

Avaliação histológica dos efeitos da crotoxina de – *Crotalus durissus terrificus* na pele do dorso de ratos Wistar

T. F. Silva¹; G. T. Santos²; F. S. Mendonça²; A. M. Soares³; L. M. G. Neves²;
M. A. M. Esquisatto²; M. V. Mazzi²

¹Curso de Ciências Biológicas, Centro Universitário Hermínio Ometto-Uniararas, 49100-000, Araras-SP, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas, Centro Universitário Hermínio Ometto-Uniararas, 49100-000, Araras-SP, Brasil

³Departamento de análises clínicas toxicológicas e bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, 14040-903, Ribeirão Preto-SP, Brasil

maumazzi@uniararas.br

(Recebido em 18 de novembro de 2010; aceito em 07 de fevereiro de 2012)

O veneno crotálico é constituído de enzimas, toxinas e peptídeos. A crotoxina corresponde à maior fração protéica do veneno e é responsável por alterações fisiopatológicas importantes. As principais manifestações clínicas da crotoxina incluem: neurotoxicidade, miotoxicidade e citototoxicidade. O presente trabalho teve como objetivo avaliar histologicamente os efeitos locais da crotoxina na pele do dorso de ratos Wistar. Diferentes concentrações da crotoxina (5µg, 10µg, 20µg, 40µg e 80µg) foram injetadas intradermicamente em 18 ratos Wistar machos. Após 24 horas da injeção, as peles foram retiradas, processadas e analisadas por microscopia de luz. As amostras de tecidos do grupo controle negativo (solução salina) mostraram características histológicas típicas de pele normal com alguns pontos de infiltrado inflamatório e crostas de fibrina. Todas as concentrações utilizadas induziram alterações histológicas que reproduziram de maneira crescente e dose dependente os danos teciduais. O edema e a hemorragia foram heterogêneos nas diferentes concentrações da toxina. Dermonecrose foi identificada nas regiões mais profundas da derme, em concentrações maiores. Nas concentrações a partir de 10µg, a inflamação foi caracterizada por leucocitose e neutrofilia, comparados ao controle. Degeneração de estruturas teciduais foi evidenciada nos animais tratados com 40µg. As fibras colágenas apresentaram pouca modificação entre os grupos tratados e controle. No entanto, os feixes de fibras tornaram-se mais eosinofílicos nos grupos tratados com 40 e 80µg de toxina. Nossos resultados corroboram em demonstrar os efeitos histológicos da crotoxina (PLA₂) no envenenamento crotálico, que são de difícil interpretação.

Palavras-chave: crotoxina; pele; inflamação

The crotalic venom is constituted of enzymes, toxins and peptides. Crotoxin corresponds to a greater fraction of the venom protein and is responsible for major pathophysiological changes. The main clinical manifestations of crotoxin include: neurotoxicity, myotoxicity and cytotoxicity. This study aimed to evaluate histologically the local effects of crotoxin in the dorsal skin of rats. Different concentrations of crotoxin (5µg, 10µg, 20µg, 40µg and 80µg) were injected intradermally in 18 male Wistar rats. After 24 hours of injection, the skins were removed, processed and analyzed by light microscopy. Tissue samples from the negative control group (saline) showed typical histological features of normal skin with some points of the inflammatory infiltrate and fibrin crust. All concentrations induced histological changes that have reproduced in an increasing manner and dose-dependent tissue injury. Edema and hemorrhage were heterogeneous with different concentrations of the toxin. Dermonecrose was identified in the deeper regions of the dermis, at higher concentrations. At concentrations of 10µg inflammation was characterized by leukocytosis and neutrophilia, in comparison with control. Degeneration of tissue structures was also evident in animals treated with 40µg. The collagen fibers showed little change between treatment and control groups. However, the fibers became more eosinophilic in the groups treated with 40 and 80µg of toxin. Our results support to demonstrate the histological effects of crotoxin (PLA₂) in *Crotalus* poisoning, which are difficult to interpret.

Keywords: crotoxin; skin; inflammation

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos representam um problema de grande importância para a saúde pública nos países tropicais pela frequência com que ocorrem e morbidade que ocasionam [1]. No Brasil, segundo dados do ministério da saúde (MS) ocorrem entre 19.000 a 22.000 acidentes ofídicos por ano com letalidade em torno de 0,45% [2]. A maioria desses acidentes deve-se a serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, sendo raros os acidentes produzidos por *Lachesis* e *Micrurus* [3]. Considerando-se os acidentes em que o tipo da serpente é identificado, o gênero *Bothrops* é responsável por 90,5% dos casos, *Crotalus* por 7,7%, *Lachesis* por 1,4% e *Micrurus* por 0,4% [4].

A cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*) habita os cerrados do Brasil central, as regiões áridas e semi-áridas do Nordeste, os campos e áreas abertas no Sul, Sudeste e Norte [5]. Os envenenamentos crotálicos são responsáveis pela maior letalidade, tendo valores que correspondem a 1,9% [2]. O veneno crotálico apresenta substâncias extremamente complexas compostas por enzimas, peptídeos e proteínas com algumas toxinas já identificadas como a crotamina, crotoxina, giroxina, convulsina, crotapotina e fosfolipase A₂ [6]

A crotoxina corresponde à fração do veneno responsável por alterações fisiopatológicas importantes, e é composta por duas subunidades, a fosfolipase A₂ e a crotapotina [7] a crotoxina é o componente responsável pela alta toxicidade do veneno crotálico [8] e representa mais de 50% das proteínas contidas no veneno [9]. Esta toxina produz potente atividade neurotóxica, que atua nas junções pré-sinápticas tanto no sistema nervoso central, quanto no sistema nervoso periférico. Inibe a liberação de acetilcolina, sendo este o fator com maior participação no bloqueio neuromuscular [10]. Evidências sugerem que a crotoxina e crotamina são as frações que induzem lesões musculares esqueléticas, podendo causar rabdomiólise intensa levando a mioglobinúria [11].

As manifestações locais são de pequena relevância, diferindo dos venenos botrópico e laquético, pois a dor é geralmente inexistente e, quando esta existe, é de baixa intensidade. Um pequeno edema pode estar presente apesar de na maioria não haver reação local [12]. As principais manifestações clínicas são neurotoxicidade, miotoxicidade, nefrotoxicidade e ação coagulante.

Neste estudo, o objetivo foi avaliar histologicamente os efeitos da aplicação da crotoxina, uma toxina isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, em diferentes concentrações, na pele do dorso de ratos Wistar.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Toxina - A crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi cedida pelo Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP) e armazenado a 4°C no laboratório de Bioquímica do Centro Universitário Hermínio Ometto - Uniararas. Para os ensaios diferentes concentrações da crotoxina isolada foram diluídas em água destilada ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$, toxina:água destilada), a saber, 5 μg , 10 μg , 20 μg , 40 μg e 80 μg .

Grupos experimentais - 18 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com 70 dias de idade e peso médio de 300 gramas foram obtidos no Centro de Experimentação Animal “Prof.Dr. Luiz Edmundo de Magalhães” do Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas, acondicionados em gaiolas com ração comercial e água *ad libitum*, e divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais de três animais cada. Todos os procedimentos foram aprovados de acordo com as regras do Comitê de Ética e Pesquisa (CEUA, nº 012/2010). Para a realização dos experimentos os animais foram submetidos à anestesia com Cloridrato de Xilazina (20mg/kg) e Cloridrato de Ketamina (50mg/kg) numa proporção de 100 μL de anestésico por animal e, em seguida, foi realizada a tricotomia na região dorsal. Após 24 horas, sob anestesia descrita anteriormente, foi realizada a injeção intradérmica nos animais: Grupo Controle negativo, 100 μL de solução salina, e cinco grupos experimentais que receberam 100 μL de solução (crotoxina) em concentrações finais diferentes por grupo (5 μg , 10 μg , 20 μg , 40 μg e 80 μg). Após 24h os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical. A

pele do dorso no local da aplicação foi fotografada e retirada para análise dos efeitos histológicos.

Análise histológica - As amostras de pele foram removidas da região dorsal dos diferentes grupos animais e imersas em solução fixadora de formaldeído a 10% em tampão Millonig pH 7,4 durante 24h à temperatura ambiente. Em seguida as peças foram desidratadas e processadas para embebição em Paraplast™ (Merck). Cortes transversais (6µm) foram corados por Picrosirius-Hematoxilina para posterior visualização do preparado em microscopia de campo claro e sob luz polarizada para observação da organização das fibras colágenas; Azul de Toluidina em tampão McIlvaine pH 4,0 para análise da distribuição dos glicosaminoglicanos; Hematoxilina e Eosina para análise da organização das estruturas teciduais. Os preparados foram analisados e documentados em Fotomicroscópio Leica DM2000 sediado junto ao Laboratório de Micromorfologia do Centro Universitário Hermínio Ometto - UNIARARAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morbidade relacionada ao envenenamento por serpentes desta espécie é dependente não somente da quantidade de veneno administrado, mas também da composição química do mesmo, característica de cada espécie peçonhenta [13, 14]. Assim, as serpentes das famílias Elapidae e Hydrophiidae produzem venenos altamente neurotóxicos, provocando a morte da vítima por bloqueio da transmissão neuromuscular. Por outro lado, os venenos de serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae (também considerada sub-família de Viperidae) provocam principalmente choque, necrose tecidual, coagulação intravascular, hemorragia local e sistêmica, e edema [15], embora a neurotoxicidade também seja um importante efeito em vítimas de envenenamento crotálico. Moléculas de natureza peptídica tais como Crotalphine e Crotoxina, ambas isoladas de venenos de *Crotalus*, já foram investigadas quanto às suas interações com diferentes tipos de receptores neuronais [16, 17, 18]. A composição do veneno crotálico é complexa, sendo constituída abundantemente por enzimas e peptídeos, dentre outras toxinas, que apresentam efeitos diversos sobre os músculos esqueléticos, sistema nervoso, rins e sistema de coagulação sanguínea [19]. Entre os componentes de origem protéicas mais estudadas no gênero estão as fosfolipases A₂ e suas isoformas. Com esta classe de enzimas já foram identificados muitos efeitos farmacológicos, dentre os quais se destacam o neurotóxico, cardiotoxico, anticoagulante, antiplaquetário, hemolítico, hemorrágico, inflamatório e mionecrótico [20]. Atualmente, existe um amplo interesse sobre estudos relacionando a estrutura-função das PLA₂, incluindo propriedades estruturais e funcionais [21].

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a crotoxina (PLA₂) causou relevantes alterações teciduais e inflamatórias sobre o modelo estudado. As amostras de tecidos de ratos do grupo controle mostraram características histológicas típicas de pele normal com alguns pontos de infiltrado inflamatório e crostas de fibrina, o que é considerado normal, pois mesmo uma injeção com solução salina provoca alterações teciduais no local de aplicação. As concentrações utilizadas de 5µg a 80µg induziram edema, infiltrado inflamatório, necrose, hemorragia e eosinofilia de fibras colágenas, que se reproduziram de maneira crescente e dose dependente (tabela 1).

Tabela 1: Efeitos citotóxicos da crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em diferentes concentrações sobre a pele do dorso de ratos Wistar

Grupos Experimentais	Edema	Infiltrado Inflamatório	Necrose	Hemorragia	Fibras Eosinofílicas
GC- Solução salina	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
GT- Crotoxina (5µg)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
GT- Crotoxina (10µg)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
GT- Crotoxina (20µg)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
GT- Crotoxina (40µg)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
GT- Crotoxina (80µg)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

GC: Grupo Controle, GT: Grupo Tratado, (+): Presente, (-): Ausente.

Utilizando concentrações maiores da crotoxina, observou-se a formação de extensas áreas de necrose na camada muscular subcutânea localizada nas regiões mais profundas da derme caracterizando ação de dermonecrose, resultante do efeito direto da toxina sobre as células (figura 1-E e F). Ação dermonecrotica também pôde ser evidenciada pelo veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* em loxocelismo analisado em cão da raça Pit bull no hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina, Paraná [22]. Outro estudo corrobora com os resultados obtidos, pois em cães envenenados por *Crotalus*, análises histopatológicas mostraram necrose de fibras musculares e mionecrose ocasional, as quais foram observadas intercaladas entre as fibras musculares normais [23]. Em envenenamento crotálico experimental realizado em bovinos, através da inoculação por via subcutânea verificou-se ao exame histológico necrose de miócitos em todos os músculos examinados [24]. Resultados similares foram obtidos com o veneno bruto da vespa social *Polybia paulista*, caracterizado por mionecrose do tipo miolítica em preparação de diafragmas de camundongos [25].

A extensão do edema foi heterogênea nas diferentes concentrações, sendo mais evidentes em concentrações maiores da toxina. Observou-se também a formação destes entre a epiderme e derme, a partir da aplicação de 20µg.

A reação inflamatória foi mais evidente a partir do grupo tratado com 10µg (figura 2-B) pela presença de um infiltrado de leucócitos com predomínio de neutrófilos. Poucos autores se referem ao comportamento dos leucócitos no envenenamento crotálico e quando o fazem é apenas como um dado complementar [26]. No entanto, alterações no número de leucócitos são esperadas, na qual a leucocitose por neutrofilia está presente [27]. Houve indução e migração de leucócitos em torno de vênulas (figura 1-B) e, posteriormente, por toda a extensão da derme em concentrações maiores. A hemorragia foi visualizada nas regiões mais profundas da derme, iniciando-se na concentração de 10µg (figura 1-C) e persistindo nas concentrações maiores. Envenenamento experimental intramuscular do veneno crotálico em bovinos contribuem com seus resultados anátomo-histológicos nos quais foram evidenciadas leves hemorragias nos pulmões, intestinos, músculos e coração [28]. Em acidentes ofídicos ocorridos com equinos da região sul do Brasil pelo gênero da serpente *Botrops* também foi relatado através de achados histopatológicos hemorragia acentuada na maioria dos órgãos [29].

A degeneração de estruturas da epiderme, derme e da camada muscular subcutânea foi maior a partir do grupo tratado com 40µg.

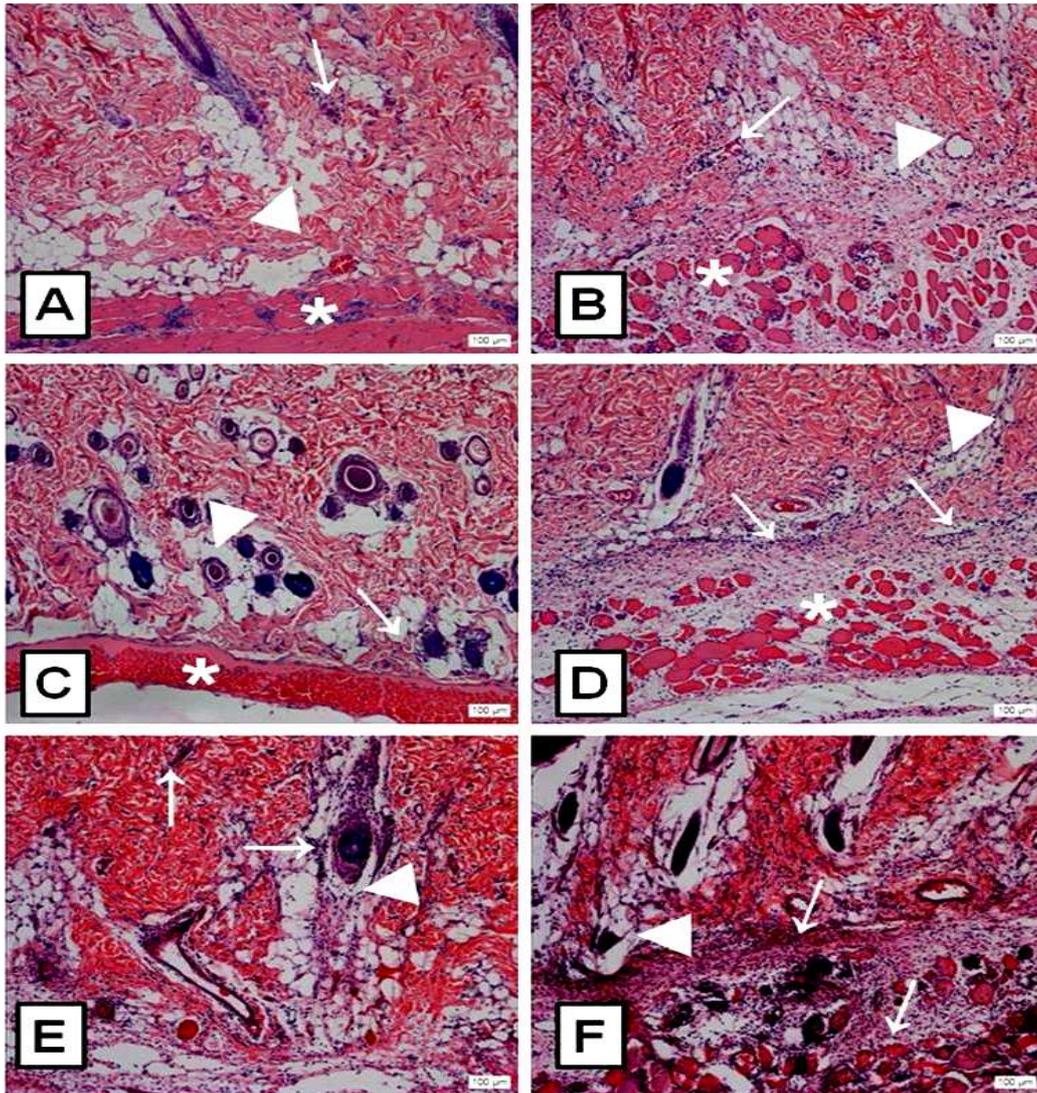


Figura 1 – Fotomicrografia de cortes transversais da região da pele (derme profunda) do dorso de ratos Wistar coletados após 24 horas da injeção intradérmica de diferentes concentrações da crotoxina isolada (μg) de *Crotalus durissus terrificus*. Em A – Grupo controle, B – (5 μg), C – (10 μg), D – (20 μg), E – (40 μg) e F – (80 μg). Os cortes foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina e analisados por microscopia de luz em campo claro. (*) – Camada muscular subcutânea; (▴) – Edema; (→) – Infiltrado inflamatório. Barra = 100 μm .

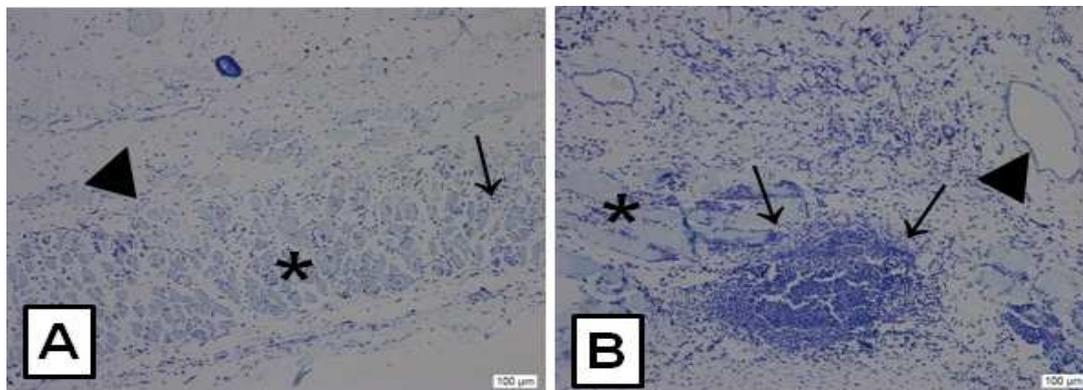


Figura 2 – Fotomicrografia de cortes transversais da região da pele (derme profunda) do dorso de ratos Wistar coletados após 24 horas da injeção intradérmica das concentrações da crotoxina isolada (μg) de

Crotalus durissus terrificus. Comparação do infiltrado inflamatório mais evidente na concentração de crotoxina em B – (10 μ g) do que em A – (Grupo controle). Os cortes foram corados pelo método Azul de Toluidina e analisados por microscopia de luz em campo claro. (*) – Camada muscular subcutânea; (►) – Edema; (→) – Infiltrado inflamatório. Barra = 100 μ m.

A organização das fibras colágenas apresentou pouca modificação quanto ao seu arranjo entre os grupos tratados e controle, como pôde ser analisado em campo claro e campo escuro (sob luz polarizada) pelo método de coloração Picrosirius–Hematoxilina (figura 3). No entanto, os feixes de fibras tornaram-se mais eosinofílicas, ou seja, apresentaram maior afinidade pela eosina, provavelmente devido à ação da fosfolipase presente na composição da crotoxina. Nas maiores concentrações do veneno (40 e 80 μ g), esta enzima deve atuar modificando a estrutura das moléculas de colágeno, aumentando a afinidade das mesmas pelo corante (figura 4-E e F).

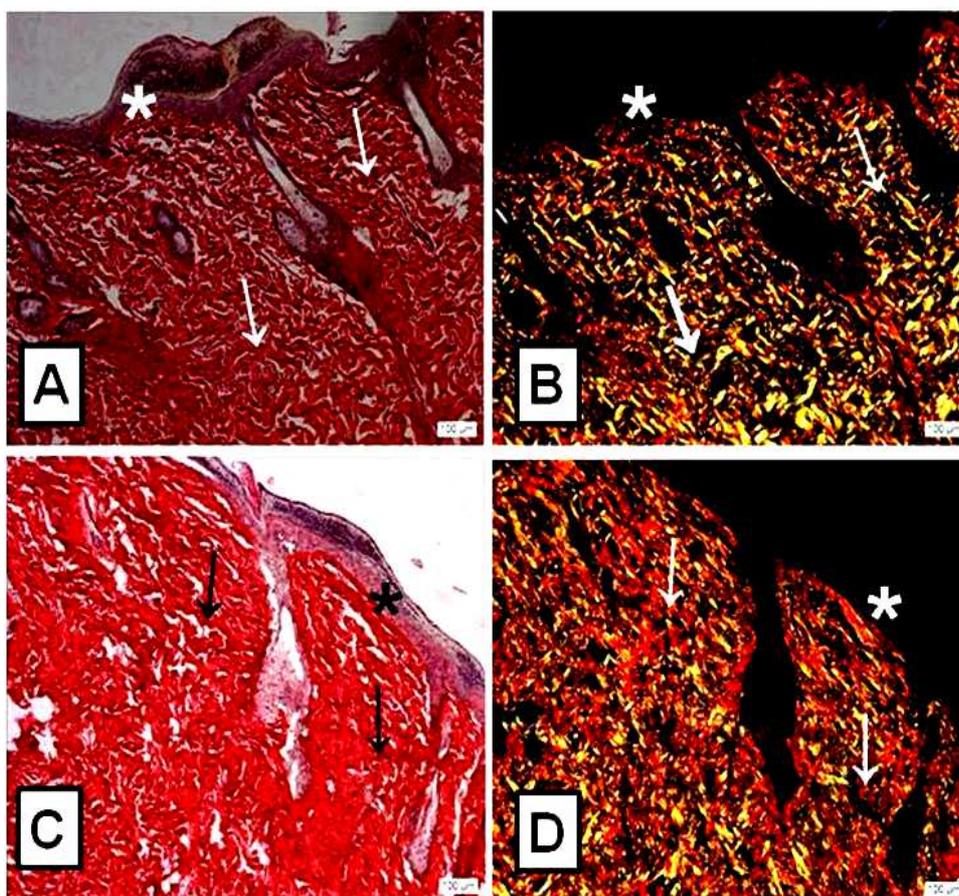


Figura 3 – Fotomicrografia de cortes transversais da região da pele (epiderme) do dorso de ratos Wistar coletados após 24 horas da injeção intradérmica das concentrações da crotoxina isolada (μ g) de *Crotalus durissus terrificus*. Em A – (Grupo controle analisado em campo claro), B – (Grupo controle analisado sob luz polarizada), C – (80 μ g de crotoxina analisada em campo claro), D – (80 μ g de crotoxina analisada sob luz polarizada). Os cortes foram corados pelo método de Picrosirius-Hematoxilina e analisados por microscopia de luz em campo claro em (A e C) e sob luz polarizada em (B e D). (*) – Epiderme; (→) – Fibras colágenas. Barra = 100 μ m.

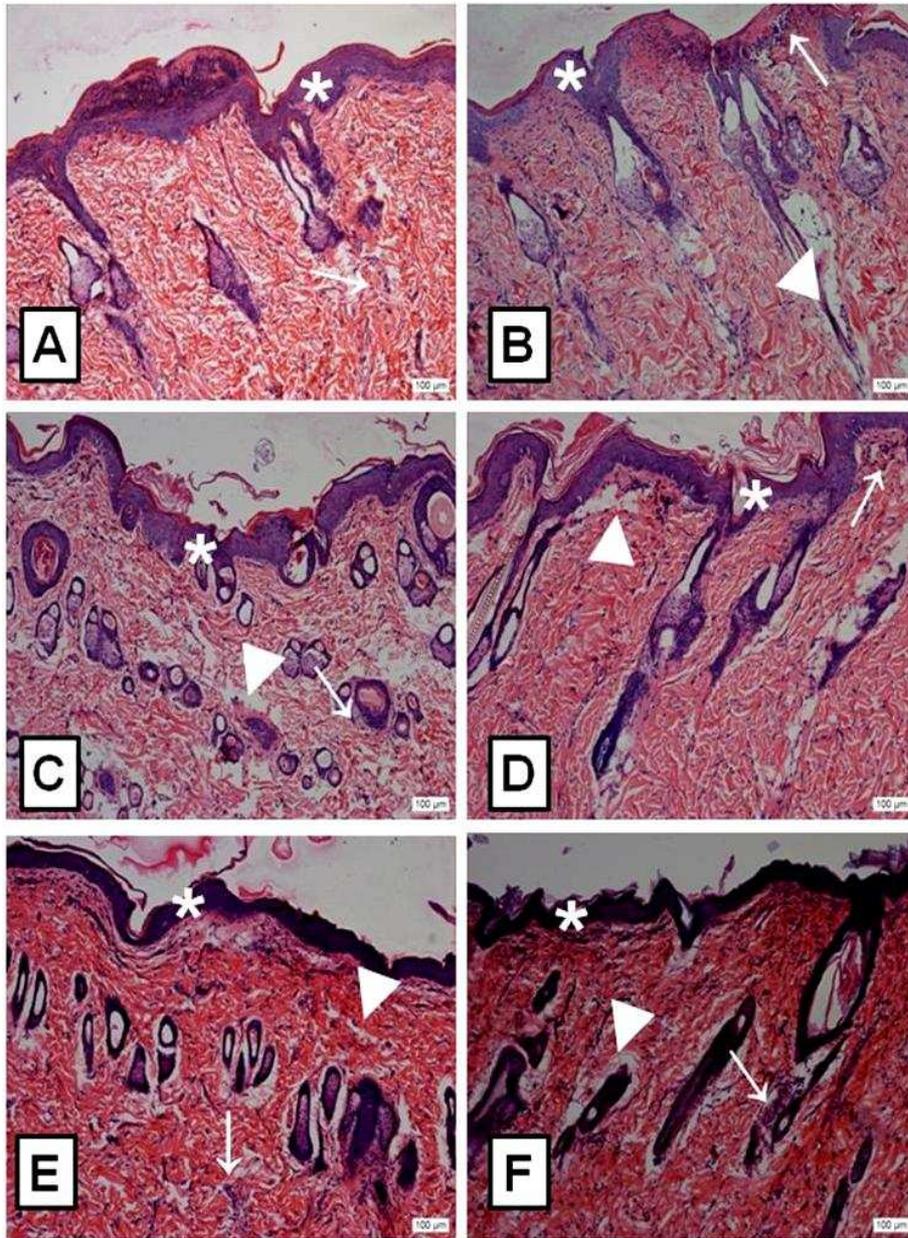


Figura 4 – Fotomicrografia de cortes transversais da região da pele (epiderme) do dorso de ratos Wistar coletados após 24 horas da injeção intradérmica das diferentes concentrações da crotoxina isolada (μg) de *Crotalus durissus terrificus*. Em A – Grupo controle, B – ($5\mu\text{g}$), C – ($10\mu\text{g}$), D – ($20\mu\text{g}$), E – ($40\mu\text{g}$) e F – ($80\mu\text{g}$). Os cortes foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina e analisados por microscopia de luz em campo claro. (*) – Epiderme; (►) – Edema; (→) – Infiltrado inflamatório. Barra = $100\mu\text{m}$.

Nesse estudo, por meio da necropsia não foram verificadas alterações macroscópicas que pudessem caracterizar o diagnóstico de injeção intradérmica da crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Não houve necrose visível no local da aplicação, como observado em envenenamentos experimentais crocálicos [30]. Apenas um edema quase imperceptível foi verificado no local, sendo este, portanto, um fator que contribui para a dificuldade do diagnóstico clínico de acidentes ofídicos causados por *Crotalus durissus terrificus*. Esta ausência de alterações no local da inoculação também foi descrita em humanos [31] e em bovinos [28].

4. CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem confirmar por meio de análises histológicas, importantes efeitos da crotoxina no envenenamento por serpentes do gênero *Crotalus*, pois as manifestações clínicas locais são de difícil interpretação, não ocorrendo lesões macroscópicas visíveis. Neste estudo foram comprovados os efeitos edematogênico, inflamatório e necrosante da crotoxina e o potencial citotóxico de uma fosfolipase (PLA₂).

1. CARDOSO, J.L.C.; BRANDO, R.B. *Acidentes por animais peçonhentos*. 1ª ed. São Paulo: Editora Santos. (1982).
2. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Fundação Nacional de Saúde (2001).
3. AMARAL, C.F.; REZENDE, N.A.; SILVA, A.O.; RIBEIRO, M.M.; MAGALHÃES, R.A.; DOS-REIS, R.J. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico: Análise de 63 casos. *Revista Instituto Medicina Tropical*. 28:220-271 (1986).
4. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional da Saúde. *Manual de Diagnóstico e Tratamento de acidentes por animais peçonhentos* (1998).
5. MELGAREJO, A.F. *Serpentes Peçonhentas do Brasil*. In: CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.; FAN, H.W.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD, V. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, 2003. 33-61p.
6. JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por Cascavel Sul-Americana (*Crotalus durissus*). *Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo*. 34:347-354 (1992).
7. HABERMANN, E.; BREITHAUP, H. Mini-review the crotoxin complex- an example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon*. 16:19 (1978).
8. SLOTTA, K.H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Memórias Instituto Butantan*. 12:505-512 (1938).
9. OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSOLP, S.; PRADO, J.F.; CRUZ, M. A. H.; RODRIGUEZ, L.S. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South- American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. *Toxicon*. 37:1341-57 (1999).
10. BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venoms. *Act. Physiol. Lat. Am*. 11:224 (1961).
11. CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E. Acute myocardial infarction-like enzyme profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*. 84:447-451 (1990).
12. BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arq Bras Med Hyg*. 64:14-20 (1990).
13. LEWIS, R.L.; GUTMANN, L. Snake venoms and the neuromuscular junction. *Semin. Neurol*. 24:175-179 (2004).
14. KOH, D.C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life. Sci*. 24:3030-3041 (2006).
15. DUTT, A.T.K.; MUKTA, V. Snakebite. *Indian. Med. Assoc*. 104:252-254 (2006).
16. ZHANG, H.L.; HAN, R.; CHEN, Z.X.; CHEN, B.W.; GU, Z.L.; REID, P.F.; RAYMOND, L.N.; QIN, Z.H. Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 48:175-182 (2006).
17. KONNO, K.; PICCOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V.O.; CAMARGO, A.C.; CURY, Y. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Peptides*. 29:1293-1304 (2008).
18. GUTIERREZ, V.P.; KONNO, K.; CHACUR, M.; SAMPAIO, S.C.; PICCOLO, G.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V.O.; CURY, Y. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. *Eur J Pharmacol*. 594:84-92 (2008).
19. ACOSTA, R.; UZCATEG, W.; AGUAGE, R.; AGUILAR, I.; GIRON, M.E. Analisis clinico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del género *Bothrops* em Venezuela. *Rev. Cubana Med. Trop*. 52:90-94 (2000).
20. HARRIS, J.B. *Snake Toxins*. Pergamon Press. Nova York, 1991. 91-129p.

21. ARAGÃO, E.A.; CHIOATO, L.; WARD, R.J. Permeabilization of E coli K12 inner and outer membranes by bothropstoxin-I, a Lys 49 phospholipase A2 from Bothrops jararacussu. *Toxicon*. 51:538-546 (2008).
22. COLLACICO, K.; CHANQUETTI, A.M.S.; FERRARI, R. Acidente por Loxosceles em cão - relato de caso. *Ensaio e Ciência: C. biológicas, agrárias e da saúde*. 12:179-195 (2008).
23. KOSCINCZUK, P. et. al. American rattlesnake (Crotalus durissus terrificus) bite accidents in dogs in Argentina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 52:125-129 (2000).
24. GRAÇA, F.A.S. et. al. Aspectos clínicos e patológicos do envenenamento crotálico experimental em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28:261-270 (2008).
25. PAES-OLIVEIRA, M.R.; SCHEIDT, A.C. Patogênese da mionecrose em preparações de diafragma de camundongo induzida pelo veneno bruto da vespa social *Polybia paulista*. *Biol. Saúde*. 11:47-54 (2005).
26. AZEVEDO-MARQUES, M.M. et. al. Rattlesnake bites. Clinical features and complementary tests. *Mem. Inst. Butantan*. 52:27-30 (1990).
27. ROSENFELD, G. Moléstias por venenos animais. *Pinheiros Terapêuticos*. 84:3-15 (1965).
28. TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 26:55-68 (2005).
29. RAPOSO, J.B.; MÉNDEZ, M.C.; BAIALARDI, C.E.G.; RAFFI, M.B. Acidente ofídico em equino no sul do Brasil – relato de caso. *Revista da FZVA Uruguiana*. 8:51-57 (2001).
30. ARAÚJO, P.; ROSENFELD, G.; BELLUOMINI, H.E. Toxicidade de venenos ofídicos. II. Doses mortais para bovinos. *Arqs Inst. Biológico*. 30:43-48 (1963).
31. AMARAL, C.F.S.; MAGALHÃES, R.A.; RESENDE, N.A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico. *Rev. Inst. Med. Trop*. 33:251-255 (1991).