de São Paulo – USP. Este veneno foi denominado de veneno irradiado. A outra parte foi mantida liofilizada, sendo denominada veneno nativo (57).

### **3.1.3. Reagentes e fonte de irradiação**

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade pró-análise. Para o preparo das soluções foi utilizado solução salina (PBS).

A irradiação foi realizada por meio de uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  (Gama Cell 220, Atomic Energy Agency of Canadá), disponível no Centro de Tecnologia das Radiações do Departamento de Aplicações de Técnicas Nucleares do IPEN/CNEN-SP.

## **3.2. Métodos**

A metodologia empregada incluiu a irradiação das peçonhas, a atividade tóxica das peçonhas, o processo de imunização dos carneiros, a titulação dos anticorpos, a avaliação da neutralização e da potência dos soros, a avaliação clínica dos animais e por fim, a análise estatística.

### **3.2.1. Irradiação da peçonha**

Do veneno liofilizado, retirou-se alíquotas de 2 mg que foram diluídas com solução salina acidificada (NaCl 150 mM, pH 3,0), alcançando a concentração final de 2 mg/mL. A seguir, as amostras foram submetidas para irradiação a uma fonte de  $^{60}\text{Co}$ , com uma dose de 2000 Gy a uma taxa de dose de 5,25 KGy/h.

A irradiação das amostras ocorreu sempre na presença de oxigênio, na temperatura ambiente e de forma homogênea e ininterrupta, conforme protocolo padronizado (57).

### **3.2.2. Atividade tóxica da peçonha**

A determinação da toxicidade das amostras nativas foi realizada pelo cálculo da dose letal capaz de matar 50% dos animais do experimento ( $DL_{50}$ ), segundo Spearman-Kärber, (65).

O valor da  $DL_{50}$  do veneno nativo utilizado foi de 0,148  $\mu\text{g/g}$  de camundongo (63).

### **3.2.3. Processo de imunização dos carneiros**

Foram utilizados três grupos com seis animais cada. O Grupo 1 (G1) recebeu veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus*, o Grupo 2 (G2) recebeu veneno irradiado de *Crotalus durissus terrificus* e o Grupo 3 (G3) permaneceu como grupo controle, não recebendo, portanto, qualquer tipo de veneno.

Os animais dos grupos 1 e 2 receberam respectivamente, seis inóculos de veneno em diferentes momentos (M) a saber: no dia um (M1) receberam 500 $\mu\text{g}$

de veneno diluído em 1 mL de PBS homogenizado com 1mL de Adjuvante Completo de Freund por via intradérmica; nos dias 14 (M2) e 28 (M3) com 1 mg de veneno diluído em 1 mL de PBS homogenizado com 1 mL Hidróxido de Alumínio por via subcutânea; no dia 42 (M4) receberam 1,5 mg de veneno diluído em 2 mL de PBS por via subcutânea e nos dias 56 (M5) e 70 (M6) receberam 2 mg de veneno diluídos em 2 mL de PBS por via subcutânea.

Os animais do Grupo 3 receberam os inóculos nos mesmos dias apenas com os respectivos adjuvantes.

Todos animais foram inoculados em quatro pontos diferentes nas regiões laterais do pescoço, num total de 2 mL da solução, cada ponto recebeu 0,5 mL da mistura.

Na área da aplicação foram realizadas tricotomia e anti-sepsia com álcool iodado.

### **3.2.4 Titulação dos anticorpos séricos contra os venenos inoculados por meio do Ensaio Imuno Enzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - ELISA)**

#### A- Reagentes

- a) Placas de microtitulação Hemobag de 96 poços
- b) Tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6
- c) Solução salina, contendo 0,05% de Tween 20<sup>®</sup>
- d) Leite em pó desnatado (Molico<sup>®</sup>) a 5%
- e) Soro IgG de burro anti-IgG de carneiro, conjugado com peroxidase (SIGMA<sup>®</sup>)
- f) Orto fenilendiamina
- g) Água oxigenada
- h) Tampão citrato/fosfato 0,05M pH 5,0
- i) Ácido cítrico 0,2M

## B- Procedimento

Foram sensibilizadas, durante 12 horas a 4 °C em câmara úmida, placas plásticas de 96 poços com 100 µL por poço de uma solução de antígeno a 10 µg/mL (1µg/poço), diluídos em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05M e pH 9,6. A placa foi lavada 4 vezes com solução salina 0,15M contendo 0,05% de Tween 20<sup>®</sup>. Foram aplicadas 200µL por poço de solução de bloqueio (5g de Molico<sup>®</sup> q.s.p. 100mL de PBST) e deixado por 1 hora a 37 °C, em câmara úmida.

Foram aplicados, nos poços, 100 µL de soro de carneiros previamente imunizados, diluídos a partir de 1/100 em solução de bloqueio e aplicadas na placa, em duplicata.

Após a incubação por 1 hora a 37°C, em câmara úmida, as placas foram lavadas 4 vezes com PBST 0,15M, e iniciou-se a revelação com adição de 100 µL de soro de burro anti-IgG de carneiro conjugado com peroxidase (SIGMA<sup>®</sup>), diluído 1/2000 da fração alíquotada (Sigma), em solução de bloqueio; aplicou-se 100 µL por poço. Após a incubação durante 1 hora a 37 °C, em câmara úmida, as placas foram lavadas 4 vezes com PBST 0,15M.

A reação foi revelada pela adição de uma solução de OPD (O-phenylenediamine) 0,5 mg/mL e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) 0,5mg/mL em tampão citrato de sódio/ácido cítrico (0,05M e pH5,0); foram aplicadas 100 µL por poço e deixadas durante 20 minutos, a temperatura ambiente, no escuro e então foi interrompida com a adição de 50 µL (por poço) de ácido cítrico 0,2M.

A leitura de cada poço foi feita em leitor automático de microplaca (DYNATECH MR 4000<sup>®</sup>), utilizando-se filtro de comprimento de onda de 490nm.

Todas as amostras de soro foram testadas em duplicata em duas leituras diferentes. O soro de animais não imunizados foi utilizado como controle.

### 3.2.5. Neutralização e potência do soro

#### 3.2.5.1. Avaliação da capacidade de neutralização “in vitro” do anticorpo antiveneno

Para a avaliação da capacidade de neutralização dos soros obtidos dos carneiros inoculados com veneno nativo ou com veneno irradiado de serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus*, no 84º dia após a primeira inoculação, uma alíquota do “pool” dos soros de cada grupo foi diluída em PBS: 1:5, 1:10, 1:20 e 1:40. Uma alíquota de soro puro também foi incluída no teste. Uma alíquota de 100 µL de cada solução foi incubada com 100 µL de uma solução contendo 5 DL<sub>50</sub> de veneno nativo diluído. A incubação foi realizada em tubos do tipo “ependorf” mantidos em estufa a 37 °C, por um período de 30 minutos (66).

Posteriormente, 200 µL de cada solução foram inoculados individualmente em oito camundongos por via intraperitoneal. Para efeito de controle, foram inoculados em outros oito camundongos 200 µL de uma solução contendo cinco DL<sub>50</sub> do veneno nativo diluída em PBS para a comprovação da sua toxicidade. Outros oito camundongos receberam apenas 100 µL de uma alíquota de soro diluída em 100 µL de PBS para avaliação da sua inocuidade.

Após 24 e 48 horas a taxa de mortalidade foi registrada.

A capacidade neutralizante do “pool” dos soros (em µg de toxina/mL de antiveneno) foi calculada conforme Kaiser *et al.* (1986), utilizando-se a seguinte equação (67):

$$\text{Capacidade neutralizante da toxina (CNT)} = (D - DL_{50}) \times 1 \times 10^5 \times (1/V_{50})$$

Em que D = Dose total da toxina (µg/g); DL<sub>50</sub> em µg/g; V<sub>50</sub> = Volume antiveneno que reduz a letalidade de 1 mL da solução de injeção da toxina a 50%. A letalidade de 50% significará que o anti-soro foi capaz de reduzir a dose efetiva para 1 DL<sub>50</sub>.

### **3.2.5.2. Avaliação da potência “in vitro” do anticorpo antiveneno**

Para a avaliação da potência dos soros obtidos dos carneiros inoculados com veneno nativo ou com veneno irradiado de serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus*, no 84º dia após a primeira inoculação, uma alíquota de 100 µL do “pool” de soros de cada grupo foi incubado com 100 µL de uma solução contendo quantidades de veneno nativo diluídos em PBS equivalentes a 1, 3, 5, 10 e 15 DL<sub>50</sub>. A incubação foi realizada em tubos do tipo “eppendorf” mantidos em estufa a 37 °C, por um período de 30 minutos (66).

Posteriormente, 200 µL de cada solução foram inoculados individualmente em oito camundongos por via intraperitoneal. Para efeito de controle, foram inoculados em outros oito camundongos 200 µL de uma solução contendo cinco DL<sub>50</sub> do veneno nativo diluída em PBS para a comprovação da sua toxicidade. Outros oito camundongos receberam apenas 100 µL de uma alíquota de soro diluída em 100 µL de PBS para avaliação da sua inocuidade.

Após 24 e 48 horas a taxa de mortalidade foi registrada.

### **3.2.6. Avaliação clínica e ponderal dos carneiros**

Os animais foram observados durante todo o processo de hiperimunização. A presença de alterações nos locais de inoculação, na pele e/ou no subcutâneo como dor e hipertermia, edema, alterações hemorrágicas, fístulas, abscessos e necroses, e o número de animais que vieram a óbito durante o processo foram relatados. Para isto, foi utilizada uma análise descritiva das observações.

Foram realizados, a cada 14 dias, durante todo experimento, hemograma completo, exames bioquímicos e parasitológicos, totalizando sete momentos (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7), com o intuito de se verificar incidência de vermes, desidratação, disfunção imunológica, hepática e renal dos animais. Neste período, os animais foram submetidos à pesagem para a determinação do ganho de peso.

### **3.2.7. Colheita de material**

#### **3.2.7.1. Sangue total**

As amostras individuais de sangue dos carneiros foram colhidas, após cada inóculo de veneno, por meio de punção da veia jugular com agulha hipodérmica (30x08mm) e seringas plásticas descartáveis<sup>1</sup> de 20mL, evitando-se o garroteamento prolongado e as múltiplas punções. As amostras foram acondicionadas de acordo com o exame laboratorial a ser realizado, sendo:

- Hemograma, contagem de plaquetas e proteína plasmática total: 1mL de sangue com EDTA (sal dissódico do ácido etileno diamino tetra-acético) a 10% como anticoagulante, na proporção de 0,1mL para cada 5mL de sangue.
- Provas de função hepática (aspartato aminotransferase - AST, proteína sérica total, albumina e globulina) e renal (uréia e creatinina): soro obtido por centrifugação (805xg) de 10mL de sangue sem anticoagulante.
- Teste de ELISA: soro obtido por centrifugação (805xg) de 10mL de sangue sem anticoagulante.

#### **3.2.7.2. Fezes**

Foram coletadas individualmente com auxílio de sacos plásticos previamente identificados, diretamente da ampola retal, fezes de todos os animais.

### **3.2.8. Exames laboratoriais**

#### **3.2.8.1. Hemograma, contagem de plaquetas, proteínas plasmáticas totais e fibrinogênio**

---

<sup>1</sup> BD - Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Brasil

A contagem do número total de hemácias e leucócitos foi realizada em contador automático de células<sup>1</sup>. A determinação da hemoglobina foi realizada segundo método colorimétrico a partir da formação da cianometahemoglobina e a determinação do volume globular foi feita pelo método do microhematócrito<sup>2</sup>.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células em esfregaços corados pelo método de Rosenfeld (68).

A determinação da proteína plasmática total foi realizada por refratometria<sup>3</sup> e a determinação do fibrinogênio foi realizada pelo método da precipitação pelo calor (56 °C), segundo Kaneko & Hervey (69) e posterior leitura por refratometria<sup>1</sup>.

### **3.2.8.2. Exames bioquímicos**

As amostras de soro para realização dos exames bioquímicos foram obtidas por centrifugação do sangue total. Estas foram armazenadas em alíquotas de 1,5 mL em frascos de polietileno a -20°C até o momento do processamento.

Após o descongelamento das amostras estas foram processadas no mesmo dia para a mensuração das seguintes provas bioquímicas por meio de análise espectrofotométrica<sup>4</sup>:

- *Uréia*: método enzimático colorimétrico<sup>5</sup>.
- *Creatinina*: método colorimétrico por reação cinética com o picrato alcalino<sup>6</sup>
- *Proteína sérica total*: método colorimétrico por reação com o reativo de biureto<sup>7</sup>.
- *Albumina*: método colorimétrico por reação com o verde de bromocresol<sup>8</sup>.

---

<sup>1</sup> CELL – Dyn 3500

<sup>2</sup> FANEM - Mod. 211

<sup>3</sup> Refratômetro ATAGO – SPR-T2 -Japan

<sup>4</sup> Espectrofotômetro Celm – SB-190

<sup>5</sup> Uréia ES - CELM

<sup>6</sup> Creatinina cinética - CELM

<sup>7</sup> Proteínas totais - LABTEST

<sup>8</sup> Albumina - LABTEST

- *Globulina*: cálculo da diferença de concentração entre a proteína sérica total e a albumina.
- *Aspartato aminotransferase (AST)*: método otimizado cinético em UV<sup>1</sup>.

### **3.2.8.3. Exames parasitológicos**

As amostras de fezes foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e remetidas imediatamente ao laboratório. No laboratório as fezes foram homogeneizadas e pesadas. Os exames foram realizados por meio da técnica McMaster (70), que permite a identificação e contagem de ovos por grama de fezes (opg) de ruminantes. Os animais receberam uma dose de 1 mL/40Kg de peso do vermífugo Levamisol (Ripercol L-150F®) repetida após 15 dias. Foram realizadas três contagens de opg nos dias 1, 15 e 30 respectivamente, sendo a primeira sem tratamento, utilizada como controle.

### **3.2.9. Análise estatística**

O estudo das respostas obtidas e avaliadas em sete momentos (M1 = dia um, M2 = dia 14, M3 = dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84), nos três grupos de pesquisa (G1 = veneno nativo, G2 = veneno irradiado, G3 = controle) ao longo do período experimental, foi realizado por meio da análise de medidas repetidas dos perfis médios dos grupos (ou procedimento similar não-paramétrico) segundo Johnson & Wichern (71).

Foi considerado o nível de 5% de significância para os testes obtidos pela estatística F.

---

<sup>1</sup> AST (GTO) - CELM

## 4. Resultados

### 4.1 – Método de Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

#### 4.1.1. Resultados do método de ELISA para o soro produzido em ovinos a partir de veneno nativo e irradiado com $^{60}\text{Co}$ de *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.) nos diferentes momentos

As médias de densidades ópticas, as variações e os desvios padrões resultantes dos títulos de anticorpos obtidos pela inoculação de veneno nativo (G1) e irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) de *Crotalus durissus terrificus* e os resultados da análise estatística dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) do “pool” de soro dos animais, nos diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84) e diluições (1:100, 1:200, 1:400 e 1:800) encontram-se nas tabelas 01 a 04 respectivamente.

Nas figuras 01 a 04 estão representados graficamente os valores das médias de densidades ópticas, nos diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84) e diluições (1:100, 1:200, 1:400 e 1:800), para os dois Grupos de animais, G1 e G2, inoculados com veneno nativo e veneno irradiado com  $^{60}\text{Co}$  respectivamente.

A tabela 05 apresenta as variações, as médias e os desvios padrões de densidades ópticas resultantes da diluição (1:100 a 1:51200) dos títulos de anticorpos obtidos pela inoculação de veneno nativo (G1) e veneno irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e os resultados da análise estatística dos ensaios imunoenzimáticos – ELISA – do “pool” de soros dos ovinos no 84º dia após a primeira inoculação.

A figura 05 representa graficamente os valores das médias de densidades ópticas resultantes da diluição (1:100 a 1:51200) dos títulos de anticorpos obtidos do “pool” de soros dos ovinos pela inoculação de veneno nativo (G1) e veneno irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) no 84º dia após a primeira inoculação.

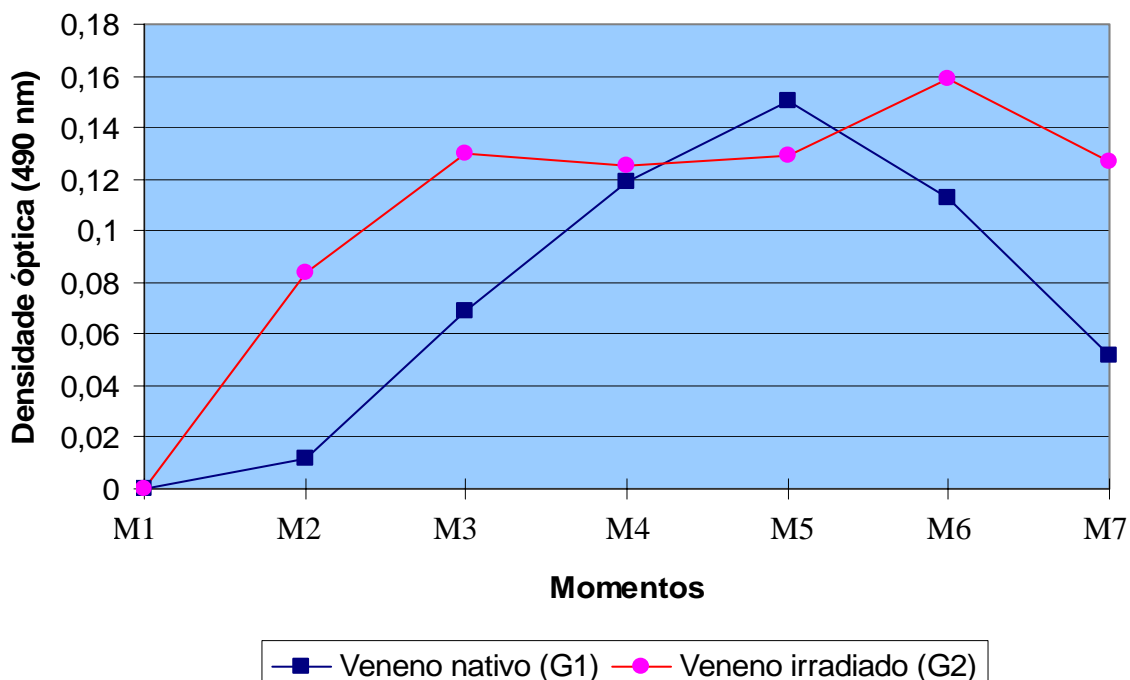
Tabela 01: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da densidade óptica (490 nm) obtidos por ensaio imunoenzimático indireto – ELISA – realizados em soro (diluição 1:100) dos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1) e irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) nos diferentes momentos.

Momentos		M2	M3	M4	M5	M6	M7
Grupos							
G1	Variação	0,011-0,014	0,051-0,088	0,100-0,138	0,100-0,199	0,091-0,133	0,031-0,073
	Média	0,012	0,069	0,119	0,150	0,113	0,052*
	D.P.	± 0,001	± 0,021	± 0,021	± 0,055	± 0,022	± 0,024
G2	Variação	0,057-0,110	0,081-0,180	0,104-0,147	0,107-0,150	0,106-0,212	0,109-0,144
	Média	0,084	0,130	0,125	0,129	0,159	0,127
	D.P.	± 0,031	± 0,053	± 0,023	± 0,024	± 0,060	± 0,019

Análise estatística	Hipótese	Estatística calculada	Significância	Comentários
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 7,652	p < 0,05	M1≠M2≠M3≠M4≠M5≠M6≠M7
<b>Grupos</b>	G1=G2	F= 26,352	p < 0,05	G1 < G2
<b>Interação dos</b>	p/ M1 : G1 = G2			p/ M1 : G1 = G2
	p/ M2 : G1 = G2			p/ M2 : G1 < G2
<b>Momentos entre</b>	p/ M3 : G1 = G2			p/ M3 : G1 < G2
	p/ M4 : G1 = G2	F= 2,387	p < 0,05	p/ M4 : G1 < G2
<b>Grupos</b>	p/ M5 : G1 = G2			p/ M5 : G1 > G2
	p/ M6 : G1 = G2			p/ M6 : G1 < G2
	p/ M7 : G1 = G2			p/ M7 : G1 < G2

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1-M7). D.P. = Desvio Padrão

G1= grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, não demonstrado, refere-se ao dia do primeiro inóculo, portanto suas densidades ópticas são nulas.



M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 01: Valores médios nos diferentes momentos das densidades ópticas (490 nm) obtidos por ensaio imunoenzimático indireto – ELISA – realizados em “pool” de soros (diluição 1:100) de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo e irradiado com  $^{60}\text{Co}$ .

A tabela 01 e a figura 01 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1 e 2, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, na diluição de 1:100, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 26,352$ ) ( $G1 < G2$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, na diluição de 1:100, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 7,652$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), na diluição de 1:100, apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 2,387$ ). Portanto, não houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

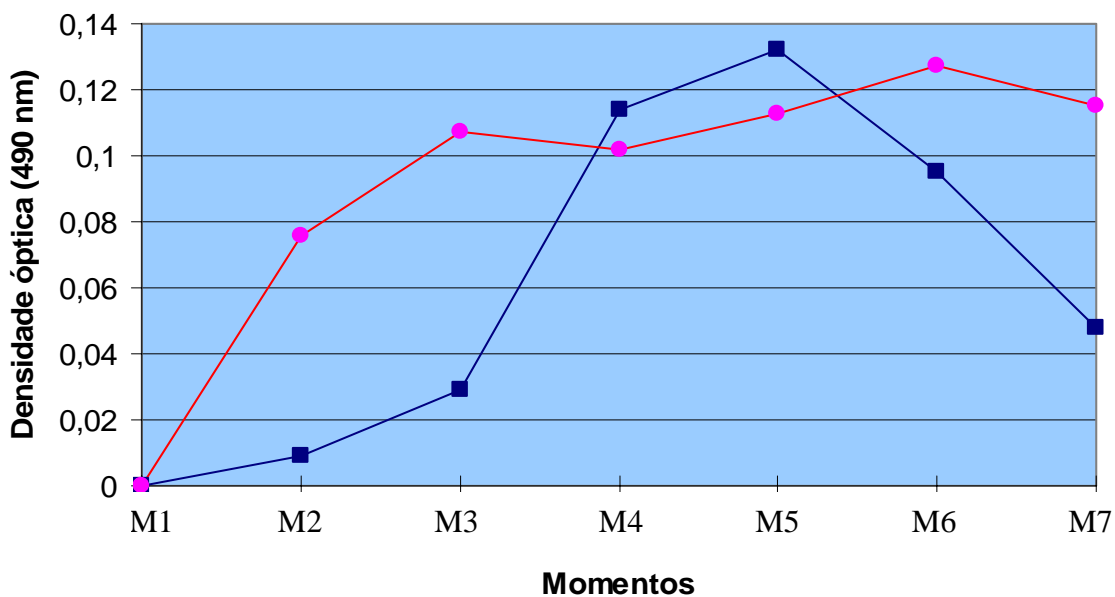
Tabela 02: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da densidade óptica (490 nm) obtidos por ensaio imunoenzimático indireto – ELISA – realizados em soro (diluição 1:200) dos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1) e irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) nos diferentes momentos.

Momentos		M2	M3	M4	M5	M6	M7
Grupos							
G1	Variação	0,008-0,011	0,027-0,032	0,088-0,148	0,112-0,152	0,081-0,110	0,015-0,080
	Média	0,009	0,029	0,114	0,132	0,095	0,048*
	D.P.	± 0,001	± 0,002	± 0,031	± 0,031	± 0,016	± 0,037
G2	Variação	0,054-0,096	0,060-0,152	0,096-0,105	0,111-0,114	0,096-0,159	0,094-0,139
	Média	0,076	0,107	0,102	0,113	0,127	0,115
	D.P.	± 0,023	± 0,053	± 0,004	± 0,001	± 0,037	± 0,023

Análise estatística	Hipótese	Estatística calculada	Significância	Comentários
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 10,638	p < 0,05	M1≠M2≠M3≠M4≠M5≠M6≠M7
<b>Grupos</b>	G1=G2	F= 23,157	p < 0,05	G1 < G2
<b>Interação dos</b>	p/ M1 : G1 = G2			p/ M1 : G1 = G2
	p/ M2 : G1 = G2			p/ M2 : G1 < G2
<b>Momentos entre</b>	p/ M3 : G1 = G2			p/ M3 : G1 < G2
	p/ M4 : G1 = G2	F= 5,176	p < 0,05	p/ M4 : G1 > G2
<b>Grupos</b>	p/ M5 : G1 = G2			p/ M5 : G1 > G2
	p/ M6 : G1 = G2			p/ M6 : G1 < G2
	p/ M7 : G1 = G2			p/ M7 : G1 < G2

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1-M7). D.P. = Desvio Padrão

G1= grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, não demonstrado, refere-se ao dia do primeiro inóculo, portanto suas densidades ópticas são nulas.



M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 02: Valores médios nos diferentes momentos das densidades ópticas (490 nm) obtidos por ensaio imunoenzimático indireto – ELISA – realizados em “pool” de soros (diluição 1:200) de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo e irradiado com  $^{60}\text{Co}$ .

A tabela 02 e a figura 02 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1 e 2, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, na diluição de 1:200, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 23,157$ ) ( $G1 < G2$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, na diluição de 1:200, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 10,638$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), na diluição de 1:200, apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 5,176$ ). Portanto, não houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

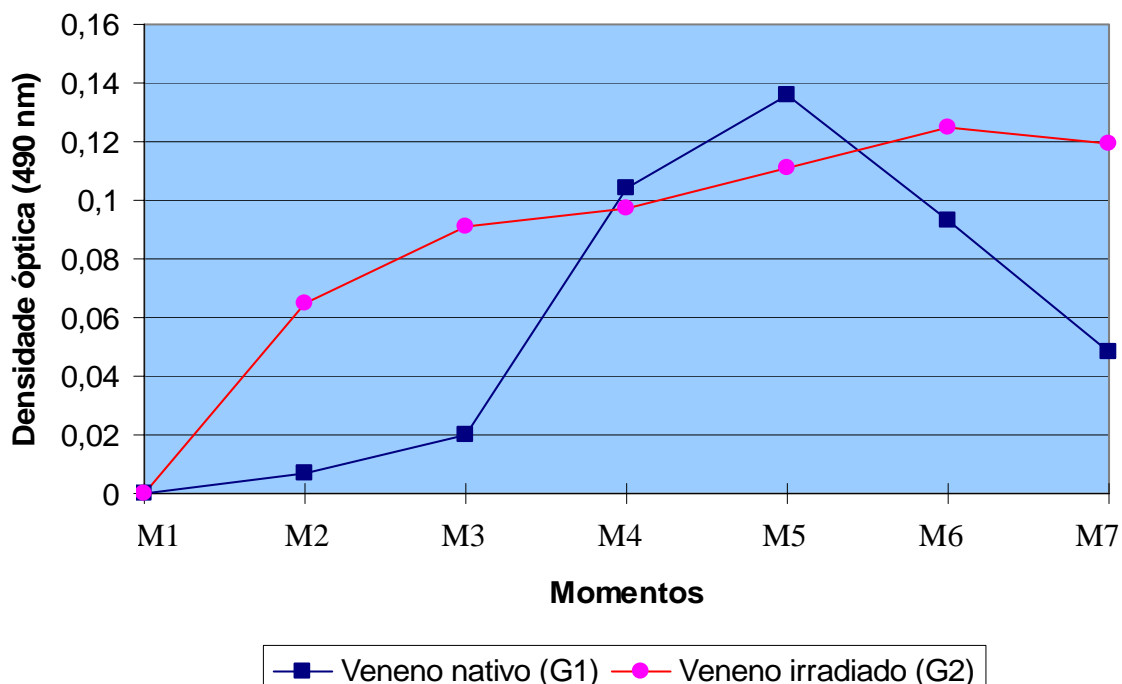
Tabela 03: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da densidade óptica (490 nm) obtidos por ensaio imunoenzimático indireto – ELISA – realizados em soro (diluição 1:400) dos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1) e irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) nos diferentes momentos.

Momentos		M2	M3	M4	M5	M6	M7
Grupos							
G1	Variação	0,005-0,008	0,017-0,022	0,091-0,118	0,107-0,183	0,080-0,104	0,020-0,082
	Média	0,007	0,020	0,104	0,136	0,093	0,048*
	D.P.	± 0,001	± 0,002	± 0,014	± 0,035	± 0,013	± 0,028
G2	Variação	0,044-0,083	0,057-0,125	0,095-0,101	0,105-0,115	0,098-0,151	0,113-0,126
	Média	0,065	0,091	0,097	0,111	0,125	0,119
	D.P.	± 0,021	± 0,039	± 0,003	± 0,005	± 0,030	± 0,006

Análise estatística	Hipótese	Estatística calculada	Significância	Comentários
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 21,932	p < 0,05	M1≠M2≠M3≠M4≠M5≠M6≠M7
<b>Grupos</b>	G1=G2	F= 22,515	p < 0,05	G1 < G2
<b>Interação dos</b>	p/ M1 : G1 = G2			p/ M1 : G1 = G2
	p/ M2 : G1 = G2			p/ M2 : G1 < G2
<b>Momentos entre</b>	p/ M3 : G1 = G2			p/ M3 : G1 < G2
	p/ M4 : G1 = G2	F= 8,410	p < 0,05	p/ M4 : G1 > G2
<b>Grupos</b>	p/ M5 : G1 = G2			p/ M5 : G1 > G2
	p/ M6 : G1 = G2			p/ M6 : G1 < G2
	p/ M7 : G1 = G2			p/ M7 : G1 < G2

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1-M7). D.P. = Desvio Padrão

G1= grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, não demonstrado, refere-se ao dia do primeiro inóculo, portanto suas densidades ópticas são nulas.



M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 03: Valores médios nos diferentes momentos das densidades ópticas (490 nm) obtidos por ensaio imunoenzimático indireto – ELISA – realizados em “pool” de soros (diluição 1:400) de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo e irradiado com  $^{60}\text{Co}$ .

A tabela 03 e a figura 03 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1 e 2, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, na diluição de 1:400, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 22,515$ ) ( $G1 < G2$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, na diluição de 1:400, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 21,932$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), na diluição de 1:400, apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 8,410$ ). Portanto, não houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

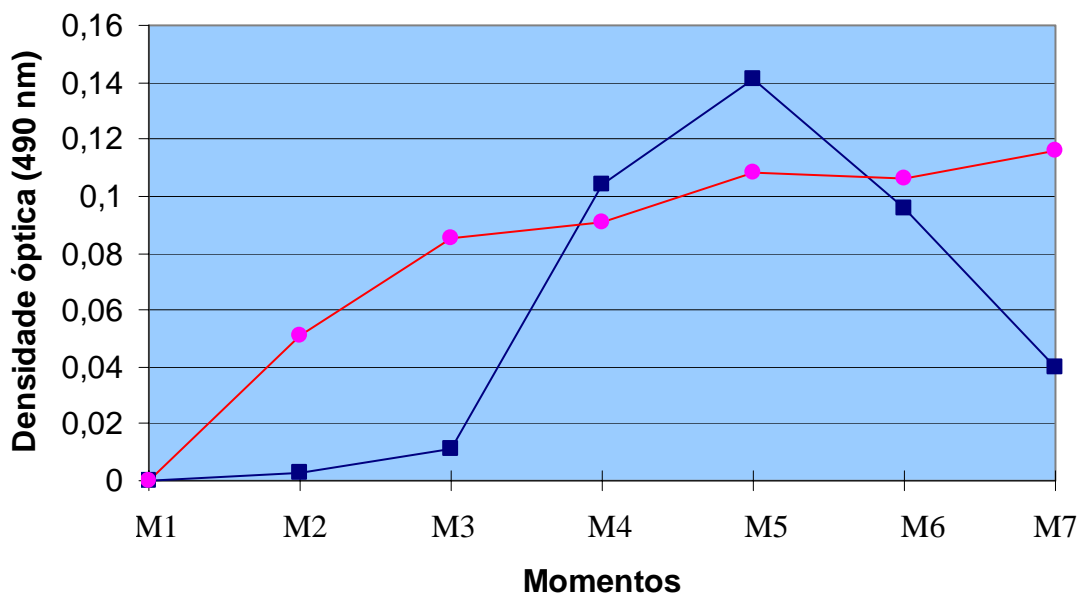
Tabela 04: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da densidade óptica (490 nm) obtidos por ensaio imunoenzimático indireto – ELISA – realizados em soro (diluição 1:800) dos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1) e irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) nos diferentes momentos.

Momentos		M2	M3	M4	M5	M6	M7
<b>G1</b>	Variação	0,002-0,004	0,008-0,015	0,084-0,122	0,100-0,182	0,069-0,118	0,004-0,075
	Média	0,003	0,011	0,104	0,141	0,096	0,040*
	D.P.	± 0,001	± 0,003	± 0,002	± 0,046	± 0,025	± 0,041
<b>G2</b>	Variação	0,037-0,063	0,050-0,118	0,083-0,098	0,101-0,113	0,079-0,133	0,093-0,139
	Média	0,051	0,085	0,091	0,108	0,106	0,116
	D.P.	± 0,014	± 0,038	± 0,007	± 0,006	± 0,030	± 0,025

Análise estatística	Hipótese	Estatística calculada	Significância	Comentários
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 21,841	p < 0,05	M1≠M2≠M3≠M4≠M5≠M6≠M7
<b>Grupos</b>	G1=G2	F= 6,407	p < 0,05	G1 < G2
<b>Interação dos</b>	p/ M1 : G1 = G2			p/ M1 : G1 = G2
	p/ M2 : G1 = G2			p/ M2 : G1 < G2
<b>Momentos entre Grupos</b>	p/ M3 : G1 = G2			p/ M3 : G1 < G2
	p/ M4 : G1 = G2	F= 7,743	p < 0,05	p/ M4 : G1 > G2
	p/ M5 : G1 = G2			p/ M5 : G1 > G2
	p/ M6 : G1 = G2			p/ M6 : G1 < G2
	p/ M7 : G1 = G2			p/ M7 : G1 < G2

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1-M7). D.P. = Desvio Padrão

G1= grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, não demonstrado, refere-se ao dia do primeiro inóculo, portanto suas densidades ópticas são nulas.



—■— Veneno nativo (G1) —●— Veneno irradiado (G2)

M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 04: Valores médios nos diferentes momentos das densidades ópticas (490 nm) obtidos por ensaio imunoenzimático indireto – ELISA – realizados em “pool” de soros (diluição 1:800) de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo e irradiado com  $^{60}\text{Co}$ .

A tabela 04 e a figura 04 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1 e 2, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, na diluição de 1:800, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 6,407$ ) ( $G1 < G2$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, na diluição de 1:800, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 21,841$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), na diluição de 1:800, apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 7,743$ ). Portanto, não houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

Tabela 05: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da densidade óptica (490 nm) obtidos por ensaio imunoenzimático indireto – ELISA – realizados em soro (diluição 1:100 a 1:51200) dos grupos de carneiros inoculados com veneno nativo (G1) e irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) no 84º dia após a primeira inoculação.

<b>Diluições (D)</b>	<b>1:100</b>	<b>1:200</b>	<b>1:400</b>	<b>1:800</b>	<b>1:1600</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:6400</b>	<b>1:12800</b>	<b>1:25600</b>	<b>1:51200</b>
<b>Grupos</b>										
<b>G1</b>										
Variação	0,031-0,073	0,015-0,080	0,020-0,072	0,004-0,075	0,000-0,170	0,000-0,058	0,000-0,047	0,000-0,020	0,000-0,016	0,000-0,003
Média	0,052	0,049	0,049	0,036	0,035	0,028	0,023	0,009	0,007	0,001
D.P.	± 0,024	± 0,037	± 0,028	± 0,039	± 0,039	± 0,033	± 0,027	± 0,011	± 0,009	± 0,001
<b>G2</b>										
Variação	0,109-0,144	0,094-0,139	0,113-0,126	0,093-0,139	0,065-0,124	0,087-0,116	0,091-0,111	0,073-0,116	0,039-0,075	0,030-0,075
Média	0,127	0,112	0,119	0,116	0,093	0,099	0,103	0,093	0,056	0,046
D.P.	± 0,019	± 0,023	± 0,006	± 0,025	± 0,031	± 0,015	± 0,010	± 0,024	± 0,020	± 0,022

#### **Análise estatística**

#### **Hipótese Significância Comentários**

<b>Diluições</b>	$D_{1:100}=D_{1:200}=D_{1:400}=D_{1:800}=D_{1:1600}=D_{1:3200}=D_{1:6400}$	$F = 6,54$	$p < 0,05$	$D_{1:100} \neq D_{1:200} \neq D_{1:400} \neq D_{1:800} \neq D_{1:1600} \neq D_{1:3200} \neq D_{1:6400}$
<b>Grupos</b>	$G1=G2$	$F = 164,46$	$p < 0,05$	$D_{1:12800} \neq D_{1:25600} \neq D_{1:51200}$ $G1 < G2$

G1= grupo de cinco ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.* (ausência de um animal que evoluiu para óbito); G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; as diluições (1:100 a 1:51200) referem-se às densidades ópticas no 84º dia após a primeira inoculação. D.P. = Desvio Padrão

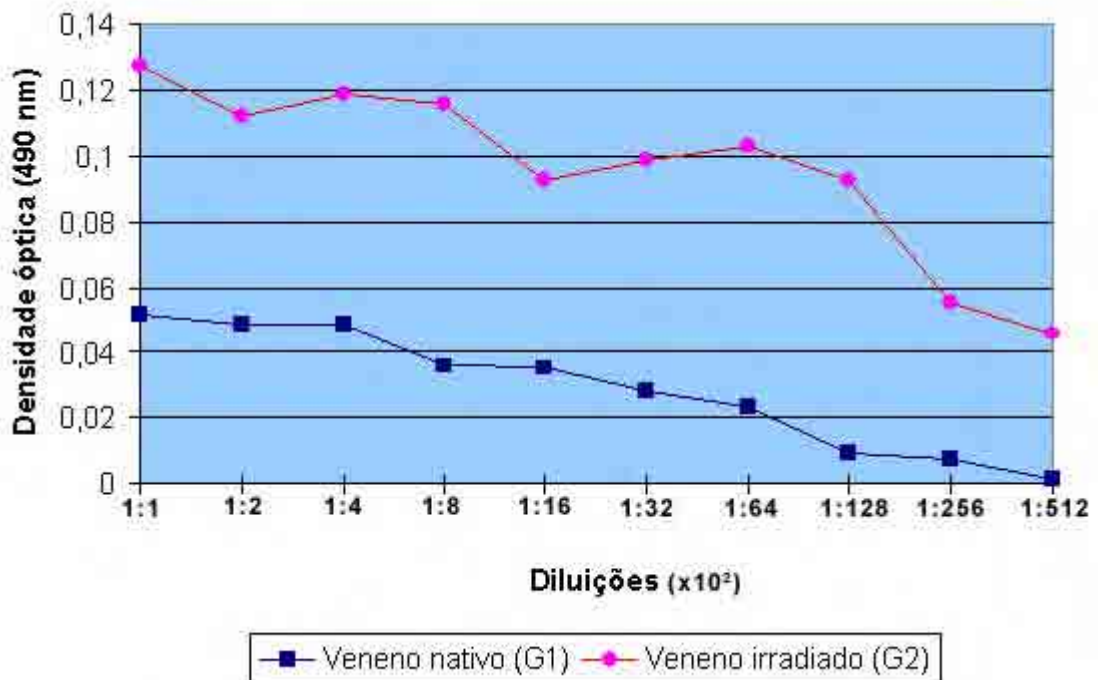


Figura 05: Valores médios das densidades ópticas (490 nm) obtidos no 84º dia após a primeira inoculação, por ensaio imunoenzimático indireto – ELISA – realizados em “pool” de soros (diluição 1:100 a 1:51200) de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo e irradiado com <sup>60</sup>Co.

A tabela 05 e a figura 05 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1 e 2, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, no 84º dia após a primeira inoculação, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 164,46$ ) ( $G1 < G2$ ).
- 2- a comparação entre as diferentes diluições de anticorpos ( $D_{1:100}; D_{1:200}; D_{1:400}; D_{1:800}; D_{1:1600}; D_{1:3200}; D_{1:6400}; D_{1:12800}; D_{1:25600}; D_{1:51200}$ ), realizada pelo teste de esfericidade, Huynh-Feldt no 84º dia após a primeira inoculação, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 6,54$ ), para todas as diferentes diluições.

## 4.2. Capacidade neutralizante e potência dos anticorpos antiveneno nativo e irradiado

Foram avaliadas a capacidade neutralizante e potência dos soros antiveneno nativo (G1) e irradiado (G2) e controle (G3), obtidos de carneiros hiperimunizados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

### 4.2.1. Avaliação da capacidade de neutralização “in vitro” do antiveneno nativo e irradiado

Os resultados obtidos nos testes “in vitro” para a determinação da capacidade de neutralização de um “pool” dos soros antiveneno crotálico, obtidos no 84º dia após a primeira inoculação dos dois grupos inoculados com veneno nativo ou irradiado com <sup>60</sup>Co, estão representados nas Tabelas 06 e 07 respectivamente.

Tabela 06: Determinação da capacidade de neutralização do “pool” de soros antiveneno crotálico, obtido de carneiros hiperimunizados com veneno nativo, inoculados via intraperitoneal em camundongos nas concentrações variáveis de soro e fixada a concentração de veneno em 5 DL<sub>50</sub> do veneno nativo.

Diluição Soro	Veneno DL <sub>50</sub>	Mortos/vivos 24 horas	Mortos/vivos 48 horas	Mortalidade (%)
Puro	5	0:8	0:8	0
1:5	5	7:1	7:1	87,5
1:10	5	8:0	8:0	100
1:20	5	8:0	8:0	100
1:40	5	8:0	8:0	100
1:80	5	8:0	8:0	100
Puro	---	0:8	0:8	0
---	5	8:0	8:0	100

O cálculo da capacidade neutralizante da toxina ou antígeno (CNT), para o soro antiveneno nativo de *Crotalus durissus terrificus*, foi realizado da seguinte maneira:

$$\text{CNT} = (0,74 - 0,148) \times 1 \times 10^5 \times (1/1000)$$

$$\text{CNT} = 59,2 \text{ } \mu\text{g de veneno/mL de soro}$$

Para um camundongo de 20 g, por exemplo, uma DL<sub>50</sub> do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é 2,96  $\mu\text{g}$  de veneno. Portanto,  $59,2/2,96 = 20 \text{ DL}_{50}$ .

Sendo assim, o soro antiveneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* foi capaz de neutralizar cerca de 59,2  $\mu\text{g}$  de veneno por mL de soro, o equivalente a 20 DL<sub>50</sub>.

Tabela 07: Determinação da capacidade de neutralização do “pool” de soros antiveneno crotálico, obtido de carneiros hiperimunizados com veneno irradiado, inoculados via intraperitoneal em camundongos nas concentrações variáveis de soro e fixada a concentração de veneno em 5 DL<sub>50</sub> do veneno nativo.

<b>Diluição Soro</b>	<b>Veneno DL<sub>50</sub></b>	<b>Mortos/vivos 24 horas</b>	<b>Mortos/vivos 48 horas</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
Puro	5	0:8	0:8	0
1:5	5	0:8	0:8	0
1:10	5	7:1	7:1	87,5
1:20	5	8:0	8:0	100
1:40	5	8:0	8:0	100
1:80	5	8:0	8:0	100
Puro	---	0:8	0:8	0
---	5	8:0	8:0	100

O cálculo da capacidade neutralizante da toxina ou antígeno (CNT), para o soro antiveneno irradiado de *Crotalus durissus terrificus*, foi realizado da seguinte maneira:

$$\text{CNT} = (0,74 - 0,148) \times 1 \times 10^5 \times (1/200)$$

$$\text{CNT} = 296 \mu\text{g de veneno/mL de soro}$$

Para um camundongo de 20 g, por exemplo, uma DL<sub>50</sub> do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é 2,96 µg de veneno. Portanto, 296/2,96 = 100 DL<sub>50</sub>.

Sendo assim, o soro antiveneno irradiado de *Crotalus durissus terrificus* foi capaz de neutralizar cerca de 296 µg de veneno por mL de soro, o equivalente a 100 DL<sub>50</sub>.

#### 4.2.2. Avaliação da potência “in vitro” do antiveneno nativo e irradiado

Os resultados obtidos nos testes “in vitro” para a determinação da potência de neutralização de um “pool” dos soros antiveneno crotálico, obtidos no 84º dia após a primeira inoculação dos dois grupos inoculados com veneno nativo ou irradiado com <sup>60</sup>Co, estão representados nas Tabelas 08 e 09 respectivamente.

Tabela 08: Determinação da potência de neutralização do “pool” de soros antiveneno crotálico, obtido de carneiros hiperimunizados com veneno nativo, inoculados via intraperitoneal em camundongos nas concentrações variáveis da DL<sub>50</sub> do veneno nativo e fixada a concentração de soro.

Observações mortos/vivos				
Soro (µL)	Veneno DL <sub>50</sub>	24 horas	48 horas	Mortalidade (%)
100	1	0:8	0:8	0
100	3	0:8	0:8	0
100	5	5:3	6:2	75
100	10	7:1	7:1	87,5
100	15	8:0	8:0	100
100	---	0:8	0:8	0
---	5	8:0	8:0	100

Tabela 09: Determinação da potência de neutralização do “pool” de soros antiveneno crotálico, obtido de carneiros hiperimunizados com veneno irradiado, inoculados via intraperitoneal em camundongos nas concentrações variáveis da DL<sub>50</sub> do veneno nativo e fixada a concentração de soro.

Observações mortos/vivos				
Soro (µL)	Veneno DL <sub>50</sub>	24 horas	48 horas	Mortalidade (%)
100	1	0:8	0:8	0
100	3	0:8	0:8	0
100	5	0:8	0:8	0
100	10	5:3	5:3	37,5
100	15	7:1	7:1	87,5
100	---	0:8	0:8	0
---	5	8:0	8:0	100

Comparando-se os resultados obtidos e observados nas tabelas 6, 7, 8 e 9, pode-se verificar que a potência e a capacidade de neutralização do soro obtido a partir do veneno irradiado de *Crotalus durissus terrificus* foram superiores ao soro obtido a partir do veneno nativo.

### 4.3. Avaliação clínica, laboratorial e ponderal dos carneiros

#### 4.3.1. – Avaliação clínica

Os animais foram observados diariamente durante todo o processo de hiperimunização. Apenas um animal veio a óbito durante este período, caso este descrito à parte.

Após sete dias da primeira imunização, todos animais apresentaram alterações nos locais de inoculação com queda de pelos, aumento de volume variando de três a seis centímetros de diâmetro, com áreas ulceradas e conteúdo purulento. À palpação, estas áreas se mostravam endurecidas, com aumento de temperatura formando um abscesso. Os linfonodos pré-escapulares apresentavam aumento de volume bilateralmente.

Figura 06: As figuras abaixo demonstram abscessos supurativos e áreas ulceradas, sete dias após a primeira inoculação em animais dos três grupos estudados.





Para o tratamento das lesões foi feita limpeza diária das feridas com solução anti-séptica (álcool iodado) e aplicada pomada iodo-iodetada por 20 dias.

Todas as lesões regrediram, porém um abscesso fibrosado de consistência firme permaneceu nos animais até o final dos experimentos.

Figura 07: As figuras abaixo demonstram a cicatrização das feridas após o tratamento realizado por cerca de 60 dias.



## **4.3.2- Avaliação laboratorial**

### **4.3.2.1. Hemograma**

#### **4.3.2.1.1- Eritrograma**

As variações, médias, desvios-padrões e os resultados da análise estatística da contagem total de hemácias, dos níveis de hemoglobina, do volume globular, da proteína total plasmática, de fibrinogênio plasmático e contagem total de plaquetas dos grupos de ovinos inoculados com veneno nativo (G1), veneno irradiado (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7), encontram-se descritos nas tabelas 10 a 15.

As médias da contagem total de hemácias, dos níveis de hemoglobina, do volume globular, da proteína total plasmática, de fibrinogênio plasmático e contagem total de plaquetas, para os três grupos de animais estudados, estão representadas respectivamente nas figuras 08 a 13.

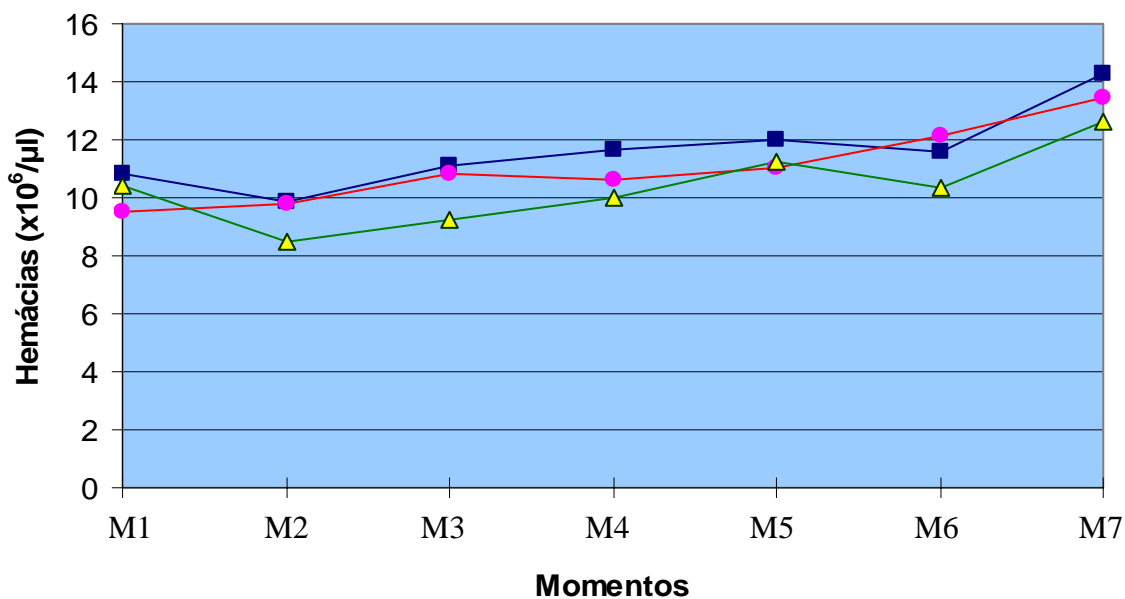
Tabela 10: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da contagem total de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), realizados nos grupos de carneiros ( $n=6$ ) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>Grupos</b>								
<b>G1</b>	Variação	10,1-11,8	8,63-10,9	10,2-12,1	10,1-13-2	10,5-12,9	9,81-12,7	13,0-15,5
	Média	10,8	9,85	11,08	11,63	11,98	11,62*	14,28*
	D.P.	$\pm 0,66$	$\pm 0,76$	$\pm 0,68$	$\pm 0,98$	$\pm 0,87$	$\pm 1,21$	$\pm 0,96$
<b>G2</b>	Variação	5,94-13,0	8,35-12,2	8,67-12,6	9,09-12,3	6,31-13,0	10,2-15,3	11,7-14,4
	Média	9,55	9,82	10,82	10,59	11,03	12,14	13,47
	D.P.	$\pm 2,36$	$\pm 1,40$	$\pm 1,53$	$\pm 1,13$	$\pm 2,45$	$\pm 1,81$	$\pm 0,97$
<b>G3</b>	Variação	6,86-12,2	6,58-10,1	8,81-9,67	9,29-11,3	10,1-12,4	9,29-11,3	11,2-14,3
	Média	10,43	8,50	9,23	10,03	11,25	10,35	12,60
	D.P.	$\pm 1,84$	$\pm 1,25$	$\pm 0,37$	$\pm 0,70$	$\pm 0,98$	$\pm 0,73$	$\pm 1,17$

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 33,271	p < 0,05	M1≠M2≠M3≠M4≠M5≠M6≠M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 2,171	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 1,547	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com  $^{60}\text{Co}$  de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



—■— Veneno nativo (G1) —●— Veneno irradiado (G2) —▲— Controle (G3)

M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 08: Valores médios nos diferentes momentos da contagem total de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 10 e a figura 08 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a contagem total de hemácias, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 2,171$ ) ( $G1=G2=G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a contagem total de hemácias, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 33,271$ ). Apenas o contraste entre os momentos 2 e 3 não foi significativo ( $p>0,05\%$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a contagem total de hemácias, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 1,547$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

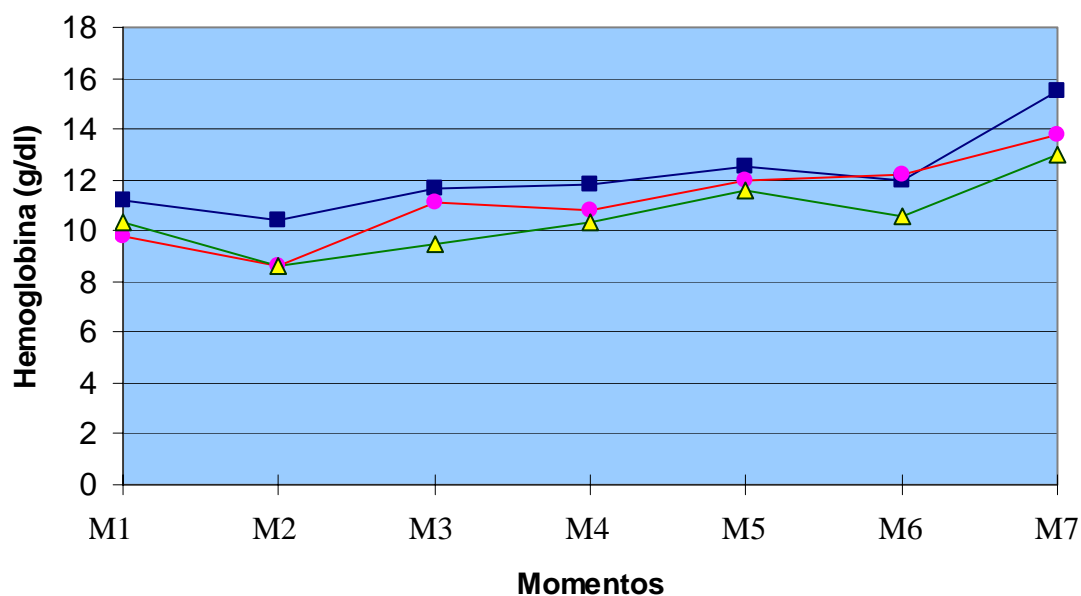
Tabela 11: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da dosagem de hemoglobina (g/dl), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>Grupos</b>								
<b>G1</b>	Variação	10,3-12,2	9,14-10,9	10,4-12,5	10,4-13,1	10,9-13,4	11,5-12,7	14,0-18,3
	Média	11,23	10,37	11,63	11,80	12,52	11,94*	15,46*
	D.P.	± 0,77	± 0,82	± 0,93	± 0,96	± 0,86	± 0,53	± 1,71
<b>G2</b>	Variação	7,47-13,7	8,84-12,7	9,69-12,7	9,75-11,9	10,9-12,7	10,7-14,7	13,1-14,7
	Média	9,78	8,63	11,15	10,81	11,98	12,23	13,78
	D.P.	± 2,21	± 1,38	± 1,24	± 0,74	± 0,69	± 1,34	± 0,60
<b>G3</b>	Variação	7,23-11,5	7,74-9,34	7,87-10,4	9,58-11,4	10,5-12,8	9,5-11,7	11,7-14,7
	Média	10,32	8,63	9,5	10,32	11,60	10,53	12,98
	D.P.	± 1,60	± 0,80	± 0,91	± 0,71	± 0,80	± 0,94	± 1,27

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 42,156	p < 0,05	M1≠M2≠M3≠M4≠M5≠M6≠M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 6,185	p < 0,05	G1 = G2 > G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 1,554	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



—■— Veneno nativo (G1) —●— Veneno irradiado (G2) —▲— Controle (G3)  
M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 09: Valores médios nos diferentes momentos da dosagem de hemoglobina (g/dl), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 11 e a figura 09 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade, pelo teste de Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a dosagem de hemoglobina, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 6,185$ ). A diferença entre grupos, testada por contrastes, revelaram uma significância entre os grupos 3 e 2 ( $p < 0,05$ ) ( $G1 = G2 > G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a dosagem de hemoglobina, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 42,156$ ). Apenas o contraste entre os momentos 2 e 3 foi de  $p = 5,9\%$ , o que pode ser considerado significativo para este experimento.
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a dosagem de hemoglobina, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 1,554$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

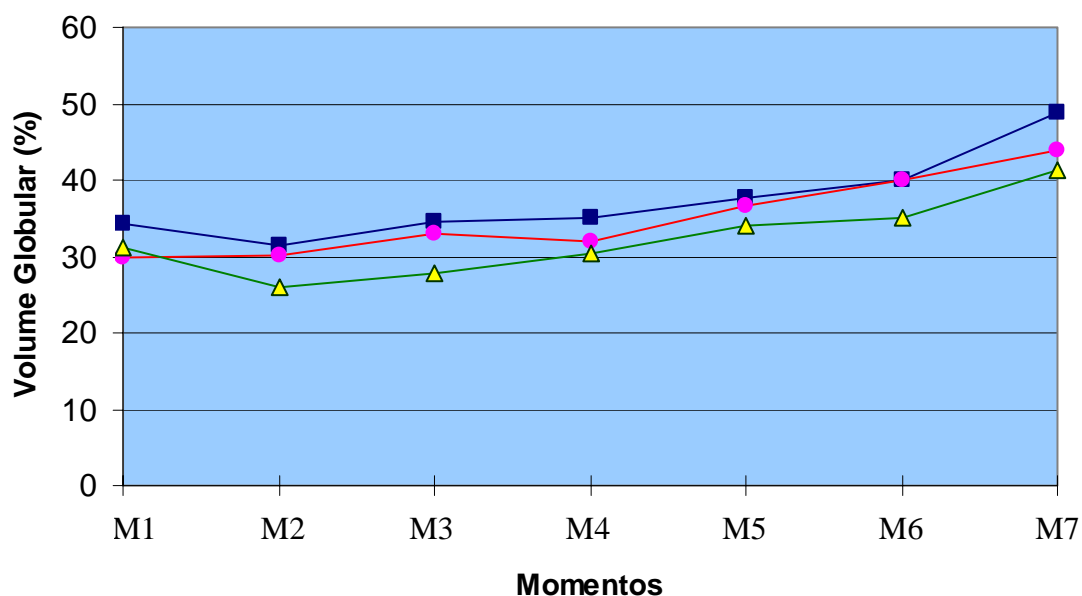
Tabela12: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da dosagem do volume globular (%), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>Grupos</b>								
<b>G1</b>	Variação	30-36	29-34	30-38	31-41	33-40	37-43	46-53
	Média	34,17	31,33	34,67	35,17	37,67	40,00*	48,80*
	D.P.	± 2,32	± 2,07	± 3,27	± 4,07	± 2,42	± 3,00	± 2,68
<b>G2</b>	Variação	24-33	27-31	29-38	28-35	33-39	35-47	42-46
	Média	30,00	30,17	33,00	32,00	36,67	40,00	44,00
	D.P.	± 7,07	± 3,82	± 3,85	± 2,76	± 2,88	± 4,15	± 1,79
<b>G3</b>	Variação	24-36	22-30	23-30	29-36	31-36	32-43	37-46
	Média	31,17	26,00	27,67	30,50	34,00	35,17	41,17
	D.P.	± 4,26	± 2,76	± 2,50	± 2,74	± 1,79	± 4,67	± 3,97

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 74,063	p < 0,05	M1≠M2≠M3≠M4≠M5≠M6≠M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 5,751	p < 0,05	G1 = G2 > G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 1,546	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



Veneno nativo (G1)
  Veneno irradiado (G2)
  Controle (G3)

M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 10: Valores médios nos diferentes momentos da dosagem do volume globular (%), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 12 e a figura 10 mostram que:

1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade, pelo teste de Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a dosagem do volume globular, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 5,751$ ). A diferença entre grupos, testada por contrastes, revelaram uma significância entre os grupos 3 e 2 ( $p < 0,05$ ) ( $G1 = G2 > G3$ ).

2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a dosagem do volume globular, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 74,063$ ). Apenas o contraste entre os momentos 2 e 3 não foi significativo ( $p < 0,05\%$ ).

3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a dosagem do volume globular, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 1,546$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

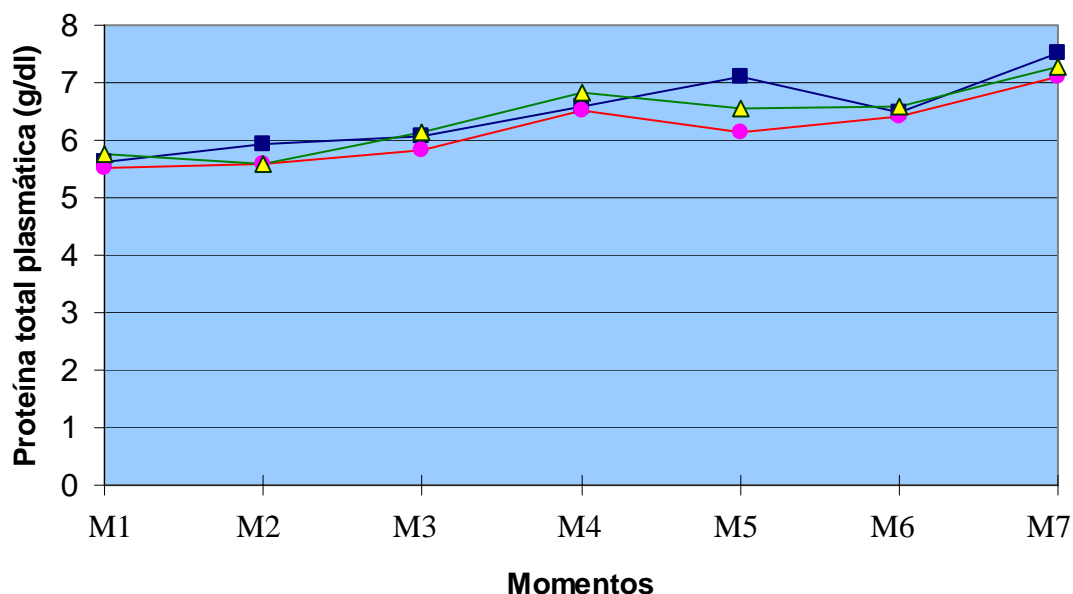
Tabela 13: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da dosagem da proteína total plasmática (g/dl), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>Grupos</b>								
<b>G1</b>	Variação	4,8-6,0	5,2-6,4	5,0-6,8	6,0-7,2	6,0-12,0	6,2-7,0	7,0-8,2
	Média	5,63	5,93	6,07	6,60	7,10	6,48*	7,52*
	D.P.	± 0,48	± 0,45	± 0,60	± 0,46	± 2,40	± 0,31	± 0,63
<b>G2</b>	Variação	4,6-6,2	5,2-6,0	4,6-6,8	6,2-6,8	5,4-6,6	5,8-7,2	6,8-7,4
	Média	5,53	5,60	5,83	6,53	6,13	6,40	7,10
	D.P.	± 0,59	± 0,36	± 0,77	± 0,21	± 0,42	± 0,47	± 0,21
<b>G3</b>	Variação	4,4-7,4	4,2-6,5	4,2-7,9	4,8-8,0	6,0-7,1	6,2-7,0	7,0-7,6
	Média	5,77	5,58	6,15	6,83	6,55	6,57	7,27
	D.P.	± 1,18	± 0,89	± 1,30	± 1,14	± 0,49	± 0,39	± 0,24

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 21,067	p < 0,05	M1=M2≠M3≠M4≠M5≠M6≠M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 0,256	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 0,586	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



—■— Veneno nativo (G1) —●— Veneno irradiado (G2) —▲— Controle (G3)  
M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 11: Valores médios nos diferentes momentos da dosagem da proteína total plasmática (g/dl), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 13 e a figura 11 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a dosagem da proteína total plasmática, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,256$ ) ( $G1=G2=G3$ )
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a dosagem da proteína total plasmática, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 21,067$ ). Apenas o contraste entre os momentos 1 e 2 não foi significativo ( $p < 0,05\%$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a dosagem da proteína total plasmática, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,586$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

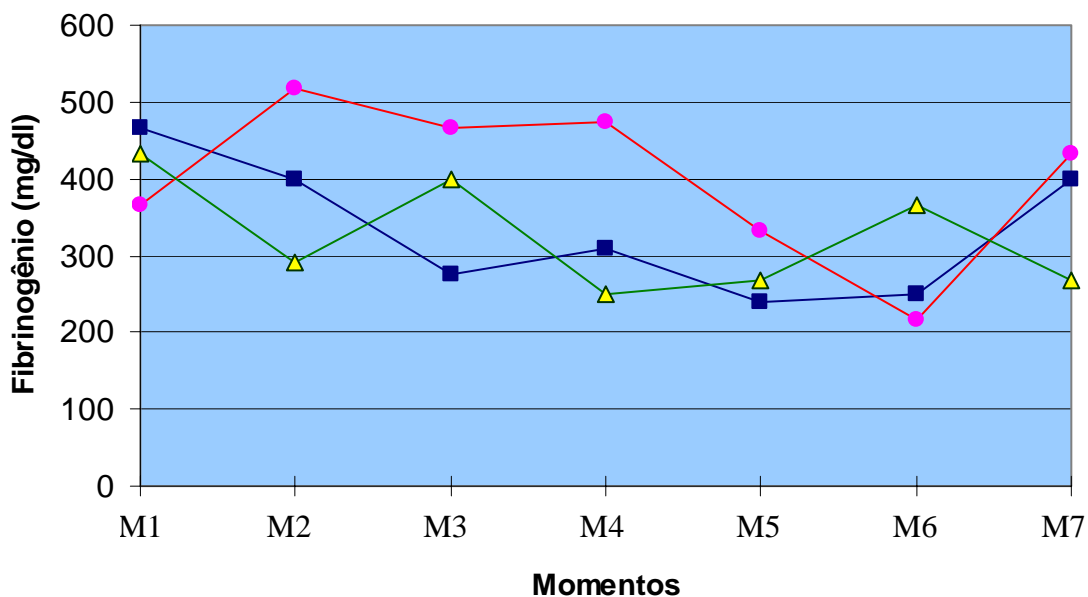
Tabela 14: Distribuição das variações, médias e desvios padrões do fibrinogênio (mg/dl), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>Grupos</b>								
<b>G1</b>	Variação	200-600	200-600	50-400	50-600	100-500	50-400	200-600
	Média	466,67	400,00	275,00	308,33	240,00	250,00*	400,00*
	D.P.	± 163,30	± 126,49	± 147,48	± 196,00	± 151,66	± 165,83	± 200,00
<b>G2</b>	Variação	200-600	100-800	400-800	50-1000	100-600	50-600	200-600
	Média	366,67	516,67	466,67	475,00	333,33	216,67	433,33
	D.P.	± 150,55	± 271,42	± 163,30	± 312,65	± 233,81	± 201,66	± 150,55
<b>G3</b>	Variação	200-800	50-500	200-800	50-600	100-400	100-1000	200-400
	Média	433,33	291,67	400,00	250,00	266,67	366,67	266,67
	D.P.	± 196,64	± 168,57	± 219,09	± 214,48	± 150,55	± 320,42	± 103,28

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 2,395	p < 0,05	M1=M2≠M3=M4≠M5=M6=M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 0,158	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 1,170	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



■ Veneno nativo (G1)    ● Veneno irradiado (G2)    ▲ Controle (G3)  
 M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 12: Valores médios nos diferentes momentos da dosagem do fibrinogênio (mg/dl), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 14 e a figura 12 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a dosagem do fibrinogênio, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,158$ ) ( $G1=G2=G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a dosagem do fibrinogênio, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 2,395$ ). Os contrastes entre os momentos 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 6 e 7 não foram significativos ( $p < 0,05\%$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a dosagem do fibrinogênio, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,586$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

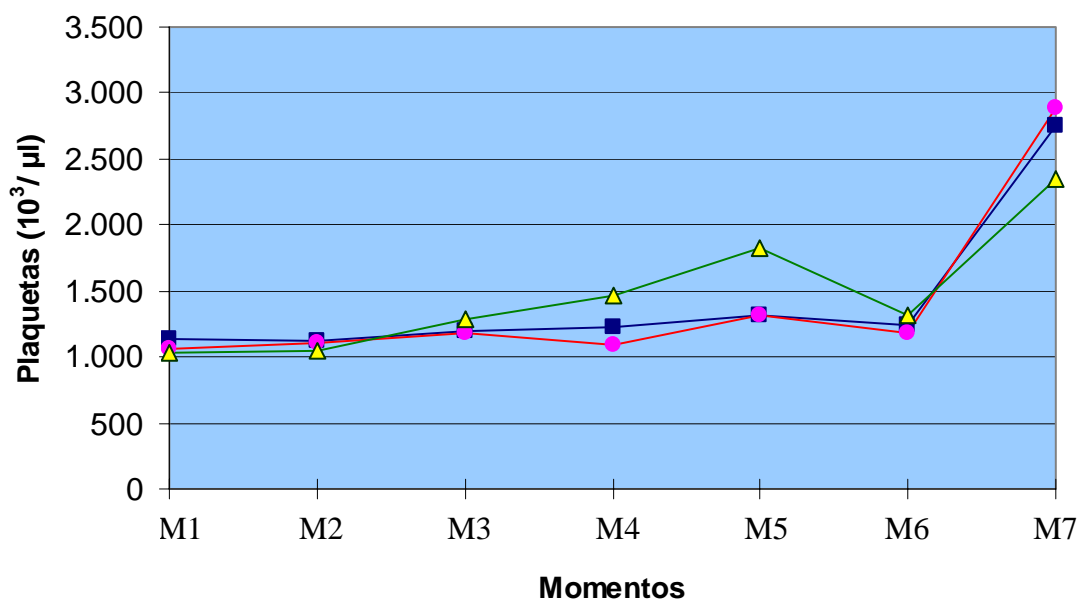
Tabela 15: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da contagem total de plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ ), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>Grupos</b>								
<b>G1</b>	Variação	847-1719	733-1730	756-1503	607-1944	1072-1620	746-1661	1350-4600
	Média	1.130	1.116	1.201	1.223	1.314	1.237*	2.752*
	D.P.	± 317	± 344	± 269	± 456	± 271	± 335	± 1.330
<b>G2</b>	Variação	581-1657	912-1233	625-1503	699-1459	223-2212	267-2152	800-6693
	Média	1.061	1.113	1.180	1.099	1.311	1.189	2.885
	D.P.	± 377	± 143	± 385	± 286	± 680	± 611	± 2.195
<b>G3</b>	Variação	641-1361	826-1200	1040-2127	504-2961	866-4445	754-2415	1344-3835
	Média	1.035	1.045	1.291	1.468	1.828	1.319	2.354
	D.P.	± 230	± 137	± 420	± 820	± 1.384	± 571	± 1.075

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 11,140	p < 0,05	M1=M2=M3=M4≠M5=M6≠M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 0,104	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 0,423	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com  $^{60}\text{Co}$  de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 13: Valores médios nos diferentes momentos da contagem total de plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ ), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 15 e a figura 13 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a contagem total de plaquetas, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,104$ ) ( $G1=G2=G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a contagem total de plaquetas, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 11,140$ ). Os contrastes entre os momentos 1 e 2, 2 e 3, 3 e 4, 5 e 6 não foram significativos ( $p < 0,05\%$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a contagem total de plaquetas, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,423$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

#### **4.3.2.1.2. Leucograma**

As variações, médias, desvios-padrões e os resultados da análise estatística da contagem total de leucócitos, contagem absoluta de neutrófilos segmentados, linfócitos, eosinófilos e monócitos dos grupos de ovinos inoculados com veneno nativo (G1), veneno irradiado (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7), encontram-se respectivamente nas tabelas 16 a 20.

As médias da contagem total de leucócitos, contagem absoluta de neutrófilos segmentados, linfócitos, eosinófilos e monócitos, para os três grupos de animais estudados, estão representadas respectivamente nas figuras 14 a 18.

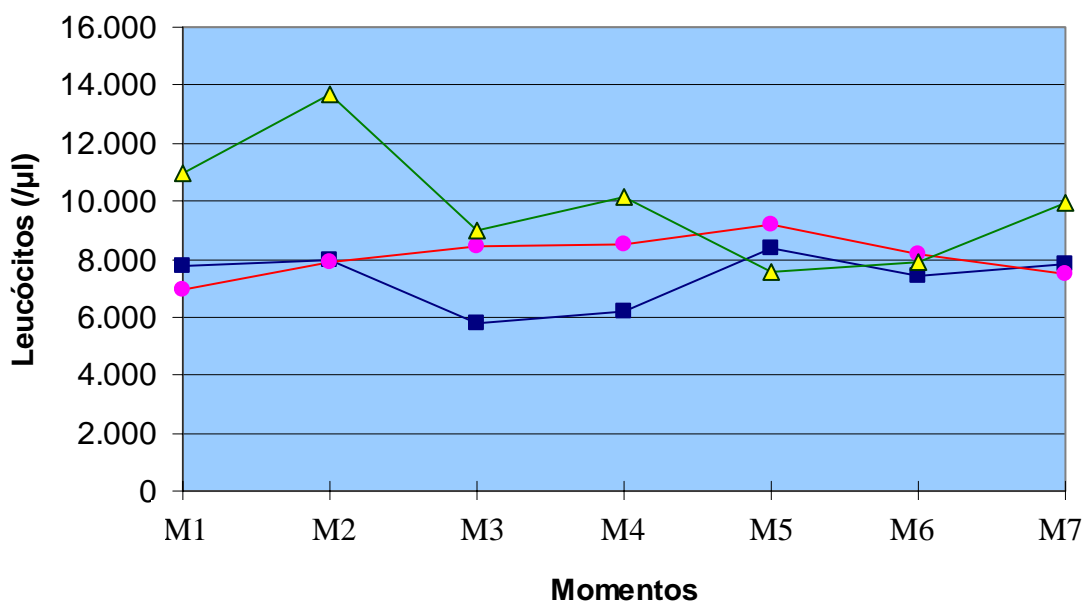
Tabela 16: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da contagem total de leucócitos ( $\mu\text{L}$ ), realizados nos grupos de carneiros ( $n=6$ ) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

Momentos								
Grupos		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<b>G1</b>	Variação	5370-9830	6510-10600	2170-8430	4240-8390	3710-22900	5400-11400	4950-12600
	Média	7.790	7.993	5.800	6.220	8.383	7.420*	7.798*
	D.P.	$\pm 1.825$	$\pm 1.780$	$\pm 2.401$	$\pm 1.494$	$\pm 7.196$	$\pm 2.676$	$\pm 2.997$
<b>G2</b>	Variação	4520-9450	3220-11100	5320-17100	4700-10900	5910-12300	6130-11400	5970-11100
	Média	6.970	7.908	8.473	8.477	9.225	8.183	7.523
	D.P.	$\pm 1.840$	$\pm 2.729$	$\pm 4.442$	$\pm 2.280$	$\pm 3.598$	$\pm 2.360$	$\pm 1.918$
<b>G3</b>	Variação	7020-16900	7650-22300	4750-15200	5390-21100	4120-14900	5570-10800	6790-13800
	Média	10.975	13.673	9.003	10.162	7.548	7.895	9.953
	D.P.	$\pm 3.894$	$\pm 5.693$	$\pm 4.783$	$\pm 5.690$	$\pm 3.933$	$\pm 2.126$	$\pm 2.942$

Análise estatística	Hipótese	Estatística calculada	Significância	Comentários
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 1,724	p > 0,05	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 2,501	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 1,683	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com  $^{60}\text{Co}$  de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



Veneno nativo (G1)
  Veneno irradiado (G2)
  Controle (G3)

M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 14: Valores médios nos diferentes momentos da contagem total de leucócitos (/µL), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 16 e a figura 14 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a contagem total de leucócitos, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 2,501$ ) ( $G1=G2=G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, e pelo teste de Huynh-Feldt, para a contagem total de leucócitos, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 1,724$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a contagem total de leucócitos, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 1,683$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

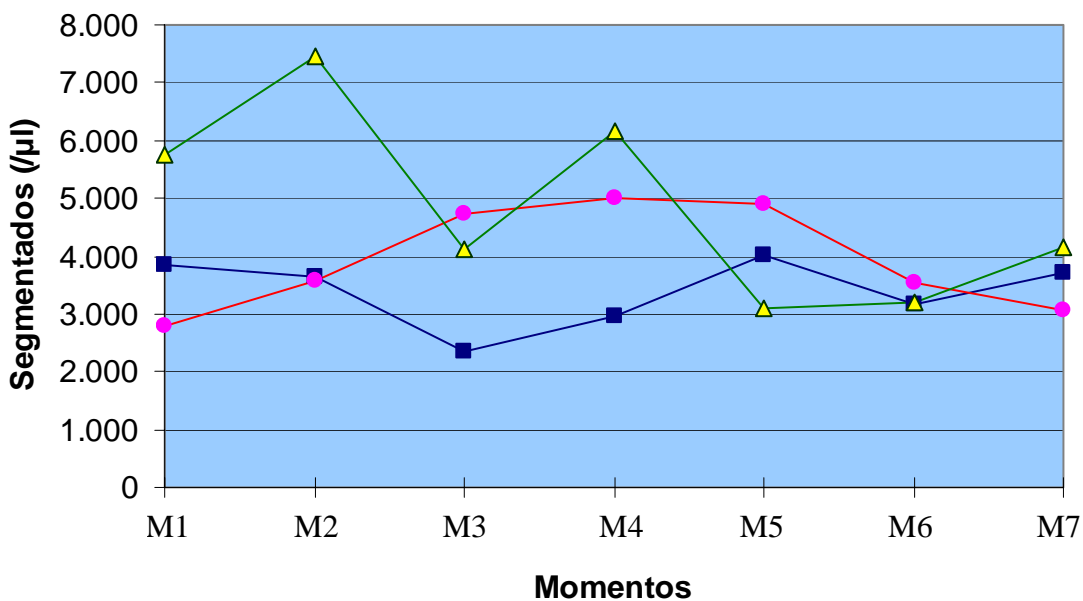
Tabela 17: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da contagem absoluta de neutrófilos segmentados (/ $\mu$ L), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>Grupos</b>								
<b>G1</b>	Variação	927-6685	1528-6111	477-3878	1696-5005	761-12824	1836-4490	1181-6048
	Média	3.853	3.627	2.332	2.959	4.022	3.160*	3.708*
	D.P.	± 1.941	± 1.721	± 1.203	± 1.176	± 4.385	± 1.017	± 1.771
<b>G2</b>	Variação	949-4725	837-6300	2003-11286	2350-6180	2009-11100	1622-6600	2028-6882
	Média	2.801	3.570	4.748	4.998	4.902	3.557	3.047
	D.P.	± 1.624	± 2.142	± 3.492	± 1.800	± 3.245	± 2.139	± 1.890
<b>G3</b>	Variação	3705-9295	2398-13200	1325-10728	431-14348	906-6556	2808-4750	3006-4902
	Média	5.754	7.457	4.104	6.167	3.107	3.191	4.169
	D.P.	± 2.352	± 4.555	± 3.568	± 4.689	± 2.090	± 890	± 602

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 1,360	p > 0,05	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 2,202	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 1,595	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com  $^{60}\text{Co}$  de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



Veneno nativo (G1)  
 Veneno irradiado (G2)  
 Controle (G3)

M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 15: Valores médios nos diferentes momentos da contagem absoluta de neutrófilos segmentados ( $\mu\text{L}$ ), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 17 e a figura 15 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a contagem absoluta de neutrófilos segmentados, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 2,202$ ) ( $G1=G2=G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a contagem absoluta de neutrófilos segmentados, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 1,360$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a contagem absoluta de neutrófilos segmentados, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 1,595$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

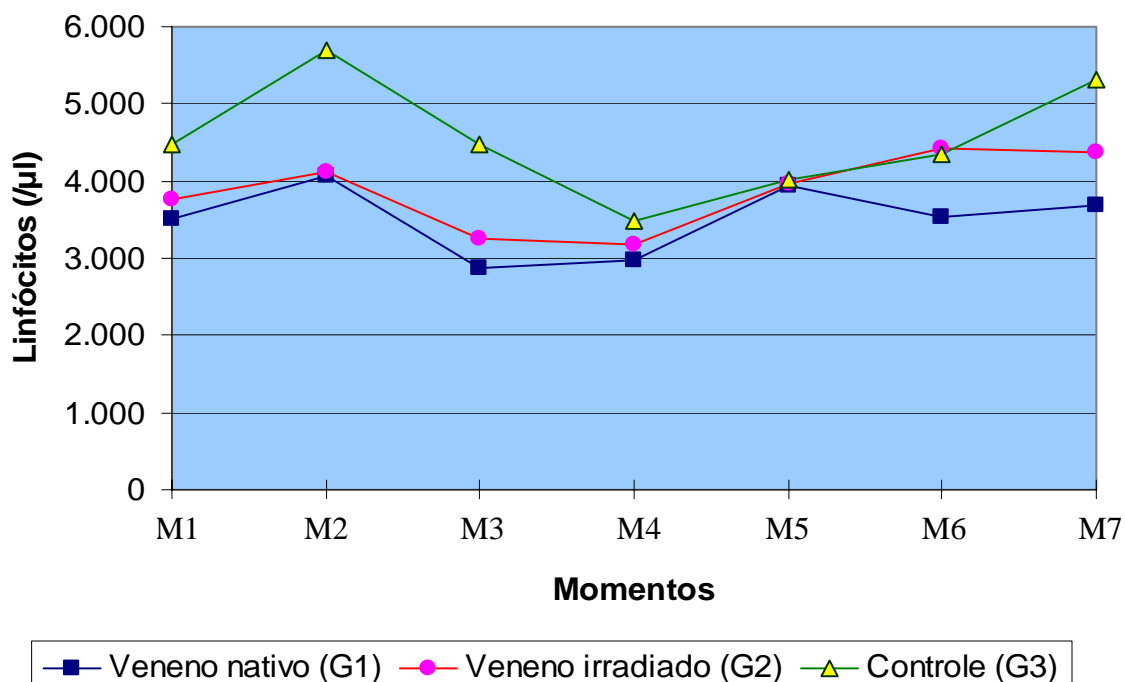
Tabela 18: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da contagem absoluta de linfócitos (/ $\mu$ L), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b>								
<b>Grupos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>G1</b>	Variação	2256-4777	2070-6572	1819-4941	2061-6041	2100-8244	2502-4490	2054-6300
	Média	3.506	4.072	2.875	2.981	3.949	3.526*	3.684*
	D.P.	$\pm 1.017$	$\pm 1.395$	$\pm 1.200$	$\pm 1.518$	$\pm 2.299$	$\pm 905$	$\pm 1.595$
<b>G2</b>	Variação	2797-4536	2383-6105	1894-4788	2136-3969	2719-6642	2452-5472	3104-6435
	Média	3.771	4.129	3.242	3.169	3.958	4.429	4.369
	D.P.	$\pm 652$	$\pm 1.473$	$\pm 1.027$	$\pm 790$	$\pm 1.448$	$\pm 1.040$	$\pm 1.149$
<b>G3</b>	Variação	2200-7267	3344-12042	2280-10336	1578-5908	2486-6854	1786-7344	1507-9384
	Média	4.487	5.685	4.470	3.474	4.008	4.348	5.315
	D.P.	$\pm 2.159$	$\pm 3.363$	$\pm 2.954$	$\pm 1.810$	$\pm 1.558$	$\pm 2.211$	$\pm 3.112$

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 4,105	p < 0,05	M1≠M2=M3=M4≠M5≠M6=M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 0,805	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 0,667	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com  $^{60}\text{Co}$  de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 16: Valores médios nos diferentes momentos da contagem absoluta de linfócitos ( $\mu\text{L}$ ), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 18 e a figura 16 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a contagem absoluta de linfócitos, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,805$ ) ( $G1=G2=G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a contagem absoluta de linfócitos, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 4,105$ ). Os contrastes entre os momentos 1 e 2, 4 e 5, 5 e 6 não foram significativos ( $p < 0,05\%$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a contagem absoluta de linfócitos, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,667$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

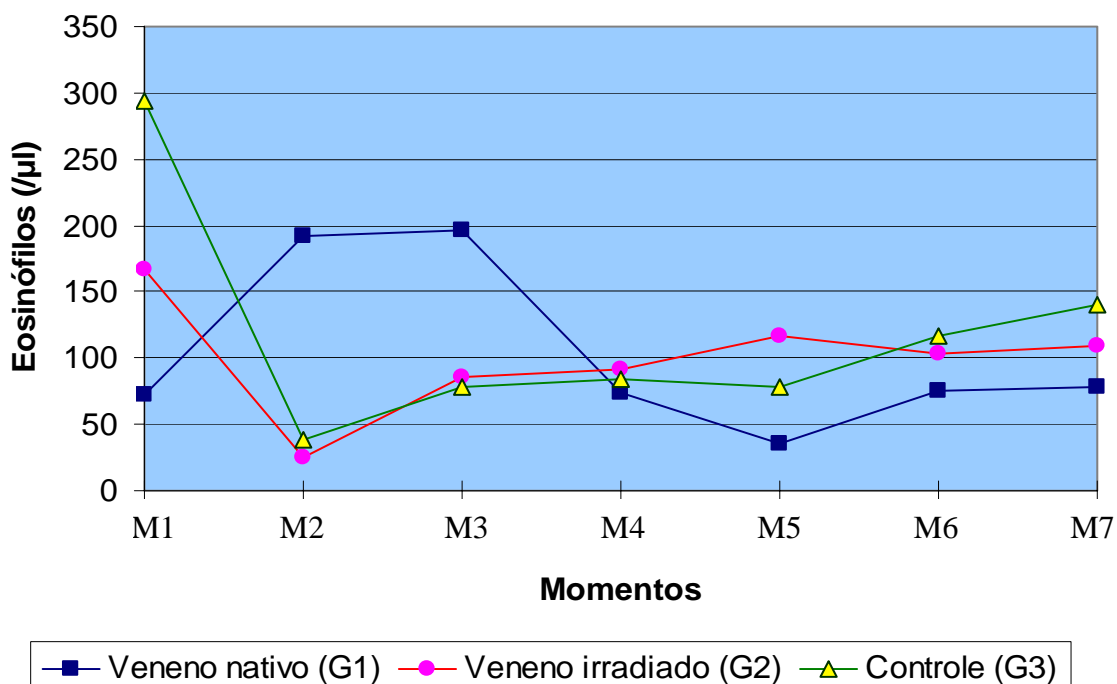
Tabela 19: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da contagem absoluta de eosinófilos ( $\mu\text{L}$ ), realizados nos grupos de carneiros ( $n=6$ ) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>Grupos</b>								
<b>G1</b>	Variação	0-197	88-305	0-506	0-340	0-110	0-326	0-385
	Média	72	192	196	74	36	76*	79*
	D.P.	$\pm 88$	$\pm 84$	$\pm 213$	$\pm 137$	$\pm 56$	$\pm 142$	$\pm 171$
<b>G2</b>	Variação	53-336	0-75	0-353	0-412	0-395	0-270	0-252
	Média	167	25	85	92	117	104	109
	D.P.	$\pm 101$	$\pm 38$	$\pm 146$	$\pm 167$	$\pm 184$	$\pm 123$	$\pm 123$
<b>G3</b>	Variação	72-676	0-153	0-319	0-394	0-301	0-380	0-392
	Média	294	38	79	84	78	116	140
	D.P.	$\pm 241$	$\pm 64$	$\pm 133$	$\pm 158$	$\pm 128$	$\pm 151$	$\pm 167$

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 0,820	p > 0,05	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 0,485	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 0,744	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com  $^{60}\text{Co}$  de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 17: Valores médios nos diferentes momentos da contagem absoluta de eosinófilos ( $\mu\text{L}$ ), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 19 e a figura 17 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a contagem absoluta de eosinófilos, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,485$ ) ( $G1=G2=G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a contagem absoluta de eosinófilos, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,820$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a contagem absoluta de eosinófilos, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,744$ ). Portanto houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

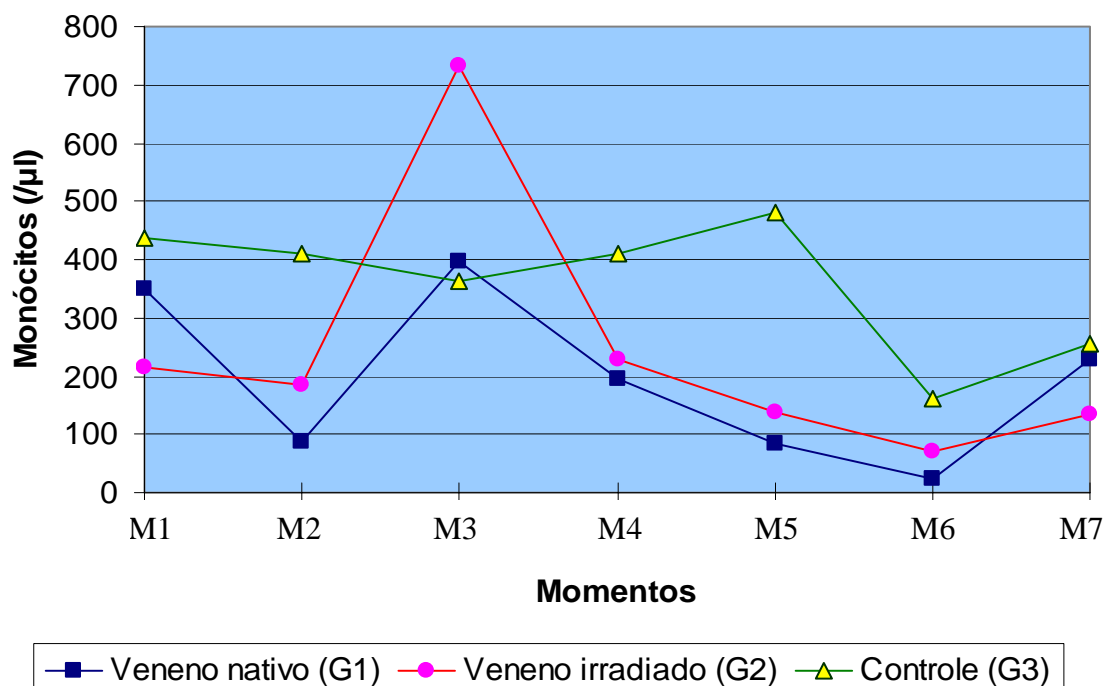
Tabela 20: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da contagem absoluta de monócitos (/ $\mu$ L), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>Grupos</b>								
<b>G1</b>	Variação	682-125	0-229	43-1180	0-336	0-183	0-108	127-385
	Média	350	86	397	196	84	22*	227*
	D.P.	± 199	± 101	± 418	± 114	± 75	± 48	± 99
<b>G2</b>	Variação	90-336	0-444	116-2366	0-890	0-300	0-424	0-330
	Média	214	185	732	228	137	71	136
	D.P.	± 103	± 173	± 863	± 336	± 124	± 173	± 128
<b>G3</b>	Variação	169-1100	0-880	95-745	108-844	94-1490	0-570	0-516
	Média	438	410	362	411	479	162	256
	D.P.	± 354	± 311	± 221	± 289	± 511	± 230	± 187

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 2,886	p < 0,05	M1=M2=M3=M4=M5#M6=M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 4,275	p < 0,05	G1 < G2 < G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 1,009	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com  $^{60}\text{Co}$  de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 18: Valores médios nos diferentes momentos da contagem absoluta de monócitos ( $\mu\text{L}$ ), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 20 e a figura 18 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade, pelo teste de Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a contagem absoluta de monócitos, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 4,275$ ) ( $G1 < G2 < G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, pelo teste de Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a contagem absoluta de monócitos, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 2,886$ ). Os contrastes entre os momentos 5 e 6 não foram significativos ( $p < 0,05\%$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a contagem absoluta de monócitos, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 1,009$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

#### **4.3.2.1.3. Exames bioquímicos**

As variações, médias, desvios-padrões e os resultados da análise estatística da dosagem de uréia, creatinina, albumina e globulina séricas e aspartato aminotransferase (AST) dos grupos de ovinos inoculados com veneno nativo (G1), veneno irradiado (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7), encontram-se nas tabelas 21 a 25.

As médias da dosagem de uréia, creatinina, albumina e globulina séricas e aspartato aminotransferase (AST), para os três grupos de animais estudados, estão representadas respectivamente nas figuras 19 a 23.

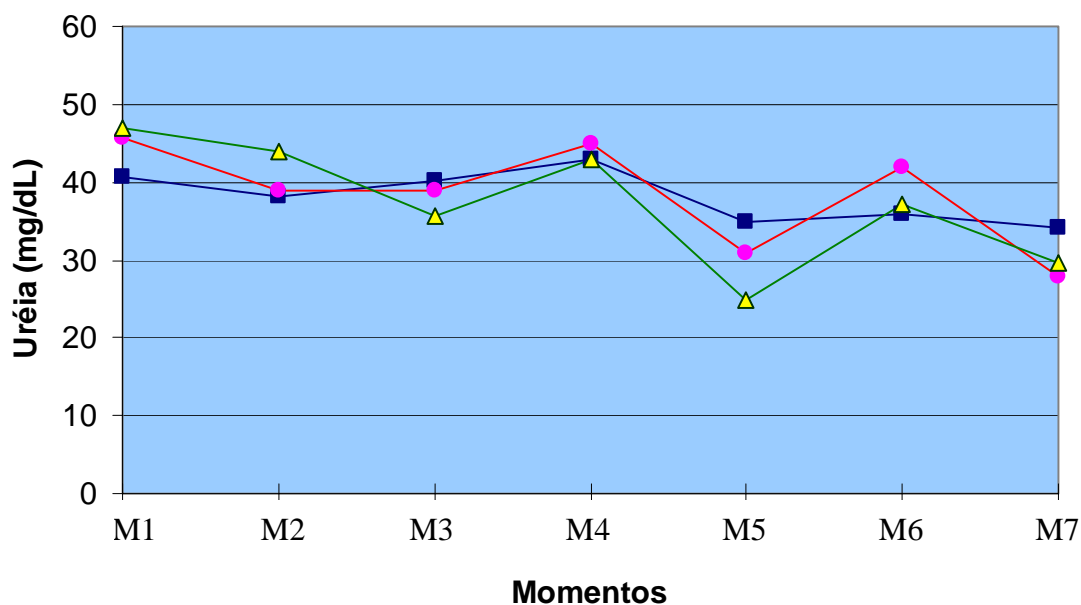
Tabela 21: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da dosagem da uréia plasmática (mg/dL), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

Momentos		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Grupos								
<b>G1</b>	Variação	35-46	35-41	35-52	41-49	21-64	30-40	24-61
	Média	40,67	38,17	40,17	42,83	35,00	35,80*	34,20*
	D.P.	± 4,89	± 2,23	± 9,11	± 3,54	± 15,39	± 3,70	± 15,45
<b>G2</b>	Variação	31-64	30-43	33-48	42-48	24-47	36-62	20-33
	Média	45,67	38,83	38,83	45,00	31,00	41,83	27,83
	D.P.	± 13,46	± 4,54	± 5,56	± 2,53	± 8,39	± 10,68	± 5,78
<b>G3</b>	Variação	32-54	27-54	24-49	33-51	18-30	31-43	20-42
	Média	47,00	43,83	35,67	42,83	24,83	37,17	29,67
	D.P.	± 7,87	± 9,79	± 8,64	± 6,97	± 4,88	± 4,40	± 7,66

Análise estatística	Hipótese	Estatística calculada	Significância	Comentários
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 12,189	p < 0,05	M1=M2≠M3≠M4≠M5=M6≠M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 0,140	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 1,076	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



Veneno nativo (G1)
  Veneno irradiado (G2)
  Controle (G3)

M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 19: Valores médios nos diferentes momentos da dosagem da uréia plasmática (mg/dL), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 21 e a figura 19 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a dosagem da uréia plasmática, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,140$ ) ( $G1=G2=G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, pelo teste de Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a dosagem da uréia plasmática, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 12,189$ ). Os contrastes entre os momentos 1 e 2, 5 e 6 não foram significativos ( $p < 0,05\%$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a dosagem da uréia plasmática, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 1,076$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

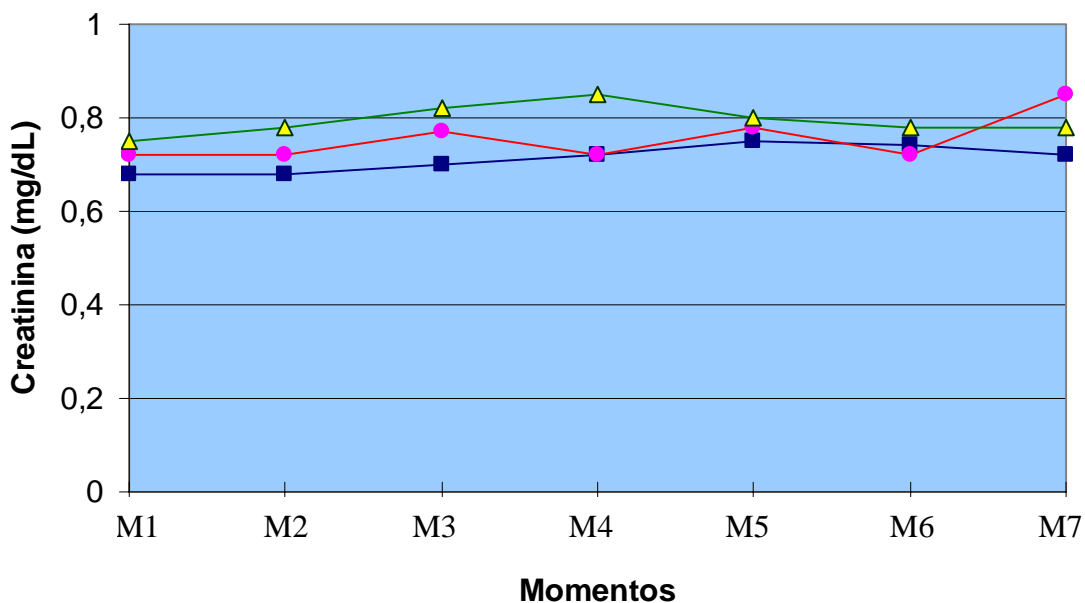
Tabela 22: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da dosagem da creatinina plasmática (mg/dL), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

Momentos								
Grupos		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<b>G1</b>	Variação	0,6-0,8	0,6-0,8	0,6-0,8	0,6-0,8	0,7-0,8	0,6-1,0	0,7-0,8
	Média	0,68	0,68	0,70	0,72	0,75	0,74*	0,72*
	D.P.	± 0,08	± 0,08	± 0,06	± 0,08	± 0,05	± 0,15	± 0,04
<b>G2</b>	Variação	0,6-1,0	0,7-0,8	0,6-1,0	0,6-0,8	0,7-0,9	0,6-1,0	0,6-1,3
	Média	0,72	0,72	0,77	0,72	0,78	0,72	0,85
	D.P.	± 0,16	± 0,04	± 0,14	± 0,08	± 0,08	± 0,15	± 0,25
<b>G3</b>	Variação	0,7-0,8	0,7-0,9	0,7-0,9	0,8-0,9	0,7-0,9-	0,6-0,9	0,5-0,9
	Média	0,75	0,78	0,82	0,85	0,80	0,78	0,78
	D.P.	± 0,05	± 0,10	± 0,08	± 0,05	± 0,09	± 0,13	± 0,16

Análise estatística	Hipótese	Estatística calculada	Significância	Comentários
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 0,164	p > 0,05	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 21,122	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 0,827	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



Veneno nativo (G1)
  Veneno irradiado (G2)
  Controle (G3)

M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 20: Valores médios nos diferentes momentos da dosagem da creatinina plasmática (mg/dL), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 22 e a figura 20 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a dosagem da creatinina plasmática, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 21,122$ ) ( $G1=G2=G3$ )
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a dosagem da creatinina plasmática, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,164$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a dosagem da creatinina plasmática, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,827$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

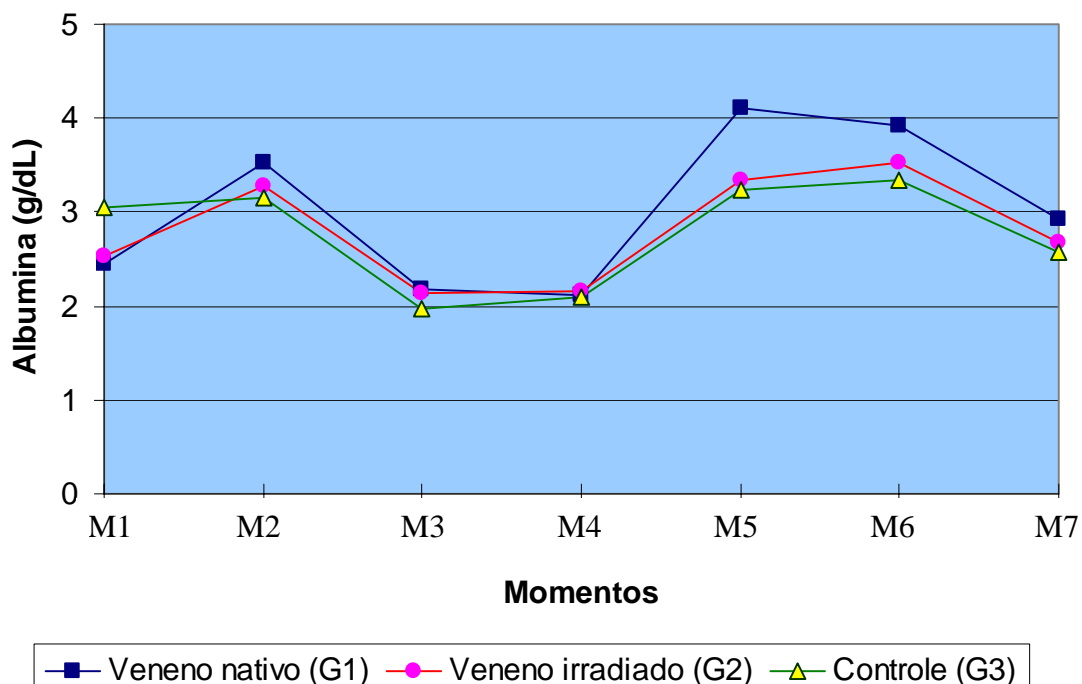
Tabela 23: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da dosagem da albumina plasmática (g/dL), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>Grupos</b>								
<b>G1</b>	Variação	2,17-2,96	2,96-4,3	2,0-2,5	1,7-2,3	3,0-6,0	3,3-4,3	2,3-4,8
	Média	2,45	3,52	2,18	2,12	4,10	3,92*	2,92*
	D.P.	± 0,27	± 0,56	± 0,17	± 0,21	± 1,11	± 0,54	± 1,10
<b>G2</b>	Variação	2,02-2,96	2,71-3,73	1,80-2,3	2,0-2,3	3,0-3,7	3,2-4,0	1,8-4,4
	Média	2,53	3,27	2,13	2,15	3,33	3,53	2,68
	D.P.	± 0,36	± 0,43	± 0,20	± 0,10	± 0,24	± 0,36	± 0,96
<b>G3</b>	Variação	1,94-4,96	2,71-3,31	1,60-2,30	1,70-2,50	2,90-3,60	3,10-3,60	1,70-3,70
	Média	3,05	3,16	1,98	2,10	3,24	3,35	2,57
	D.P.	± 1,14	± 0,83	± 0,23	± 0,32	± 0,24	± 0,16	± 0,69

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 21,609	p < 0,05	M1≠M2≠M3≠M4≠M5≠M6=M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 1,156	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 0,829	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 21: Valores médios nos diferentes momentos da dosagem da albumina plasmática (g/dL), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 23 e a figura 21 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a dosagem da albumina plasmática, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 1,156$ ) ( $G1=G2=G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, pelo teste de Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a dosagem da albumina plasmática, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 21,609$ ). Os contrastes entre os momentos 6 e 7 não foram significativos ( $p < 0,05\%$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a dosagem da albumina plasmática, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,829$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

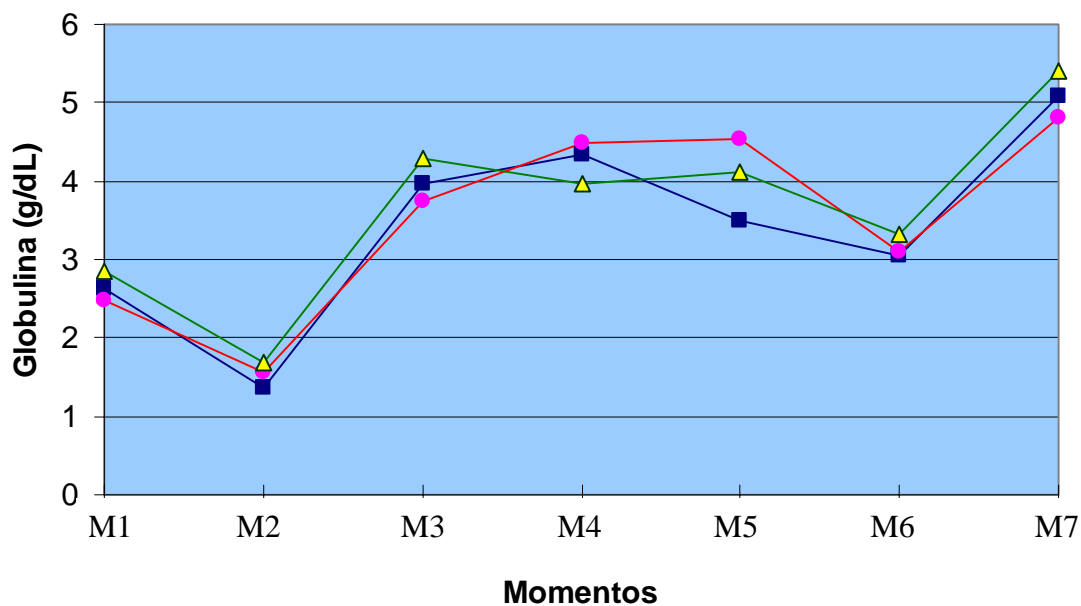
Tabela 24: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da dosagem da globulina plasmática (g/dL), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
<b>Grupos</b>								
<b>G1</b>	Variação	1,71-3,90	0,68-2,39	3,16-4,60	3,96-4,93	1,89-6,46	2,01-5,50	4,2-6,16
	Média	2,63	1,36	3,96	4,35	3,49	3,06*	5,09*
	D.P.	± 0,85	± 0,69	± 0,50	± 0,38	± 1,58	± 1,40	± 0,78
<b>G2</b>	Variação	0,50-4,14	0,43-2,23	1,64-5,33	3,39-5,84	3,85-5,13	1,89-4,53	3,90-6,72
	Média	2,48	1,55	3,74	4,50	4,54	3,10	4,81
	D.P.	± 1,26	± 0,62	± 1,24	± 1,01	± 0,43	± 1,01	± 1,11
<b>G3</b>	Variação	0,11-4,61	0,51-2,99	2,37-6,56	2,39-5,63	2,90-5,98	2,66-4,16	4,31-6,27
	Média	2,84	1,69	4,30	3,96	4,11	3,33	5,41
	D.P.	± 1,59	± 1,03	± 1,67	± 1,19	± 1,03	± 0,53	± 0,74

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 23,177	p < 0,05	M1≠M2≠M3≠M4≠M5=M6≠M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 0,876	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 0,798	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



—■— Veneno nativo (G1) —●— Veneno irradiado (G2) —▲— Controle (G3)

M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 22: Valores médios nos diferentes momentos da dosagem da globulina plasmática (g/dL), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 24 e a figura 22 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a dosagem da globulina plasmática, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,876$ ) ( $G1=G2=G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, pelo teste de Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a dosagem da globulina plasmática, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 23,177$ ). Os contrastes entre os momentos 5 e 6 não foram significativos ( $p < 0,05\%$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a dosagem da globulina plasmática, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,798$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

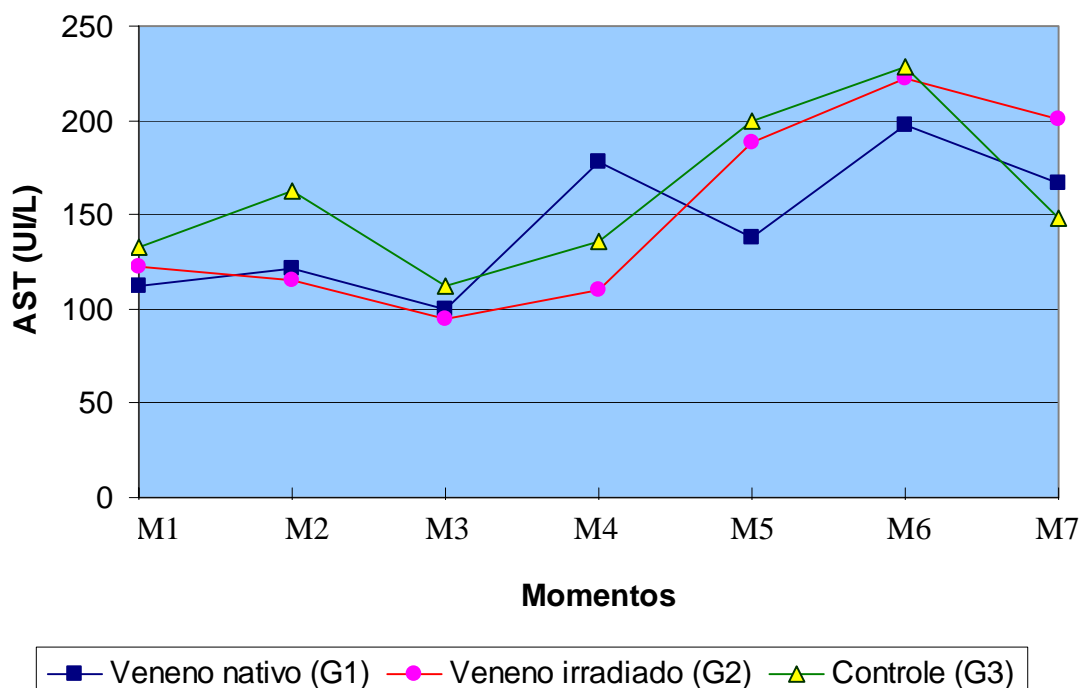
Tabela 25: Distribuição das variações, médias e desvios padrões da dosagem da aspartato-aminotransferase (AST) plasmática (UI/L), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

Momentos		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Grupos								
<b>G1</b>	Variação	84-135	102-150	87-114	108-454	86-202	70-372	68-254
	Média	111,67	121,83	100,17	177,67	137,40	197,80*	166,80*
	D.P.	± 19,12	± 17,80	± 11,27	± 136,29	± 42,60	± 134,09	± 76,05
<b>G2</b>	Variação	103-151	97-134	67-118	91-127	91-257	94-368	78-270
	Média	122,00	115,17	94,83	110,17	187,83	222,17	200,67
	D.P.	± 16,25	± 14,63	± 19,07	± 13,63	± 61,08	± 101,61	± 85,02
<b>G3</b>	Variação	109-165	100-368	74-168	97-208	56-327	70-340	56-282
	Média	132,50	162,83	112,33	136,17	199,17	228,00	148,33
	D.P.	± 25,07	± 103,08	± 32,66	± 40,32	± 98,46	± 115,67	± 101,66

Análise estatística	Hipótese	Estatística calculada	Significância	Comentários
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 7,234	p < 0,05	M1=M2≠M3=M4=M5=M6=M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 0,457	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 0,561	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 23: Valores médios nos diferentes momentos da dosagem da aspartato-aminotransferase (AST) plasmática (U/L), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 25 e a figura 23 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para a dosagem da aspartato-aminotransferase (AST) plasmática, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,457$ ) ( $G1=G2=G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, pelo teste de Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para a dosagem da aspartato-aminotransferase (AST) plasmática, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 7,234$ ). Os contrastes entre os momentos 1 e 2, 3 e 4, 4 e 5, 5 e 6, 6 e 7 não foram significativos ( $p < 0,05\%$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para a dosagem da aspartato-aminotransferase (AST) plasmática, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,561$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

### **4.3.3. – Avaliação ponderal**

#### **4.3.3.1. Ganho de peso**

O objetivo de se avaliar o ganho de peso foi o de verificar se os diferentes esquemas de hiperimunização proporcionaram ganhos de peso diferentes.

A distribuição das variações, médias e desvios padrões do peso dos animais (Kg), dos grupos de ovinos inoculados com veneno nativo (G1), veneno irradiado (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7), encontram-se na tabela 26.

As médias de peso dos animais (Kg), para os três grupos de animais estudados, estão representadas na figura 24.

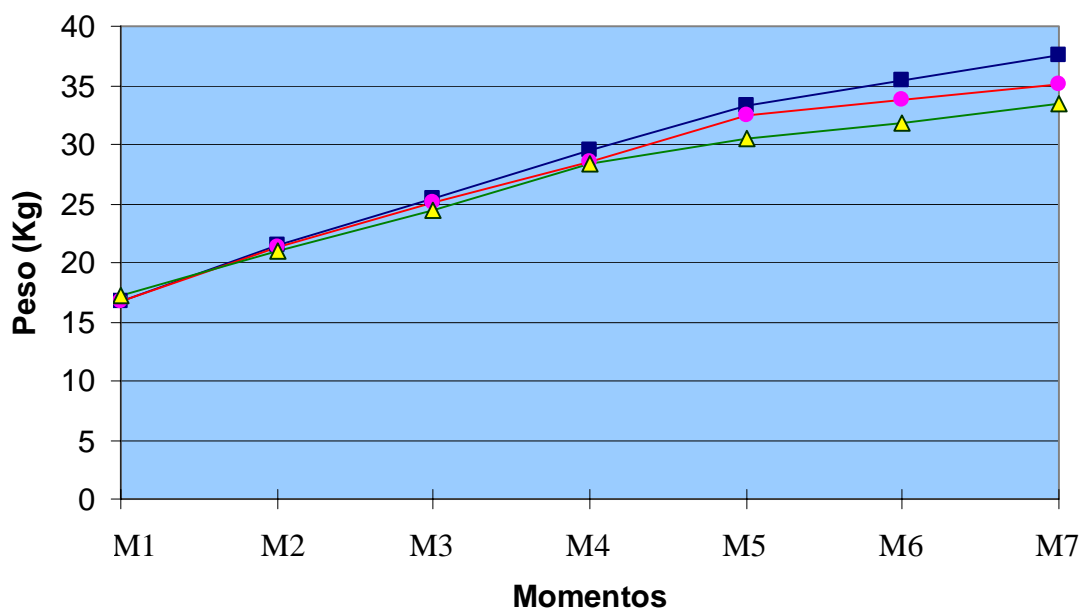
Tabela 26: Distribuição das variações, médias e desvios padrões do peso dos animais (Kg), realizados nos grupos de carneiros (n=6) inoculados com veneno nativo (G1), irradiado com <sup>60</sup>Co (G2) e controle (G3) nos diferentes momentos.

<b>Momentos</b> <b>Grupos</b>		<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M6</b>	<b>M7</b>
		<b>G1</b>	Variação	11,8-19,2	24,8-24,5	20-27,5	24-32	25,2-36,3
	Média	16,75	21,55	25,42	29,45	33,3	35,48*	37,52*
	D.P.	± 2,92	± 3,45	± 2,85	± 3,17	± 4,58	± 5,80	± 4,91
<b>G2</b>	Variação	10-22	13-30,8	17,5-34	18,7-38,5	21,2-44,8	22,5-45,8	23,2-47
	Média	16,75	21,27	25,08	28,58	32,4	33,73	35,06
	D.P.	± 4,41	± 6,36	± 5,83	± 6,96	± 8,23	± 8,19	± 7,89
<b>G3</b>	Variação	10,7-21,5	12,7-28,5	15-34	18,4-37,9	20,5-41,3	22-41	23,5-42
	Média	17,18	20,95	24,5	28,42	30,5	31,80	33,50
	D.P.	± 5,10	± 6,48	± 7,65	± 7,95	± 8,52	± 9,14	± 8,70

<b>Análise estatística</b>	<b>Hipótese</b>	<b>Estatística calculada</b>	<b>Significância</b>	<b>Comentários</b>
<b>Momentos</b>	M1=M2=M3=M4=M5=M6=M7	F= 243,272	p < 0,05	M1≠M2≠M3≠M4≠M5≠M6≠M7
<b>Grupos</b>	G1 = G2 = G3	F= 0,81	p > 0,05	G1 = G2 = G3
<b>Interação dos Momentos entre Grupos</b>	p/ M1 : G1 = G2 = G3			p/ M1 : G1 = G2 = G3
	p/ M2 : G1 = G2 = G3			p/ M2 : G1 = G2 = G3
	p/ M3 : G1 = G2 = G3			p/ M3 : G1 = G2 = G3
	p/ M4 : G1 = G2 = G3	F= 1,133	p > 0,05	p/ M4 : G1 = G2 = G3
	p/ M5 : G1 = G2 = G3			p/ M5 : G1 = G2 = G3
	p/ M6 : G1 = G2 = G3			p/ M6 : G1 = G2 = G3
	p/ M7 : G1 = G2 = G3			p/ M7 : G1 = G2 = G3

\* Ausência de um animal que evoluiu para óbito (G1- M6 e M7). D.P. = Desvio Padrão

G1 = grupo de seis ovinos inoculados com veneno nativo de *C.d.t.*; G2= grupo de seis ovinos inoculados com veneno irradiado com <sup>60</sup>Co de *C.d.t.*; G3 = grupo de seis ovinos - controle; M1= dia 01, M2= dia 14, M3= dia 28, M4= dia 42, M5= dia 56, M6= dia 70 e M7= dia 84. O momento M1, refere-se ao dia do primeiro inóculo.



■ Veneno nativo (G1) ● Veneno irradiado (G2) ▲ Controle (G3)

M1 = dia 1; M2= dia 14; M3= dia 28; M4= dia 42; M5= dia 56; M6= dia 70; M7= dia 84

Figura 24: Valores médios nos diferentes momentos do peso dos animais (Kg), para os grupos de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo (G1), irradiado com  $^{60}\text{Co}$  (G2) e controle (G3).

A tabela 26 e a figura 24 mostram que:

- 1- a comparação entre os Grupos 1, 2 e 3, realizada pelo teste de esfericidade e pelo teste de Huynh-Feldt, para o peso dos animais, mostrou que não houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 0,81$ ) ( $G1=G2=G3$ ).
- 2- a comparação entre os títulos de anticorpos em diferentes momentos (dia um, 14, 28, 42, 46, 70 e 84), realizada pelo teste de esfericidade, pelo teste de Huynh-Feldt e posteriormente testada por contrastes, para o peso dos animais, mostrou que houve diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 243,272$ ).
- 3- a comparação dos momentos entre os grupos (interação), para o peso dos animais, não apresentou diferença estatística no nível de 5% de significância ( $F = 1,133$ ). Portanto, houve uniformidade dos grupos ao longo do tempo.

#### **4.3.3.2. Monitoramento parasitológico**

O monitoramento parasitológico permitiu diminuir os níveis de endoparasitas dos grupos de ovinos inoculados com veneno nativo (G1), veneno irradiado (G2) e controle (G3) a partir da contagem de ovos por grama de fezes (opg), realizado em três momentos ao longo do experimento e os resultados encontram-se na tabela 27.

Os resultados permitem verificar uma tendência à diminuição da infestação por parasitas com o esquema anti-helmíntico adotado.

Tabela 27: Contagem de ovos por grama de fezes (opg) dos ovinos inoculados com veneno nativo (Grupo 1), veneno irradiado (Grupo 2) e controle (Grupo 3).

Grupo	Animal	1º opg	2º opg	3º opg
Grupo 1	1	300 ovos de <i>Strongylideos</i> 100 ovos de <i>Strongyloides</i> <i>Eimeria</i> sp (+)	<i>Eimeria</i> sp - raros	Amostra negativa
	2	1600 ovos de <i>Strongylideos</i> Ovos de <i>Moniezia</i> <i>Eimeria</i> sp (+)	1900 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp - raros	800 ovos de <i>Strongylideos</i>
	3	1500 ovos de <i>Strongylideos</i> Ovos de <i>Moniezia</i> <i>Eimeria</i> sp - raros	700 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp - raros	100 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp - raros
	4	2900 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp (++)	<i>Eimeria</i> sp (+)	200 ovos de <i>Strongylideos</i> Ovos de <i>Moniezia</i> sp <i>Eimeria</i> sp (+)
	5	1100 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp (+)	500 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp (+)	500 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp (raros)
	6	<i>Eimeria</i> sp (+++)	<i>Eimeria</i> sp (raros)	<i>Eimeria</i> sp (raros)
Grupo 2	1	6700 ovos de <i>Strongylideos</i> 500 ovos de <i>Strongyloides</i> <i>Eimeria</i> sp (++)	7100 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp (+)	1400 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp - raros
	2	2700 ovos de <i>Strongylideos</i> 100 ovos de <i>Strongyloides</i> <i>Eimeria</i> sp - raros	1800 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp - raros	1200 ovos de <i>Strongylideos</i>
	3	100 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp (+)	<i>Eimeria</i> sp (++)	<i>Eimeria</i> sp (raros)
	4	1700 ovos de <i>Strongylideos</i>	<i>Eimeria</i> sp (raros)	<i>Eimeria</i> sp (raros)
	5	200 ovos de <i>Strongylideos</i> Ovos de <i>Moniezia</i> sp <i>Eimeria</i> sp (+)	200 ovos de <i>Strongylideos</i> / ovos de <i>Moniezia</i> sp / <i>Eimeria</i> sp (+)	<i>Eimeria</i> sp (raros)
	6	6700 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp (raros)	300 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp (raros)	200 ovos de <i>Strongylideos</i>
Grupo 3	1	800 ovos de <i>Strongylideos</i> 300 ovos de <i>Strongyloides</i> Ovos de <i>Moniezia</i> sp <i>Eimeria</i> sp (++)	200 ovos de <i>Strongylideos</i> 100 ovos de <i>Strongyloides</i> <i>Eimeria</i> sp - raros	900 ovos de <i>Strongylideos</i>
	2	9200 ovos de <i>Strongylideos</i>	3800 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp (+)	300 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp - raros
	3	Oocistos de coccídeos (+)	1800 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp - raros	1200 ovos de <i>Strongylideos</i>
	4	<i>Eimeria</i> sp - raros	<i>Eimeria</i> sp - raros	Amostra negativa
	5	1600 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp (raros)	1300 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp (raros)	300 ovos de <i>Strongylideos</i>
	6	200 ovos de <i>Strongylideos</i> <i>Eimeria</i> sp (++)	1200 ovos de <i>Strongylideos</i>	<i>Eimeria</i> sp (raros)

Quantidade de Oocistos de *Eimeria* observados na microscopia: Raros; Pequena (+); Regular (++); Grande (+++)  
1º opg – dia um; 2º opg – dia 15; 3º opg – dia 30

#### **4.3.4. Relato de caso**

Durante o experimento, um animal do grupo de ovinos inoculados com veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* (G1), veio a óbito.

O relato deste caso, tornou-se parte importante do trabalho pois o óbito poderia ter sido causado por envenenamento crotálico, decorrente do processo de hiperimunização com veneno nativo adotado ou por outra causa à esclarecer.

##### **4.3.4.1. Resumo da história clínica**

O animal proveniente de experimento com inoculação de veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo apresentava anorexia e mucosas ictéricas e de coloração achocolatadas há dois dias.

Recebeu quatro inoculações de veneno (0,5 mg; 1,0 mg; 1,0 mg e 1,5 mg respectivamente) a cada 14 dias. Começou a apresentar sintomas no 60º dia após o início dos experimentos, sendo o único animal a apresentar tais sintomas. Há 10 dias, houve mudança na ração oferecida aos animais, substituindo a ração da Purina®, que não apresenta Cobre em sua composição, pela ração Nutrimin®, com 3 ppm de Cobre em sua composição.

Para melhor acompanhamento do caso, o animal foi internado na Clínica de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, Botucatu, com Registro Geral (RG): 127378.

##### **4.3.4.2. Exame físico**

Foi realizado exame físico no animal, sendo observado: atitude quadrupedal, mucosas ictéricas/achocolatadas, estado de nutrição ruim, peso 22,3 Kg, hidratação 92%, temperatura 38,6 °C, frequência respiratória 20 mpm, frequência cardíaca 80 bpm, ausência de movimentos ruminais, olhos com secreção ocular bilateral, ligeira caquexia, mucosas “achocolatadas”, desidratação 8%, bulhas arrítmicas com sopro grau II-IV (até V) sistólico, taquicardia, anorexia, abscessos em região do pescoço, crepitação grossa e aumento de ruído em região traqueo-brônquica bilateral, anúria verificada por sondagem, aumento de volume de linfonodos pré-escapulares.

#### 4.3.4.3. Exames laboratoriais

O animal foi internado e os exames realizados no primeiro dia foram:

##### 1. Hemograma parcial

Volume globular: 14%

Proteína plasmática: 9,0 g/dl

Fibrinogênio: 1000 mg/dl

Os exames realizados no segundo dia foram:

##### 1. Hemograma completo

Hemácias: 5.306.000 / $\mu$ L

Hemoglobina: 6,0 g/dl

Volume globular: 18%

Proteína plasmática: 8,8 g/dl

Fibrinogênio: não foi possível a leitura devido à coloração do plasma

Plaquetas: 808.000 / $\mu$ L

Metarrubricitos: 18 / 100 leucócitos

Leucócitos: 45.025 / $\mu$ L

Segmentados: 64 % (28.816 / $\mu$ L)

Linfócitos: 21 % (9.455 / $\mu$ L)

Eosinófilos: 14% (6.304 / $\mu$ L)

Monócitos: 1% (450 / $\mu$ L)

Obs: Neutrófilos hipersegmentados, plasma intensamente hemolisado

##### 2. Bioquímico

Uréia: 220,4 mg/dl

Creatinina: 10,0 mg/dl

Aspartato aminotransferase (AST): 1.120,0 UI/L

Gama glutamiltransferase (GGT): 84,0 UI/L

Proteína total (soro): 11,0 g/dl

Albumina: 7,5 g/dl

Globulina: 2,5 g/dl

Bilirrubina total: 7,4 mg/dl  
Bilirrubina direta: 0,6 mg/dl  
Bilirrubina indireta: 6,8 mg/dl  
Creatinofosfoquinase (CPK): 6.947,3 UI/L

### 3. Derrame cavitário

Tipo de fluído: líquido peritoneal  
Volume: 0,5 mL  
Cor: acastanhado  
Aspecto: turvo  
Densidade: 1030  
pH: não foi possível realizar devido à coloração  
Proteínas: +++ (4,6 g/dl)  
Glicose: não foi possível realizar devido à coloração  
Sangue oculto: +++  
Hemácias: 5.500 / $\mu$ L  
Células nucleadas: 440,0 / $\mu$ L  
Citologia: Presença de hemácias íntegras. Predomínio de neutrófilos segmentados (31%), seguidos de linfócitos (30%), macrófagos (23%), células mesoteliais (10%) e eritroblasto (6%).  
Creatinina: 80 mg/dl  
Uréia: 374 mg/dl  
Fibrinogênio: < 100 mg/dl  
Obs: Coagulação positiva, linfócitos reativos e presença de eritrofagocitose.

### 4. Exame parasitológico

Contagem de ovos – opg. (Gordon & Whitlock): 800 ovos por grama de *Strongylideos*

Os exames realizados no terceiro dia foram:

### 1. Bioquímico

Uréia: 194,3 mg/dl

Creatinina: 10,0 mg/dl

## 2. Derrame cavitário

Tipo de fluido: líquido peritoneal

Volume: 4,0 mL

Cor: castanho escuro

Aspecto: turvo

Densidade: 1036

pH: 8,0

Proteínas: +++ (5,0 g/dl)

Glicose: não foi possível realizar devido à coloração

Sangue oculto: +++

Hemácias: 2.090 / $\mu$ L

Células nucleadas: 963 / $\mu$ L

Citologia: Presença de hemácias íntegras. Predomínio de neutrófilos hipersegmentados (83%), seguidos de linfócitos (8%), macrófagos (6%), eritroblasto (2%) e células mesoteliais (1%)

Creatinina: 10 mg/dl

Uréia: 454,4 mg/dl

Fibrinogênio: < 100 mg/dl

## 3. Exame de soroaglutinação microscópica para Leptospirose

O exame de soroaglutinação microscópica para Leptospirose foi realizado pelo Serviço de Diagnóstico de Zoonoses do Hospital Veterinário da FMVZ – Botucatu. O soro mostrou-se não reagente aos sorovares testados: *bratislava*, *castellonis*, *canicola*, *djasiman*, *gryppytyphosa*, *hardjo*, *wolffi copenhageni*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *purogenes*, *tarassovi*.

### 4.3.4.4. Evolução clínica e tratamento

No primeiro dia, após o exame físico, foram realizadas transfusão sanguínea (500 mL) e fluidoterapia (1,5 L de Ringer Lactato)

No segundo dia de internação, o animal apresentava ligeiro apetite, fezes ressecadas com muco, anúria, temperatura 38,2 °C, frequência cardíaca de

106 bpm, frequência respiratória 32 mpm, ausência de movimentos ruminais, taquicardia com desdobramento de segunda bulha cardíaca, mucosas achocolatadas, pulso forte e cheio, bexiga e apêndice vermiforme normal à palpação, mucosas prepucial e peniana de cor achocolatada. O tratamento realizado foi manitol 1 g/Kg, IV (100 mL); furosemida 4 mg/KG, IV; Multibiótico (Penicilina) 20.000 UI/Kg, IM (3 mL); Fluidoterapia 2,0 L de Ringer Lactato, IV.

No terceiro dia de internação, o animal apresentava ausência de fezes, anúria, temperatura 38,3 °C, frequência cardíaca de 112 bpm, frequência respiratória 20 mpm, ausência de movimentos ruminais, taquicardia com desdobramento de segunda bulha cardíaca, mucosas achocolatadas, pulso forte e cheio, mucosas prepucial e peniana de cor achocolatada. Como o animal não urinou até o presente momento, foi amputado o apêndice vermiforme para tentativa de sondagem e infusão de solução fisiológica, porém sem sucesso. Apresentou urina castanho-escura (oligúria) com presença de grumos e alguns cálculos. A colheita de líquido peritoneal revelou um líquido escuro (acastanhado) compatível com urina.

Devido à evolução negativa do quadro, foi autorizado o sacrifício do animal para realização de necropsia.

Para o sacrifício, segundo as normas éticas da Comissão de Ética do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, foi utilizado 0,2 mg/Kg de Xilazina intravenosa seguida de eletrocussão.

#### **4.3.4.5. Suspeitas diagnósticas**

Intoxicação por veneno de *Crotalus durissus terrificus*, intoxicação por cobre, ruptura de bexiga, uretra ou ureter(es), leptospirose, clostridiose.

#### **4.3.4.6. Relatório de necropsia**

A necropsia foi realizada pelo Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – Botucatu.

RG: 127378

Necropsia: 374/04

Espécie: Ovina

Raça: Mestiço

Sexo: Macho

Idade: 3 meses

Causa mortis: sacrifício "in extremis"

**Processos secundários:** hidrotórax, hidroperitônio, pneumonia no lobo apical direito e esquerdo, hidropericárdio, edema subcutâneo em região ventral, esplenomegalia, degeneração hepática, rins de coloração escura, ruptura de ureter, ileíte catarral, congestão cerebral.

A figura 25 mostra a carcaça de ovino durante a necropsia com hidrotórax e hidroperitônio evidentes.

A figura 26 mostra degeneração hepática e a figura 27 mostra o rim de coloração escura.

A figura 28 mostra as mucosas oculares de coloração "achocolatada".

#### **Achados histopatológicos:**

- Fígado: degeneração macrofotocular difusa, infiltrado inflamatório polimorfonuclear difuso, congestão discreta, colestase (figuras 29, 30 e 31).

- Rins: congestão, hemorragia, glomérulos hipercelulares, proteína na luz tubular e no espaço de Bowman, degeneração e necrose do epitélio tubular, esclerose glomerular, sinéquias glomerulares, proliferação de células parietais, dilatação tubular (figura 32).

- Intestino: congestão (figura 33).

A figura 34 mostra o músculo esquelético histologicamente normal com ausência de áreas de necrose nas fibras esqueléticas.

**Conclusão:** Quadro anátomo-patológico compatível com intoxicação por cobre.

Figura 25: Carcaça de ovino durante a necropsia: hidrotórax e hidroperitônio.

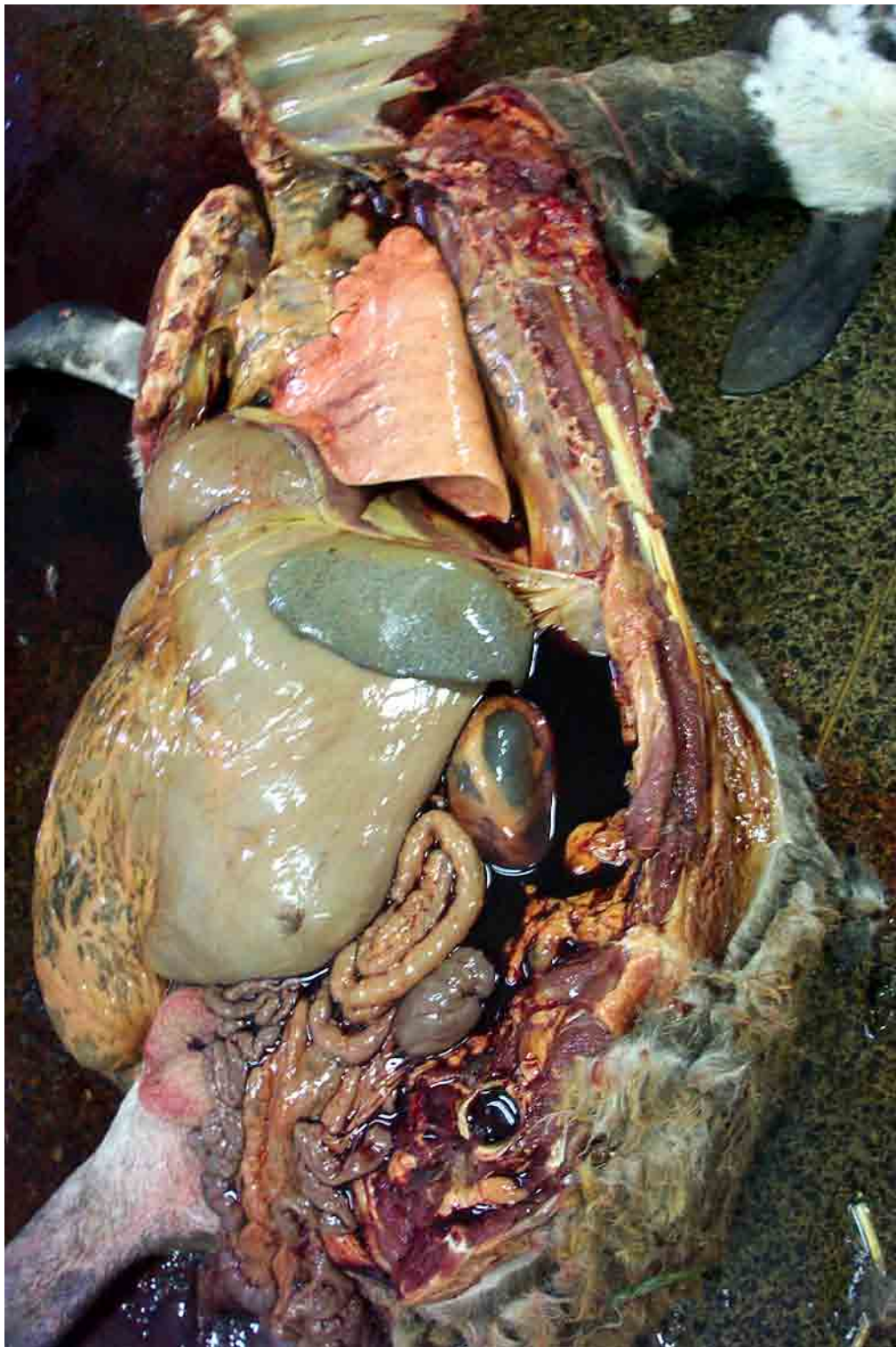


Figura 26: Necropsia de ovino: degeneração hepática



Figura 27: Necropsia de ovino: rim de coloração escura

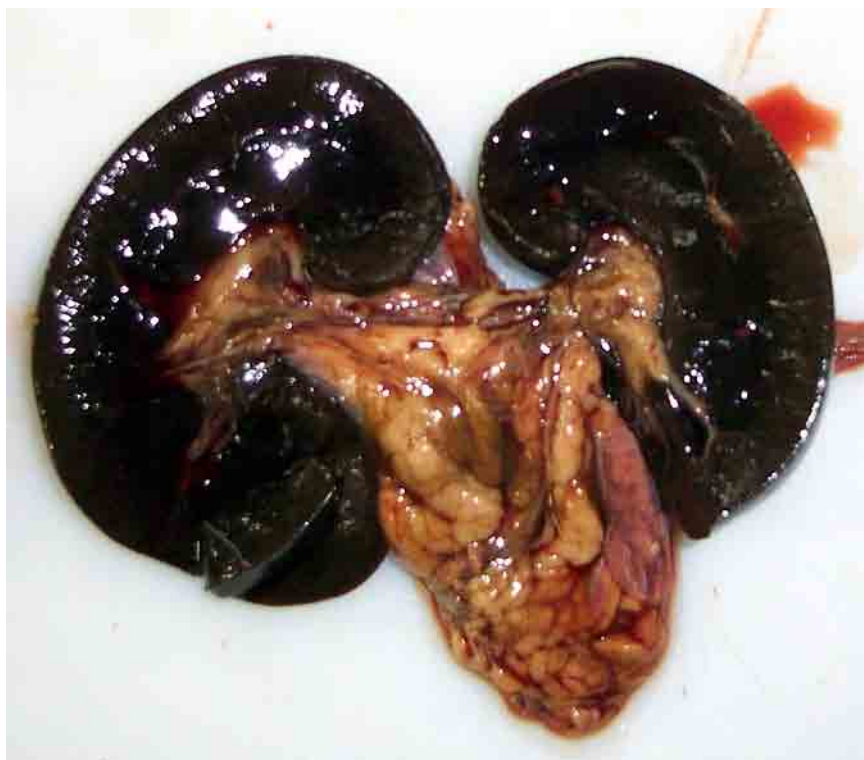


Figura 28: Necropsia de ovino: mucosas oculares de coloração "achocolatada".



Figura 29: Imagem de rim, com presença de proteína e hemácias nos túbulos renais, proteína na cápsula de Bowman, esclerose de glomérulo e dilatação de túbulos adjacentes (HE: 50X).

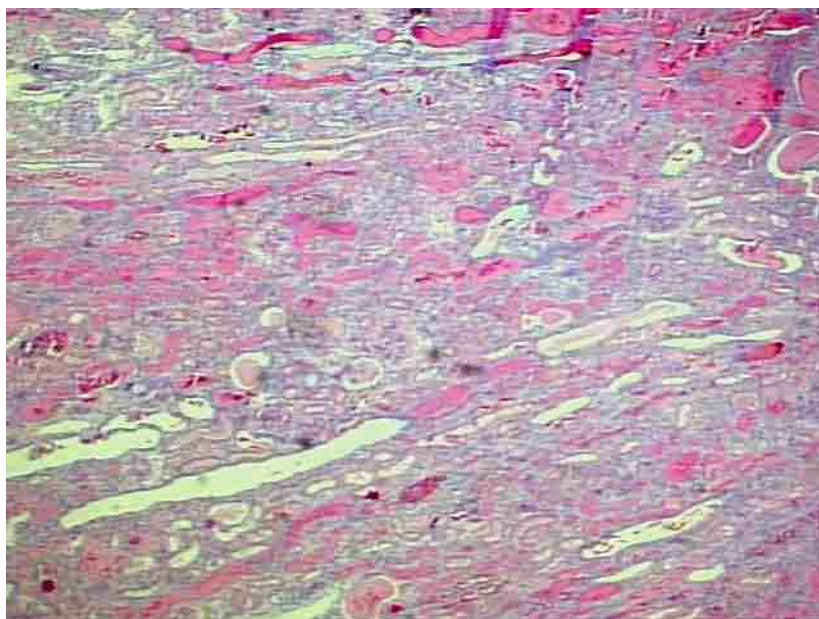


Figura 30: Imagem de rim, glomérulos hiper celulares com presença em grande quantidade de proteína na cápsula da Bowman com túbulos renais proximais com grande quantidade de proteína e hemácias, degeneração tubular (HE: 200X).

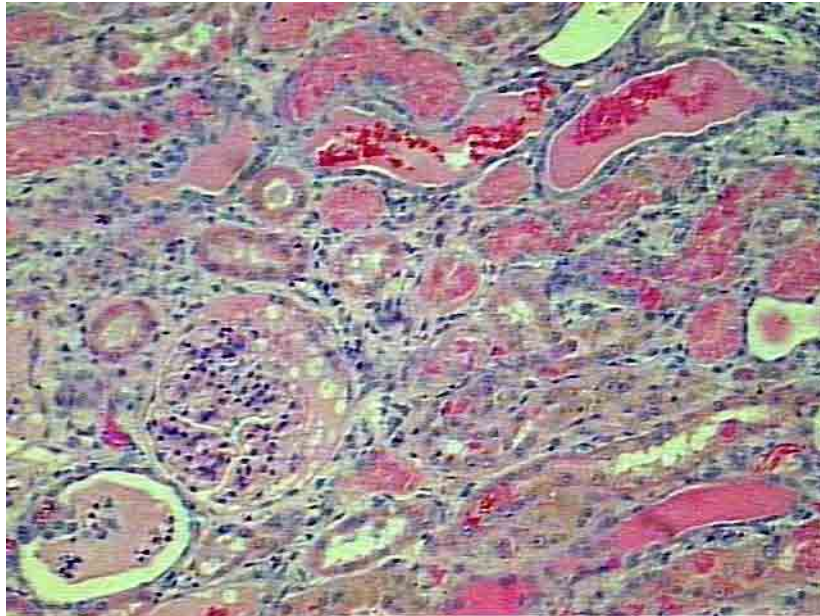


Figura 31: Túbulos renais, degeneração tubular hidrópica com necrose tubular e presença de células necrosadas na luz do túbulo (HE: 400 X).

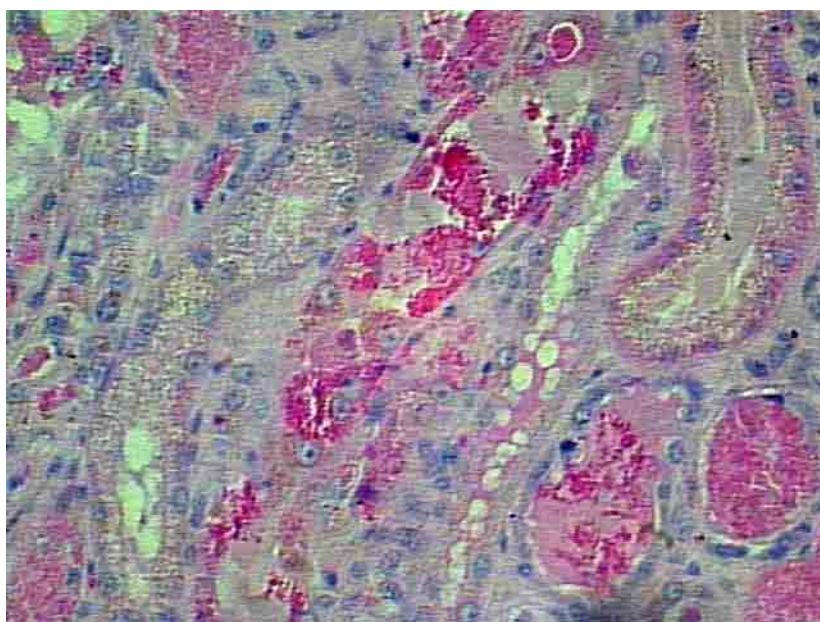


Figura 32: Imagem de fígado, veia centro lobular, com degeneração macrofotocular (esteatose) com numerosas áreas de colestase (bile), infiltrado glomerular mononuclear e áreas de congestão (HE: 200 X).

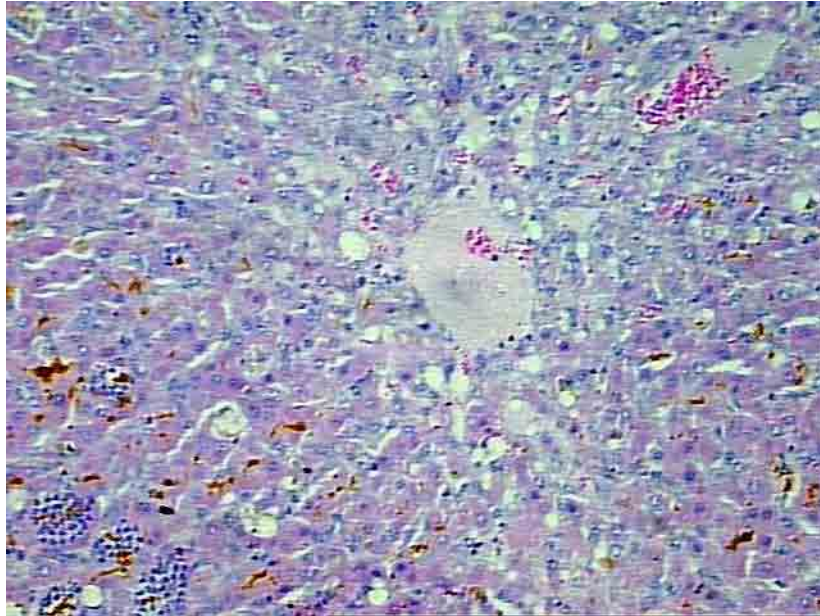
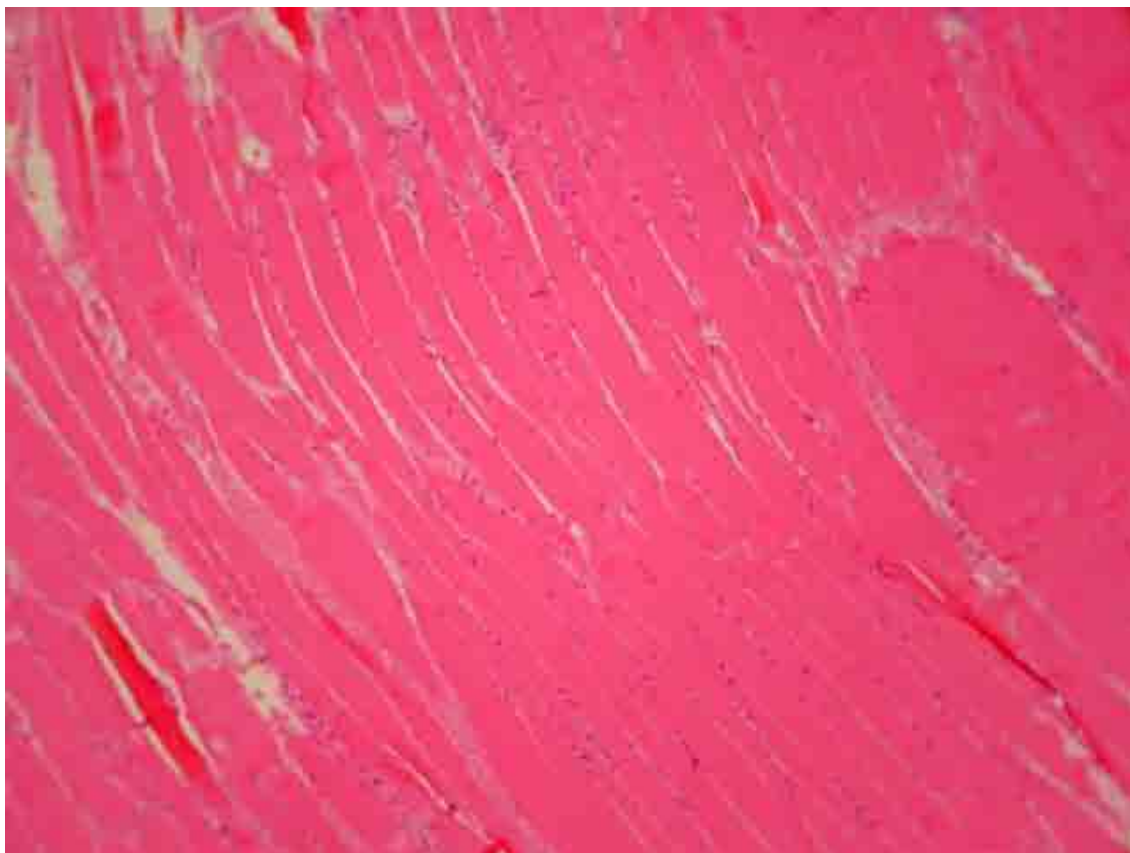


Figura 33: Imagem de intestino, áreas focais de congestão vascular (HE: 200X).



Figura 34: Imagem de músculo esquelético histologicamente normal mostrando ausência de áreas de necrose nas fibras esqueléticas (HE: 200X).



#### **4.3.4.7. Determinação de metais pesados (Cobre)**

Foi realizada a determinação de metais pesados (Cobre) em amostras de fígado e rim, pelo Centro de Assistência Toxicológica – CEATOX do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu.

A técnica utilizada foi de Espectrometria por absorção atômica e os resultados foram:

- Fígado: 237,8  $\mu\text{g/g}$
- Rim: 51,2  $\mu\text{g/g}$

## 5. Discussão

A administração parenteral de antivenenos constitui o principal tratamento dos envenenamentos por serpentes peçonhentas desde os trabalhos pioneiros de Calmette e Phisalix & Bertrand (72, 73, 74).

Por outro lado, acidentes com a cascavel sul-americana, *Crotalus durissus*, representam problema de saúde, com mais de 2000 acidentes por ano no Brasil e uma taxa de mortalidade consideravelmente elevada (10).

Devido a sua elevada toxicidade, o veneno de *Crotalus durissus terrificus* pode produzir graves intoxicações nos animais soro-produtores, as quais pode levar à morte (33), causando prejuízo aos produtores de soro.

No Brasil a produção de soro antiofídico é feita em eqüinos . Em vista disso, efeitos colaterais agudos nos indivíduos que recebem estes soros são causados principalmente por imuno sensibilização aos anticorpos produzidos contra proteínas deste animal (75).

Consroe *et al.* (76), defendem que o antiveneno produzido em outros animais, como ovinos, sejam menos imunogênicos que os anticorpos eqüinos. Isto acaba estimulando a pesquisa de novos esquemas de hiperimunização que visem obter títulos elevados de anticorpos específicos nesses animais (33).

Segundo Ângulo *et al.* (34), poucos estudos têm sido realizados sobre alterações clínicas e fisiológicas dos animais imunizados com venenos ofídicos para a produção de antivenenos.

Apesar do sucesso amplamente difundido desta imunoterapia, refletido na neutralização dos mais relevantes efeitos tóxicos dos venenos ofídicos e na drástica redução da mortalidade por picadas de serpentes em muitos países (11, 77), alguns problemas permanecem com a utilização de antivenenos: (a) a parcial ineficácia na neutralização de toxinas que induzem a danos teciduais locais (78); (b) a desigualdade entre os perfis farmacocinéticos dos antivenenos e algumas toxinas, os quais impedem uma neutralização tardia (79); (c) a incidência de reações adversas seguidas da imunoterapia (80-85); (d) reações locais e efeitos sistêmicos indesejáveis nos animais soroprodutores (33, 34).

No intuito de reduzir a extensão destas alterações, aumentar a vida útil dos animais soroprodutores e melhorar a produção de antiveneno, a destoxicação dos venenos de serpentes por vários métodos, têm sido sugeridas, mas algumas delas afetam as propriedades antigênicas das toxinas (33, 52-63).

Assim, os objetivos deste trabalho foram delineados com o intuito de investigar a eficiência da técnica de irradiação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* com  $^{60}\text{Co}$  na produção de antiveneno em ovinos em fase de crescimento. Além disso, a técnica de ELISA previamente padronizada, foi utilizada para detectar e acompanhar o título de anticorpos durante o processo de hiperimunização. Foram avaliadas a capacidade de neutralização e a potência dos soros obtidos. Por fim, foi realizada a avaliação clínica, laboratorial e ponderal dos animais durante todo o experimento, com vistas à produção de soro a baixo custo.

O presente trabalho utilizou venenos nativos e irradiados de *Crotalus durissus terrificus*, cuja  $\text{DL}_{50}$  mostrou-se dentro dos valores observados na literatura (21, 46, 49, 55).

Segundo Landon & Smith (42), os cavalos continuam sendo a espécie animal preferida no processo de produção de antivenenos. Estes autores relatam que, de aproximadamente 200 antivenenos produzidos no mundo, para o tratamento de acidentes com serpentes, escorpiões, aranhas e peixes, somente seis são preparados exclusivamente com soro de origem não-eqüina.

Alguns pesquisadores vêm utilizando ovinos para a produção de antivenenos com sucesso (32, 42). Não existem fatores emotivos contra seu uso para a produção de antivenenos, e ainda, estão livres de doenças como encefalite viral e anemia infecciosa eqüinas, que provocam grandes prejuízos aos produtores (11).

A principal vantagem do uso de ovelhas está na sua excelente capacidade de resposta imune humoral. A resposta é rápida, com cerca de 100% dos animais alcançando altos títulos de anticorpos específicos mantendo-se elevados por um longo período quando a imunização é continuada (42).

Por outro lado, os cavalos hiperimunizados produzem elevados níveis de uma imunoglobulina chamada  $\text{IgG}_T$  (84), que mostra uma forte habilidade protetora embora seja muito mais imunogênica que a  $\text{IgG}$  (32, 37). Nos ovinos, a  $\text{IgG}_T$  não foi detectada (11)

A administração de concentrado de imunoglobulinas eqüinas ou  $\text{F(ab)}_2$  freqüentemente causa reações de hipersensibilidade tipo III mediadas por imuno-complexos, provavelmente pela bivalência destas moléculas, bem como pelos altos níveis de  $\text{IgG}_T$  circulantes nestes animais (32). Segundo os mesmos autores, muitos pacientes são sensibilizados a proteínas eqüinas devido à

exposição prévia e portanto, com alto risco de apresentarem reação anafilática de hipersensibilidade tipo I quando do uso do antiveneno.

A verdadeira incidência de reações anafiláticas é incerta, mas várias mortes ocorrem (37). Segundo Theakston *et al.* (11), a incidência de reações precoces de hipersensibilidade é bastante diversa, variando entre 5 a 80%. Outras reações agudas como erupções cutâneas, hipotensão, dificuldade respiratória e flebites ocorrem em cerca 20% dos pacientes (79). Muitos pacientes que recebem antiveneno de origem eqüina desenvolvem a doença do soro, uma reação de hipersensibilidade tipo III que cursa com febre, artralgia, erupções cutâneas difusas e glomerulopatia (85).

Clark *et al.* (39), relatam com sucesso a eficácia do uso de antiveneno de origem ovina no tratamento da neurotoxicidade dos acidentes causados por cascavéis norte-americanas.

Netto *et al.* (63), demonstraram uma excelente perspectiva da utilização de ovinos como animais soroprodutores de antiveneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*.

Para avaliar a atividade imunogênica de venenos, toxinas e anticorpos vários métodos foram desenvolvidos nos últimos anos (86). Dessa forma, os testes de radioimunoensaios, de hemaglutinação, de imunoeletroforese, de “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) e imunoensaios fluorescentes têm sido utilizados (86,87).

Theakston *et al.* (88), foram os primeiros pesquisadores a descreverem o uso do teste de ELISA para a detecção de venenos de serpentes e anticorpos antivenenos. Este teste tem mostrado ser um método com melhor especificidade, sensibilidade, rapidez de execução, simplicidade e baixo custo (86,89).

Devido a sua sensibilidade e especificidade, Oguiura *et al.* (89) utilizaram o método de ELISA para quantificar a crotamina no veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Outros autores utilizaram o ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliar, quantificar e acompanhar a atividade imunogênica de animais hiperimunizados com veneno nativo e irradiado de *Crotalus durissus terrificus* (49, 63, 90), revelando a eficiência deste teste.

Por outro lado, com a crise na produção de soros antiofídicos ocorrida no Brasil na década de 1980, pesquisadores do Instituto de Pesquisas Energéticas

e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), iniciaram estudos sobre o uso da radiação ionizante como ferramenta na detoxificação de venenos (49, 53-62).

Guarniere-Cruz *et al.* (54), analisando os efeitos de doses crescentes de radiação sobre o veneno de *Bothrops jararaca* em solução salina de 2,0 mg/mL não observaram a formação de precipitado. Verificaram no entanto, que ocorreu a formação de agregados protéicos solúveis nas amostras irradiadas, proporcionalmente ao aumento da dose. Quando o veneno de *Bothrops jararacussu* foi irradiado nas mesmas condições, também não foi observada a precipitação das proteínas, mas sim a formação de agregados em solução (60).

Posteriormente, Nascimento *et al.* (57) avaliaram a influência da radiação ionizante sobre a crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e observaram o aparecimento de agregados protéicos menos tóxicos que a crotoxina nativa. Estes autores utilizaram também o método de ELISA na verificação dos aspectos imunológicos durante o processo de hiperimunização.

Ferreira Junior *et al.* (90) utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA), avaliaram qualitativa e quantitativamente o nível de anticorpos antiveneno de *Crotalus durissus terrificus* irradiado em fonte de  $^{60}\text{Co}$  produzidos em camundongos. Verificaram que os soros produzidos foram capazes de reconhecer as toxinas nativas. Os resultados foram compatíveis com os encontrados por De Paula (59).

Nesta pesquisa, o teste de ELISA foi utilizado para detectar, monitorar e comparar os títulos de anticorpos produzidos nos grupos experimentais de carneiros que receberam veneno de *Crotalus durissus terrificus* na forma nativa e irradiada com  $^{60}\text{Co}$ .

Os valores de densidade óptica observados no teste de ELISA para as diversas diluições do veneno nativo e irradiado de *Crotalus durissus terrificus* demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados.

Os resultados observados mostraram que o pico de anticorpos do grupo inoculado com veneno nativo ocorreu no dia 56 (momento 5) e do grupo inoculado com veneno irradiado ocorreu no dia 70 (momento 6). Devemos salientar que, após o pico alcançado, os valores de densidade óptica para o grupo inoculado com veneno nativo apresentou queda acentuada, enquanto no grupo inoculado com veneno irradiado manteve-se praticamente estável nas diluições estudadas.

Notamos ainda que os anticorpos já são formados a partir do primeiro inóculo e que este fenômeno é bem mais acentuado no grupo inoculado com veneno irradiado, no qual os títulos já se apresentam elevados no dia 28 (momento 3).

No dia 84 (momento 7), realizamos uma titulação dos níveis de anticorpos de 1:100 até 1:51200. Foi observada diferença estatística entre os dois grupos estudados, sendo que os níveis de anticorpos do grupo inoculado com veneno irradiado mantiveram-se superiores ao do grupo inoculado com veneno nativo em todas as diluições. Esses resultados ainda demonstram que, os níveis de anticorpos do grupo inoculado com veneno nativo são praticamente os mesmos, na diluição de 1:400, que o grupo inoculado com veneno irradiado alcançou apenas na diluição de 1:51200.

Observamos, pelos títulos de anticorpos produzidos tanto no grupo de ovinos hiperimunizados com veneno nativo quanto no grupo de ovinos inoculados com veneno irradiado de *Crotalus durissus terrificus* que ambos venenos foram imunogênicos e induziram a formação de anticorpos capazes de reconhecer o veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus*.

A análise dos resultados obtidos em seu conjunto permite diversas considerações e observações a partir da literatura.

Assim, tem sido descrito que a irradiação de peçonhas de serpentes e toxinas isoladas causa a diminuição de sua toxicidade (49, 54-57, 62, 91).

De acordo com Souza Filho *et al.* (56), Nascimento *et al.* (92) e Boni-Mitake *et al.* (62), a diminuição da toxicidade da crotoxina e da crotamina, duas importantes toxinas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, pela radiação gama de <sup>60</sup>Co após a administração em camundongos, foi cerca de duas vezes menor.

Segundo Costa (93), a diminuição da toxicidade da peçonha de abelha *Apis mellifera* irradiada pode ser devido às alterações estruturais nas moléculas de proteínas, observados a partir de resultados de espectrometria, eletroforese e cromatografia líquida de alto desempenho. Assim sendo, pode-se sugerir que estas alterações estruturais nos componentes da peçonha poderiam promover a atenuação da toxicidade da mesma.

A toxicidade em camundongos, de amostra nativa e irradiada com dose de 1000 Gy, da fração crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi verificada por Souza-Filho *et al.* (56). Estes autores observaram que a amostra

irradiada (DL<sub>50</sub> de 309 µg/Kg) foi duas vezes menos letal que a forma nativa (DL<sub>50</sub> de 147 µg/Kg). Quando a irradiação era aumentada para 1500 Gy, havia uma diminuição da letalidade para cerca de 3,5 vezes.

Na irradiação da crotoxina, Nascimento *et al.* (57), propõem que sua melhor imunogenicidade, depende do efeito de agregação protéico, que ocorre após o tratamento com raios gama, resultando em 50 a 60% de agregados de baixa toxicidade.

Bennacef-Heffar & Laraba-Djebari (94), avaliando o efeito dos raios gama sobre o veneno de serpente africana *Vipera lebetina*, demonstraram que a solubilidade das proteínas diminui após sua irradiação, alterando todos os componentes essenciais deste veneno, o que promove a sua destoxicação com a manutenção da sua imunogenicidade. Esta diminuição pode ser causada pela agregação das proteínas (95).

Estes resultados são compatíveis com encontrados por outros autores (49, 55, 96), que sugeriram que a redução da toxicidade seria explicada pela formação de agregados protéicos após a irradiação. Neste caso, rejeita-se a hipótese de uma simples mudança na estrutura da molécula de proteína indicando a formação de um novo composto.

Trabalhando com uma proteína recombinante de *Mycobacterium leprae* nativa e uma irradiada com <sup>60</sup>Co (2kGy) em um modelo de imunização, Pinho *et al.* (97), mostraram que a proteína irradiada apresentou grande imunogenicidade apesar da ausência de formação agregados. Uma razão para isto seria que a irradiação gama produz mudanças oxidativas nestes antígenos, levando a um melhor reconhecimento pelo sistema imunológico e provavelmente as células apresentadoras de antígeno foram alvos desta ação (61).

É sabido que os antígenos ao entrarem no organismo sofrem um processo de oxidação pelas células de defesa para facilitar no processo de fagocitose. Diante de amostras irradiadas, os macrófagos já encontram estas moléculas oxidadas e portanto, eliminam esta etapa do processo. Um melhor processamento, associado a uma apresentação mais rápida do antígeno faz com que o sistema imunológico produza anticorpos mais completos, contra um número maior de epítomos do antígeno, resultando em uma melhor imunogenicidade (98).

Trabalhando com macrófagos peritoniais, um componente do sistema fagocítico mononuclear, *Cardi et al.* (99), concluíram que o reconhecimento mais eficiente da crotoxina irradiada é devido à formação de epítomos oxidados na crotoxina após o tratamento com irradiação gama.

Segundo *Cardi et al.* (61), a irradiação gama provou ser o método de maior sucesso para a destoxicação da crotoxina, importante toxina do veneno crotálico. Segundo os autores, a redução da toxicidade se deve a uma endocitose precoce da crotoxina por células fagocíticas, melhorando o processamento do antígeno. Isto porque a irradiação promove a oxidação das moléculas facilitando sua fagocitose, devido à presença dos receptores “Scavenger” presentes na superfície dos macrófagos.

Para *Hati et al.* (100), a destoxicação pode resultar em alterações estruturais de epítomos relevantes e por essa razão diminuir a eficácia dos anticorpos produzidos contra estas toxinas.

Contradizendo estes autores, a crotoxina irradiada apresenta uma baixa LD<sub>50</sub> e atividade enzimática, mas os agregados formados com a irradiação, têm alto peso molecular podendo ser apresentados e fagocitados de forma mais eficiente. Outra explicação seria que as modificações oxidativas das proteínas, melhoram seu reconhecimento por receptores específicos. Isto é devido à radiação gama induzir radicais livres pela radiólise da água, que podem atuar nas proteínas, promovendo a oxidação das moléculas, as quais podem ser reconhecidas por estes receptores (101).

As espécies reativas resultantes da radiólise da água induzida pela radiação, principalmente radicais hidroxilas e elétrons aquosos, atuam nas moléculas protéicas, promovendo várias modificações (102). Radicais hidroxilas estão envolvidos na atenuação da toxicidade e atividade enzimática, enquanto elétrons aquosos promovem modificações estruturais (58, 103).

O efeito da radiação ionizante nas proteínas e peptídeos, em soluções aquosas, é mediada tanto direta quanto indiretamente. No efeito direto, o processo inicial de deposição energética ocorre dentro das moléculas afetadas, e no efeito indireto, várias espécies reativas como e<sup>-</sup> aq, H<sup>+</sup> e OH<sup>-</sup> formados pela radiólise da água reagem rapidamente com uma grande variedade de moléculas biológicas (104). Esta reação pode ser específica a certos locais ou grupos de moléculas (100).

Souza *et al.* (105), investigaram a habilidade da radiação gama produzida pelo  $^{60}\text{Co}$  (2000 Gy) na atenuação dos efeitos tóxicos do veneno de *Bothrops jararacussu* em junções neuromusculares de camundongos. Concluíram que a radiação é capaz de minimizar os efeitos da paralisia e a miotoxidade causada pelo veneno. Segundo os mesmos autores, estes achados apóiam a hipótese de que a radiação gama pode ser uma importante ferramenta para melhorar a produção de soros antiofídicos por reduzir a toxicidade dos venenos, preservando sua imunogenicidade.

Cardi *et al.* (101), concluíram que o tratamento com irradiação gama da crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, levam a um melhor antígeno para esquemas de imunização visando à produção de antivenenos crotálico ou botrópico-crotálico. Ferreira Junior *et al.* (90), encontraram resultados semelhantes quando utilizaram o veneno total de *Crotalus durissus terrificus* irradiado com  $^{60}\text{Co}$  na imunização de camundongos.

A irradiação causa mudanças químicas e físico-químicas de estruturas secundárias e terciárias das proteínas, enquanto mantém suas propriedades imunogênicas. Esta destoxicação pode ser um método eficaz para reduzir os efeitos tóxicos do veneno em animais imunizados, promovendo melhores antígenos para o preparo de toxóides e vacinas (106, 107).

No presente trabalho foi possível observar que o método de ELISA mostrou-se útil no acompanhamento da produção de anticorpos durante o processo de hiperimunização de ovinos inoculados com veneno nativo ou irradiado com  $^{60}\text{Co}$  de serpentes *Crotalus durissus terrificus*. O método permitiu ainda observar detalhadamente a evolução e o perfil dos anticorpos produzidos.

O veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* é composto por uma mistura de peptídeos e proteínas biologicamente ativas com atividades enzimáticas letais e neurotóxicas (108).

Muitos estudos observaram que o soro anticrotálico possui uma quantidade de anticorpos normalmente inferior à quantidade de anticorpos de outros soros antivenenos (109), sugerindo que o veneno crotálico é de certa maneira um pobre imunógeno (1, 110) ou que tem componentes com atividades imunossupressoras (111). Este efeito imunossupressor do veneno, na resposta imune humoral, foi relatado por Cardoso & Mota (112).

Neste trabalho não houve evidência de imunossupressão devido aos valores de linfócitos apresentados pelos três grupos durante todo o experimento se apresentarem dentro dos parâmetros normais para a espécie.

Alguns pesquisadores relataram que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* tem um efeito inibitório na produção de soro antitoxínico-crotálico (113) e algumas atividades de macrófagos (114).

Rangel-Santos *et al.* (108), demonstraram pela primeira vez que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* bem como a crotoxina têm efeito sobre a proliferação de células esplênicas.

Vários métodos comerciais atuais para a imunização com veneno de *Crotalus durissus terrificus* demonstram-se de certa maneira pouco satisfatórios devido à resposta imune relativamente pobre dos cavalos (115).

Schaeffer *et al.* (110), em um estudo sobre a captura pelo antiveneno (Wyeth's Polyvalent Antivenom) das frações do veneno de serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae, demonstraram que o alto peso molecular das frações dos venenos de *Crotalus adamanteus*, *Crotalus atrox* e *Bothrops atrox* produzem altos títulos de anticorpos verificado pelo método de ELISA. Entretanto, somente baixos a moderados valores de ELISA são obtidos para ambas frações de alto e baixo peso molecular, do veneno de *C. durissus terrificus*.

Dos-Santos *et al.* (111), estudaram a imunidade adquirida por camundongos imunizados com fosfolipase A<sub>2</sub> purificada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Mostraram uma associação entre a proteção do antiveneno e a quantidade de anticorpos circulantes presente no soro dos animais imunizados.

Em outro estudo, Dos-Santos *et al.* (116), avaliando um esquema de imunização de cavalos imunizados com fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, demonstraram a correlação entre os títulos de anticorpos verificados pelo método de ELISA e a resistência dos animais a um desafio de uma dose letal de 200 mg do veneno cru.

Portanto, verificamos que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* é considerado relativamente um pobre imunógeno, mas é altamente tóxico. Após a verificação de títulos adequados de anticorpos pelo método de ELISA no presente trabalho, foram realizados testes de soroneutralização "in vitro" com o intuito de analisar a potência e a capacidade de neutralização dos soros

obtidos nos carneiros inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus* nativo ou irradiado com  $^{60}\text{Co}$ .

Os testes de soroneutralização podem ser realizados por meio de técnicas “in vitro” e “in vivo” utilizando animais de experimentação (26).

O teste de capacidade de neutralização foi realizado no presente trabalho com o intuito de se verificar a quantidade de veneno neutralizada por um mililitro de soro.

A capacidade de neutralização do “pool” de soros obtidos do grupo de ovinos inoculados com veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* foi de 59,2  $\mu\text{g}$  de veneno/mL de soro, equivalente a 20  $\text{DL}_{50}$ . Já a capacidade de neutralização do “pool” de soros obtidos do grupo de ovinos inoculados com veneno irradiado de *Crotalus durissus terrificus* foi de 296  $\mu\text{g}$  de veneno/mL de soro, equivalente a 100  $\text{DL}_{50}$ .

Nos teste de potência de neutralização realizados nesta pesquisa, observando-se a sobrevida dos animais após o desafio, verificamos que aqueles camundongos que receberam soro de ovinos imunizados com veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus*, ao receberem uma e três  $\text{DL}_{50}$  apresentaram 0% de mortalidade. Ao receberem cinco  $\text{DL}_{50}$  a mortalidade foi de 75%. Com dez  $\text{DL}_{50}$  a mortalidade foi de 87,5% e de 100% com 15  $\text{DL}_{50}$ .

Nos teste de potência de neutralização realizados nesta pesquisa, observando-se a sobrevida dos animais após o desafio, verificamos que aqueles camundongos que receberam soro de ovinos imunizados com veneno irradiado de *Crotalus durissus terrificus*, ao receberem uma, três e cinco  $\text{DL}_{50}$  apresentaram 0% de mortalidade. Ao receberem dez  $\text{DL}_{50}$  a mortalidade foi de 37,5%. Com 15  $\text{DL}_{50}$  a mortalidade foi de 87,5%.

Um grupo de animais foi testado apenas com o soro puro para avaliar sua inocuidade, sendo observado 0% de mortalidade. Outro grupo de animais recebeu cinco  $\text{DL}_{50}$  de veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus* para verificação de sua toxicidade, sendo observado 100% de mortalidade.

Estes resultados demonstram que o soro obtido a partir do grupo de ovinos inoculados com veneno irradiado de *Crotalus durissus terrificus* apresentou melhor desempenho e eficácia em neutralizar o veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus*, que o soro obtido a partir do grupo inoculado com veneno nativo.

Estes resultados estão de acordo com Clissa *et al.* (49), Netto *et al.* (63) e Ferreira Junior *et al.* (90) analisadas anteriormente.

Maria *et al.* (117) e Heneine *et al.* (118), verificando a correlação entre métodos “in vitro” e “in vivo” para a neutralização e potência de soros antibotrópicos, sugerem que o método de ELISA pode ser utilizado como técnica “in vitro” para se avaliar a potência de soros antiofídicos brasileiros durante o processo de hiperimunização. Entretanto, o teste clássico “in vivo” em camundongos deve ser usado nos testes finais de produção de antiveneno. Desta forma, não se pode dispensar o emprego de animais de experimentação nos testes finais de avaliação da capacidade de soroneutralização e de potência de antivenenos (11), como os realizados no presente trabalho.

Os testes de capacidade de soroneutralização e potência mostraram que os soros produzidos foram capazes de neutralizar o veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus*, corroborando com os trabalhos (49, 54, 55, 57, 63, 90), que afirmam que a radiação ionizante tem a propriedade de atenuar a toxicidade de venenos ofídicos sem comprometer contudo as suas propriedades antigênicas.

Durante todo o processo de hiperimunização, para a avaliação clínica e ponderal, todos os animais foram observados diariamente. Para isto, foram realizados exames clínicos, laboratoriais e pesagem dos animais.

Os resultados demonstraram que todos os animais apresentaram alterações locais significativas, como necrose, fístulas e abscessos, cerca de sete dias após a primeira inoculação, que foi realizada com Adjuvante Completo de Freund.

Devido ao fato dos animais do grupo controle receberem apenas o Adjuvante Completo de Freund e solução salina, podemos associar este fato ao adjuvante e não ao veneno crotálico, seja ele nativo ou irradiado.

Carvalho *et al.* (119), citam como o maior problema na produção de antivenenos comerciais a toxicidade do veneno bem como do Adjuvante de Freund. Este causa inflamação e lesões no local do inóculo e contribui para a redução da longevidade de cavalos como animais produtores de imunoglobulinas.

Segundo Ângulo *et al.* (34), algumas alterações locais moderadas como edema, abscessos, fístulas e fibroses podem ser observadas nos animais durante o processo de hiperimunização com venenos de serpentes,

principalmente do gênero *Bothrops*. Estas alterações também foram verificadas por Ferreira Junior *et al.* (120).

Estrada *et al.* (121), observaram o aparecimento de edema, abscessos, fístulas e fibroses no local de inoculação do veneno na maioria dos cavalos imunizados com venenos de *Bothrops asper*, *Crotalus durissus* e *Lachesis muta*.

O Adjuvante Completo de Freund é muito conhecido e utilizado por combinar propriedades imunomodulatórias do *Mycobacterium tuberculosis* com emulsão de efeito depósito de curto prazo (122).

Segundo Theakston *et al.* (11), o Adjuvante Completo de Freund é amplamente utilizado em esquemas de hiperimunização por laboratórios de todo mundo apesar de sua agressividade aos animais soroprodutores.

Sjostrom *et al.* (32), comparando a produção de antivenenos comerciais produzidos em cavalos e em ovelhas, demonstraram que as ovelhas apresentam melhor tolerância ao Adjuvante Completo de Freund e a outros adjuvantes, sem apresentar lesões locais.

Netto *et al.* (46), observaram um pequeno aumento nos linfonodos pré-escapulares de ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo e irradiado, após o uso de Adjuvante Completo e Incompleto de Freund, mas não relatam presença de alterações locais.

Nesta pesquisa, foi verificada também a presença de aumento nos linfonodos pré-escapulares, no entanto, as reações locais foram muito evidentes, fato que discorda da literatura.

Uma explicação para isto, seria que os venenos ofídicos concentram uma quantidade muito grande de bactérias e a formação de abscessos e necroses pode dar-se por ação destas bactérias presentes no veneno (121). Esta explicação também não está de acordo com os resultados encontrados neste trabalho devido ao fato do mesmo lote de veneno ter sido utilizado em outras inoculações e apenas a primeira, com Adjuvante Completo de Freund, causou lesões.

A outra explicação seria o fato de utilizarmos animais jovens e em fase de crescimento. É possível sugerir que, neste caso, o sistema imunológico dos ovinos não esteja ainda totalmente preparado para interagir com o Adjuvante Completo de Freund. Assim, o *Mycobacterium tuberculosis* teria efeito mais

agressivo sobre o sistema imunológico dos animais, contribuindo para os efeitos colaterais observados.

Para verificar alterações sistêmicas devido ao veneno nativo, ao veneno irradiado e/ou aos adjuvantes, realizaram-se exames laboratoriais nos animais dos três grupos.

Os resultados das médias verificadas no eritrograma para a contagem do número de hemácias mostraram que os valores encontrados estão dentro da normalidade nos três grupos testados e que não houve diferença estatística entre os grupos. Notamos ainda um pequeno aumento no perfil ao longo do experimento.

As médias da dosagem de hemoglobina e do volume globular mostraram que os valores encontrados estão dentro da normalidade apesar da diferença estatística encontrada entre o grupo inoculado com veneno irradiado e o grupo controle, evidenciando uma dosagem maior de hemoglobina e do volume globular nos grupos 01 e 02 durante praticamente todo o experimento. Notamos ainda um pequeno aumento no perfil ao longo do experimento.

Estes resultados demonstram que não houve interferência do veneno crotálico utilizado no processo de hiperimunização sobre os glóbulos vermelhos dos ovinos.

Os resultados das médias para a dosagem de proteína plasmática mostraram que os valores encontrados estão abaixo da normalidade nos três grupos testados até o dia 28 (momento 3) e que não houve diferença estatística entre os grupos. Notamos ainda um aumento no perfil ao longo do experimento e os valores encontrando-se dentro da normalidade nos demais momentos até o fim do experimento.

Os resultados das médias verificadas para a dosagem de fibrinogênio plasmático mostraram que os valores encontrados estão dentro da normalidade nos três grupos testados e que não houve diferença estatística entre os grupos.

Os resultados das médias verificadas para a dosagem de plaquetas mostraram que os valores encontrados não estão dentro da normalidade nos três grupos testados e que não houve diferença estatística entre os grupos. Notamos um aumento significativo no dia 84 (momento 7), porém observado nos três grupos estudados.

Uma trombocitose transitória pode ocorrer devido à ação da epinefrina durante o estresse causando esplenocontração e liberando grande quantidade

de plaquetas na circulação. Outra causa de trombocitose seria a presença de citocinas (IL1, IL3, IL6 e IL11), produzidas em processos inflamatórios e em reações que estimulem o sistema imune, estimulam o fator de colônia dos megacariócitos (123).

A interferência técnica pode ocorrer devido ao aparelho de contagem eletrônica de células poder contar pequenas hemácias como plaquetas (68).

Os resultados das médias verificadas no leucograma para a contagem total do número de leucócitos mostraram que os valores encontrados estão dentro da normalidade nos três grupos testados, com exceção do dia 14 (momento 2) para o grupo controle, no qual um animal apresentou contagem de 22.300 leucócitos ( $\mu\text{L}$ ), elevando assim a média do grupo, devido a grande abscesso causado pela primeira inoculação com Adjuvante Completo de Freund. Para seu tratamento, foi utilizado Enrofloxacin (Baytril®) na dose de 5 mg/Kg uma vez ao dia durante 5 dias. Após, os valores voltaram a serem apresentados dentro da normalidade. Não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados.

Os resultados das médias verificadas para a contagem total do número de neutrófilos mostraram que os valores encontrados estão dentro da normalidade nos três grupos testados, com exceção do dia 14 (momento 2) para o grupo controle, no qual um animal apresentou contagem de 13.200 neutrófilos ( $\mu\text{L}$ ), elevando assim a média do grupo, aumentando, também o número de leucócitos. Diante disto, estabeleceu-se tratamento antibacteriano, como descrito acima. Após, os valores voltaram a serem apresentados dentro da normalidade. Não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados.

Os resultados das médias verificadas para a contagem total de linfócitos, de eosinófilos e de monócitos mostraram que os valores encontrados estão dentro da normalidade nos três grupos testados e que houve diferença estatística entre os grupos apenas para a contagem total de monócitos.

Alterações hematológicas na contagem sanguínea de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, fatores da coagulação (28) e fibrinogênio (124, 125), são alguns dos efeitos tóxicos causados por venenos animais nos seres humanos. Em experimentos em ratos com uma mistura de venenos de diferentes serpentes brasileiras, houve uma lenta e gradual diminuição dos valores de hematócrito, contagem de eritrócitos e linfócitos, além de aumento no número de neutrófilos

e hemoglobina. O número total de leucócitos oscilou, com diminuição e aumento durante o período experimental (28). Estes dados são parcialmente discordantes dos resultados encontrados em nosso trabalho.

Cardoso & Mota (112), sugerem que a crotoxina, fração do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é responsável por inibir efeitos na resposta imune humoral, mas não celular.

Os resultados das médias verificadas para a dosagem de uréia plasmática mostraram que os valores encontrados estão dentro da normalidade nos três grupos testados, com exceção nos grupos 2 e 3 no momento M1. Não houve diferença estatística entre os grupos. Estes animais poderiam ter a dosagem de uréia acima dos valores normais devido a causas pré-renais como: aumento da ingestão de proteína, desidratação, hemorragia gastrointestinal, doenças cardíacas, choque séptico ou traumático (123, 126).

Os resultados das médias verificadas para a dosagem de creatinina plasmática mostraram que os valores encontrados estão abaixo da normalidade nos três grupos testados em todos os momentos e que não houve diferença estatística entre os grupos.

Os resultados das médias verificadas para a dosagem de albumina plasmática mostraram que os valores encontrados estão dentro da normalidade nos três grupos testados, com exceção dos dias 28 (momento 3) e dia 42 (momento 4) em que os valores para os três grupos encontram-se ligeiramente abaixo nos valores normais para a espécie. Não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados.

Os resultados das médias verificadas para a dosagem de globulina plasmática mostraram que os valores encontrados não estão dentro da normalidade nos três grupos testados nos dias 01 (momento 1) e dia 14 (momento 2) e dia 70 (momento 6). Não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados.

A relação albumina:globulina pode estar alterada quando há uma grande produção de globulinas (imunoglobulinas). O fígado diminui a produção de albumina para manter a relação globulina:albumina normal. Em processos inflamatórios, o fígado diminui a produção de albumina para produzir proteínas de fase aguda (proteínas inflamatórias) (127).

Os resultados das médias verificadas para a dosagem de aspartato aminotransferase (AST) mostraram que os valores encontrados estão dentro

da normalidade nos três grupos testados. Não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados.

Com o intuito de realizar a avaliação ponderal ao longo do experimento, realizou-se a pesagem periódica dos animais e seu monitoramento parasitológico.

Os animais tiveram excelente ganho de peso ao longo de todo o experimento. Os três grupos estudados não apresentaram diferença estatística e ao final do experimento o grupo inoculado com veneno nativo apresentou média ligeiramente superior ao grupo com veneno irradiado, que por sua vez apresentou média ligeiramente superior ao grupo controle. Isto pode ter ocorrido devido à presença de animais de raças diferentes entre os grupos o que pode ter proporcionado um ganho de peso diferenciado entre os animais.

Estas observações permitem sugerir a possibilidade da produção de soro a partir de animais jovens e em fase de crescimento. Isto porque o processo de hiperimunização não causou efeito sobre a capacidade de crescimento e ganho de peso dos animais, os quais foram capazes de produzir anticorpos contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

O monitoramento parasitológico permitiu verificar que os animais provindos do campo de diferentes propriedades mostraram uma taxa de infestação relativamente alta de parasitas. Isto foi contornado com a correta utilização de vermífugos. Animais sob adequado controle parasitológico tendem a apresentar melhor resposta imunológica e ganho de peso.

Praticamente 100% dos ruminantes domésticos albergam uma ou mais espécies de endoparasitas. A infestação, entretanto, não é sinônimo de doença pois, geralmente, os animais de um rebanho se encontram em boas condições de saúde, ou pelo menos, a grande maioria deles (128).

Portanto, de maneira geral, os três grupos estudados apresentaram perfis clínico e ponderal semelhantes, indicando que a ação do veneno tanto nativo quanto irradiado não causou debilidade e deficiência nutricional. No entanto, um dos animais do grupo 1, ou seja, inoculado com veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus*, foi a óbito durante o experimento. O quadro clínico sugeria dentre os diagnósticos diferenciais, intoxicação por veneno crotálico, o que estimulou estudo mais detalhado do caso.

Após exame clínico completo e exames laboratoriais, algumas hipóteses diagnósticas foram sugeridas como intoxicação por veneno *Crotalus durissus*

*terrificus*, intoxicação por cobre, ruptura de bexiga, uretra ou ureter(es), leptospirose e clostridiose.

Foram realizados diversos procedimentos clínicos e cirúrgicos, sem sucesso, com o intuito de retirar o animal do quadro de insuficiência renal aguda (IRA). Devido à irreversibilidade do quadro e suspeita de presença de urina na cavidade abdominal, foi sugerida a eutanásia do animal.

Com a necropsia do animal, ficou evidenciada a ruptura de um dos ureteres e colhido material para a realização de exames histopatológicos.

O corte histopatológico do intestino, mostrou pouca agressão à mucosa, descartando um quadro de clostridiose. O corte histopatológico da musculatura estriada demonstrou que não houve ação sistêmica do veneno crotálico, portanto, descartando a hipótese de que o veneno crotálico utilizado para a imunização tenha causado envenenamento. O exame sorológico negativo para leptospirose também descartou esta hipótese.

Os resultados dos exames histopatológicos demonstraram um quadro renal e hepático compatível com intoxicação por cobre, apesar dos valores encontrados na dosagem de cobre no fígado e rim estarem abaixo dos níveis capazes de causar a morte segundo a literatura.

Apesar da pequena quantidade de Cobre na composição da ração, o quadro de intoxicação pode ter-se agravado devido a possibilidade de urolitíase no animal, como causa da anúria e ruptura do ureter.

Os ovinos são considerados os animais mais susceptíveis aos efeitos tóxicos do cobre. A intoxicação por cobre nessa espécie pode ocorrer sob as seguintes formas: (a) forma aguda que ocorre pela ingestão de doses elevadas de Cu; (b) forma crônica primária causada pelo consumo de alimentos contendo níveis elevados de cobre; (c) intoxicação crônica fitógena associada ao consumo de pastagens que contêm níveis normais de Cu e teores reduzidos de molibdênio e (d) intoxicação crônica hepatógena em que o acúmulo de Cu ocorre em consequência de lesões hepáticas causadas por plantas que contêm pirrolizidinas (129, 130). Em vários surtos de intoxicação crônica por Cu em ovinos, níveis de Cu no rim e no fígado são utilizados como método auxiliar para o diagnóstico (131, 132, 133, 134).

Muitos autores acreditam que a concentração de Cu no fígado é o indicador mais sensível da exposição de ruminantes a dietas com altos níveis de Cu (135). Os níveis de cobre dos ovinos que desenvolveram crise hemolítica neste

surto variaram de 369 a 854 ppm com base na matéria seca (MS) no fígado e 152 a 679 ppm MS no rim. Níveis de cobre iguais ou superiores a 500 ppm MS no fígado e 80 ppm MS no rim indicam ocorrência de intoxicação por esse mineral (136). No entanto, níveis baixos de Cu no fígado (247 ppm MS) já foram observados em casos de intoxicação por Cu em ovinos. A determinação do Cu no córtex renal é o procedimento mais confiável para o diagnóstico de intoxicação por Cu em ovinos uma vez que após a crise hemolítica os valores de Cu hepático tendem a decrescer (136, 137).

Portanto, descartou-se a suspeita de envenenamento por veneno crotálico causado pelo processo de hiperimunização.

## 6. Considerações finais

Por fim, a análise dos resultados em seu conjunto permitiu considerar que:

O teste de ELISA mostrou-se eficiente para avaliar, acompanhar e comparar a resposta imune humoral dos ovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, nativo ou irradiado com  $^{60}\text{Co}$ ;

Os títulos do “pool” de soros produzidos em ovinos hiperimunizados com veneno irradiado, avaliados pelo método de ELISA, mostraram-se superiores aos títulos do “pool” de soros obtido a partir do veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus*;

A capacidade imunogênica do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi mantida após a irradiação;

Os anticorpos dos ovinos hiperimunizados de ambos os grupos foram eficazes na neutralização “in vitro” do veneno nativo de *Crotalus durissus terrificus*;

O “pool” de soros produzido a partir do veneno irradiado de *Crotalus durissus terrificus* obteve maior potência e capacidade neutralizante quando comparado ao “pool” de soros obtido a partir do veneno nativo;

A avaliação clínica e ponderal, mostrou que ovinos em fase pós-desmame, não tiveram alterado seus perfis fisiológicos e apresentaram um excelente ganho de peso durante o período experimental;

Com o desenvolvimento normal dos ovinos testados, o processo de hiperimunização foi realizado com sucesso, sendo produzidos nestes animais, anticorpos específicos contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Além disso, pudemos verificar que a verminose dos animais foi facilmente controlada por anti-helmínticos convencionais, levando os animais a uma melhor conversão alimentar;

Foi observado também que, além do veneno irradiado ser menos tóxico aos ovinos, o Adjuvante Completo de Freund foi responsável por importantes lesões nos locais de inoculação, inclusive no grupo que não recebeu veneno;

Portanto, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, justifica-se plenamente a utilização da radiação gama na destoxicação do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* com o intuito de aprimorar a soroprodução.

A utilização de ovinos em fase de pós-desmame como animais de soroprodução, pode ser uma excelente alternativa ao ovinocultor. Uma alternativa, seria destinar estes ovinos para alimentação humana após o final do processo de hiperimunização e o sangue seria mais um sub-produto rentável à disposição do criador.

A presente experiência, realizada em animais jovens confinados, deverá ser transportada para animais a campo, com intuito de se avaliar a eficiência do modelo experimental, além do que, este modelo deverá ser acrescido do uso de outros venenos de serpentes que comumente causam acidentes em nosso país.

## 7. Resumo

A técnica de Elisa foi utilizada para avaliar e comparar a resposta imune humoral de ovinos jovens para a produção de soro anticrotálico. Durante o processo de soroprodução, foi realizada a avaliação clínica e ponderal dos animais. Os parâmetros utilizados foram hemograma completo, dosagem de uréia, creatinina, aspartato aminotransferase, proteínas totais, albumina, globulina. O peso dos animais foi aferido quinzenalmente durante o experimento. A capacidade de neutralização do soro produzido a partir de veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus*, nativo (VN) e irradiado (Vlr) com Cobalto-60 foi verificada por meio de desafios *in vitro*. Um grupo de seis animais recebeu veneno nativo, o segundo grupo recebeu veneno irradiado e o terceiro grupo foi o controle. Os animais receberam seis imunizações durante 84 dias com intervalo de 14 dias. Houve diferença significativa ( $p < 5\%$ ) no teste de ELISA do perfil de anticorpos produzidos pelos grupos experimentais (VN < Vlr). Não houve diferença significativa ( $p < 5\%$ ) para os testes bioquímicos, hemograma e peso dos animais entre os três grupos testados. O grupo imunizado com veneno irradiado apresentou perfil de anticorpos maior que o grupo imunizado com veneno nativo. A capacidade de neutralização do soro produzido a partir do Vlr foi cinco vezes maior quando comparado ao soro produzido com VN. A avaliação clínica e ponderal, mostrou que ovinos em fase pós-desmame, não tiveram alterado seus perfis fisiológicos e apresentaram um excelente ganho de peso durante o período experimental. Estes resultados demonstram uma nova perspectiva para a utilização de ovinos visando a produção comercial de soro anticrotálico, que poderá ser aplicado no tratamento do envenenamento de seres humanos e animais. O custo para sua produção poderá ser reduzido pela posterior utilização dos ovinos hiperimunizados na alimentação humana.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*; hiperimunização; ovinos; soro anticrotálico; irradiação.

## 8. Summary

The Elisa technique was used to evaluate and compare the humoral immune response of young ovines to anticrotalic serum production. During serum production, the clinical and weight evaluation of the animals was performed. The parameters utilized were complete blood count, and dosage of urea, creatinine, aspartate aminotransferase, total proteins, albumin and globulin. The animals weight was verified fortnightly during the experiment. The neutralization capacity of the serum produced from the snake *Crotalus durissus terrificus* natural (NV) and Cobalt-60-irradiated venom (IrV) was evaluated by *in vitro* challenges. One group of six animals received natural venom, the second group received irradiated venom, and the third was the control group. The animals received six immunizations during 84 days with an interval of 14 days. There was a significant difference ( $p < 5\%$ ) in the ELISA test for the profile of the antibodies produced by the experimental groups (NV < IrV). There was no significant difference ( $p < 5\%$ ) for biochemical tests, complete blood count, and animals weight between the three groups tested. The group immunized with irradiated venom showed antibodies profile higher than the group immunized with natural venom. The neutralization capacity of the serum produced from the IrV was fivefold higher when compared to the serum produced with NV. The clinical and weight evaluation showed that the ovines in post-weaning phase did not have their physiological profiles altered, and showed an excellent increase in weight during the experimental period. These results indicate a new perspective for the utilization of ovines, aiming the commercial production of anticrotalic serum, which may be applied in the treatment of human and animal envenomation. The cost for its production may be reduced by the posterior utilization of hyperimmunized ovines in human feeding.

Key words: *Crotalus durissus terrificus*; hyperimmunization; ovines; anticrotalic serum; irradiation.

## 9. Referências bibliográficas<sup>1</sup>

1. SOERENSEN B. Produção de soros antipeçonhentos e características imunológicas de cada soro. Anavenenos. In: SOERENSEN B. Animais peçonhentos: reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros, clínica e tratamento dos envenenamentos. São Paulo, Livraria Atheneu, 1990. 138p..
2. CHIPPAUX JP, GOYFFON M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 1998 36; 6: 823-46.
3. MEIER J. Venomous Snakes. In: STOCKER KF. Medical Use of Snake Venom Proteins. Boca Raton, Boston: CRC, 1990, p. 1-32.
4. WILLEMSE GT. Individual variation in snake venom. *Comp Biochem Physiol* 1978; 61: 553-57.
5. TSAI IH, WANG YM, CHEN YH. Variations of Phospholipases A<sub>2</sub> in the geographic venom samples of Pitvipers. *J Toxicol Toxin Rev* 2003; 22 (3): 651-62.
6. CARDOSO JLC. Acidentes por animais peçonhentos na Coordenação de Zoonoses e Animais Peçonhentos – comentários e sugestões. Brasília, Nov. 1993 (NR:93-1011).
7. RESENDE CC, ARAÚJO FAA, SALENAVE RNUR. Análise epidemiológica dos acidentes ofídicos. Brasil – junho de 1986 a dezembro de 1987. Ministério da Saúde – Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Brasília – DF, p.37, nov. 1989.
8. BARRAVIERA B. Estudo Clínico dos acidentes ofídicos. CD-ROM. EPUB, Rio de Janeiro. 1999.
9. HOGE AR & ROMANO-HOGE SARWL. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem Inst Butantan* 1978/79; 42/43: 373-496.
10. MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1998. 131 p. il.
11. THEAKSTON RDG, WARRELL DA, GRIFFITHS E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 2003; 41: 541-57.
12. BARRAVIERA B, COELHO KYR, CUPPI PR, MEIRA DA. Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes in Botucatu (State of São Paulo, Brazil). *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1995; 37: 63-9.
13. SALVINI TF, AMARAL AC, SELISTRE DE ARAÚJO HS *et al.*. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon* 2001; 39: 1141-9.

---

<sup>1</sup> Segundo normas de Vancouver: “Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals” (International Committee of Medical Journal Editors, 1993) (138) e por deliberação do Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP.

14. MARCONDES M. Snakebite induced acute renal failure: an experimental model. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 82-8.
15. BARRAVIERA B. Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arq Bras Med* 1990; 64: 14-20.
16. RAW I, ROCHA MC, ESTEVES MI *et al.*. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz J Med Biol Res* 1986; 19: 333.
17. BARRAVIERA B, BONJORNO Jr JC, ARAKAKI D *et al.* A retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snakebites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989; 22; 5-12.
18. BARRAVIERA B, LOMONTE B, TARKOWSKI A, HANSON LA, MEIRA DA. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. *J Venom Anim Toxins* 1995; 1: 11-22.
19. VORONOV E, APTE RN, SOFER S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *J Venom Anim Toxins* 1999; 5 (1): 5-33.
20. BRAZIL V. Serumtherapia anti-ophidica. *Rev Med de Sao Paulo* 1909; 7 (15): 197-29.
21. BOGARÍN G, MORAIS JF, YAMAGUCHI IK, STEPHANO MA, GUTIÉRREZ JM. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica 2000; 38: 1429-41.
22. CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C *et al.* Determination of the neutralizing potency of horse antithrotophic and anticrotalic antivenoms in blood samples collected on filter paper. *Toxicon* 2001; 39: 1607-9.
23. MORAIS EG *et al.* Snake antivenoms from hyper immunized horses: Comparison on the antivenom activity and biological properties of their whole IgG and F(ab')<sub>2</sub> fragments. *Toxicon* 1994; 32: 725-34.
24. HARLOW E, LANE D. *Antibodies: a Laboratory Manual*. USA: Cold-Spring Harbor Laboratory, 1988.
25. STEWARD M, MALE D. Técnicas Imunológicas. In: ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. *Imunologia*. São Paulo. ED. Manole Ltda. 5ª Ed. 1999, 423p..
26. BARBOSA CF, RODRIGUES RJ, OLORTEGUI CC *et al.* Determination of the neutralizing potency of horse antivenom against bothropic and crotalic venoms by indirect enzyme immunassay. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28: 1077-80.
27. TEAKSTON RDG, LLOYD-JONES MJ, REID HA. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. *The Lancet* 1977; 24: 639-41.

28. BARRAVIERA B & PERAÇOLI MTS. Soroterapia heteróloga. In: BARRAVIERA B. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas Ltda, 1994. cap. 28, 411p..
29. RUCAVADO A, MORENO E, GUTIÉRREZ JM. Effect of adjuvants on the antibody response of mice to *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. Braz J Med Biol Res 1996; 29 (10): 1337-40.
30. FAN HW, FRANÇA FOS. Soroterapia. In: SCHVARTSMAN S. Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos: São Paulo, Brasil, Ed. Sarvier, 1992, 288p..
31. CHRISTENSEN PA. The preparation and purification of antivenoms. Mem Inst Butantan 1966; 33: 245-250.
32. SJOSTROM L, AL-ABDULLA IH, RAWAT S, SMITH DC, LANDON J A comparison of ovine and equine antivenoms. Toxicon 1994; 32: 427-433.
33. GUIDOLIN R, DIAS DA SILVA W, HIGASHI HG, CARICATI CP., LIMA MLRS *et al.* Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálico tratados por glutaraldeído. Mem Inst Butantan 1989; 51: 85-90.
34. ANGULO Y, ESTRADA R, GUTIÉRREZ JM. Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. Toxicon 1997; 35: 81-90.
35. RUSSEL FE, TIMMERMAN WF, MEADOWS PE. Clinical use of antivenin prepared from goat serum. Toxicon 1970; 8: 63-5.
36. EGEN N, RUSSEL F, CONSROE P, GERRISH K, DART R *et al.* A new ovine Fab antivenom for north american venomous snakes. Vet Human Toxicol 1994; 36 (4): 362.
37. DART RC, SEIFERT S, CARROLL L, CLARK R, HALL E *et al.* Affinity-purified, Mixed Monoespecific Crotalid Antivenom Ovine Fab for the Treatment of Crotalid Venom Poisoning. Annals of Emergency Medicine 1997; 30 (1): 33-39.
38. RAWAT S, LAING G, SMITH DC, THEAKSTON D, LANDON J. A new antivenom to treat eastern coral (*Micrurus fulvius fulvius*) envenoming. Toxicon 1994; 32: 185-90.
39. CLARK RF, WILLIAMS SR, NORDT SP, BOYER-HASSEN LV. Successful treatment of crotalid-induced neurotoxicity with a new polyspecific crotalid Fab antivenom. Annals E Med 1997; 30 (1): 54-57.
40. SMITH DC, REDDI KR, LAIG G, THEAKSTON RDG, LANDON J. An affinity purified ovine antivenom for the treatment of *Vipera berus* envenoming. Toxicon 1992; 30: 865-71.
41. CHULASUGANDHA P. Snake antivenoms: Heterologous and polyclonal antisera. J Toxicol Toxin Rev 2003; 22 (1): 1-14.
42. LANDON J, SMITH DS. Merits of sheep antisera for antivenom manufacture. J Toxicol Toxin Rev 2003; 22 (1): 15-22.

43. RATANABANANGKOOM K. Merit and demerit of polyvalent snake antivenom. *J Toxicol Toxin Rev* 2003; 22 (1): 77-89.
44. DART RC, SIEFERT SA, CAROLL L, CLARK RF, GARCIA RA *et al.* Humam trial of affinity purified antibody fragment for snake venom poisoning. *Vet Humam Toxicol* 1994; 36 (4): 363.
45. ARIARATNAM CA, SJOSTROM L, RAZIEK Z, KULARATNE SAM, THEAKSTON DG, WARRELL DA. Merit and demerit of polyvalent snake antivenom. *Trans R S Trop Med Hyg* 2001; 95: 74-80.
46. NETTO DP, CHIACCHIO SB, BICUDO PL, ALFIERI AA, BALARIM MRS, NASCIMENTO N. Hematological changes in sheep inoculated with natural and Cobalt 60-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom (Laurenti, 1768). *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2004; 10 (1): 34-52.
47. FREIRE-MAIA N. Radiogenética humana. São Paulo, Edgard Blücher, Editora da USP, 1972.
48. GROSCH DS, HOPYWOOD LE. The eletrophoretic analysis of snake venoms. *Arch Biochem* 1947; 13: 253-9.
49. CLISSA PB, NASCIMENTO N, ROGERO JR. Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gama rays. *Toxicon* 1999; 37: 1131-41.
50. SKIENS WE. Sterilizing radiation effects on selected polymers. *Radiat Phys Chem* 1980; 15: 47-57.
51. HARTMEIER W. Immobilized Biocatalusts – An Introduction, New York: Springer-Verlag, 1986.
52. BERNARDES DML. Avaliação de métodos de identificação de especiarias e vegetais desidratados submetidos à irradiação gama. São Paulo: 1996. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
53. ROGERO JR, NASCIMENTO N. Detoxification of snake venom using ionizing radiation. *J Venom Anim Toxins* 1995; 1 (1): 7-10.
54. GUARNIERI-CRUZ MC, MURATA Y. Attenuation of *Bothrops jararaca* venom by ionizing radiation. *Toxicon* 1990; 28: 92-98.
55. MURATA Y, NISHIKAWA AK, NASCIMENTO N, HIGASHI HG, DIAS DA SILVA W, ROGERO JR. Gamma irradiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities. *Toxicon* 1992; 28: 617.
56. SOUZA-FILHO JN, GUARNIERI-CRUZ MC, MURATA Y, ROGERO JR. Detoxification of the crotoxin complex gama radiation. *Braz J Med Res* 1992; 25: 103-13.

57. NASCIMENTO N, SEEBART C, FRANCIS B, ROGERO JR, KAISER II. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. *Toxicon* 1996; 34: 123-131.
58. ADRIANI EP. Irradiation of Crotoxin in Aqueous Solution: The role of the main reactive species in structural and biological alterations. *J Venom Anim Toxins* 1996; 2 (2): 168.
59. DE PAULA RA. Attainment and evaluation of antisera raised against irradiated whole crotalic venom or crotoxin in <sup>60</sup>Co source. *J Venom Anim Toxins* 1996; 2 (2): 166.
60. SPENCER PJ. Biochemical and immunological alterations of <sup>60</sup>Co irradiated *Bothrops jararacussu* venom. *J Venom Anim Toxins* 1996; 2 (2): 165.
61. CARDI BA, NASCIMENTO N, ANDRADE Jr HF. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with <sup>60</sup>Co γ-rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. *Int J Radiat Biol* 1998; 73 (5): 557-564.
62. BONI-MITAKE M, COSTA H, SPENCER PJ, VASSILIEFF VS, ROGERO JR. Effects of <sup>60</sup>Co gamma radiation on crotamine. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 1531-38.
63. NETTO DP, CHIACCHIO SB, BICUDO PL, ALFIERI AA, NASCIMENTO N. Humoral response and neutralization capacity of sheep serum inoculated with natural and Cobalt 60-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom (Laurenti, 1768). *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2002; 8 (2): 297-314.
64. DA SILVA RJ. Effect of *Crotalus durissus terrificus* (LAURENTI, 1768) and *Bothrops jararaca* (WIED, 1824) venoms on the evolution of Ehrlich ascites tumor. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 1996; 2 (2): 167.
65. WHO. Progress in characterization of venoms and standardization of antivenoms, WHO offset publication 1981; 58: 450-53.
66. LEÓN G, VALVERDE JM, ROJAS G, LOMONTE B, GUTIÉRREZ JM. Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 2000; 38: 233-44.
67. KAISER II, MIDDLEBROOK JL, CRUMRINE MHM, STEVENSON WW. Cross-reactivity and neutralization by rabbit antisera raised against crotoxin, its subunits and two related toxins. *Toxicon* 1986; 24 (7): 669-78.
68. JAIN NC. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.
69. KANEKO JJ, HERVEY JW. Clinical biochemistry of domestic animals. 5ed. New York: Academic Press., 1997. 932p.
70. GORDON HM, WHITLOCK HUA. A new technique for counting nematodes eggs in sheep faeces. *J C S I R O* 1939; 12/13: 50-52.
71. JOHNSON RA, WICHERN DW. Applied multivariate statistical analysis, 3<sup>rd</sup> Ed., Prentice-Hall, New Jersey, 1992, 642p.

72. HAWGOOD BJ. Doctor Albert Calmette 1963-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. *Toxicon* 1999; 37: 1241-58.
73. VITAL-BRAZIL O. History of the primordia of snake-bite accident serotherapy. *Mem Inst Butantan* 1987; 49 (1): 7-20.
74. GARCIA M, MONGE M, LEÓN G, LIZANO S, GUTIERREZ JM *et al.* Effect of preservatives on IgG agregation, complement-activating effect and hypotensive activity of horse polyvalent antivenom used in snakebite envenomation. *Biologicals* 2002; 30: 143-51.
75. RIVIERE G, CHOUMET V, AUDEBERT F, SABOURAUND A, DEBRAY M, BON C. Effect of antivenom on pharmacokinetics in experimentally envenomed rabbits: Toward an optimization of antivenom therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281(1), 1-8.
76. CONSROE P, EGEN NB, RUSSELL FE, SMITH DC, LANDON J. *et al.* Comparison of a new ovine antigen binding fragment (Fab) antivenin for United States *Crotalidae* with the commercial antivenin for protection against venom-induced lethality in mice. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 507-10.
77. CHIPPAUX JP. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull. World Health Org* 1999; 76: 515-24.
78. GUTIÉRREZ JM, LEÓN G, ROJAS G *et al.* Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 1998; 36: 1529-38.
79. ISMAIL M, ABD-ELSALAM MA, AL-AHAIDIB MS. Pharmacokinetics of <sup>125</sup>I-labelled *Walterinnesia aegyptia* venom and its specific antivenins; flash absorption and distribution of the venom ion its toxin versus slow absorption and distribution of IgG, F(ab')<sub>2</sub> and Fab of the antivenin. *Toxicon* 1998; 36 93-114.
80. MALASIT P, WARREL DA, CHANTHAVANICH P *et al.* Prediction, prevention, and mechanism of early (anaphylactic) antivenom reactions in victims of snake bites. *Br Med J* 1986; 292: 17-20.
81. JURKOVICH GJ, LUTERMAN A, MCCULLAR C *et al.* Complications of *Crotalidae* antivenin therapy. *J Trauma* 1988; 28: 1032-7.
82. OTERO-PATIÑO R, CARDOSO JLC, HIGASHI HG *et al.* A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in Urabá, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 183-9.
83. LALLO DG, THEAKSTON RDG. Snake antivenoms. *J Toxicol C Toxicology* 2003; 41: 227-90.
84. EK N. Serum levels of the immunoglobulins IgG and IgG(T) in horses. *Acta Vet Scand* 1974; 15: 609-19.
85. CORRIGAN P, RUSSELL FE, WAINSCHEL J. Clinical reactions to antivenin. *Toxicon* 1978; (suppl): 457-65.
86. SELVANAYAGAM ZE, GOPALAKRISHNAKONE P Tests for detection of snakes venoms, toxins and venom antibodies: review on recent trends (1987-1997). *Toxicon* 1999; 37: 565-86.
87. BARRAVIERA B, SARTORI A, PEREIRA DA SILVA MF, KANEKO R, PERAÇOLI RMTS. Use of ELISA assay to evaluate venom, antivenom, IgG and IgM human antibody levels

- in serum and cerebrospinal fluid from patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. J Venom Anim Toxins 1998; 36: 1363-70.
88. THEAKSTON RDG, LLOYD-JONES MJ, REID HA. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. Lancet 1977; 24: 639-41.
  89. OGUIURA N, CAMARGO ME, DA SILVA ARP, HORTON DSPQ. Quantification of crotamine, a small basic myotoxin, in South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by enzyme-linked immunosorbent assay with parallel-lines analysis. Toxicon 2000; 38: 443-8.
  90. FERREIRA JUNIOR RS, NASCIMENTO N, MARTINEZ JC, ALVES JB, MEIRA DA, BARRAVIERA B. Immunization with native and cobalt 60-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom in Swiss mice: assessment of the neutralizing potency of antisera. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2005; (in press).
  91. HERRERA E, YARLEQUE A, CAMPOS S, ZAVALETA A. Gama irradiation effect on biological activity and enzymatic properties of snake venoms. Inf Nucl 1986; 3: 1-14.
  92. NASCIMENTO N, SPENCER PJ, ANDRADE JR HF. Effects of gamma radiation on snake venoms. Radiat Phys Chem 1998; 52: 665-9.
  93. COSTA H. <sup>60</sup>Co gamma radiation effects on Apis mellifera venom: biochemical, pharmacological, and immunological aspects. J Venom Anim Toxins 2002; 8(1): 182.
  94. BENNACEF-HEFFAR N, LARABA-DJEBARI F. Evaluation of the effect of gamma rays on the venom of *Vipera lebetina* by biochemical study. Can J Physiol Pharmacol 2003; 81: 1110-17.
  95. LEE JW, KIM JH, YOON HS, KANG KO, LEE SY *et al*. Effects of gamma radiation on the allergenic and properties of milk proteins. J Food Prot 2001; 64(2): 272-76.
  96. NASCIMENTO N. Biochemical and immunological characterization of the main products of crotoxin irradiation. J Venom Anim Toxins 1996; 2(2): 169.
  97. PINHO JRR, CARDI BA, ANDRADE Jr HF, BARR PJ, BATHURST IC *et al*. Immunogenic properties of the Mycobacterium *leprae* recombinant 18-Kda antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae* enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. Int J Leprosy 1995; 63: 381-90.
  98. CARDI BA. Elicited endocytosis of irradiated crotoxin by macrophages. J Venom Anim Toxins 1997; 3(1), 107.
  99. CARDI BA, NASCIMENTO N, ROGERO JR, ANDRADE Jr HF. Immunochemical detection of purified crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in motor end plate of striated muscle in CBA/J mice. B J Med Biol R 1992; 25: 905-8.
  100. HATI RN, MANDAL N, HATI AK. Active immunization of rabbits with gamma irradiated Russell's viper venom toxoid. Toxicon 1990; 28(8): 895-902.
  101. CARDI BA, ANDRADE Jr HF, ROGERO JR, NASCIMENTO N. Differential biodistribution of native and 2 kGy <sup>60</sup>Co irradiated crotoxin in tissues of CBA/J mice. Nat Toxins 1998; 6: 19-25.
  102. BUTLER J, LAND EJ, SWALLOW J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiations systems. Radiat Phys Chem 1984; 24: 273-82.

103. SPENCER, PJ. Effects of radiation on the structure of bothropstoxin-1. *J Venom Anim Toxins* 2000; 6: 282.
104. KEMPNER ES. Effects of high-energy electrons and gamma rays directly on protein molecules. *J Pharm Sci* 2002; 91:301.
105. SOUZA FDA, SPENCER PJ, ROGERO JR, NASCIMENTO N, DAL PAI-SILVA M, GALLACCI M. <sup>60</sup>Co gamma irradiation prevents *Bothrops jararacussu* Venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. *Toxicon* 2002; 40(8): 1101-06.
106. ABIB H, LARABA-DJEBARI F. Effects of <sup>60</sup>Co gamma radiation on toxicity and hemorrhagic, myonecrotic, and edema-forming activities of *Cerastes cerastes* venom. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81: 1125-30.
107. ABIB L, LARABA-DJEBARI F. Effect of gamma irradiation on toxicity and immunogenicity of *Androctonus australis hector* venom. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81: 1118-1124.
108. RANGEL-SANTOS A, LIMA C, LOPES-FERREIRA M, CARDOSO DF. Immunossuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 2004; 44: 609-16.
109. ROLIM-ROSA R, VIEIRA EGJ, SILLES-VILLARROEL M, SIRACUSA YQ, TIZUKA H. Análise Comparativa entre os diferentes esquemas de hiperimunização empregados na produção de soros antiofídicos pelo Instituto Butantan (1957-1979). *Mem Inst Butantan* 1979; 44/45: 259-68.
110. SHAEFFER Jr RC, RANDALL H, RESK J, CARLSON RW. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of size-selected crotalic venom antigens by Wenth's polyvalent antivenom. *Toxicon* 1988; 26: 67-76.
111. DOS-SANTOS MC, DINIZ CR, PACHECO MA, DIAS DA SILVA W. Phospholipase A<sub>2</sub> injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 1988; 26; 207-13.
112. CARDOSO DF, MOTA I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular response. *Toxicon* 1997; 35: 607-12.
113. DOS-SANTOS MC, D'IMPÉRIO LIMA MR, DIAS DA SILVA W. Influence of *Crotalus* venom on the response to sheep red blood cells. *Braz J Med Biol Res* 1986; 19: 639a.
114. SOUZA-E-SILVA MCC, GONÇALVES LRC, MARIANO M. The venom of South American rattlesnake inhibits macrophage mediator. *Inflammation* 1996; 5:18-23.
115. FREITAS TV, TAVARES AP, THEAKSTON RDG, LAING G, NEW RRC. Use of liposomes for protective immunization against *Crotalus durissus* (tropical rattlesnake) venom. *Toxicon* 1989; 27: 341-7.
116. DOS-SANTOS MC, YAMAGUCHI IK, CARICATTI CP, HIGASHI HG, DIAS DA SILVA W. Immunization of equines with Phospholipase A<sub>2</sub> protects against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Braz J Med Biol Res* 1989; 22: 509-12.
117. MARIA WS, CAMBUY MO, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Neutralizing potency of horse antiofídico anivenom. Correlation between in vivo and in vitro methods. *Toxicon* 1998; 36(10): 1433-9.

118. HENEINE LG, CARVALHO JR AD, BARBOSA CF, SANTOS MRA. Development of a ELISA to assess the potency of horse therapeutic polyvalent antivenom. *Toxicon* 1998; 36: 1363-70.
119. CARVALHO VT, GOMES RT, VIOTTI AP, FREITAS TV. Immunization with liposome-encapsulated *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 2000; 38: 881-6.
120. FERREIRA JUNIOR RS, NASCIMENTO N, MARTINEZ JC, ALVES JB, MEIRA DA, BARRAVIERA B. Immunological assessment of mice hyperimmunized with native and cobalt-60-irradiated *Bothrops* venoms. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2005; (in press).
121. ESTRADA R, GUTIÉRREZ JM, ALVARADO J, ROBLES A, AVILA C, GONZALEZ N. Desarrollo de la respuesta de anticuerpos anti-fosfolipasa A<sub>2</sub> en caballos inoculados con veneno para la producción de suero antiofídico polivalente en Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1989; 37(2): 181-87.
122. COX JC, COULTER AR. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 1997; 15(3): 248-56.
123. MEYER DJ, HARVEY JW. Evaluation of hemostasis: coagulation and platelet disorders. In: *Veterinary laboratory medicine*. 1998. 111-137 p.
124. AMARAL CFS, REZENDE NA, PEDROSA TMG, SILVA AO, PEDROSO ERP. Afibrinogenemia secundária a acidente crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1988; 4: 288-92.
125. THOMAZINI IA, IUAN FC, CARVALHO I, HERNANDES DH, AMARAL IF, PEREIRA PCM, BARRAVIERA B. Evaluation of platelet function and serum fibrinogen levels in patients bitten by snakes of the genus *Crotalus*. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 3: 219-20.
126. BARSANTI JA, LEES GE, WILLARD MD, GREEN RA. Urinary disorders. In: WILLARD MD, TVEDTEN H. *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 4 Ed. 2004, 135-164p.
127. MOSHAGE HJ, JANSEN JAM, FRANSSSEN JH, HAFKENSCHIED JCM. Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. *J Clin Invest* 1987; 79: 1635-41.
128. AMARANTE A F T, BAGNOLA JR J, AMARANTE M R V, BARBOSA M A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state. *Brazil Vet Parasitol* 1997; 73: 89-104.
129. SEAMAN JT. Pyrrolizidine alkaloid poisoning of sheep in New South Wales. *Aust Vet J* 1987; 64:164-7.
130. PEREIRA D, RIVERO R. Intoxicação crônica fitógena por cobre, In: RIET-CORREA F, MÉNDEZ MC, SCHILD AL. *Intoxicações por Plantas e Micotoxinas em Animais Domésticos*. Editora Hemisfério Sul do Brasil, Pelotas. 1993. p. 299-307.
131. PILATI C, BARROS CSL, GIUDICE JC, BONDAN E. Intoxicação crônica por cobre em ovinos. *Revista Veterinária* 1990; 54: 31-4.
132. RIET-CORREA F, OLIVEIRA JA, GIESTA S, SCHILD AL, MÉNDEZ MC. Intoxicação crônica por cobre em ovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras* 1989; 9:51-4.

133. MACPHERSON A, MILNE EM, MACPHERSON AJ. Copper poisoning in ewes. *Vet Rec* 1997; 41: 631.
134. BROOKS G. Copper poisoning in ewes. *Vet Rec* 1998; 142: 24.
135. AUZA NJ, OLSON WG, MURPHY MJ, LINN JG. Diagnosis and treatment of copper toxicosis in ruminants. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 214: 1624-8.
136. POPE AL. A review of recent mineral research with sheep. *J Anim Sci* 1971; 33: 1333-43.
137. GOONERATNE SR, HOWELL JMCC; GAWTHORNE J. Intracellular distribution of copper in the liver of normal and copper loaded sheep. *Res Vet Sci* 1979; 27:30-7.
138. Uniform Requeriments for Manuscripts submitted to Biomedical Journals (International Comitte of Medical Journals Editors, 1993) [citado 2005 fev 05]. Acessado em: URL: <http://www.icmje.org>

## 8. Apêndice