

ALINE APARECIDA SALTÃO BARÃO

Exposição pré-natal ao veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*: uma avaliação bioquímica, hematológica, física e neurocomportamental.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof^a. Dr^a. Valquiria Abrão Coronado Dorce.

**São Paulo
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALINE APARECIDA SALTÃO BARÃO

Exposição pré-natal ao veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*: uma avaliação bioquímica, hematológica, física e neurocomportamental.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof^a. Dr^a. Valquiria Abrão Coronado Dorce.

**São Paulo
2006**

*"O segredo é não correr atrás das borboletas.....É
cuidar do jardim para que elas venham até você"*

Mário Quintana

Dedicatória

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”. Fernando Pessoa

Dedico este trabalho a todas as “pessoas incomparáveis” que me deram o privilégio de conhecê-las nesta longa caminhada:

“Ao meu marido Alan pelo incentivo, compreensão, amor e por me ajudar a superar muitos obstáculos”.

“A minha mãe e aos meus irmãos pelos momentos felizes que me proporcionam durante toda minha vida”.

“A Dr^a Valquíria Dorce pela amizade, profissionalismo, dedicação e ensinamentos. Agradeço por ter acreditado em mim e por toda sua contribuição para minha vida profissional e pessoal”.

Agradecimentos

- A todos os amigos e pesquisadores do Instituto Butantan e em especial a: Dr^a Ana Leonor, Dr^a Geane, Dr^a Norma, Dr. Isaltino, Ana Letícia, Cíntia, Ana Sílvia, Thalma, Bianca, Ana Beatriz, Luciene, Marcela, Diana e Nathália pela companhia agradável durante todo este tempo.
- Ao Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Metodista (LABMESP) pelo fornecimento dos reagentes e realização das análises bioquímicas. E em especial aos professores Rogério Gentil Bellot e Gláucia Dehn Mahana pela orientação nos experimentos.
- Ao Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan em especial a Dr^a Ida Shigheko e Dr Marcelo Santoro pelo fornecimento dos reagentes, utilização dos equipamentos e apoio nas análises hematológicas.
- Ao Instituto Butantan e Fundação Butantan.
- Aos professores dos cursos de pós-graduação que contribuíram para minha formação acadêmica.
- A todos da Secretaria de Pós-graduação da área de concentração de Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.
- A FAPESP pelo apoio financeiro (processo 03/10211-7)

Resumo

Exposição pré-natal ao veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*: uma avaliação bioquímica, hematológica, física e neurocomportamental.

Foram estudados os efeitos da injeção subcutânea materna (1mg/Kg) de veneno no desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole. Foram verificados o desempenho reprodutivo, os parâmetros bioquímicos e hematológicos maternos e as possíveis malformações na prole após administração de 3mg/kg de veneno. Na avaliação física e neurocomportamental dois grupos receberam veneno no 10º (E10) ou 16º dia (E16) gestacional e o grupo controle (C) recebeu salina nos dois dias. Após nascer, cada filhote foi observado diariamente até que apresentasse os parâmetros físicos estudados. Em dias pré-determinados foram testados alguns reflexos e a atividade motora. Observamos alterações físicas na prole de E10 e E16, além de diminuição no tempo de alguns reflexos da prole de E16. No desempenho reprodutivo materno dois grupos receberam veneno no 5º (E5) ou 10º dia (E10) gestacional e o grupo controle (C1) recebeu NaCl 0,9% nos dois dias. No 21º dia gestacional os filhotes foram retirados por laparotomia e divididos em três grupos que receberam tratamentos específicos para análises esqueléticas, viscerais e histológicas. Foram verificados aumento de perdas pós implantações em mães de E10 e aumento de peso de fígado em fetos de E5 e E10. A análise de malformações esqueléticas revelou ossificação craniana afetada na prole de mães de E10. Na avaliação bioquímica e hematológica materna, quatro grupos receberam salina no 5º (C5) ou 10º dia (C10) ou veneno no 5º (E5) ou 10º dia (E10) gestacional e um grupo com 10 machos e 10 fêmeas não prenhes que receberam salina. A glicemia de E5 e E10 mostrou-se elevada em relação aos seus respectivos controles. Poucas alterações foram observadas em alguns parâmetros do hemograma. Portanto, doses que causam envenenamentos leves (1mg/Kg) e moderados (3mg/Kg) podem provocar alterações na mãe e em sua prole. Logo, sugere-se que os efeitos do veneno não são dependentes da dose administrada.

Palavras chave: venenos de escorpião/toxicidade, prenhez, feto/anormalidades, reflexo anormal, contagem de células sanguíneas, glicemia.

ÍNDICE

1- Introdução	07
2- Objetivos	17
2.1- Objetivos gerais	17
2.2- Objetivos específicos.....	17
3- Material e Métodos	18
3.1- <i>Sujeitos experimentais</i>	18
3.2- <i>Drogas e Reagentes</i>	18
3.3- <i>Procedimentos</i>	19
3.3.1- Cruzamento de animais e diagnóstico de prenhez.....	19
3.3.2- Tratamento.....	19
3.3.3- Avaliação da intoxicação materna.....	21
3.3.4- Padronização da ninhada e avaliação do desenvolvimento físico	
neurocomportamental pós-natal.....	21
3.3.4.1- Desenvolvimento físico.....	21
3.3.4.2- Desenvolvimento reflexológico.....	22
3.3.5- Laparotomia e avaliação do desempenho reprodutivo materno.....	23
3.3.6- Preparação dos filhotes.....	23
3.3.6.1- Diafanização e Análise esquelética	24
3.3.6.2- Fixação e Análise visceral.....	24
3.3.6.3- Histologia.....	25
3.3.7- Coleta e armazenamento do material biológico materno	25
3.3.8- Avaliação dos parâmetros bioquímicos maternos.....	26
3.3.9- Avaliação dos parâmetros hematológicos maternos	26
3.4- <i>Delineamento experimental</i>	27
3.4.1.- Experimento 1 - Efeitos de 1,0 mg/kg da injeção do veneno bruto do	
escorpião <i>Tityus serrulatus</i> sobre parâmetros do desenvolvimento físico e	
comportamental da prole de ratas tratadas no 10° dia de	
prenhez.....	27
3.4.2. Experimento 2 - Efeitos de 1,0 mg/kg da injeção do veneno bruto do	
escorpião <i>Tityus serrulatus</i> sobre parâmetros do desenvolvimento físico e	
comportamental da prole de ratas tratadas no 16° dia de	
prenhez.....	27

3.4.3. Experimento 3– Avaliação do desempenho reprodutivo materno e da incidência de malformações e anomalias na prole após a injeção de 3,0 mg/kg do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> no 5º dia de prenhez.....	28
3.4.4. Experimento 4 – Avaliação do desempenho reprodutivo materno e da incidência de malformações e anomalias na prole após a injeção de 3,0 mg/kg do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> no 10º dia de prenhez.....	29
3.4.5. Experimento 5 - Efeitos do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> (3,0 mg/Kg) sobre parâmetros bioquímicos maternos no 5º dia de prenhez.....	29
3.4.6. Experimento 6 - Efeitos do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> (3,0 mg/Kg) sobre parâmetros bioquímicos maternos no 10º dia de prenhez.....	30
3.4.7. Experimento 7 - Efeitos do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> (3,0 mg/Kg) sobre parâmetros hematológicos maternos no 5º dia de prenhez.....	30
3.4.8. Experimento 8 - Efeitos do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> (3,0 mg/Kg) sobre parâmetros hematológicos maternos no 10º dia de prenhez.....	31
3.5- Análise Estatística	31
4- Resultados.....	32
4.1. Experimento 1 - Efeitos da injeção do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> sobre parâmetros do desenvolvimento físico e comportamental da prole de ratas tratadas no 10º dia de prenhez.....	32

4.2. Experimento 2 - Efeitos da injeção do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> sobre parâmetros do desenvolvimento físico e comportamental da prole de ratas tratadas no 16° dia de prenhez.....	33
4.3. Experimento 3– Avaliação do desempenho reprodutivo materno e da incidência de malformações e anomalias após a injeção de 3,0 mg/kg do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> no 5° dia de prenhez.....	42
4.4. Experimento 4 – Avaliação do desempenho reprodutivo materno e da incidência de malformações e anomalias após a injeção de 3,0 mg/kg do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> no 10° dia de prenhez.....	43
4.5. Experimento 5 - Efeitos do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> (3,0 mg/Kg) sobre parâmetros bioquímicos maternos no 5° dia de prenhez.....	52
4.6. Experimento 6 - Efeitos do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> (3,0 mg/Kg) sobre parâmetros bioquímicos maternos no 10° dia de prenhez.....	52
4.7. Experimento 7 - Efeitos do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> (3,0 mg/Kg) sobre parâmetros hematológicos maternos no 5° dia de prenhez.....	58
4.8. Experimento 8 - Efeitos do veneno bruto do escorpião <u>Tityus serrulatus</u> (3,0 mg/Kg) sobre parâmetros hematológicos maternos no 10° dia de prenhez.....	59
5- Discussão.....	67
6- Conclusões.....	84
7- Referencias Bibliográficas.....	86

1. Introdução

Os escorpiões existem há cerca de 350 milhões de anos e pouco mudaram desde essa época. Eles pertencem à ordem dos artrópodes e classe dos aracnídeos. Quanto à classificação em famílias e gêneros existem inúmeras discussões a respeito (Lourenço, 2001). Uma das famílias mais importantes é a Buthidae por possuir espécies produtoras de venenos ativos sobre o homem (Lucas e Silva, 1992). O gênero *Tityus*, que pertence a essa família, apresenta mais de 60 espécies, sendo a *Tityus serrulatus* e a *Tityus bahiensis* responsáveis pela quase totalidade dos acidentes (Cupo *et al.*, 1994).

No Brasil, o escorpião que possui a peçonha considerada mais tóxica é o *Tityus serrulatus*, também chamado de escorpião amarelo. Ele tem hábitos noturnos e aparece principalmente nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Espírito Santo. No decorrer do tempo, desenvolveu hábitos domiciliares, podendo ser visto em habitações humanas, lajes, túmulos, rodapés, porões, etc (Lucas e Silva, 1992; Torres *et al.*, 2002).

O escorpião amarelo possui fácil adaptação ao meio ambiente, podendo sobreviver sem comida por vários meses, mas sempre

necessitando de água fresca (Bucherl, 1971). Além disso, possuem capacidade de se reproduzir por partenogênese, ou seja, os óvulos se desenvolvem no interior do organismo materno, não necessitando de fertilização (Cândido *et al.*, 1999). O homem também promove ambientes favoráveis ao aparecimento do escorpião. O lixo e entulho gerados pela ação antrópica propiciam o aparecimento de insetos e aranhas, constituintes principais da dieta escorpiônica (Queiroz, 1997). Com todos estes fatores a seu favor, nota-se grande explosão demográfica da espécie (Soares *et al.*, 2002). Devido o desenvolvimento de hábitos domiciliares é cada vez mais freqüente a presença de escorpiões em áreas urbanas. Prova disso são os dados do Ministério da Saúde que relatam que 56% dos acidentes com estes animais ocorrem em zonas urbanas e somente 34% nas áreas rurais.

Com isso, o escorpionismo é considerado um sério problema de saúde pública no Brasil (Machado *et al.*, 2000; Cupo e Hering, 2002). Dados de 2004 do Ministério da Saúde indicam ocorrência anual de mais de 28.000 casos de acidentes escorpiônicos (Wen e Santalucia, 2005). Isso corresponde a aproximadamente 34% de todos os acidentes por animais peçonhentos, superando os acidentes por serpentes (32%) e por aranhas (21%). O maior número de notificações (12.000 casos) provem das regiões Nordeste e Sudeste, sendo os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Alagoas e Pernambuco responsáveis por grande parte dos acidentes (Wen e Santalucia, 2005). Infelizmente o número de casos elevou-se muito nos últimos anos (Wen e Santalucia, 2005). Baseados nos dados do Ministério da Saúde observamos que entre 1989 e 1998 ocorreu uma média de 6.322 casos, já entre 1999 e 2004 esta média elevou-se muito, apresentando 20.117 casos de acidentes escorpiônicos.

Os acidentes por escorpiões são importantes em virtude da grande freqüência com que ocorrem e de sua potencial gravidade principalmente em crianças picadas pelo *Tityus serrulatus* (Goyffon *et al.*, 1982; Lourenço *et al.*, 1996; Ghalim *et al.*, 2000).

No Brasil a letalidade por escorpionismo é de 0,2%, mas conforme pode ser visto na figura 1, em crianças menores de 10 anos este índice é mais elevado.

A dor é sintoma sempre presente no escorpionismo e a intensidade com que se manifesta dependerá não só da sensibilidade individual como também da quantidade de veneno inoculada nos tecidos. Pode ser muito leve, quase imperceptível nos casos benignos, até muito intensa e quase insuportável nos casos mais severos. Os pacientes, principalmente as crianças, apresentam-se em geral muito agitados. É possível o aparecimento de tremores generalizados e, com agravamento do quadro, os doentes podem passar de agitação psicomotoras a profundo torpor. Podem ocorrer hipertensão seguida de hipotensão arterial e arritmias cardíacas variadas. Nos casos mais severos, insuficiência cardíaca e edema agudo de pulmão fazem parte do quadro clínico. Nas fases mais tardias e graves pode-se estabelecer bradicardia. Os sintomas respiratórios são agravados pela presença de grande quantidade de secreções como também pela presença de constrição traqueo-brônquica. Outros sintomas descritos no envenenamento escorpiônico são alteração da visão, tonturas, cefaléias, nistagmo, dificuldades de marcha, delírios e alterações no olfato (Hering *et al.*, 1987; Freire-Maia e Campos, 1989; Freire-Maia, 1995; Troncon *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2005).

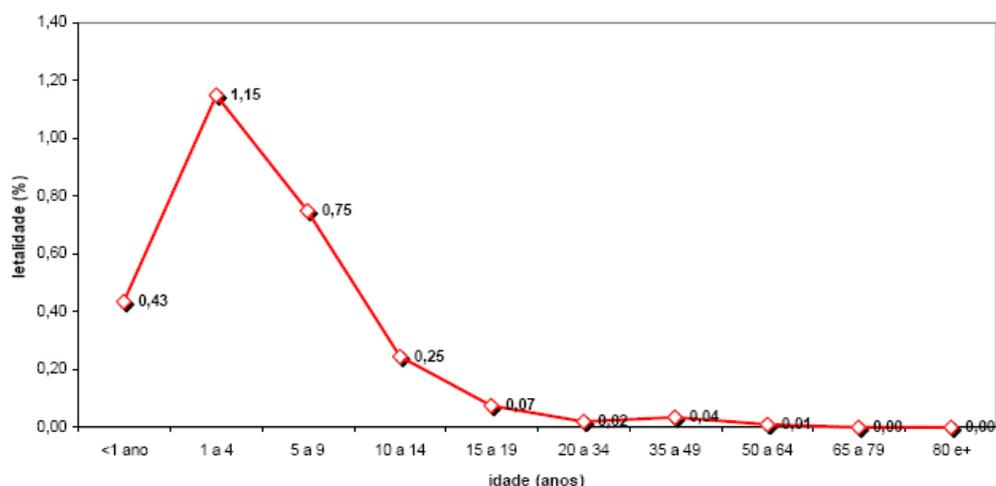


Figura 1- Letalidade por faixa etária. Dados de 2001 a 2004. Ministério da Saúde- Secretaria de Vigilância em Saúde.

A intensidade destes efeitos é determinada por vários fatores: local da picada, através do qual o veneno penetrou na corrente sanguínea, quantidade de veneno inoculado, peso do corpo da vítima, estação do ano na qual ocorreu o acidente, tamanho do escorpião, estado de saúde da pessoa atingida e espécie do escorpião (revisado por Dorce e Sandoval, 1992). Assim como outros membros desse gênero, o *Tityus serrulatus* tem capacidade de inocular apenas uma pequena quantidade de veneno a cada picada e por esta razão a maioria de acidentes envolvendo adultos não é letal. Bucherl (1971) registrou a quantidade máxima e a média da peçonha seca por exemplar de *Tityus serrulatus*, obtidas por extração através do choque elétrico. A quantidade de veneno que este escorpião pode inocular é pequena variando de 0,23 a 1,1 miligramas de peçonha seca. A DL50 deste veneno em ratos é de 0,56mg/Kg pela via endovenosa (Sandoval e Dorce, 1993).

Estudos sobre a toxicocinética do veneno em camundongos mostram que os níveis máximos de veneno no sangue, pulmão, coração e baço ocorreram em 30 minutos após a injeção subcutânea enquanto nos rins e no fígado em 15 minutos. Após duas horas a concentração do veneno no sangue e nestes órgãos diminui rapidamente, sendo que em 8 horas já não está em níveis suficientemente detectáveis (Revelo *et al.*, 1996).

A peçonha do escorpião amarelo é direcionada primeiramente à obtenção de seus alimentos, entretanto nota-se uma grande quantidade de toxinas antimamíferos adquiridas provavelmente em processos evolutivos para sua defesa contra possíveis predadores como gambás e outros (Ji *et al.*, 1994).

O veneno do escorpião é composto por mucopolissacarídeos, pequenas quantidades de hialuronidase e fosfolipase, moléculas de pequena massa molecular como serotonina e histamina, inibidores de proteases, liberadores de histaminas e neurotoxinas (Courad e Jover, 1983). Cada veneno de escorpião pode conter várias neurotoxinas. Elas são moléculas de polipeptídios básicos com massa molecular por volta de 7000 daltons, constituída por cadeias únicas ligadas por pontes dissulfídicas (Courad e Jover, 1983).

As neurotoxinas escorpiônicas são capazes de interferir na permeabilidade iônica das células excitáveis (Catterall, 1980). Foram descritas quatro diferentes famílias de toxinas que interagem com diferentes canais iônicos: as que afetam o canal de sódio (Catterall, 1980; Rochat *et al.*, 1979), de potássio (Carbone *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1985), de cloreto (Debin *et al.*, 1993) e de cálcio (Valdivia *et al.*, 1992; Valdivia e Possani, 1998).

A peçonha do *Tityus serrulatus* contém dois principais tipos de neurotoxinas que atuam em canais de sódio, chamadas de alfa e beta conforme seu sítio de ligação. (Rochat *et al.*, 1984; Kirsch *et al.*, 1989; Possani *et al.*, 1999). Ao se ligar nestes canais existentes nas membranas axonais, determinam um desequilíbrio na concentração de outros íons levando a uma liberação anormal de neurotransmissores (Gueron e Yaron, 1970; revisto por Dorce e Sandoval, 1992; Fukuhara *et al.*, 2004).

O efeito primário das toxinas tipo alfa é a diminuição da inativação aumentando a permeabilidade ao sódio com conseqüente aumento na duração do potencial de ação. As toxinas tipo beta também atuam em canais de sódio diminuindo seu limiar de ativação para abertura do canal com conseqüente aumento da instabilidade celular (Kirsch *et al.*, 1989).

Estudos realizados por Nencioni *et al.* (2000), comprovam efeitos neurotóxicos de algumas frações do veneno do *Tityus serrulatus*. Uma neurotoxina purificada tipo alfa, denominada primeiramente como TS-8F e identificada como TsTX (Sampaio *et al.*, 1983), quando injetada no hipocampo de ratos, determinou padrões comportamentais alterados, atividade epileptiforme no hipocampo e córtex cerebral além de danos a células piramidais e granulares do giro denteado hipocampais (Carvalho *et al.*, 1998).

Além de efeitos neurotóxicos, após a administração do veneno bruto ou da neurotoxina TsTX-I intraperitonealmente em ratos, foi observado aumento do números de leucócitos bem como aumento das enzimas creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), amilase e de citocinas (Bertazzi *et al.*, 2002). A picada do escorpião também produz injúria tecidual que pode induzir a resposta inflamatória sistêmica com subsequente liberação de citocinas (D' Suze *et al.*, 2003). A leucocitose é comum no envenenamento escorpiônico e também está associada à reação inflamatória sistêmica (Magalhães, 1998).

A liberação de citocinas ativa o sistema complemento e pode levar a hemólise, como observado em casos de envenenamento por escorpiões da família Buthidae. (Kankonkar *et al.*, 1992; Corrêa *et al.*, 1997). Fukuhara (2001) relacionou a gravidade clínica do envenenamento com a concentração de peçonha circulante observando que em casos graves há um aumento das citocinas.

As ações em conjunto de neurotoxinas presentes na peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* podem incluir manifestações sistêmicas graves como já comentado anteriormente, contudo, há raros dados na literatura sobre possíveis efeitos do veneno na mãe e na prole de mães que entram em contato com o mesmo nos períodos pré e pós-natais (Ismail *et al.*, 1983; Cruttenden, 2003).

Ao se pensar em toxicidade do desenvolvimento pré-natal e pós-natal em ratos provenientes de mães tratadas com este veneno, deve-se levar em

conta todas as possíveis ações, tanto as periféricas como as centrais e suas conseqüências para o feto e para o filhote.

Para que haja um desenvolvimento normal do feto após a fecundação, são necessárias duas condições: herança genética e meio ambiente intra-uterino adequados. A humanidade sempre se preocupou com o nascimento de indivíduos malformados, estes eram atribuídos a maldições divinas, satânicas ou associados a lendas. O conceito era considerado um ser totalmente protegido pelo útero materno e a placenta era considerada uma barreira inviolável a qualquer agente externo. Entretanto, experimentos visando correlacionar fatores externos às malformações provaram o contrário na segunda metade do século XVIII. Somente nos anos 30 e 40 é que foram realizados os primeiros experimentos com mamíferos confirmando esta proposição. Já nos anos 50 surgiu a teratologia como ramo de pesquisa científica, visando estudar malformações fetais congênitas (teratogênese), embriofetalidade e outros fatores relacionados à mãe e feto estando altamente relacionada com a toxicologia reprodutiva (Lemonica, 1996).

A gestação é um processo dinâmico envolvendo crescimento e desenvolvimento do embrião/feto e alterações fisiológicas do sistema materno. Da concepção ao nascimento o embrião/feto humano aumenta em peso mais ou menos um bilhão de vezes enquanto o organismo materno pode aumentar mais ou menos de 15% a 20%. Entretanto, as mudanças no sistema materno durante a gestação incluem alterações na absorção, distribuição, metabolismo e excreção de nutrientes para melhor suprir e proteger o sistema em desenvolvimento (Walton *et al.*, 1992).

A exposição materna a substâncias ou agentes tóxicos pode causar alterações nas mães e isso pode ter como conseqüência, perturbações no desenvolvimento da prole, mesmo que esta não tenha contato direto (através da placenta) com a substância (Franková, 1985). Outras substâncias e agentes podem alcançar o feto sem alterar aparentemente o metabolismo da mãe e causar danos diretamente sobre ele através da passagem pela placenta e penetração na circulação fetal.

Muitos processos metabólicos de importância vital são realizados pela placenta. Ela serve como uma combinação de trato gastrointestinal, rins, pulmão, fígado, baço, timo e como órgão endócrino multifuncional (Szabo e Grimaldi, 1970). Além disso, o metabolismo fetal e conseqüentemente o crescimento fetal, dependem diretamente dos nutrientes capazes de atravessar a barreira placentária (Herrera, 2002). Aminoácidos, vitaminas, carboidratos, lipídios e minerais da mãe são capazes de ultrapassar esta barreira passando para circulação fetal (Chao e Juchau, 1983). Outras moléculas importantes como as imunoglobulinas tipo G também passam através da placenta e conferem imunidade ao feto, protegendo-o assim de diversos agentes infecciosos (Chiodo *et al.*, 1983)

Logo, toda substância que penetra na corrente sanguínea materna deve ser considerada como capaz de atravessar a placenta e atingir o feto salvo prova em contrário (Ward e Mirkin, 1997).

A exposição a uma substância tóxica pode ocorrer durante todo o ciclo reprodutivo nos mamíferos. As conseqüências podem ser bastante variadas, dependendo do período deste ciclo, da susceptibilidade individual e entre espécies e da intensidade da exposição (Lemonica, 1996).

Apesar da alta permeabilidade de substâncias à barreira materno-placentária, existem outros mecanismos que visam à proteção do conceito como o aumento da volemia materna. Este aumento durante a gestação é de 35 % o que pode alterar a cinética de substâncias. Os níveis de progesterona, que se encontram altos na gestação, estimulam enzimas celulares que conseqüentemente aumentam a metabolização de substâncias químicas que, por sua vez alteram sua toxicidade, aumentando ou diminuindo-a dependendo do metabólito formado (Lemonica, 1996).

Algumas situações na qual a fisiologia materna sofre alteração muito grande como desequilíbrio osmótico, vasoconstrição uterina, anemias, alterações de pressão, anoxia, hipotermia, hipertermia, etc, são capazes de prejudicar o feto (Carney, 1997). Dados da literatura associam casos de estresse emocional e ansiedade durante a gestação com abortos espontâneos, retardo no crescimento fetal, neonatos pré-termos,

malformação fetal (Mulder *et al*, 2002) e com distúrbios no desenvolvimento comportamental pós-natal (Kofman, 2002).

O desenvolvimento dos mamíferos se dá em quatro períodos: o de implantação, o de organogênese, o de desenvolvimento fetal e o neonatal (Manson e Kang, 1989).

O período de implantação vai desde a fecundação até o implante do blastocisto no útero materno e nesta fase um agente tóxico pode provocar embriofetalidade sendo bastante rara a ocorrência de teratogênese. O período seguinte, chamado de organogênese, inicia-se na fase de proliferação celular e vai até a formação de órgãos rudimentares. Nesta fase os agentes podem levar a teratogênese ou a embriofetalidade, sendo que neste período ocorre a maioria das anomalias viscerais e esqueléticas. Já no período de desenvolvimento fetal e neonatal os órgãos vão apresentar crescimento tecidual e maturação. As anomalias observadas são menores do que no período de organogênese, sendo muitas vezes sutis (Manson e Kang, 1989).

As anomalias sutis que podem aparecer durante o desenvolvimento do animal muitas vezes não são detectáveis pela simples observação macroscópica ou microscópica, são necessários estudos comportamentais, bioquímicos e de biologia molecular, além de outros recursos e metodologias disponíveis após o nascimento (Nasello, 1997).

No rato, o implante do blastocisto no útero materno ocorre até o quinto dia de gestação, a organogênese vai do sexto ao décimo sexto dia e deste até o vigésimo primeiro ocorre o desenvolvimento fetal (Manson e Kang, 1989). Apesar destes períodos pré-determinados indicarem maior ou menor frequência de malformações, sabe-se que cada órgão possui seu período crítico específico que corresponde à formação de suas estruturas típicas e crescimento.

No período pós-natal, substâncias que apresentarem características físico-químicas adequadas, passarão para a prole através do aleitamento materno. Os filhotes apresentam baixa capacidade excretória bem como um

metabolismo enzimático limitado, logo o aleitamento pode ser responsável pela intoxicação dos mesmos (Castro, 1991).

Algumas substâncias provocam efeitos adversos discretos, como atraso no crescimento e desenvolvimento. Para caracterização de tais efeitos utiliza-se o termo toxicidade do desenvolvimento, que compreende a quatro manifestações: alterações do crescimento, morte, malformações e déficits ou prejuízos funcionais (Lemonica, 1996).

Alguns agentes são conceituados como teratógenos comportamentais pois desagregam o desenvolvimento comportamental por exposição pré-natal tanto durante a organogênese como durante o desenvolvimento fetal (Lemonica, 1996).

Ao nascer, os ratos apresentam um sistema nervoso central imaturo com deficiente irrigação cerebral e ausência de barreira hematoencefálica (Baker *et al*, 1979; Bernardi, 1999). O desenvolvimento desse sistema se dá, portanto no decorrer do período pós-natal. Qualquer influencia durante a gestação, desde o começo da organogênese até o período de amamentação pode influir neste processo levando tanto a anomalias sutis quanto a teratogênese propriamente dita.

A maturação pós-natal da atividade motora do rato ocorre através dos seguintes processos comportamentais: do desenvolvimento da postura e locomoção quadrúpede, dos ajustes dinâmicos posturais, de algumas respostas de orientação e de habilidades motoras complexas (Altman e Sudarshan, 1975). Através de testes comportamentais podemos avaliar tais parâmetros nos animais.

O atraso e baixo desenvolvimento dos reflexos neonatais são considerados importantes, pois podem estar associados a modificações cerebrais induzidas por estresse (Drago *et al.*, 1999). Estudos em humanos mostram que crianças nascidas de mães que sofreram algum tipo de estresse durante a gestação apresentam atraso na fala e na atividade motora (Patin *et al.*, 2004). Se a exposição materna a algum tipo de estresse resultar em dano no desenvolvimento do sistema nervoso, pode-se esperar que o comportamento também se altere (Weinstock, 2001).

O desenvolvimento de um organismo significa uma complexa coordenação de divisões, migrações e interações celulares, regulação gênica e diferenciação. Qualquer agente que interfira nesses processos pode causar malformações no embrião. Deste modo, é crescente a preocupação e investigação acerca de agentes exógenos capazes de causar morte ou anomalias estruturais e comportamentais no neonato.

Na Arábia Saudita, foram realizados estudos com escorpião *Androctonus amoreuxi*, constatando a capacidade de seu veneno provocar anomalias congênitas bem como reabsorção fetal quando inoculado em ratas prenhes (Ismail *et al.*, 1983).

No Brasil, poucos levantamentos a respeito de venenos de escorpiões nativos causando alterações maternas, anomalias congênitas, embriofetalidade ou alteração no desenvolvimento foram realizados, contudo, este é um campo aberto a estudos, visto que a cada ano os casos de escorpionismo aumentam no Brasil.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Estudar os efeitos da exposição ao veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*, verificando possíveis alterações em parâmetros físicos e neurocomportamentais da prole de ratas tratadas, durante a prenhez. Verificar também alterações no desempenho reprodutivo e nos parâmetros hematológicos e bioquímicos dessas ratas expostas ao veneno.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Com a dose de 1,0 mg/Kg que corresponde ao envenenamento leve:

Estudar os efeitos físicos e comportamentais na prole de ratos a partir da administração materna do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 10º ou 16º dias de gestação.

2.2.1. Com a dose de 3,0 mg/Kg que corresponde ao envenenamento moderado:

Estudar o desempenho reprodutivo materno e a morfologia da prole de ratos após a administração materna do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou 10º dias de gestação.

Avaliar no 5º e 10º dias gestacionais as prováveis alterações no hemograma, na glicemia e nas taxas de transaminase glutâmico oxaloacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e de amilase de ratas grávidas, uma hora após a administração do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* tempo de ação do veneno que provoca prováveis alterações sanguíneas (Bertazzi *et al.*, 2002).

Os dias de injeção foram escolhidos pois o quinto dia corresponde ao final do período de implantação do blastocisto no útero de ratas, durante o qual, qualquer substância nociva, pode ocasionar a embriofetalidade, sendo extremamente rara a ocorrência de teratogênese. Já o 10º dia de gestação corresponde à metade do período de organogênese logo, substâncias administradas nesta fase podem levar a teratogênese ou embriofetalidade além disso, para o rato, este dia corresponde ao período crítico de vários órgãos. O 16º dia de gestação corresponde ao período inicial de maturação cerebral (Bernardi, 1999).

3. Material e Métodos

3.1. Sujeitos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar, 30 machos e 115 fêmeas, sexualmente maduros, pesando entre 250 a 300g. Os animais foram acondicionados a 22 ± 2 °C, no Biotério do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan. Água e comida foram fornecidas “ad libitum” durante todo procedimento experimental. As fêmeas foram separadas em 11 grupos, sendo cinco controles e seis experimentais. Dez machos foram utilizados para o grupo destinado às análises bioquímicas e os outros foram utilizados para cruzamento com as fêmeas.

3.2. Drogas e Reagentes

Foram utilizados solução NaCl (0,9%), veneno bruto liofilizado do escorpião *Tityus serrulatus*, (fornecido pela Comissão de veneno e obtido pelo Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan), acetona, líquido de Bouin, solução de KOH (0,8%), alizarina (Solução saturada), álcool etílico (80%), álcool etílico (90%), solução clareadora: (2 partes de álcool etílico, 1

parte de glicerina, 2 partes de álcool benzílico) e solução de formaldeído à 10% .

Para as análises bioquímicas foram utilizados kits específicos para glicemia (Labor & Labor®), transaminase glutâmico pirúvica (Labor & Labor®), transaminase glutâmico oxaloacética (Labor & Labor®) e amilase (Labor & Labor®).

Para as análises hematológicas foram utilizados kits específicos: Hemoton, Hemoblank II, Hemolise, Auto Despro (Hemogran ®).

3.3. Procedimentos

3.3.1. Cruzamento de animais e diagnóstico de prenhez

As ratas foram agrupadas em gaiolas de polietileno com tampa metálica contendo duas fêmeas cada. Um macho foi colocado no final do dia (aproximadamente às 16 horas) e retirado pela manhã do dia seguinte quando foi feito então o lavado vaginal que consiste em injeção de 60 microlitros de solução salina, com ajuda de uma pipeta, no canal vaginal da rata e retirada do material com esta mesma pipeta. O líquido foi colocado na lâmina e observado ao microscópio onde se verificou a presença de espermatozóides e de células de estro (caracterizada como a fase estrogênica máxima) para confirmação do diagnóstico de prenhez (dia zero de gestação). Após esta confirmação as fêmeas foram separadas individualmente. Os machos e as fêmeas não prenhes não foram utilizados nestes experimentos.

3.3.2. Tratamento

Para a avaliação física e neurocomportamental da prole foram utilizados três grupos. Cada grupo com 10 fêmeas que receberam injeções

subcutâneas no 10º e 16º dias de gestação com solução salina e veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* (1,0 mg/Kg) de tal maneira que os animais do grupo controle receberam salina nos dois dias de injeção, os animais de um grupo experimental receberam salina no 10º dia de gestação e veneno no 16º dia e do outro grupo, veneno no 10º dia e salina no 16º dia gestacional. O número de animais e as injeções foram assim definidos para que fosse evitado o desperdício de animais e de veneno.

Para a avaliação do desempenho reprodutivo materno foram realizados três grupos com no mínimo 10 animais cada: um grupo controle, que recebeu injeção de solução salina nos dias 5 e 10 de gestação e dois grupos experimentais: um grupo recebeu solução salina no 5º dia e veneno no 10º dia gestacional (3,0 ml/Kg) e o outro grupo recebeu injeção de veneno no 5º dia (3,0 mg/Kg) e solução salina no 10º dia de gestação.

Para a avaliação bioquímica e hematológica materna, foram utilizados quatro grupos, cada um com dez ou mais fêmeas que receberam injeções subcutâneas (3,0mg/Kg) de solução salina (grupos controle) ou veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* (grupos experimentais) no 5º ou 10º dia de gestação.

Um grupo com dez machos e outro com 10 fêmeas não prenhes receberam solução salina por via subcutânea e foram submetidos a análise hematológica e bioquímica do sangue.

O veneno utilizado foi descongelado no momento da injeção, diluído a partir de uma solução concentrada e aplicado subcutaneamente no dorso de todos os animais.

As doses de 1,0 mg/Kg e 3,0 mg/Kg foram determinadas baseadas na DL50 e em experimentos anteriores em nosso laboratório e correspondem respectivamente aquelas que causam envenenamentos leves e moderados, sem levar a morte das mães. Os dias de injeção são os mesmos em que estudos anteriores, também de nosso laboratório, procuravam verificar alterações morfológicas nos filhotes.

3.3.3. Avaliação da intoxicação materna

As fêmeas prenhes foram avaliadas quanto ao ganho de peso nos dias 0, 5, 10, 16 e 21 da gestação. As fêmeas destinadas às análises bioquímicas e hematológicas foram pesadas na mesma frequência até o dia em que foram sacrificadas para os experimentos.

3.3.4. Padronização da ninhada e avaliação do desenvolvimento físico e neurocomportamental pós-natal

Ratas receberam injeção de 1,0 mg/Kg do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* no 10° ou 16° dias de gestação. As ninhadas foram padronizadas no dia 2 do nascimento. Sempre que possível foram utilizados 8 filhotes distribuídos na mesma proporção entre machos e fêmeas. Em alguns casos, os filhotes foram escolhidos independentemente do sexo até que se completasse 8 filhotes. Algumas ninhadas apresentaram número menor ou igual a 8 filhotes, sendo assim, todos foram utilizados.

Para manuseio dos filhotes alguns cuidados foram tomados. As mãos do pesquisador foram lavadas em água corrente e esfregadas na ração e na maravalha, a fim de evitar qualquer odor diferente que estressasse o animal. Os animais foram marcados delicadamente a fim de evitar qualquer trauma. Avaliações físicas e reflexológicas foram realizadas segundo Alder e Zbinden (1997 modificado).

3.3.4.1 Desenvolvimento físico

Cada filhote foi observado diariamente e individualmente no mesmo horário até que apresentassem a ocorrência dos parâmetros físicos: desdobramento de orelhas, erupção do dentes incisivos, abertura dos olhos,

abertura do orifício do ouvido, descida dos testículos e abertura do canal vaginal.

A pesagem dos filhotes ocorreu a cada seis dias, iniciando-se no segundo dia de vida e terminando no vigésimo dia de vida.

3.3.4.2. *Desenvolvimento reflexológico.*

Os dias dos testes descritos a seguir foram pré-determinados em outros experimentos.

a) *Preensão palmar*: O animal foi contido por uma das mãos do pesquisador, com o cuidado de não tocar sua pata esquerda dianteira. Com a ponta de um lápis esta pata foi tocada. Ela deveria se fechar no contato físico com o lápis. Este foi o critério para se considerar que houve ocorrência do reflexo. O teste foi realizado nos dias 4, 6 e 8 de vida.

b) *Reflexo postural*: O animal foi colocado em posição de decúbito dorsal e foi medido o tempo que o mesmo levou para virar o corpo e ficar na posição de decúbito ventral. O animal deveria ficar com as quatro patas na superfície. O teste foi realizado nos dias 4, 6, 8 e 10 de vida.

c) *Geotaxia negativa*: O animal foi colocado em uma rampa de aproximadamente 45 graus de inclinação a 5 cm da borda inferior desta superfície, com a cabeça direcionada para baixo. O resultado esperado para este teste é que o animal volte para a posição oposta, ou seja, com a cabeça voltada para cima. O teste foi realizado nos dias 6, 8, 10 e 12 de vida.

d) *Caixa de atividade*: Este aparelho contém dois grupos de sensores que medem a atividade geral e a atividade locomotora do animal. Os filhotes foram colocados nesta caixa individualmente e observados durante cinco minutos. Após a retirada de cada animal, a caixa foi limpa com solução álcool-água a 5% para evitar interferências com odor do animal anterior. O teste foi realizado nos dias 10, 14, 18 e 22 de vida.

3.3.5. Laparotomia e Avaliação do Desempenho Reprodutivo Materno

No vigésimo primeiro dia de gestação, as ratas designadas para análise do desempenho reprodutivo foram submetidas a laparotomia. Para isso, os animais foram profundamente anestesiados em câmara com dióxido de carbono, os cornos uterinos foram expostos e os filhotes retirados junto com suas placentas. Ambos foram contados e pesados. Os filhotes foram analisados externamente quanto sua aparência geral, sexo e vitalidade.

No útero foi verificada a presença de reabsorções e pontos de implantação.

Os corpos lúteos presentes em cada ovário foram contados para avaliação da quantidade de óvulos eliminados.

Para cada mãe foi realizado o cálculo individual materno que avaliou as perdas pré - implantação e pós - implantação através das seguintes proporções:

$$\text{PERDAS PRÉ-IMPLANTAÇÃO} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de implantações}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}}$$

$$\text{PERDAS PÓS-IMPLANTAÇÃO} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de implantações} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de implantações}}$$

3.3.6. Preparação dos filhotes

Após o procedimento descrito anteriormente os filhotes retirados foram sacrificados por inalação de gás carbônico. Cada ninhada foi dividida aleatoriamente em três grupos distintos, para análise de possíveis malformações esqueléticas ou malformações viscerais e para análise histológica de alguns órgãos.

3. 3. 6.1. *Diafanização e Análise Esquelética*

Para preparação dos filhotes foi utilizado um procedimento proposto por Staples *et al.* (1964). Baseado neste método, os corpos dos filhotes foram colocados em acetona e após 24 horas eviscerados. Os rins, o fígado, os pulmões e o coração foram pesados. A acetona foi substituída por uma solução de KOH a 0,8% misturada a solução saturada de alizarina. Esta mistura de soluções foi trocada quatro vezes com intervalo mínimo entre trocas de 24 horas. Ao término das quatro trocas, a solução foi substituída pela solução clareadora. A partir daí, foram realizadas as análises baseadas na contagem dos pontos de ossificação proposta por Aliverti *et al.* (1979), a qual determina o grau de desenvolvimento fetal e no roteiro proposto por Taylor (1986) para observação de parâmetros como anomalias e/ou malformações nos ossos cranianos (frontal, parietal, interparietal e occipital), esterno, vértebras (cervicais, torácicas, lombares, sacrais e caudais), costelas, bacia, clavícula e extremidades (metacarpos, metatarsos e falanges).

Segundo Bernardi (1999) o termo malformação significa não só formação anormal de tecidos, ele remete também anormalidades bioquímicas. Logo, neste estudo preferimos chamar as alterações encontradas de anomalias, visto que não realizamos métodos complementares que provem outras alterações.

3. 3. 6. 2. *Fixação e Análise Visceral*

Os corpos dos filhotes foram colocados em solução de Bouin para fixação das estruturas viscerais e decalcificação dos ossos. Após quatro dias essa solução foi substituída por álcool 80% sendo trocada novamente por álcool 90% após dois dias. A análise das vísceras foi realizada conforme método proposto por Wilson (1965) que consiste em fixar os corpos e seccioná-los transversalmente com lâminas afiadas, em fatias de aproximadamente 1,0 mm cada, de maneira que seja possível a visualização

das seguintes estruturas quanto a possíveis malformações e/ou anomalias viscerais: palato, ouvido interno, medula, cavidade nasal, septo nasal, retina, córnea, cristalino, hemisfério cerebral, ventrículos (cérebro), glândula salivar, tireóide, esôfago, traquéia, timo, coração, fígado, rins, bexiga, ureter e gônadas.

3.3.6.3. *Histologia*

Parte dos filhotes dos grupos que receberam veneno e salina no quinto e no décimo dia de gestação foram sacrificados e juntamente com suas placentas foram colocados em uma solução de formaldeído à 10%. Estes animais foram eviscerados, seus órgãos (pulmão, fígado, rins e coração) e suas placentas foram emblocados em resina Paraplast®.

Devidamente identificados, os órgãos foram encaminhados para o Laboratório de Histologia, do Departamento de Patologia Experimental da Universidade de São Paulo, para confecção das lâminas para análise dos tecidos. Para isso, foram feitos cortes seqüenciais, transversais e longitudinais conforme o fragmento, de qualquer parte representativa da amostra, com aproximadamente 5 μ cada. As lâminas foram coradas pela técnica de H.E. (hematoxilina –eosina).

3.3.7. ***Coleta e armazenamento de material biológico materno***

As ratas foram expostas a dose do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou 10º dias de gestação. Uma hora após a administração do veneno, os animais foram submetidos a punção cardíaca para retirada de sangue. A punção cardíaca foi realizada com o animal anestesiado, introduzindo-se uma agulha acoplada a uma seringa de 10 ml (BD®) na altura do coração. Logo após a coleta, o material foi transferido para dois tubos: um tubo contendo EDTA (Vacum®) que foi armazenado a 4°C até a sua análise e outro tubo seco (Vacum®), que foi centrifugado a 2465g por 7

minutos para separação do soro. O soro foi armazenado a -80° C até a análise.

3.3.8. Avaliação dos parâmetros bioquímicos materno

Foram avaliados através do sistema automatizado Cobas Mira S® os seguintes parâmetros: amilase (método enzimático), transaminase glutâmico oxaloacética (método cinético), transaminase glutâmico pirúvica (método cinético) e glicemia (método glicose oxidase).

3.3.9. Avaliação dos parâmetros hematológicos maternos

Alguns parâmetros do hemograma (contagem global de células vermelhas e leucócitos, hematócrito, plaquetas e dosagem de hemoglobina) foram analisados através do sistema automatizado Sero Diagnostics 9020 AX. Devido a falta de acurácia do analisador automático utilizado, dois parâmetros (contagem diferencial de células brancas e citomorfologia de glóbulos vermelhos) foram feitos através do método manual.

Para a contagem diferencial de glóbulos brancos, foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo da seguinte maneira: o sangue foi homogeneizado e uma gota do material foi colocada sobre uma das extremidades da lâmina. Com uma lâmina auxiliar colocada a um ângulo aproximado de 45° sobre a gota de sangue, foi realizado um movimento retilíneo e preciso espalhando o sangue pela lâmina. Após a secagem procedeu-se a coloração com Panótico Rápido LB® (Laborclin®). A leitura foi feita do meio do esfregaço para a cauda com movimentos abrangendo toda a lâmina, em microscópio óptico com aumento de 100 vezes. Foram contadas 100 células brancas.

Para avaliação da citomorfologia de glóbulos vermelhos, a mesma lâmina confeccionada para a contagem diferencial de glóbulos brancos foi utilizada para observação da coloração e morfologia das células vermelhas.

A leitura abrangeu a parte final do esfregaço, onde as células encontravam-se bem distribuídas e foi realizada em microscópio óptico com aumento de 100 vezes.

3.4. Delineamento experimental

3.4.1. Experimento 1 - Efeitos de 1,0 mg/Kg da injeção do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus sobre parâmetros do desenvolvimento físico e comportamental da prole de ratas tratadas no 10º dia de prenhez.

Após a confirmação de prenhez conforme procedimento descrito no item 3.3.1, as fêmeas foram distribuídas conforme descritos no item 3.3.2. Os animais deste experimento receberam injeção de 1,0 mg/Kg de veneno no 10º dia de gestação e de 1,0 ml/Kg de solução salina no 16º dia de gestação. Os animais do grupo controle receberam 1ml/Kg de solução salina no 10º e no 16º dia de gestação.

Foi realizada análise da intoxicação materna conforme descrito no item 3.3.3.

As mães foram mantidas individualmente em suas caixas até o nascimento dos filhotes, quando foi feita a padronização, conforme item 3.3.4., e análise completa dos parâmetros físicos e neurocomportamentais dos filhotes descritos no item 3.3.4.1. e 3.3.4.2.

3.4.2. Experimento 2 - Efeitos de 1,0 mg/Kg da injeção do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus sobre parâmetros do desenvolvimento físico e comportamental da prole de ratas no 16º dia de prenhez.

Após a confirmação de prenhez conforme procedimento descrito no item 3.3.1, as fêmeas foram distribuídas conforme descritos no item 3.3.2. Os animais deste experimento receberam injeção de 1ml/Kg de solução salina no 10º dia de gestação e de 1,0 mg/Kg de veneno bruto no 16º dia de

gestação. Os animais do grupo controle receberam 1ml/Kg de solução salina no 10º e no 16º dia de gestação.

Foi realizada análise da intoxicação materna conforme descrito no item 3.3.3.

As mães foram mantidas individualmente em suas caixas até o nascimento dos filhotes, quando foi feita a padronização, conforme item 3.3.4., e análise completa dos parâmetros físicos (item 3.3.4.1) e neurocomportamentais (item 3.3.4.2).

3.4.3. Experimento 3 – Avaliação do desempenho reprodutivo materno e da incidência de malformações e anomalias na prole após a injeção do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus no 5º dia de prenhez.

Após a confirmação de prenhez conforme procedimento descrito no item 3.3.1, as fêmeas foram distribuídas conforme descritos no item 3.3.2. Os animais deste experimento receberam injeção subcutânea (3,0 mg/Kg) de veneno bruto no 5º dia de gestação e solução salina no 10º dia gestacional. Os animais do grupo controle receberam solução salina no 5º e 10º dia gestacional.

Foi realizada análise da intoxicação materna conforme descrito no item 3.3.3.

As mães foram mantidas individualmente em suas caixas evitando-se ao máximo situações estressantes. No vigésimo primeiro dia gestacional foi realizada a laparotomia conforme item 3.3.5. e a ninhada foi dividida aleatoriamente: uma parte foi submetida à análise visceral conforme item 3.3.6.2., outra parte à análise esquelética conforme item 3.3.6.1 e o restante dos filhotes à análise histológica (item 3.3.6.3).

3.4.4. Experimento 4 – Avaliação do desempenho reprodutivo materno e da incidência de malformações e anomalias na prole após a injeção do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus no 10º dia de prenhez.

Após a confirmação de prenhez conforme procedimento descrito no item 3.3.1, as fêmeas foram distribuídas conforme descritos no item 3.3.2. Os animais deste experimento receberam injeção subcutânea (3,0 mg/Kg) de solução salina no 5º dia e veneno bruto no 10º dia de gestação. Os animais do grupo controle receberam solução salina no 5º e no 10º dia gestacional.

Foi realizada análise da intoxicação materna conforme descrito no item 3.3.3.

As mães foram mantidas individualmente em suas caixas evitando-se ao máximo situações estressantes. No vigésimo primeiro dia gestacional foi realizada a laparotomia conforme item 3.3.5 e a ninhada foi dividida aleatoriamente: uma parte foi submetida à análise visceral conforme item 3.3.6.2., outra parte à análise esquelética conforme item 3.3.6.1 e o restante dos filhotes à análise histológica (item 3.3.6.3).

3.4.5. Experimento 5 - Efeitos do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus (3,0 mg/ kg) sobre parâmetros bioquímicos maternos no 5º dia de prenhez.

Após a confirmação de prenhez conforme procedimento descrito no item 3.3.1, as fêmeas foram distribuídas conforme descritos no item 3.3.2. Os animais deste experimento receberam injeção subcutânea (3,0 mg/Kg) de veneno bruto no 5º dia de gestação e os animais do grupo controle receberam solução salina no mesmo dia.

Foi feita a análise da intoxicação materna conforme descrito no item 3.3.3.

As mães foram mantidas individualmente em suas caixas por uma hora. Logo depois foram coletadas as amostras conforme descrito no item

3.3.7 e foi realizada a avaliação dos parâmetros bioquímicos conforme item 3.3.8.

3.4.6. Experimento 6 - Efeitos do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus (3,0 mg/ kg) sobre parâmetros bioquímicos maternos no 10º dia de prenhez.

Após a confirmação de prenhez conforme procedimento descrito no item 3.3.1, as fêmeas foram distribuídas conforme descritos no item 3.3.2. Os animais deste experimento receberam injeção subcutânea (3,0 mg/Kg) de veneno bruto no 10º dia de gestação e os animais do grupo controle receberam solução salina no mesmo dia.

Foi feita a análise da intoxicação materna conforme descrito no item 3.3.3.

As mães foram mantidas individualmente em suas caixas por uma hora. Logo depois foram coletadas as amostras conforme descrito no item 3.3.7, foi realizada a avaliação dos parâmetros bioquímicos conforme item 3.3.8.

3.4.7. Experimento 7 - Efeitos do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus (3,0 mg/Kg) sobre parâmetros hematológicos maternos no 5º dia de prenhez.

Dos mesmos animais do experimento cinco foram coletadas amostras sanguíneas conforme descrito no item 3.3.7 e procedeu-se a avaliação dos parâmetros hematológicos conforme descrito no item 3.3.9.

3.4.8. Experimento 8 - Efeitos do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus (3,0 mg/Kg) sobre parâmetros hematológicos maternos no 10º dia de prenhez.

Dos mesmos animais do experimento seis foram coletadas amostras sanguíneas conforme descrito no item 3.3.7 e procedeu-se a avaliação dos parâmetros hematológicos conforme descrito no item 3.3.9.

3.5. Análise Estatística

Os dados provenientes da avaliação comportamental e física da prole foram analisados utilizando-se primeiramente o teste de Bartlett para determinação da distribuição paramétrica ou não paramétrica. Após esta análise, para os dados com distribuição paramétrica foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey Kramer e para os dados com distribuição não paramétrica foi utilizado o teste de Kruskal Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney.

O teste escolhido para a análise de malformações e anomalias em filhotes foi o teste de Fischer.

O intervalo de confiança aceitável para todos os testes foi de 5%.

4. Resultados

Efeitos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* sobre parâmetros do desenvolvimento físico e comportamental da prole de ratas tratadas com 1,0 mg/Kg em diferentes períodos gestacionais.

*4.1. Experimento 1 - Efeitos da injeção do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* sobre parâmetros do desenvolvimento físico e comportamental da prole de ratas tratadas no 10º dia de prenhez.*

Os resultados mostrados na figura 1 indicam que as variações de peso materno entre os dias 0 e 5, 5 e 10 e 10 e 16 da gestação não foram significantes [F(2,29)= 0,653; 0,637; 0,027; p>0,05]. Entretanto, observa-se que houve um aumento significativo na variação de peso materno entre o 16º e 21º dia gestacional [F(2,29)= 4,052; p<0,05].

Em relação ao desenvolvimento físico pós-natal da prole de mães que receberam veneno no 10º dia gestacional, observou-se que o desdobramento de orelhas [H= 6,597; p> 0,05], a abertura de ouvidos [H=8,602; p> 0,05], a erupção dos dentes incisivos [H=3,240; p> 0,05], abertura de olhos [H= 11,729; p> 0,05], abertura do canal vaginal [H= 0,805; p> 0,05] e descida dos testículos [H= 1,332; p> 0,05] ocorreram normalmente, sem alteração em relação ao grupo controle (tabela 1). Entretanto, nas figuras 2 e 3 respectivamente, observamos um aumento de peso de filhotes tanto fêmeas [F(2,101)=11,793; p<0,05] como machos [F(2,106)=10,666; p<0,05] no 20º dia de vida. Nos demais dias não foram notadas alterações significativas para fêmeas [F(2,105)= 0,010; F(2,101)= 0,162; F(2,102)= 0,371] nem para machos [F(2,117)= 0,231; F(2,116)= 0,181; F(2,108)= 0,630; p<0,05].

Quanto ao desenvolvimento comportamental dos filhotes, observou-se um aumento do tempo do reflexo de preensão palmar testado no 6º dia de vida (tabela 2) [F(2,203)=6, 319, p> 0,05]. Nos demais dias de observação deste reflexo não foram encontradas alterações [F(2,224)=

1,141; $F(2,139)=6,427$ $p < 0,05$]. O reflexo postural representado na tabela 3 [$F(2,224)=4,984$; $F(2,225)=8,445$; $F(2,224)=1,248$; $F(2,222)=0,144$; $p > 0,05$] e o reflexo de geotaxia negativa representado na tabela 4 [$F(2,150)=5,190$; $F(2,217)=13,634$; $F(2,220)=14,107$; $F(2,216)=1,021$; $p > 0,05$] não sofreram alterações. Muitos filhotes observados no 6º dia de vida não apresentavam o reflexo de geotaxia negativa, fato não significativo, pois ocorreu tanto em animais controle quanto experimentais.

A atividade geral (figura 4) [$F(2,221)=3,782$; $F(2,213)=2,497$; $F(2,211)=0,433$; $F(2,210)=9,357$; $p > 0,05$] e a atividade locomotora (figura 5) [$F(2,221)=2,345$; $F(2,213)=1,235$; $F(2,211)=0,359$; $F(2,210)=11,196$; $p > 0,05$] registrada pela caixa de atividade também não foram alteradas.

4.2. Experimento 2 - Efeitos da injeção do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus sobre parâmetros do desenvolvimento físico e comportamental da prole de ratas tratadas no 16º dia de prenhez.

Os resultados obtidos estão descritos na figura 1 e indicam que a variação de peso materno não foi significativa em nenhum dos períodos analisados [$F(2,29)=0,653$; $0,637$; $0,027$; $4,052$; $p > 0,05$].

Os parâmetros físicos dos filhotes foram observados em diferentes dias que estão descritos no delineamento experimental. Verificou-se que houve um adiantamento no desdobramento de orelhas (tabela 1) [$H=6,597$; $p < 0,05$], e um retardo na abertura do orifício do ouvido (tabela 1) [$H=8,602$; $p < 0,05$]. Nas figuras 2 e 3 respectivamente, observamos um aumento de peso de filhotes tanto fêmeas [$F(2,101)=11,793$ $p < 0,05$] como machos [$F(2,106)=10,666$; $p < 0,05$] no 20º dia de vida. Nos demais dias observados não foram notadas alterações significativas para fêmeas [$F(2,105)=0,010$; $F(2,101)=0,162$; $F(2,102)=0,371$; $p > 0,05$] nem para machos [$F(2,117)=0,231$; $F(2,116)=0,181$; $F(2,108)=0,630$; $p > 0,05$].

Os outros parâmetros como abertura de olhos [$H=11,729$; $p > 0,05$], erupção dos dentes incisivos [$H=3,240$; $p > 0,05$], abertura do canal vaginal

[H= 0,805; $p > 0,05$] e descida dos testículos [H= 1,332; $p > 0,05$] não foram significativamente alterados (tabela 1).

Em relação ao desenvolvimento comportamental dos filhotes, observou-se uma diminuição do tempo do reflexo postural testado no 6º dia de vida (tabela 3) [F(2,225)=8,445; $p > 0,05$] e uma diminuição do tempo do reflexo de geotaxia negativa observado nos dias 6 [F(2,150)=5,190; $p < 0,05$], 8 [F(2,217)=13,634; $p < 0,05$] e 10 de vida [F(2,220)=14,107; $p < 0,05$] (tabela 4). Muitos filhotes observados no 6º dia de vida não apresentavam este reflexo, fato não significativo, pois ocorreu tanto em animais controle quanto experimentais. Já para o reflexo de preensão palmar testado no 8º dia [F(2,139)= 6,427; $p < 0,05$] foi observado um aumento no tempo de ocorrência em relação ao controle (tabela 2). Nos demais dias de observação deste reflexo não foram verificadas alterações [F(2,224)=4,984; F(2,203)= 6,319; $p > 0,05$]

A atividade geral (figura 4) [F(2,221)= 3,782; F(2,213)=2,497; F(2,211)=0,433; F(2,210)=9,357; $p > 0,05$] e a atividade locomotora (figura 5) [F(2,221)=2,345; F(2,213)=1,235; F(2,211)=0,359; F(2,210)=11,196; $p > 0,05$] registrada pela caixa de atividade também não foram alteradas.

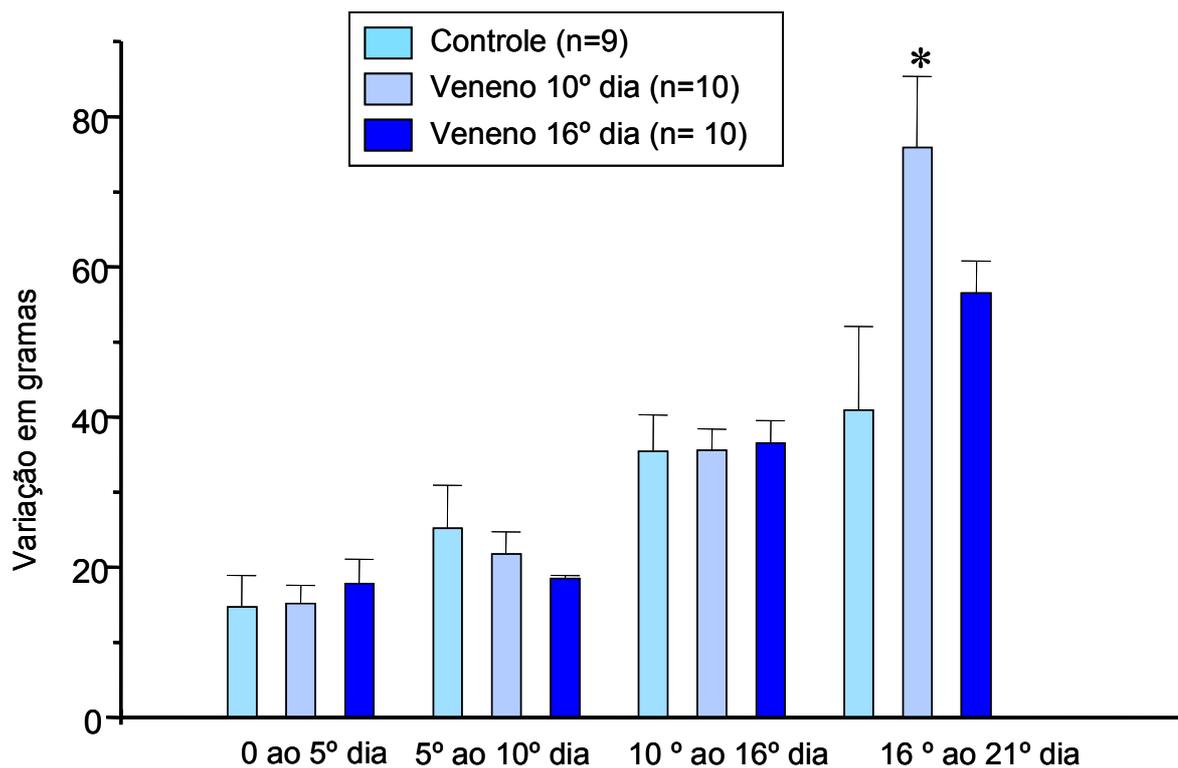


Figura 2- *Varição em gramas do peso materno durante a gestação em fêmeas tratadas no 10º ou 16º dia de prenhez com 1,0 mg/Kg de veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus*

- Os dados se referem à média \pm erro padrão da média
- * Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$)- Teste ANOVA seguido de Teste de Tukey Kramer.
- n = número de fêmeas tratadas

Tabela 1- Observação dos dias de ocorrência dos eventos relacionados aos parâmetros físicos da prole de mães tratadas no 10º ou 16º dia gestacional com o veneno bruto (1,0 mg/Kg) do escorpião *Tityus serrulatus*

Parâmetros Físicos	Controle	n	Veneno - 10º dia	n	Veneno - 16º dia	n
Desdobramento de orelhas (em dias)	4,1 ± 0,1	72	4,1 ± 0,1	76	3,9 ± 0,1*	79
Abertura do orifício do ouvido (em dias)	6,0 ± 0,1	48	6,3 ± 0,1	54	6,7 ± 0,1*	56
Erupção dos dentes incisivos (em dias)	9,6 ± 0,1	72	9,4 ± 0,1	76	9,3 ± 0,1	78
Abertura dos olhos (em dias)	14,4 ± 0,1	70	14,6 ± 0,1	74	14,3 ± 0,1	71
Descida dos testículos (em dias)	14,7 ± 0,2	33	14,8 ± 0,4	38	14,1 ± 0,40	38
Abertura do canal vaginal (em dias)	36,4 ± 0,6	35	35,2 ± 0,3	37	35,1 ± 0,4	31

Os dados se referem à média ± erro padrão da média
n= número de filhotes observados

* Significativamente diferente do controle (p < 0,05)- Teste Kruskal Wallis seguido de Teste U de Mann Whitney.

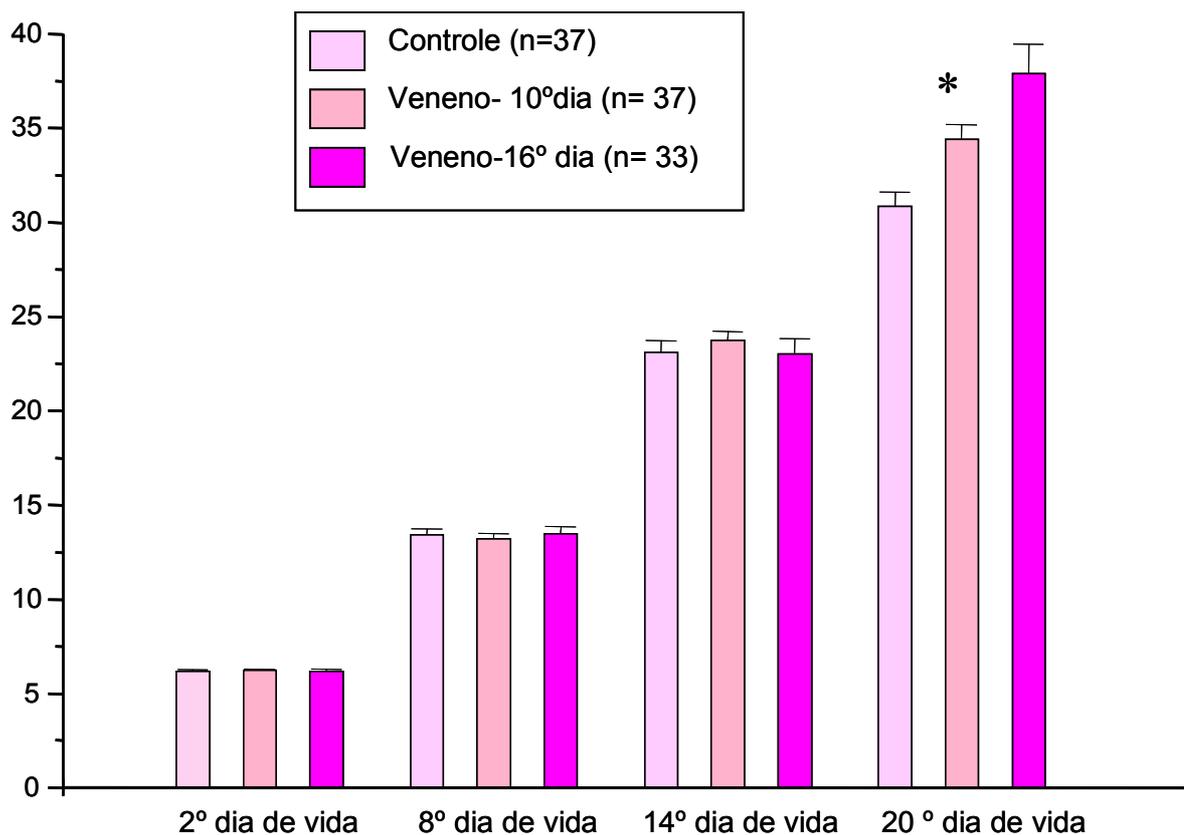


Figura 3- *Peso em gramas de filhotes fêmeas provenientes de mães tratadas no 10º ou 16º dia gestacional com 1,0 mg/kg do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus.*

- Os dados se referem à média \pm erro padrão da média

- * Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$)- Teste ANOVA seguido de Teste de Tukey Kramer

- n= número de animais pesados

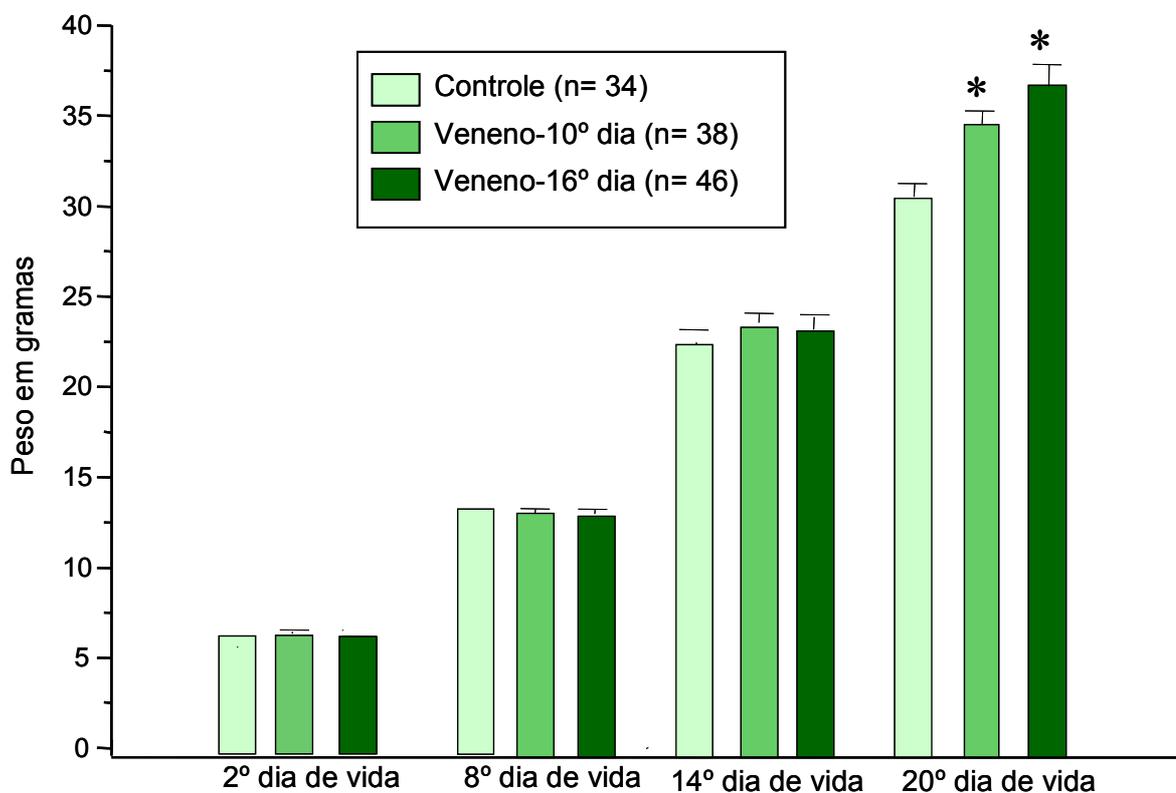


Figura 4- *Peso em gramas de filhotes machos provenientes de mães tratadas no 10º ou 16º dia gestacional com 1,0 mg/Kg do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus.*

-Os dados se referem à média \pm erro padrão da média

- Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$)- Teste ANOVA seguido de Teste de Tukey Kramer.*

- n= número de animais pesados

Tabela 2- Tempo para ocorrência (em segundos) do reflexo de preensão palmar da prole de mães tratadas no 10º ou 16º dia de prenhez com 1,0mg/Kg de veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*.

Dias de observação do reflexo	Controle (segundos)	n	Veneno 10º dia (segundos)	n	Veneno 16º dia (segundos)	n
4º dia de vida	1,6 ± 0,1	71	1,4 ± 0,1	76	1,6 ± 0,1	80
6º dia de vida	2,8 ± 0,4	62	6,6 ± 1,5 *	74	2,5 ± 0,2	70
8º dia de vida	2,0 ± 0,2	49	2,1 ± 0,1	45	3,5 ± 0,5*	48

Os dados se referem à média ± erro padrão da média

n= número de filhotes observados

* Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$)- Teste ANOVA seguido de Teste de Tukey Kramer.

Tabela 3- Tempo de ocorrência (em segundos) do reflexo postural da prole de mães tratadas no 10º ou 16º dia de prenhez com 1,0 mg /Kg de veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*.

Dias de observação do reflexo	Controle (segundos)	n	Veneno 10º dia (segundos)	n	Veneno 16º dia (segundos)	n
4º dia de vida	11,4 ± 1,3	72	12,8 ± 1,7	75	7,1 ± 0,9	80
6º dia de vida	9,2 ± 1,5	72	7,4 ± 1,4	76	2,7 ± 0,3 *	80
8º dia de vida	2,8 ± 0,6	72	2,5 ± 0,3	76	1,9 ± 0,2	79
10º dia de vida	1,5 ± 0,2	72	1,4 ± 0,1	76	1,5 ± 0,3	77

Os dados se referem à média ± erro padrão da média

n= número de filhotes observados

* Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$)- Teste ANOVA seguido de Teste de Tukey Kramer

Tabela 4- Tempo de ocorrência (em segundos) do reflexo de geotaxia negativa da prole de mães tratadas no 10º ou 16º dia de prenhez com 1,0 mg /Kg de veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*.

Dias de observação do reflexo	Controle (segundos)	n	Veneno 10º dia (segundos)	n	Veneno 16º dia (segundos)	n
6º dia de vida	66,3 ± 6,9	48	64,9 ± 7,2	38	41,4 ± 5,6*	67
8º dia de vida	40,3 ± 3,5	72	45,3 ± 4,4	71	22,2 ± 1,7 *	77
10º dia de vida	22,6 ± 1,7	71	22,8 ± 1,2	76	14,2 ± 1,0*	76
12º dia de vida	10,2 ± 0,8	70	10,1 ± 0,7	76	8,8 ± 0,7	73

Os dados se referem à média ± erro padrão da média

n= número de filhotes observados

* Significativamente diferente do controle (p < 0,05)- Teste ANOVA seguido de Teste de Tukey Kramer

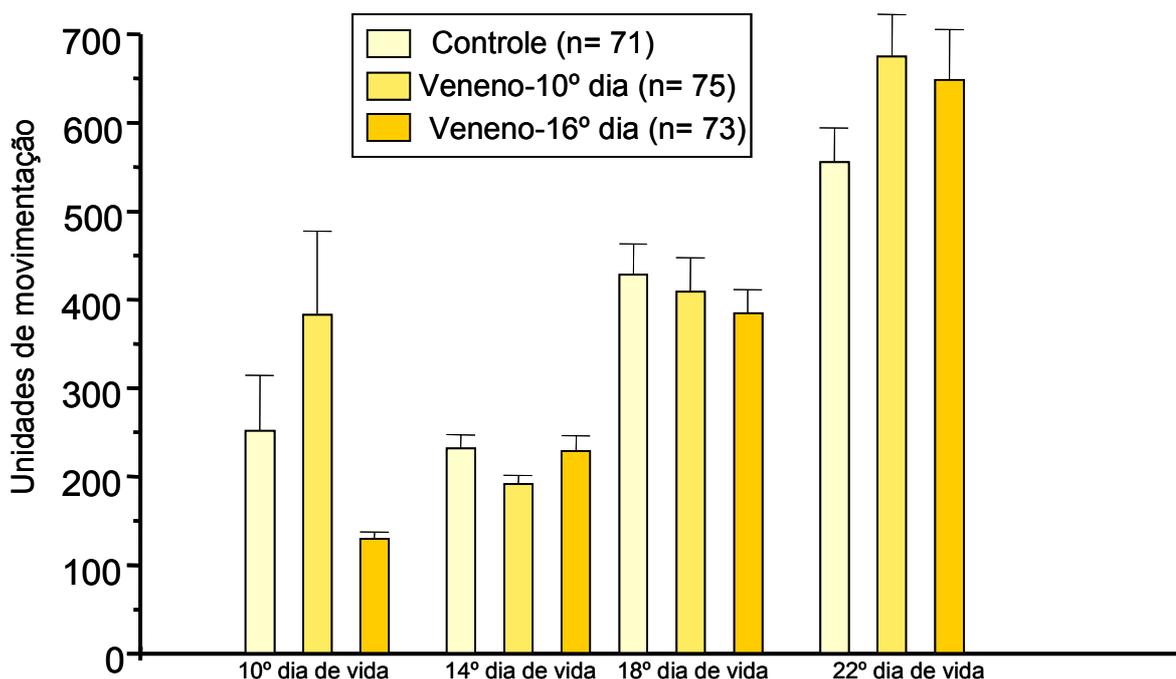


Figura 5- Registro da atividade geral na caixa de atividade (em unidades de movimentação) observado na prole de mães tratadas no 10° ou 16° dia de prenhez com 1,0 mg/Kg de veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*.
- Os dados se referem à média \pm erro padrão da média. Teste ANOVA seguido de Teste de Tukey Kramer. n= número de animais observados

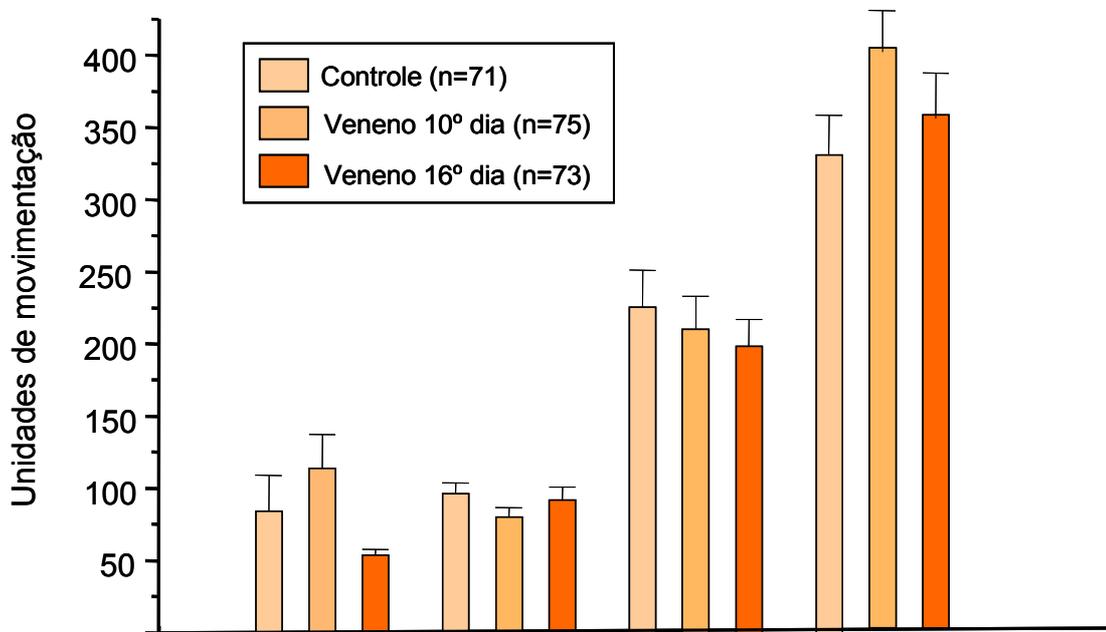


Figura 6- Registro da atividade locomotora na caixa de atividade (em unidades de movimentação) observado na prole de mães tratadas no 10° ou 16° dia de prenhez com 1,0mg/Kg de veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*.
- Os dados se referem à média \pm erro padrão da média. Teste ANOVA seguido de Teste de Tukey Kramer. n= número de animais observados

Efeitos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* sobre o desempenho reprodutivo e parâmetros sanguíneos de ratas tratadas com 3,0 mg/Kg em diferentes períodos gestacionais.

*4.3. Experimento 3 – Avaliação do desempenho reprodutivo materno e da incidência de malformações e anomalias após a injeção de 3,0mg/Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º dia de prenhez.*

Os resultados mostrados na figura 6 indicam que a variação de peso materna não foi significativa em nenhum dos períodos analisados [$F(2,28)= 6,452; 2,586; 2,898; 0,055; p > 0,05$].

O peso do útero [$F(2,28)= 1,736; p > 0,05$] (tabela 6) bem como o número de corpos lúteos [$H= 1,960; p > 0,05$], de reabsorções [$H= 0,322; p > 0,05$] e de implantes totais [$H= 4,916; p > 0,05$] não foram alterados em mães que receberam veneno no 5º dia de prenhez (tabela 5).

As perdas pré-implantações [$H= 2,756; p > 0,05$] e pós-implantação [$H= 8,031; p > 0,05$] também não foram significativamente alteradas (tabela 5).

Nas tabelas 5 e 6 observa-se que o número de filhotes vivos [$F(2,28)= 1,736; p > 0,05$], o número de filhotes mortos [$F(2,28)= 1,736; p > 0,05$], os seus pesos ao nascimento [$F(2,326)= 0,508; p > 0,05$] e o peso de suas placentas [$F(2,236)= 3,610; p > 0,05$] não apresentaram alterações significativas.

Em relação ao peso de órgãos de filhotes, houve um aumento no peso do fígado [$F(2,103)= 17,516; p < 0,05$]. Os demais órgãos analisados como rins [$F(2,102)= 1,609; p > 0,05$], coração [$F(2,100)= 0,855; p > 0,05$] e pulmão [$F(2,102)= 2,723; p > 0,05$] não apresentaram alterações (tabela 7).

Estes órgãos, juntamente com as placentas foram analisados microscopicamente e não foram encontradas alterações nas suas principais estruturas. Foram analisados 29 placentas, 20 corações, 19 fígados, 20 pulmões e 16 rins.

Quanto à avaliação da incidência de malformações e anomalias externas reconhecíveis ao nascimento, não foi observada nenhuma alteração nos grupos analisados (tabela 8).

Nos filhotes destinados à avaliação da incidência de malformações e anomalias esqueléticas não foi observado nenhum tipo de malformação óssea. Foram observadas costelas onduladas e a presença da 14^a costela vestigial, no entanto, nenhum destes parâmetros apresentou significância em relação ao grupo controle (tabela 9).

Os resultados da avaliação de incidência de malformações e anomalias viscerais (tabela 10) indicam que não houve diferença significativa entre os parâmetros observados, mas foi notada hemorragia cerebral mais acentuada em filhotes cujas mães receberam veneno.

Na tabela 11 as análises dos números de centros de ossificação de filhotes revelaram que não houve diferença significativa em falange anterior [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], falange posterior [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], metacarpos [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], metatarsos [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], estenébrios [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], vértebras cervicais [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], vértebras torácicas [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], vértebras lombares [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], vértebras sacrais [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], e vértebras caudais [F(2,102)= 1,609; p> 0,05].

4.4. Experimento 4 – Avaliação do desempenho reprodutivo materno após a injeção de 3,0 mg/Kg do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus no 10º dia de prenhez.

Os resultados descritos na figura 6 indicam que não houve variação de peso materno de fêmeas que receberam veneno no 10º dia gestacional [F(2,28)= 6,452; 2,586; 2,898; 0,055; p> 0,05].

O peso do útero [F(2,28)= 1,736; p> 0,05] (tabela 6) bem como o número de corpos lúteos [H= 1,960; p>0,05], de reabsorções [H= 0,322; p> 0,05] e de implantes totais [H= 4,916; p> 0,05] não foram alterados em mães que receberam veneno no 10º dia de prenhez (tabela 5).

As perdas pré-implantações [H= 2,756; $p > 0,05$] também não apresentaram alterações significativas, ao contrário das perdas pós-implantações [H= 8,031; $p > 0,05$], que aumentaram nas mães deste grupo (tabela 5).

Nas tabelas 5 e 6 pode-se observar que o número de filhotes vivos [F(2,28)= 1,736; $p > 0,05$], o número de filhotes mortos [F(2,28)= 1,736; $p > 0,05$], os seus pesos ao nascimento [F(2,326)= 0,508; $p > 0,05$] e o peso de suas placentas [F(2,236)= 3,610; $p > 0,05$] não foram significativamente alterados.

Em relação ao peso de órgãos de filhotes, foi observado que houve um aumento no peso do fígado [F(2,103)= 17,516; $p < 0,05$] dos mesmos. Os demais órgãos analisados como rins [F(2,102)= 1,609; $p > 0,05$], coração [F(2,100)= 0,855; $p > 0,05$] e pulmão [F(2,102)= 2,723; $p > 0,05$] não apresentaram alterações (tabela 7).

Estes órgãos, juntamente com as placentas, foram analisados microscopicamente e não foram observadas alterações significativas nas suas principais estruturas. Foram analisados 28 placentas, 14 corações, 18 fígados, 19 pulmões e 14 rins.

Quanto à avaliação da incidência de malformações e anomalias externas reconhecíveis ao nascimento, elas não ocorreram em nenhum dos grupos analisados (tabela 8).

Nos filhotes destinados à avaliação da incidência de malformações e anomalias esqueléticas não foi observado nenhum tipo de malformação óssea, no entanto as anomalias esqueléticas foram comumente observadas nos dois grupos. Contudo, uma destas anomalias, a ossificação craniana, foi observada com frequência significativamente maior em filhotes de mães tratadas ($p < 0,05$). Os ossos parietais e/ou occipitais dos filhotes apresentaram-se ligeiramente afundados. Esta observação não pode ser feita logo após o nascimento dos filhotes, somente foi notada após a coloração e preparo para a análise esquelética. Outras anomalias observadas foram às costelas onduladas e a presença da 14^a costela vestigial, no entanto, não diferiram do controle (tabela 9).

Os resultados da avaliação de incidência de malformações e anomalias viscerais (tabela 10) indicam que não houve alteração significativa entre os parâmetros observados, mas apesar disso, notamos uma hemorragia cerebral mais acentuada em filhotes cujas mães receberam veneno.

Ilustradas na tabela 11 as análises dos números de centros de ossificação de filhotes revelaram que não houve diferença significativa em falange anterior [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], falange posterior [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], metacarpos [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], metatarsos [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], estenébrios [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], vértebras cervicais [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], vértebras torácicas [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], vértebras lombares [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], vértebras sacrais [F(2,102)= 1,609; p> 0,05], e vértebras caudais [F(2,102)= 1,609; p> 0,05].

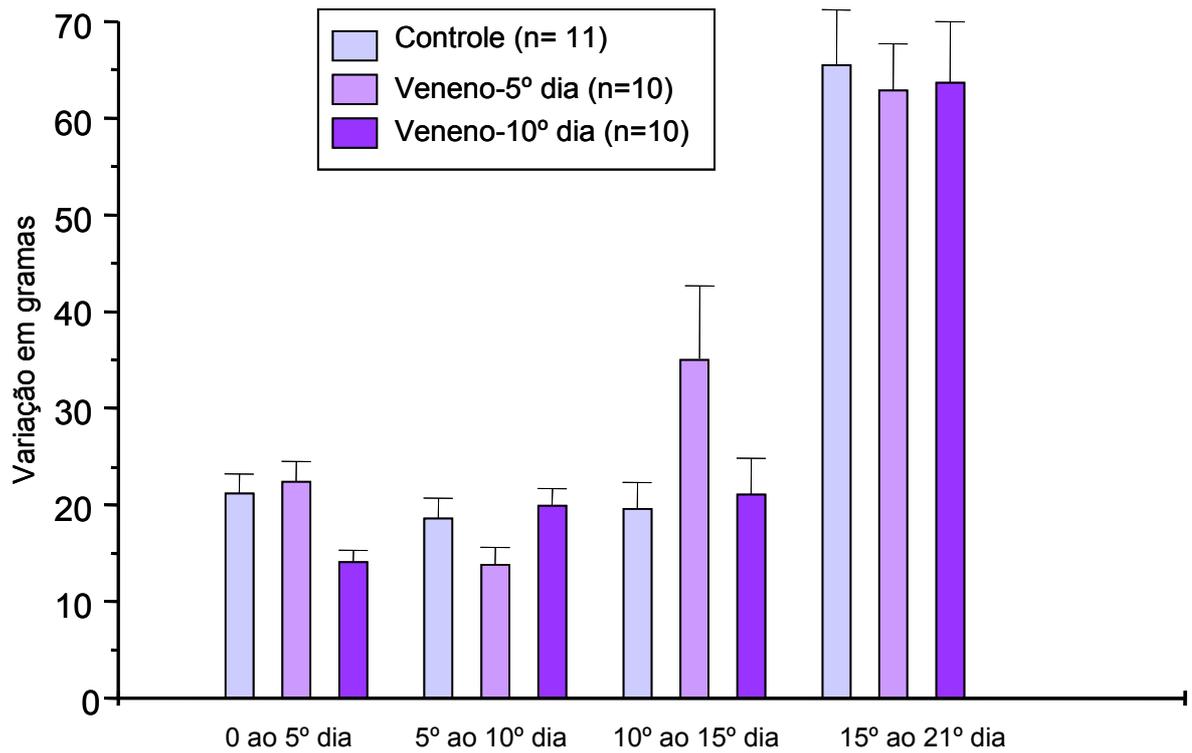


Figura 7- Variação em gramas do peso materno de fêmeas submetidas a avaliação do desempenho reprodutivo que foram tratadas no 5º ou 10º dia de prenhez com 3,0mg /Kg de veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus*

Os dados se referem à média \pm erro padrão da média

* Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$)- Teste ANOVA seguido de Teste de Tukey Kramer

n= número de fêmeas

Tabela 5- Análise dos parâmetros do desempenho reprodutivo materno após injeção de 3,0 mg/Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* em diferentes períodos de gestação.

Parâmetros	Controle (n=11)	Veneno 5º dia (n = 10)	Veneno 10º dia (n=10)
Reabsorções (número absoluto)	0,363 ± 0,203	0,200 ± 0,133	0,200 ± 0,133
Implantes (número absoluto)	9,454 ± 1,115	12,200 ± 0,757	11,200 ± 0,940
Corpos Lúteos (número absoluto)	12,272 ± 0,675	13,600 ± 0,670	12,600 ± 0,371
Perdas Pré implantações (índice)	0,257 ± 0,076	0,133 ± 0,035	0,154 ± 0,069
Perdas Pós implantações (índice)	0,000 ± 0,000	0,140 ± 0,067	0,147 ± 0,058*
Filhotes vivos (número absoluto)	9,272 ± 1,088	11,700 ± 0,746	10,600 ± 0,956
Filhotes mortos (número absoluto)	0,000 ± 0,000	1,400 ± 0,945	0,900 ± 0,706

Os dados se referem à média ± erro padrão da média

* Significativamente diferente do controle (p< 0,05) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

n = número de fêmeas tratadas.

Tabela 6- *Análise dos pesos de placentas, útero e filhotes e provenientes de mães que receberam injeção de 3,0 mg/Kg do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus em diferentes períodos de gestação.*

Pesos (em gramas)	Controle	Veneno 5º dia	Veneno 10º dia
Peso do Útero	68,1 ± 7,5	84,6 ± 4,6	77,7 ± 6,3
Pesos Filhotes	5,4 ± 0,3	5,1 ± 0,1	5,2 ± 0,4
Pesos Placentas	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0

Os dados se referem à média ± erro padrão da média

* Significativamente diferente do controle (p< 0,05) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

O número de total de filhotes observados foram respectivamente: 107 (grupo controle), 120 (veneno 5º dia) e 106 (veneno 10º dia).

Tabela 7- *Pesos de órgãos de filhotes provenientes de mães que receberam injeção de 3,0mg/Kg do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus em diferentes períodos de gestação.*

Pesos de órgãos (em gramas)	Controle	n	Veneno 5º dia	n	Veneno 10º dia	n
Fígado	0,29+0,01	37	0,41+0,02*	32	0,40+0,01*	37
Pulmão	0,10+0,00	37	0,14+0,02	31	0,12+0,00	37
Coração	0,04+0,01	34	0,03+0,00	32	0,03+0,00	37
Rins	0,04+0,00	37	0,04+0,00	32	0,04+0,00	36

Os dados se referem à média ± erro padrão da média

Significativamente diferente do controle (p< 0,05) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

n = número de filhotes cujos órgãos foram analisados. Os rins foram pesados aos pares.

Tabela 8- Avaliação da incidência de malformações e de anomalias externas observadas nos filhotes de mães que receberam veneno de 3,0mg/Kg no 5º ou 10º dia gestacional.

Parâmetros	Controle (n=10)	Veneno - 5º dia (n = 10)	Veneno - 10º dia (n=10)
<i><u>Malformações externas</u></i>			
Número de fetos afetados	0/23	0/35	0/25
Número de ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10
<i><u>Anomalias externas</u></i>			
Número de fetos afetados	0/23	0/35	0/25
Número de ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10

n = número de fêmeas tratadas.

Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais e controle (p> 0,05).

Tabela 9- *Avaliação da incidência de malformações ou anomalias esqueléticas observadas nos filhotes de mães que receberam veneno de 3,0mg/Kg no 5º ou 10º dia gestacional.*

Parâmetros	Controle (n=10)	Veneno - 5º dia (n = 10)	Veneno - 10º dia (n=10)
<i><u>Malformações esqueléticas</u></i>			
Número de fetos afetados	0/37	0/32	0/36
Número de ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10
<i><u>Anomalias esqueléticas</u></i>			
Número de fetos afetados	1/37	2/32	12/36 *
Número de ninhadas afetadas	1/10	2/10	6/10
Ossificação craniana afetada	0/37	2/32	12/36*
Costelas onduladas	1/37	2/32	0/36
Costelas fundidas	0/37	0/32	0/36
Vértebras divididas	0/37	0/32	0/36
14ª costela vestigial	3/37	1/32	1/36

n = número de fêmeas tratadas.

* Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$) – Prova exata de Fischer.

Tabela 10- Avaliação da incidência de malformações e de anomalias viscerais observadas nos filhotes de mães que receberam veneno (3,0mg/Kg) no 5º ou 10º dia gestacional.

Parâmetros	Controle (n=10)	Veneno - 5º dia (n = 10)	Veneno - 10º dia (n=10)
<i>Malformações viscerais</i>			
Número de fetos afetados	0/23	0/35	0/25
Número de ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10
<i>Anomalias viscerais</i>			
Número de fetos afetados	3/23	5/35	4/25
Número de ninhadas afetadas	2/10	4/10	3/10
Hemorragia cerebral	3/23	4/35	4/25
Ectopia renal	0/23	0/35	0/25
Hipoplasia renal	0/23	0/35	0/25
Ouvido interno achatado	0/23	0/35	0/25
Diencéfalo poroso	0/23	0/35	0/25

n = número de fêmeas tratadas. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais e controle ($p > 0,05$). Prova exata de Fischer

Tabela 11- Número de centros de ossificação de filhotes de mães que receberam veneno bruto (3,0mg/Kg) no 5º dia ou 10º dia de gestação.

	Controle n= 37	Veneno 5º dia n= 32	Veneno 10º dia n= 36
Falange anterior	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,4 ± 0,1
Falange posterior	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1
Metacarpos	4,0 ± 0,1	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0
Metatarsos	4,0 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,0 ± 0,0
Estenóbrio	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0
Vértebras cervicais	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0
Vértebras torácicas	13,0 ± 0,0	13,0 ± 0,0	13,0 ± 0,1
Vértebras lombares	6,0 ± 0,0	5,9 ± 0,0	6,0 ± 0,0
Vértebras sacrais	5,0 ± 0,0	5,1 ± 0,1	5,0 ± 0,0
Vértebras caudais	4,5 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,2 ± 0,1

Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

Os dados se referem à média ± erro padrão da média

n = número de animais analisados

4.5. Experimento 5 - Efeitos do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus (3,0mg/Kg) sobre parâmetros bioquímicos maternos no 5º dia de prenhez.

Os resultados mostrados na figura 7 indicam que não houve variação significativa no peso de mães em nenhum dos períodos analisados [$F(3,44)=0,311$; $p>0,05$] A figura 8 indica que houve um aumento na glicemia [$F(5,59)=23,734$; $p<0,05$] de fêmeas que receberam veneno no 5º dia de gestação quando comparada com grupo controle e também com o grupo de machos. Os dois grupos que receberam veneno também apresentaram glicemia significativamente elevada em relação ao grupo de fêmeas não prenhes. As transaminases oxaloacética [$F(5,59)=0,324$; $p>0,05$] (figura 9) e pirúvica [$F(5,59)=1,179$; $p>0,05$] (figura 10) não apresentaram alterações em relação ao grupo de fêmeas que não recebeu veneno e nem em relação ao grupo de machos.

A amilase (figura 11) de fêmeas não prenhes apresentou-se significativamente maior em relação ao grupo de machos [$F(5,59)=3,016$; $p>0,05$].

4.6. Experimento 6 - Efeitos do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus (3,0mg/Kg) sobre parâmetros bioquímicos maternos no 10º dia de prenhez.

Os resultados mostrados na figura 7 indicam que não houve variação significativa no peso de mães em nenhum dos períodos analisados [$F(3,44)=0,311$, $F(1,22)=1,620$; $p>0,05$]. Pelos dados descritos na figura 8 podemos observar que a glicemia das fêmeas tratadas com veneno no 10º dia de gestação também apresentou um aumento significativo quando comparado com o grupo controle e com o grupo de machos. Os dois grupos que receberam veneno também apresentaram glicemia significativamente elevada em relação ao grupo de fêmeas não prenhes [$F(5,59)=23,734$; $p<0,05$]. A transaminase glutâmico oxaloacética [$F(5,59)=0,324$; $p>0,05$] (figura 9) e a transaminase glutâmico pirúvica [$F(5,59)=1,179$; $p>0,05$] (figura 10) não foram alteradas significativamente em nenhum dos grupos analisados.

A amilase (figura 11) de fêmeas não prenhes apresentou-se significativamente maior em relação ao grupo de machos [$F(5,59) = 3,016$; $p > 0,05$].

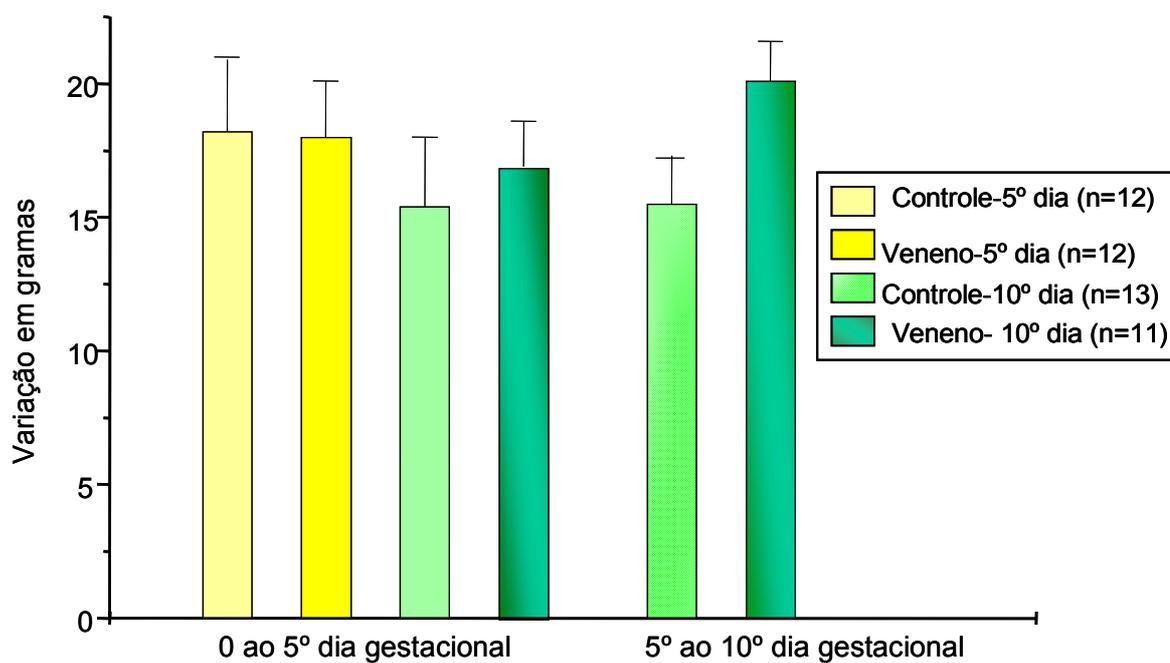


Figura 8- *Variação (em gramas) do peso materno durante a gestação de ratas submetidas às análises bioquímicas e hematológicas que receberam 3,0mg /Kg de veneno do escorpião Tityus serrulatus no 5º ou 10º dia gestacional.*

Os dados se referem à média \pm erro padrão da média

** Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$)- Teste ANOVA seguido de Teste de Tukey Kramer*

n= número de fêmeas

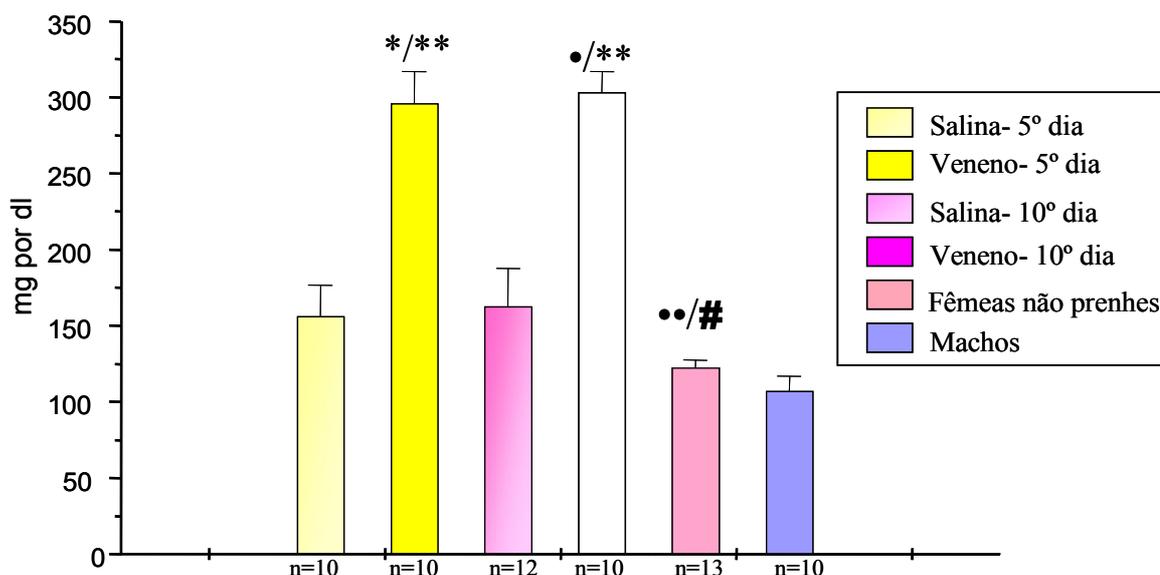


Figura 9- Glicemia após injeção de 3,0 mg/Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou 10º dia gestacional.

Os dados se referem à média \pm erro padrão da média

* Significativamente diferente do grupo de fêmeas prenhes que receberam salina no 5º dia gestacional ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

** Significativamente diferente do grupo de machos ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

• Significativamente diferente do grupo de fêmeas prenhes que receberam salina no 10º dia gestacional ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer

• • Significativamente diferente do grupo de fêmeas prenhes que receberam veneno no 5º dia gestacional ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

Significativamente diferente do grupo de fêmeas prenhes que receberam veneno no 10º dia gestacional ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

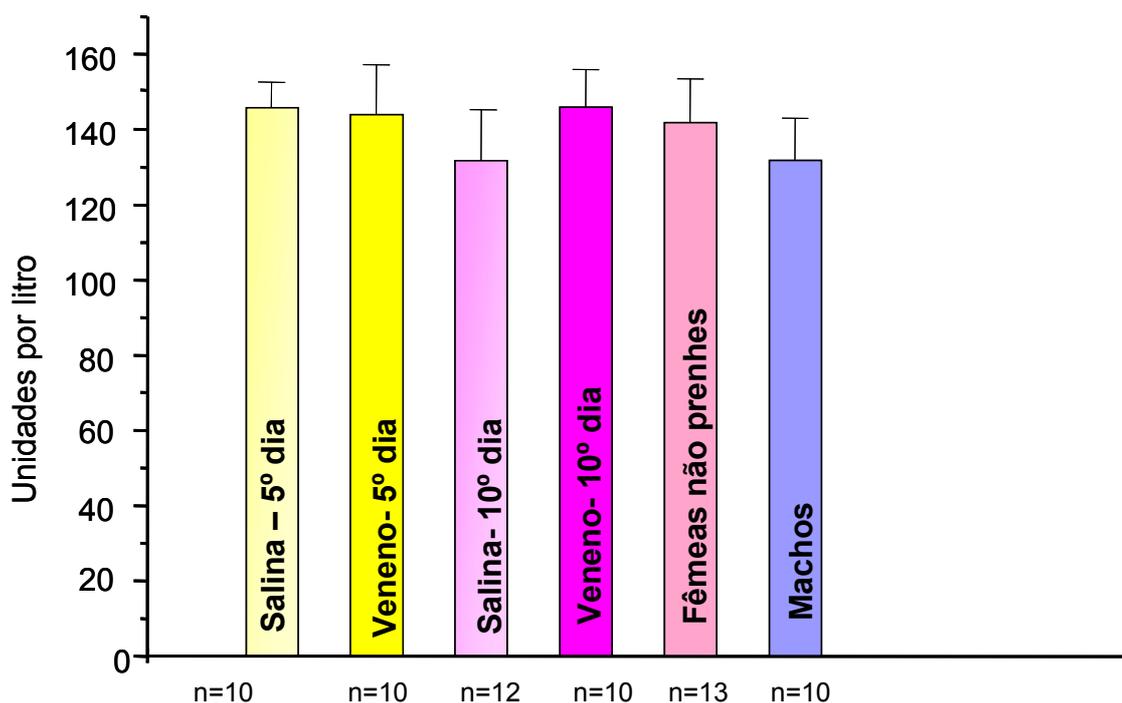


Figura 10- Transaminase glutâmico oxaloacética após injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou 10º dia de gestação.

Os dados se referem à média \pm erro padrão da média. Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer. n= número de animais tratados

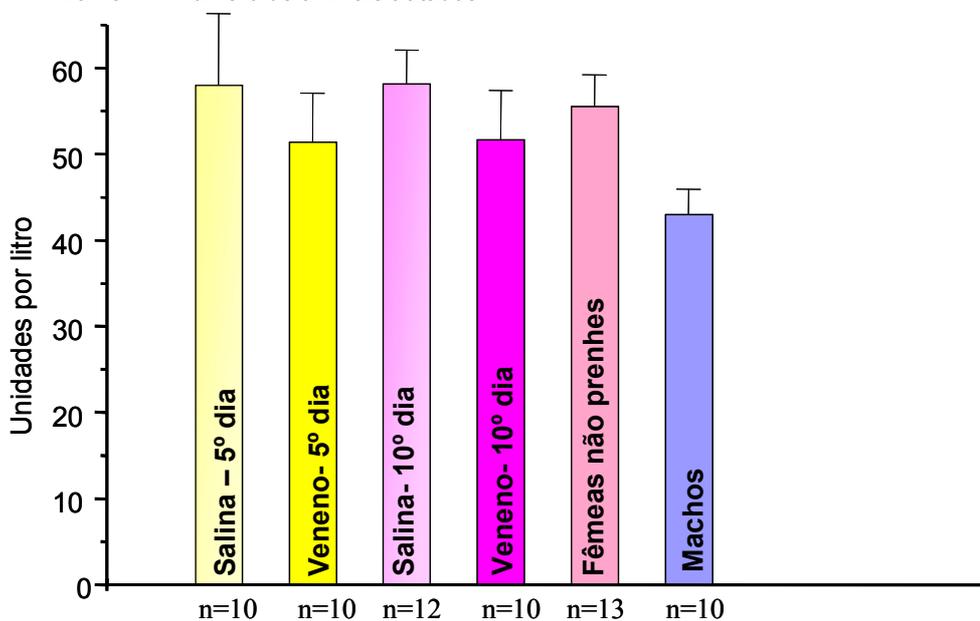


Figura 11- Transaminase glutâmico pirúvica após injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou 10º dia de gestação.

Os dados se referem à média \pm erro padrão da média. Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer. n= número de animais tratados

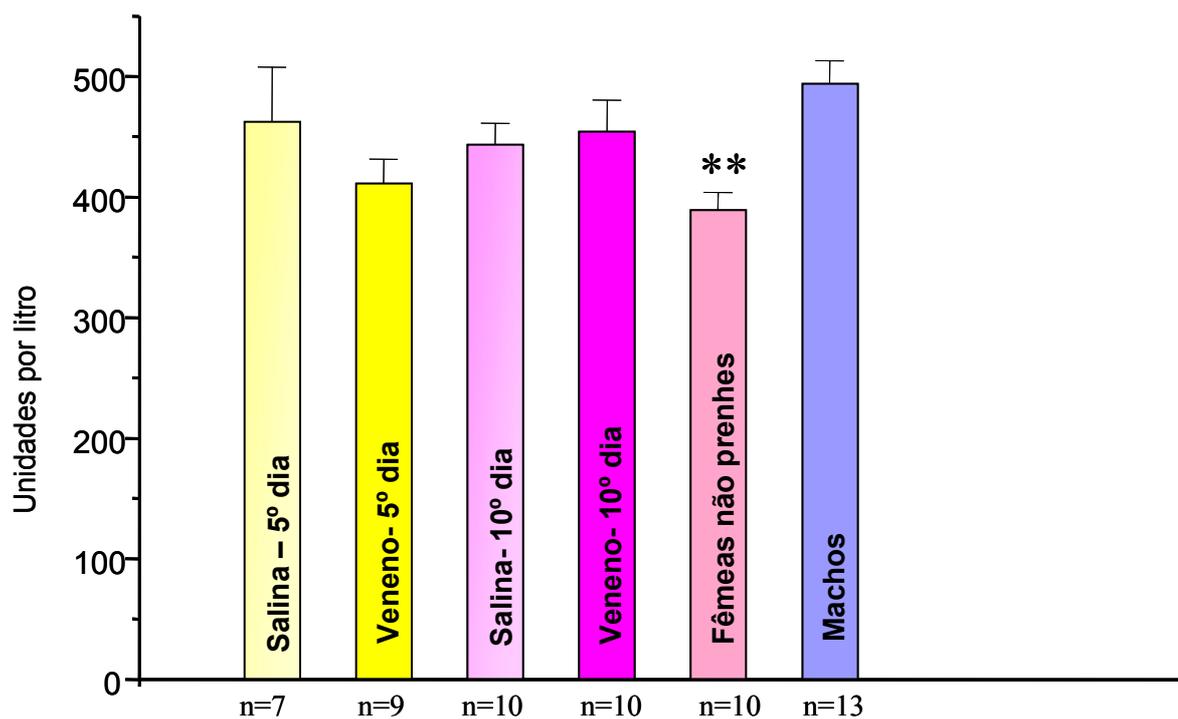


Figura 12- Amilase após injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou 10º dia de gestação.

** Significativamente diferente do grupo de machos ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

n= número de animais tratados

4.7. Experimento 7 - Efeitos do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus (3,0mg/Kg) sobre parâmetros hematológicos maternos no 5º dia de prenhez.

Na figura 7, a variação no peso de mães que receberam veneno não apresentou significância em relação ao grupo que recebeu salina no mesmo dia de gestação [F(3,44)= 0,311; p>0,05]

Os resultados ilustrados na figura 12 indicam que em relação ao grupo de machos, ocorreu aumento significativo na contagem global de hemácias do grupo de fêmeas prenhes que recebeu salina no 5º dia gestacional e do grupo de fêmeas não prenhes [F(5,59)= 4,462; p<0,05].

O hematócrito de machos (figura 13) apresentou valor maior do que o dos grupos de fêmeas que recebeu salina no 5º dia gestacional [F(5,59)= 5,143 p< 0,05].

A dosagem de hemoglobina (figura 14) do grupo de fêmeas prenhes que recebeu salina ou veneno no 5º dia gestacional apresentou-se diminuída em relação aos grupos de machos [F(5,59)= 5,759; p< 0,05].

Os índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio) [F(5,59)= 1,345; p>0,05], HCM (hemoglobina corpuscular média) [F(5,59)= 1,605; p>0,05], CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) [F(5,59)= 1,557; p>0,05] não apresentaram alterações significativas (figuras 15, 16 e 17 respectivamente).

Conforme descrito na figura 18, a contagem global de plaquetas [F(5,59)= 3,434; p<0,05] apresentou-se aumentada no grupo de fêmeas prenhes que recebeu salina no 5º dia gestacional quando comparadas ao grupo de fêmeas não prenhes e de machos.

Quando comparado ao grupo de machos, a contagem global de leucócitos [F(5,54)= 5,350; p<0,05] revelou-se diminuída no grupo de fêmeas prenhes que receberam veneno ou salina no 5º dia gestacional e no grupo de fêmeas não prenhes (figura 19).

A contagem diferencial de leucócitos para linfócitos [F(5,60)= 0,581; p>0,05], neutrófilos [F(5,60)= 5,503; p>0,05] e para monócitos [F(5,38)= 0,117; p>0,05] não mostrou alterações em nenhum dos grupos analisados (figuras 20, 21 e 22 respectivamente).

4.8. Experimento 8 - Efeitos do veneno bruto do escorpião Tityus serrulatus (3,0mg/Kg) sobre parâmetros hematológicos maternos no 10º dia de prenhez.

Na figura 7, a variação no peso de mães que receberam veneno não apresentou significância em relação ao grupo que recebeu salina no mesmo dia de gestação [F(3,44)= 0,311, F(1,22)= 1,620; p>0,05].

Os resultados mostrados na figura 12 indicam que em relação ao grupo de machos, ocorreram alterações significativas na contagem global de hemácias do grupo de fêmeas não prenhes e de fêmeas prenhes que receberam veneno ou salina no 10º dia gestacional [F(5,59)= 4,462; p<0,05].

O hematócrito de machos (figura 13) apresentou valor maior que do grupo de fêmeas que recebeu salina no 10º dia gestacional [F(5,59)= 5,143; p<0,05].

A dosagem de hemoglobina (figura 14) do grupo de machos apresentou-se aumentada em relação aos grupos de fêmeas prenhes que recebeu salina ou veneno no 10º dia gestacional. Foi observado também que o grupo de fêmeas não prenhes apresentou alteração significativa em relação ao grupo de fêmeas prenhes que recebeu salina no 10º dia gestacional [F(5,59)= 5,759; p<0,05].

Os índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio) [F(5,59)= 1,345; p>0,05], HCM (hemoglobina corpuscular média) [F(5,59)= 1,605; p>0,05], CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) [F(5,59)= 1,557; p>0,05] não apresentaram alterações significativas (figuras 15, 16 e 17 respectivamente).

Conforme descrito na figura 18, a contagem global de plaquetas apresentou-se normal [F(5,59)= 3,434; p>0,05] em todos os grupos deste experimento.

A contagem global de leucócitos [F(5,54)= 5,350; p<0,05] revelou-se valor maior no grupo de machos quando comparado aos grupos de fêmeas prenhes que receberam veneno ou salina no 10º dia gestacional e ao grupo de fêmeas não prenhes (figura 19).

A contagem diferencial de leucócitos para linfócitos [$F(5,60)= 0,581$; $p>0,05$], neutrófilos [$F(5,60)= 5,503$; $p>0,05$] e para monócitos [$F(5,38)= 0,117$; $p>0,05$] e não revelou alterações em nenhum dos grupos analisados (figuras 20, 21 e 22 respectivamente).

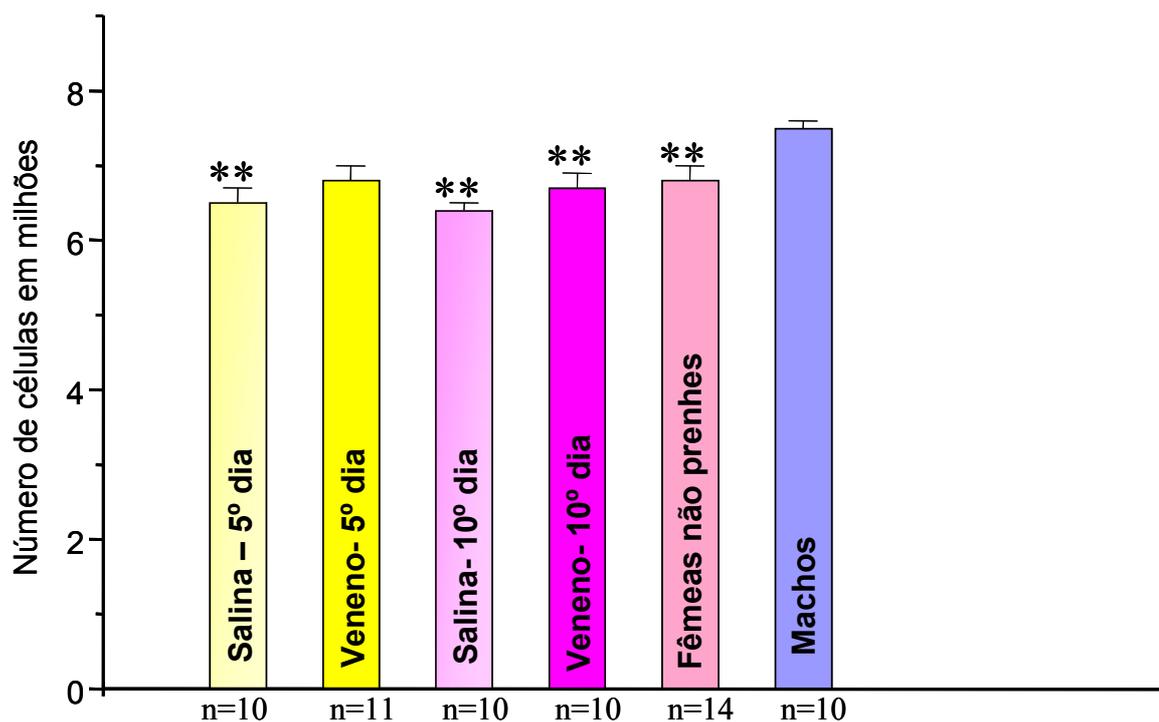


Figura 13- Contagem de glóbulos vermelhos após a injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou no 10º dia de gestação.
-** Significativamente diferente do grupo de machos ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.
- n= número de animais tratados

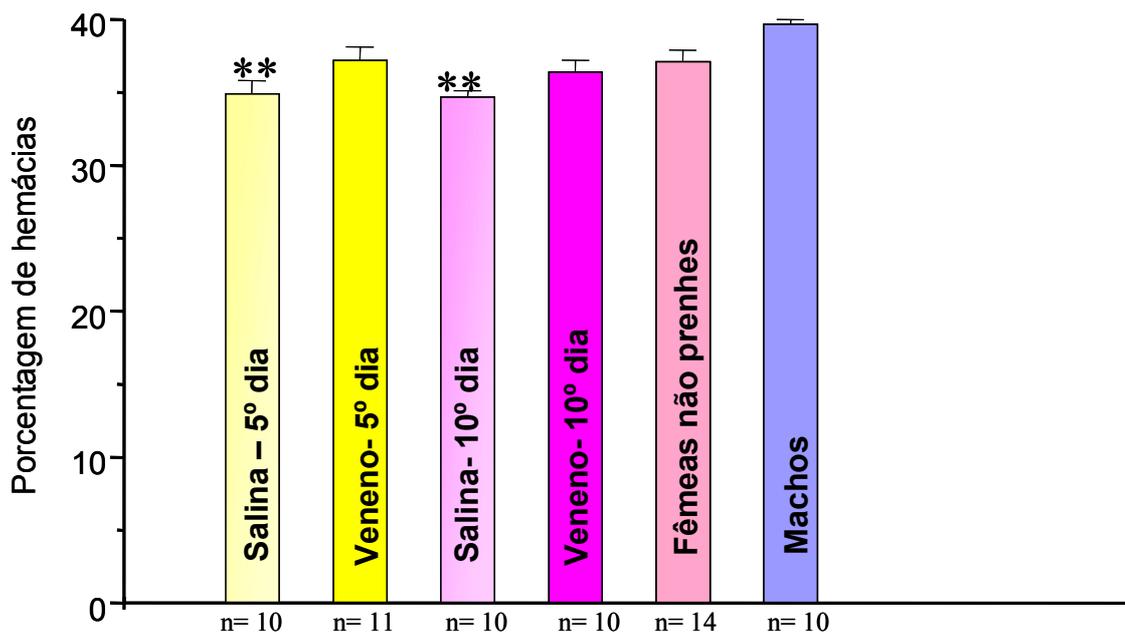


Figura 14- Valor do hematócrito após a injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou no 10º dia de gestação.

-** Significativamente diferente do grupo de machos ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

- n= número de animais tratados

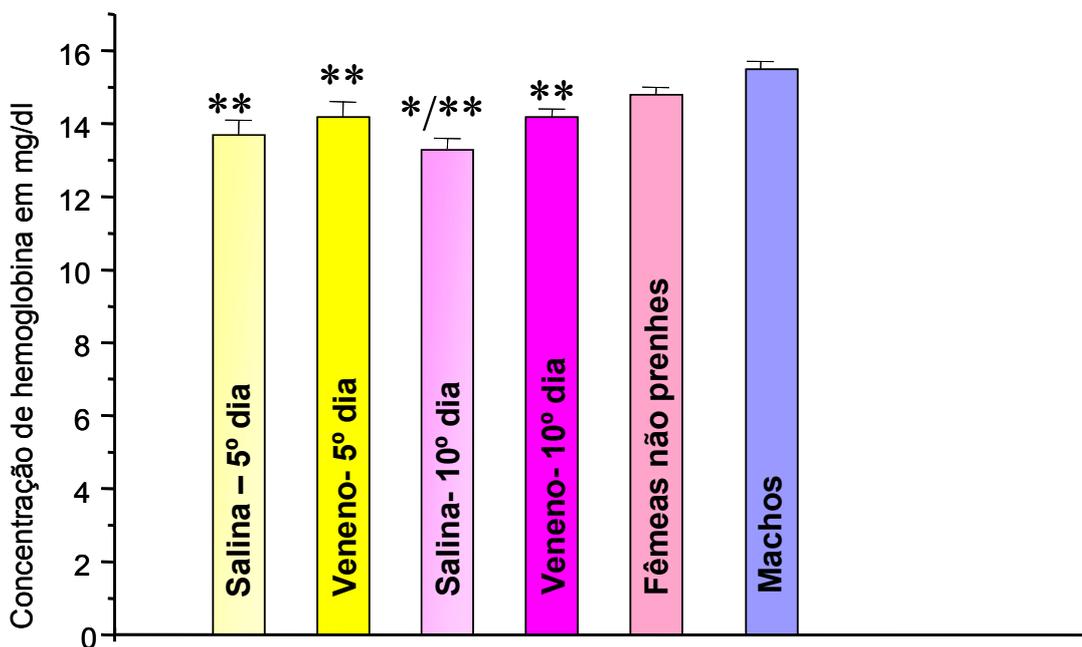


Figura 15- Dosagem de hemoglobina após a injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou no 10º dia de gestação.

-** Significativamente diferente do grupo de machos ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer. *Significativamente diferente do grupo de fêmeas não prenhes ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

- n= número de animais tratados

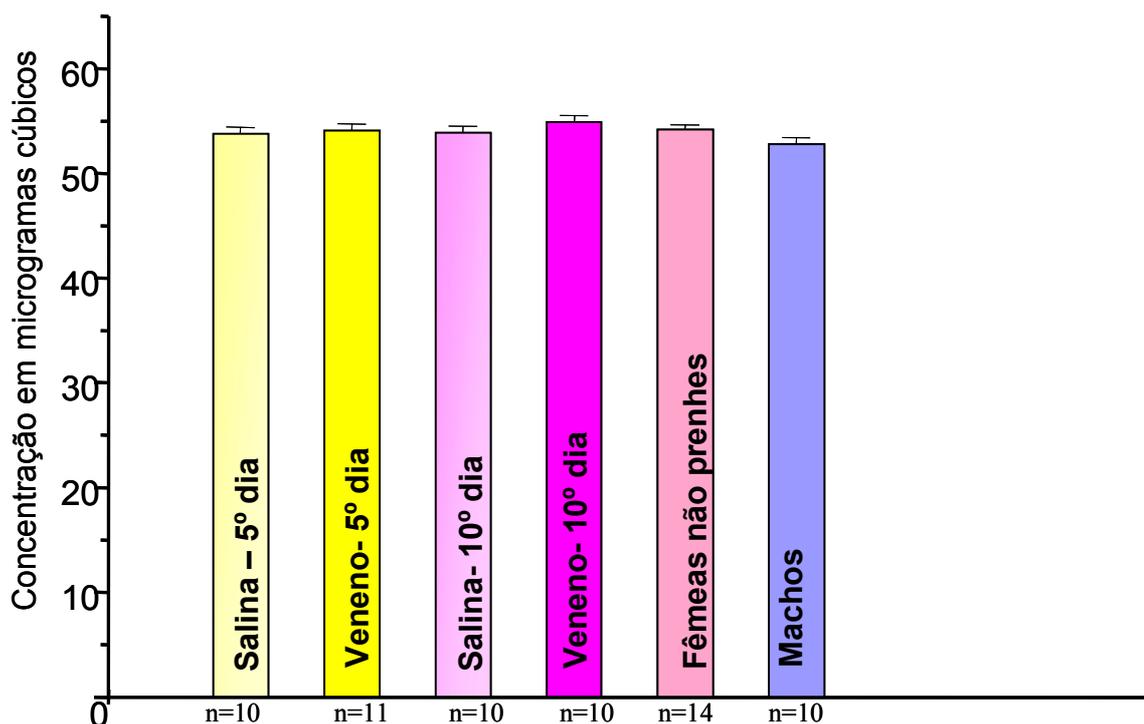


Figura 16 – Volume corpuscular médio (V.C.M.) após injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou no 10º dia de gestação.

- Teste ANOVA seguido de Tukey Kramer
- n= número de animais tratados

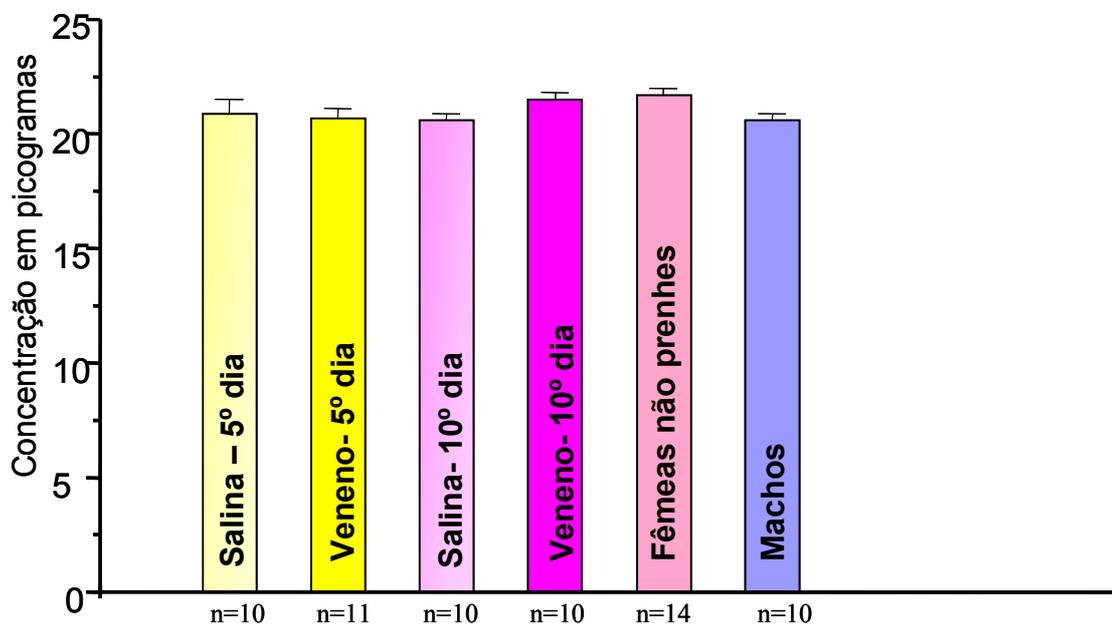


Figura 17 – Hemoglobina corpuscular média (H.C.M.) após injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou no 10º dia de gestação.

- Teste ANOVA seguido de Tukey Kramer
- n= número de animais tratados

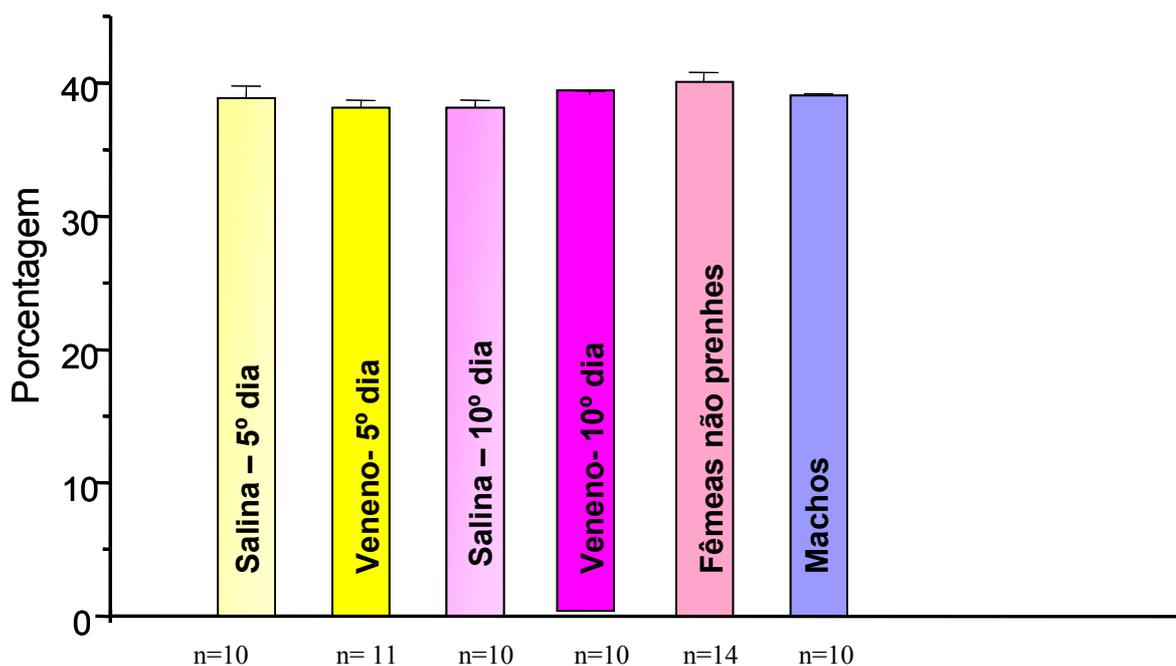


Figura 18- Concentração de hemoglobina corpuscular média (C.H.C.M.) após injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou no 10º dia de gestação.

- Teste ANOVA seguido de Tukey Kramer
- n= número de animais tratados

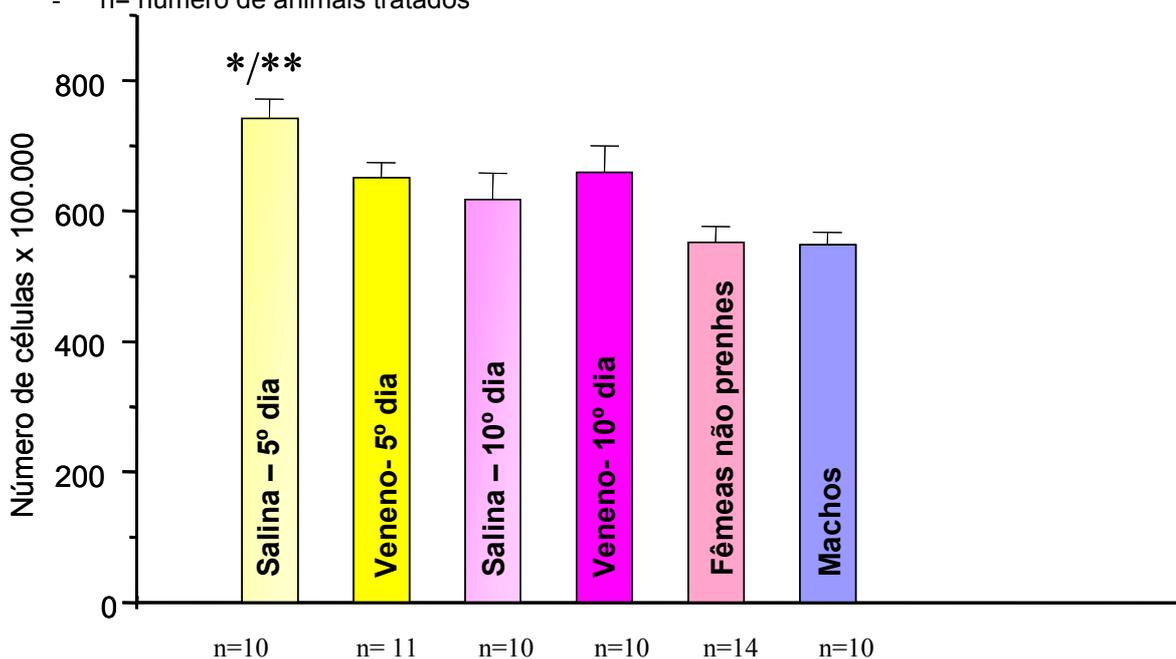


Figura 19 - Contagem global de plaquetas após injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou 10º dia de gestação.

- ** Significativamente diferente do grupo de machos ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.
- *Significativamente diferente do grupo de fêmeas não prenhes ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.
- n= número de animais tratados

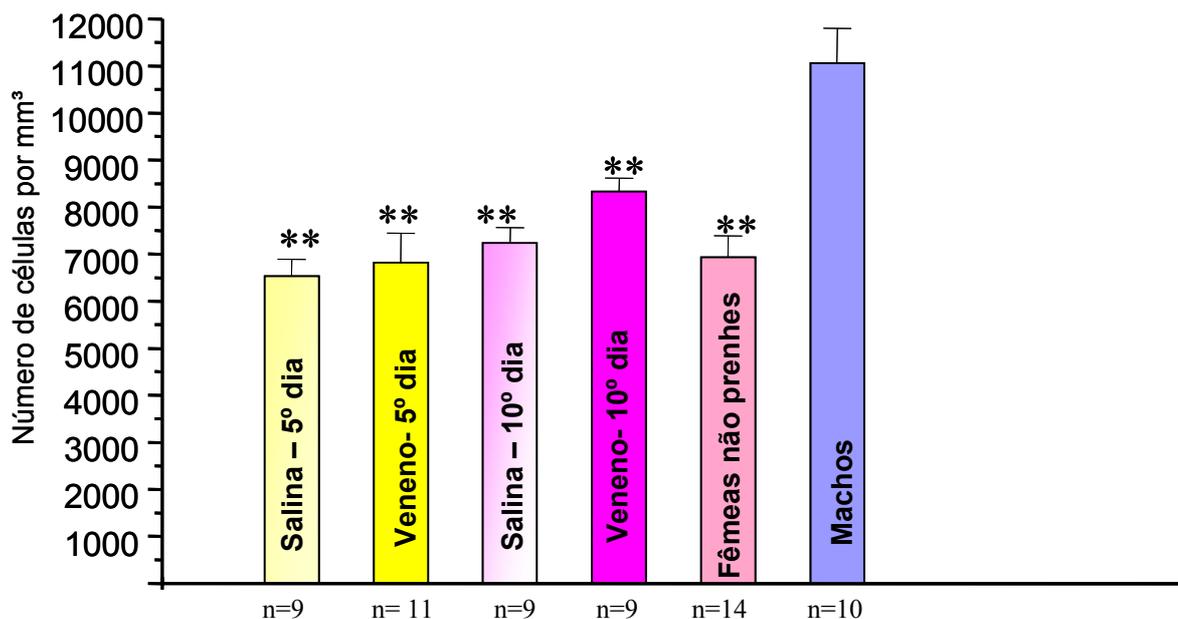


Figura 20 – Contagem global de leucócitos maternos após injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º e 10º dia de gestação.

-** Significativamente diferente do grupo de machos ($p < 0,05$) -Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

- n= número de animais tratados

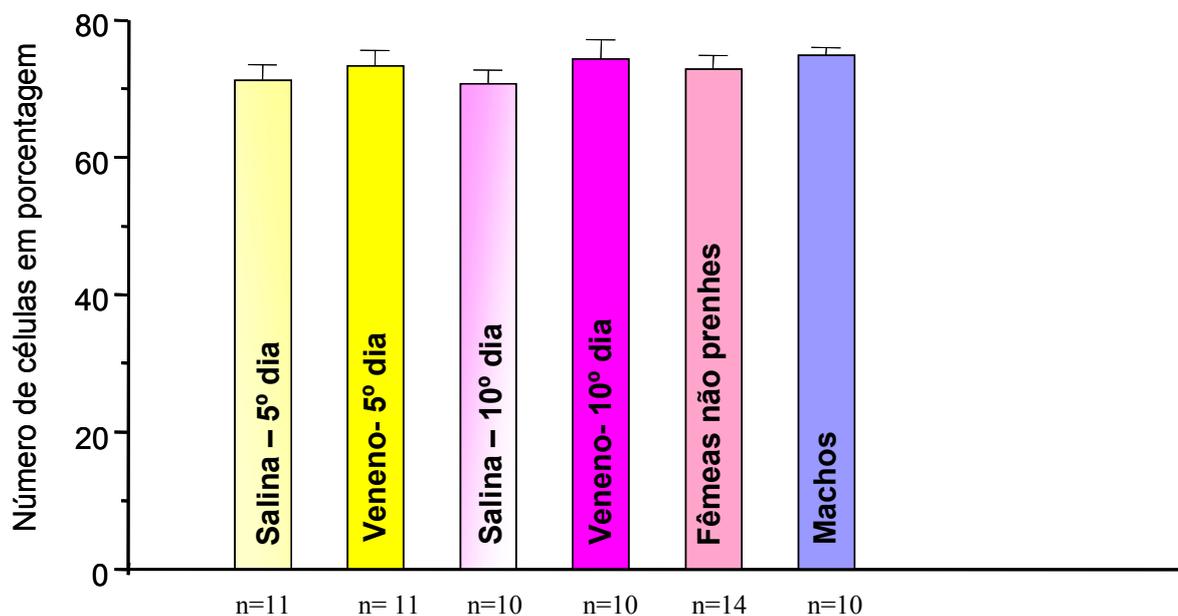


Figura 21– Contagem de linfócitos após a injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou 10º dia de gestação.

-Teste ANOVA seguido de Tukey Kramer

-n= número de animais tratados

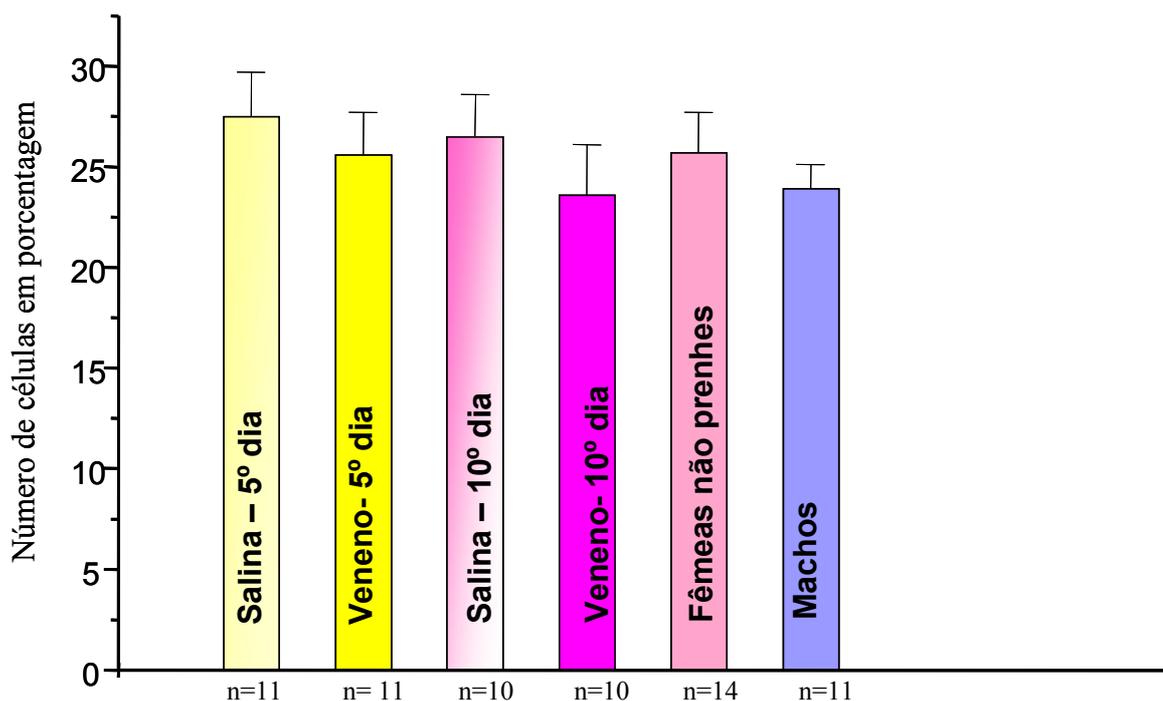


Figura 22 – Contagem de neutrófilos após a injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou 10º dia de gestação.

-Teste ANOVA seguido de Tukey Kramer

-n= número de animais tratados

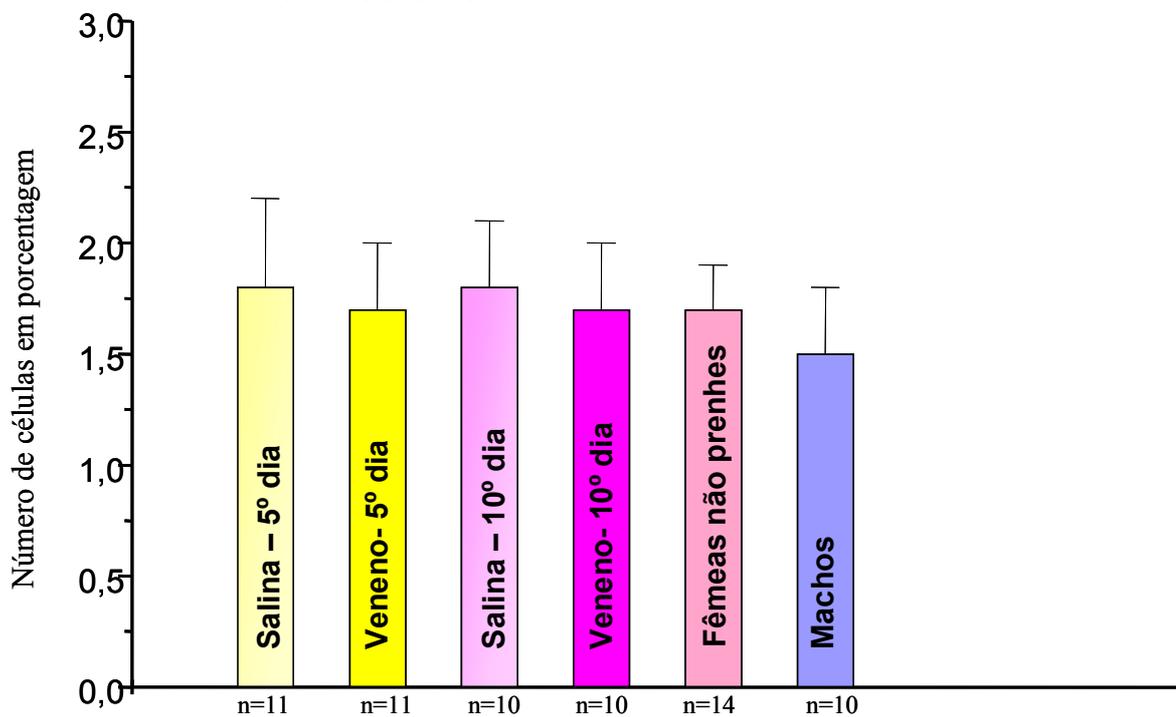


Figura 23 – Contagem diferencial de monócitos de mães após a injeção de 3,0mg /Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou 10º dia de gestação.

-Teste ANOVA seguido de Tukey Kramer

-n= número de animais tratados

5- Discussão

Os escorpiões da família Buthidae são aqueles de maior interesse médico, pois possuem espécies produtoras de venenos ativos sobre o homem. Os escorpiões *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* pertencentes a esta família são responsáveis pela grande maioria dos acidentes no Brasil.

Conforme pode ser observado nas estatísticas, os casos de envenenamento escorpiônico vem crescendo devido à facilidade com que este animal se adapta e difunde em ambientes totalmente urbanizados.

Como já comentado, apesar da grande importância, poucos estudos a respeito de venenos de escorpiões brasileiros causando alterações maternas e na prole foram realizados. Em relação a acidentes em outras partes do mundo, existem algumas citações mostrando que os venenos dos escorpiões *Leiurus quinquestriatus* e *Buthus minax* tem capacidade de induzir o aborto em mulheres grávidas (Osman *et al.*, 1972; Ismail *et al.*, 1973, 1974). Outra espécie de escorpião, o *Androctonus amoreuxi* tem veneno que provoca defeitos esqueléticos e reabsorção fetal quando injetado em altas doses e em dias consecutivos na gestação de ratas. (Ismail *et al.*, 1983).

Esses raros estudos mostram apenas alterações no feto e não no desenvolvimento pós-natal dos mesmos. Portanto é evidente a grande importância de trabalhos nesta área.

Em estudos dos efeitos perinatais de drogas, a dose a ser empregada não deve produzir graves efeitos tóxicos na mãe, pois o emprego de doses que levam ao aparecimento de sintomas acentuados de intoxicação não permite concluir se as possíveis alterações apresentadas pelos conceptos seriam devidas à ação embriotóxica da substância em estudo ou às alterações na homeostase materna (Lemônica, 1996).

As doses deste trabalho foram assim escolhidas porque em estudos anteriores (Cruttenden, 2003) foram utilizadas doses de 0,3 mg/Kg e 1,0 mg/Kg e foram observadas poucas alterações no desempenho reprodutivo materno. A dose de 1,0 mg/Kg causou poucas alterações em relação aos

estudos comportamentais e reflexológicos da prole. Desta maneira, resolvemos investigar outros parâmetros como os sanguíneos e reprodutivos, utilizando doses maiores de veneno (3,0mg/Kg).

A dose utilizada para o estudo do desenvolvimento pós-natal (1,0mg/Kg) simula um envenenamento leve, causando poucas alterações sistêmicas. Já para o estudo do desempenho reprodutivo e parâmetros sanguíneos, a dose escolhida (3mg/Kg) simula um envenenamento moderado, provocando algumas alterações sistêmicas sem levar a morte materna. Estas doses foram determinadas a partir de estudos pilotos em fêmeas não prenhes.

Durante a aplicação de ambas as doses foi perceptível o fato que a injeção do veneno provavelmente tenha provocado dor nos animais, que pareceu dissipar-se ao término desta. Apesar de não ser possível inferir sobre este conceito na espécie experimental em questão, sinais clássicos comportamentais puderam ser observados durante a injeção do veneno (vocalização, tentativa de fuga e ataque) que não foram observados em animais controle. Soma-se a isso o fato da literatura descrever dor em seres humanos como sintoma sempre presente em picadas por *Tityus serrulatus* (Vital Brasil, 1981; Freire-Maia e Campos, 1989; Torres *et al.*, 2002).

Ao aplicarmos a dose de 1mg/Kg os animais ficavam retraídos, durante cerca de uns três a quatro minutos, lambendo o local da picada e parecendo um pouco mais sensíveis ao contato com outros animais. Após este tempo, o comportamento se normalizava, eles paravam de lamber-se e voltavam a ter seu comportamento normalizado. Na maior dose (3mg/Kg) administrada, os animais mostraram comportamento alterado por aproximadamente trinta minutos após a injeção. Apresentavam-se agressivos ao contato com outros animais, sugerindo uma maior sensibilidade dolorosa, lambiam o local da injeção durante os primeiros minutos. Vários animais apresentaram secreção nasal e lacrimal, piloereção e movimentos espasmóticos. Alguns permaneciam estáticos, isolados num canto da gaiola enquanto outros permaneciam muito agitados. Com o decorrer do tempo os sinais e sintomas foram gradativamente sendo

abrandados dando lugar ao comportamento normal. Muitos tiveram sede intensa. Ao término do prazo citado, os animais encontravam-se aparentemente normais sem resquícios observáveis de sintomas de envenenamento.

Os dias de injeção foram determinados para que pudéssemos correlacionar este estudo com outros realizados em nosso laboratório. Os dias são baseados no período de desenvolvimento do rato segundo Manson e Kang (1989). O 10º dia corresponde ao período de organogênese, onde se observa grande proliferação celular e formação de órgãos rudimentares. Esse período é crítico para formação de diversos órgãos como: olhos, coração e arcos aórticos, esqueleto axial, palato, sistema urogenital e cérebro. Já o 16º dia corresponde ao período de desenvolvimento fetal, onde ocorre principalmente a maturação e diferenciação cerebral.

Quando administramos 1,0 mg/Kg de veneno às mães no 10º dia gestacional, foram observadas somente alterações em peso de filhotes, os demais parâmetros físicos não se alteraram. Já na exposição materna ao veneno no 16º dia gestacional observamos um adiantamento no desdobramento de orelhas e um retardo na abertura do orifício do ouvido da prole.

Na avaliação do peso materno verificamos um aumento de peso significativo do 16º para o 21º dia gestacional somente nas ratas que receberam o veneno no 10º dia de gestação. Com isso, também poderíamos correlacionar o aumento de peso materno com o aumento do peso dos filhotes da prole dessas mães. O veneno não causou toxicidade materna.

Diversos fatores de crescimento (Gerton e Cueto, 2001) e citocinas (Torchinsky e Toder 2004) relacionados ao desenvolvimento do embrião já foram identificados e caracterizados nos últimos anos.

Para uma gestação bem sucedida, é necessário que haja um balanço intrauterino de citocinas. Trabalhos demonstram que o estresse embriopático modula a expressão de um grande número de citocinas como TNF alfa (fator de necrose tumoral), TGR beta (fator de crescimento

transformante beta), IL-1 (interleucina-1) operando no meio intrauterino e no embrião (Torchinsky e Toder 2004).

Os estresses embrionários, independentemente de sua natureza, primeiramente perturbam o processo apoptótico, aumentando a taxa de morte em populações de células alvo. Ao mesmo tempo, o embrião tem uma surpreendente habilidade para compensar a morte celular excessiva. Logo, o estresse pode ou não resultar em perda gestacional ou mau desenvolvimento fetal, dependendo de como a maquinaria apoptótica funciona (Torchinsky e Toder 2004).

O fator de crescimento transformante beta (TGF beta) foi primeiramente identificado há duas décadas (Ingman e Robertson, 2002) e está incluso numa grande superfamília com importantes papéis pleiotrópicos no crescimento de muitos órgãos e sistemas (Abreu *et al.*, 2002). As principais funções do TGF beta são controle do ciclo celular, diferenciação, regulação do desenvolvimento, formação de matriz extracelular, angiogênese e outros (Bottner *et al.*, 2000). Alguns membros da família TGF beta também estão envolvidas no desenvolvimento do sistema nervoso (Mehler *et al.*, 1998). Uma isoforma desta citocina em sinergismo com o fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) podem ter como consequência efeitos no controle ou descontrole da proliferação e/ou diferenciação celular (Abreu *et al.*, 2002). Outras citocinas como as da família TNF também desempenham papel importante no desenvolvimento do embrião (Pfeffer, 2003). Algumas citocinas, como as pró inflamatórias e alguns fatores de crescimento são capazes de ativar fatores de transcrição como o NFkB (nuclear factor kappa B). O NFkB é um fator que também regula diversos processos como apoptose, proliferação e diferenciação celular (Chen e Greene, 2004). Portanto fica evidente a importância das citocinas na gestação.

Os fatores de crescimento tem suas ações envolvidas com processos de crescimento, reparo e diferenciação celular (Gerton e Cueto, 2001). O EGF (fator de crescimento epidérmico) é um polipeptídeo, primeiramente isolado das glândulas submaxilares de camundongos adultos, que estimula

a proliferação e queratinização de vários tecidos *in vivo* e *in vitro*. (Cohen, 1960).

Este fator é parte de uma complexa rede de fatores de crescimento e receptores que juntos ajudam a modular o crescimento celular (Goodsell, 2003). Membros da família dos EGF têm múltiplos efeitos no desenvolvimento embrionário (Gerton e Cueto, 2001) e de filhotes (Smart *et al.*, 1989).

Estudos realizados por Smart *et al.* (1989) relatam que administração de EGF a ratos recém nascidos acelera a ocorrência de determinados parâmetros como erupção de dentes incisivos, abertura de olhos e retarda outros parâmetros como abertura de canal auditivo, por exemplo.

In vitro, o EGF tem efeitos estimulatórios na migração de células pituitárias de ratos muito jovens (González *et al.*, 2004).

Outra família de fatores de crescimento, os FGF (fatores de crescimento de fibroblastos), são responsáveis por mediar uma variedade de respostas celulares durante o desenvolvimento embrionário. Eles desempenham papel crítico na morfogênese pela regulação da proliferação, diferenciação e migração celular. O FGF-2 é um membro desta família que tem efeitos em vários tecidos como cérebro (promovendo diferenciação e sobrevivência de neurônios); músculos (atuando na miogênese); ossos (atuando na condrogênese); pele (fazendo reparos teciduais) dentre outros (Bikfalvi *et al.*, 2005).

Desta maneira, uma hipótese para os efeitos observados sobre o retardo na abertura do orifício do ouvido e o adiantamento no desdobramento de orelhas em filhotes de mães que receberam o veneno no 16º dia gestacional, poderia ser uma consequência do veneno sobre algum fator de crescimento e/ou citocina, ou até mesmo, fatores agindo em sinergismo determinando desenvolvimento anormal de células. Somente estudos específicos poderiam comprovar esse relacionamento. Até o momento, não existem estudos dos efeitos de venenos de escorpião sobre os fatores de crescimento e citocinas.

Observamos também um aumento de peso dos filhotes machos e fêmeas no 20º dia de vida, tanto de mães que receberam veneno no 10º quanto no 16º dia gestacional. Diversos trabalhos correlacionam estresse materno com diminuição de peso ao nascimento, atrasos e prejuízos no desenvolvimento fetal (Cabrera *et al.*, 1999; Zhu e Stadlin *et al.*, 1999). Isto sugere que um aumento de peso, contanto que não seja excessivo nem decorrente de patologia gestacional como a diabetes, esteja relacionado com vitalidade e saúde (Cruttenden, 2003).

Em estudos anteriores, foi verificado que as proles de mães que receberam a mesma dose do veneno que usamos (1,0 mg/Kg) no mesmo dia (décimo dia gestacional) apresentaram aumento no peso de filhotes recém nascidos e de seus pulmões. Logo, o aumento de peso pode estar correlacionado com o aumento de peso de órgãos que possam ter sido afetados pelo veneno (Cruttenden, 2003).

A avaliação da intoxicação materna, através da variação de peso, também foi estudada e verificamos um aumento significativo de peso do 16º para o 21º dia gestacional somente nas ratas que receberam o veneno no 10º dia de gestação. Com isso também poderíamos correlacionar o aumento de peso materno com o aumento de peso dos filhotes da prole destas mães. O fato de as mães não apresentarem sinais de intoxicação indica que as alterações observadas nos filhotes não se devem a isto.

A maturação pós-natal da atividade motora do rato ocorre através dos seguintes processos comportamentais: do desenvolvimento da postura e locomoção quadrúpede, dos ajustes dinâmicos posturais, de algumas respostas de orientação e de habilidades motoras complexas (Altman e Sudarshan, 1975).

O reflexo postural é medido pelo tempo que um animal, colocado apoiado de costas, consegue voltar à posição original. Animais recém nascidos demoram a retornar a posição normal, sendo que a medida que ele se desenvolve, o tempo necessário para a execução desse reflexo diminui gradativamente (Patin *et al.*, 2004). Três sistemas estão envolvidos

na regulação postural: o vestibular, o exteroceptivo (tátil) e o proprioceptivo (Altman e Sudarshan, 1975).

Outro reflexo importante é o de geotaxia negativa, que compreende a resposta de girar a cabeça para cima quando o animal é colocado em um plano inclinado com a cabeça para baixo. Segundo Altman e Sudarshan (1975) no 5º dia de vida, filhotes de ratos são capazes de girar todo o corpo em um ângulo de 180° e a partir deste dia o tempo necessário para que o reflexo ocorra diminui gradativamente. Em contrapartida, observamos que muitos dos filhotes observados no 6º dia de vida não apresentaram esse reflexo, fato não significativo, pois ocorreu tanto com animais controle quanto com experimentais.

O reflexo postural e o de geotaxia negativa de ratos jovens refletem o grau de desenvolvimento motor e do sistema vestibular. Um atraso na maturação do reflexo de geotaxia negativa sugere um atraso na maturação das estruturas nervosas envolvidas na habilidade motora, particularmente o cerebelo. Quanto ao reflexo de endireitamento, um atraso no seu desenvolvimento pode indicar uma alteração na mielinização (Patin *et al.*, 2004).

Como dito anteriormente, a maturação e diferenciação cerebral ocorrem por volta do 16º dia. Observamos que a prole de mães que recebeu o veneno neste dia de gestação, apresentou uma diminuição no tempo de latência do reflexo postural no 6º dia de vida e do reflexo de geotaxia negativa no 6º, 8º e 10º dia de vida. Em contrapartida, neste mesmo grupo observamos um aumento no tempo de latência do reflexo de preensão palmar testado no 8º dia de vida.

O reflexo de preensão palmar, reflexo também medular, envolve respostas motoras do animal. Este é o único que com o passar do tempo desaparece (Deiró *et al.*, 2006). Também observamos um significativo aumento no tempo de latência deste reflexo na prole de mães que receberam veneno no 10º de gestação. Com isso, também podemos sugerir que o veneno possa provocar alterações no desenvolvimento do sistema

nervoso central, influenciando em nível medular a ocorrência destes reflexos.

O desenvolvimento da atividade motora no rato ocorre ainda durante o período de lactação, com um pico máximo em torno do 15º dia de vida, a seguir a atividade decresce e ao desmame os níveis de atividade são similares aos dos animais na idade adulta (Reiter e Macphail, 1982). Para observação da atividade motora utilizamos a caixa de atividade. Em nenhum dos grupos foram observadas alterações na atividade geral e na atividade locomotora da prole de mães tratadas com o veneno em diferentes períodos gestacionais mostrando que o veneno parece não agir sobre o desenvolvimento das vias relacionadas com este comportamento.

Devido os resultados encontrados, pretendemos realizar estudos futuros verificando se durante a vida adulta os filhotes de mães que receberam veneno apresentam alterações comportamentais.

Para avaliação do desempenho reprodutivo materno escolhemos dois dias importantes na gestação do rato: o quinto e o décimo dia gestacional além de utilizar uma dose maior do veneno. O décimo dia gestacional como já foi explicado anteriormente corresponde a metade do período de organogênese. O quinto dia gestacional é o final do período de implantação do blastocisto no útero materno. A implantação do blastocisto é um processo envolvendo movimentos altamente coordenados onde células específicas do embrião estabelecem contato com um tecido especializado materno, o útero. Esta coordenação envolve produção regulada de fatores de crescimento, citocinas e hormônios, tanto do embrião como de tecidos de origem materna. Concomitantemente, receptores para estes fatores devem ser expressos pelos tecidos apropriados para propagar os sinais de implantação (Carson *et al.*, 2000). Na maior parte dos estudos com grupos de substâncias químicas, os resultados relatam redução do número de implantações mais do que malformações anatômicas, relacionando este período acima de tudo com o fenômeno da embriofetividade. Porém, vários trabalhos têm mostrado que os primeiros dias de gestação são susceptíveis

a prejuízos não letais, gerando, portanto as malformações propriamente ditas (Rutledge, 1997).

Uma série de agentes químicos podem produzir alterações durante estágios pós-zigóticos que resultam em morte e/ou malformação. O espectro de agentes conhecidos capazes de afetar o blastocisto é amplo. Tratamentos com agentes mutagênicos no período de implantação podem ocasionar defeitos nos membros, abertura de palato, defeitos esqueléticos entre outros. Em camundongos, o tratamento com o ácido retinóico entre os dias quatro e cinco de gestação, produz problemas na cauda e duplicação dos membros posteriores (Rutledge, 1997).

Quanto ao desempenho reprodutivo materno dos grupos de fêmeas que receberam veneno (3mg/Kg) no 5º ou no 10º dia gestacional não observamos alterações no número de corpos lúteos em relação ao grupo controle. A variação de peso materna, o peso uterino, as reabsorções, o número de implantações e as perdas pré implantações também não foram alterados em nenhum dos grupos. Entretanto, no grupo de mães que receberam veneno no 10º dia gestacional verificamos um aumento de perdas pós implantação.

As perdas pós implantação estabelecem a relação entre o número de embriões que se implantaram com aqueles que se desenvolveram normalmente. Já as perdas pré-implantação estabelecem a relação entre o número de óvulos liberados e fecundados com a quantidade de embriões que conseguiram se implantar. Logo, podemos propor que o veneno deve estar agindo sobre o desenvolvimento fetal e não sobre a implantação dos embriões, caso contrário observaríamos alterações também nas perdas pré-implantação e no número de implantes propriamente ditos.

Em relação ao peso de filhotes, de suas respectivas placentas, pulmões, corações e rins, não observamos alterações significativas em nenhum dos grupos analisados. No entanto, verificamos que nos dois grupos cujas mães receberam veneno, houve um aumento no peso de fígado da prole, mostrando que este pode ser um dos órgãos afetados pelo veneno. Outro estudo de nosso laboratório (Cruttenden, 2003) revelou

aumento no peso de pulmões e placentas de filhotes cujas mães receberam doses menores de veneno. Isto nos faz acreditar que o efeito do veneno obedeça às leis do “tudo ou nada”, ou seja, o fato de a dose ser maior não leva necessariamente a um aumento do efeito. Ele pode ocorrer ou não, independente da dose administrada.

Os cortes histológicos dos órgãos citados acima e das placentas foram realizados e não observamos nenhuma alteração microscópica. A análise microscópica dos rins foi considerada prejudicada, pois em diversas lâminas não foi possível a observação de estruturas renais importantes devido a coloração fraca ou parcialmente ausente.

O veneno administrado no 5º ou 10º dia de gestação não foi capaz de produzir malformações externas reconhecíveis ao nascimento em nenhuma das ninhadas analisadas. O desenvolvimento fetal também não foi prejudicado, fato que pode ser constatado pela contagem dos centros de ossificação, que não revelou alterações.

As anomalias encontradas, tanto esqueléticas como viscerais, apresentaram-se nos grupos experimentais em quantidades e de natureza muito semelhante às aquelas apresentadas no grupo controle. Várias anomalias e malformações espontâneas ocorrem com determinadas incidências em ratos de laboratório. Dados da literatura que apontam a incidência destas anomalias para esta espécie de sujeito experimental estão de acordo com as incidências encontradas neste estudo (Kimmel e Wilson 1973; Szabo, 1989).

Logo, seria evidente que este tipo de ocorrência não tem qualquer ligação com a exposição pré-natal ao veneno. No entanto, a ossificação craniana da prole de mães que recebeu veneno no 10º dia gestacional mostrou-se levemente afetada. Os ossos occipitais e/ou parietais dos filhotes apresentaram-se ligeiramente “afundados” em um terço dos filhotes, afetando seis ninhadas das dez analisadas.

A rata prenhe é um importante modelo animal em testes de toxicologia reprodutiva, no entanto estudos de desenvolvimento placentário e parâmetros sanguíneos maternos são escassos, o que reflete ainda mais a

importância de informações, visto que na gestação ocorrem muitas alterações na fisiologia materna. No caso de envenenamento materno severo, existirá um grande comprometimento na homeostase, que poderá acarretar em prejuízos a vida intra uterina (Carney, 1997)

Administramos às ratas prenhes veneno do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º e no 10º dia gestacional e analisamos parâmetros bioquímicos sanguíneos (transaminase glutâmico oxaloacética, transaminase glutâmico pirúvica, amilase e glicemia) e parâmetros hematológicos (hemograma completo). Para avaliar se houve a intoxicação materna, a exemplo dos experimentos anteriores, também verificamos a variação do peso materno, parâmetro que não se alterou em nenhum dos períodos observados.

Estudos anteriores com ratos Wistar machos mostram que o veneno do escorpião *Tityus serrulatus* além de efeitos neurotóxicos, possui também efeitos sistêmicos como o aumento de enzimas plasmáticas, citocinas (Bertazzi *et al.*, 2002) e leucócitos (Magalhães *et al.*, 1998).

As transaminases constituem um grupo de enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e alfa cetoácidos por transferência de grupos amino. As duas transaminases de interesse clínico são de glutamato oxalacetato (TGO) também chamada aspartato- transaminase (AST), e a de glutamato piruvato (TGP), também chamada alanina transaminase (ALT). Estas enzimas são amplamente distribuídas nos tecidos, predominando a TGO no coração, fígado, músculo estriado, rim e pâncreas e a TGP no fígado, rim e coração. Elas têm grande utilidade clínica principalmente no acompanhamento de lesões hepáticas e cardíacas, podendo avaliar também função pancreática (Miller e Gonçalves, 1999).

No experimento, em nenhum dos períodos gestacionais analisados foram observadas alterações nestas enzimas se comparados os grupos experimentais com seus respectivos controles, mostrando que o veneno parece não lesar as células cardíacas ou hepáticas. No entanto, se compararmos os valores obtidos com aqueles descritos na literatura (De Rijk *et al.*, 2002) para ratos Sprague Dowley (valor médio de TGO-81U/L) nota-

se um grande aumento em todos os grupos do experimento. Isto pode ser explicado pelo método que utilizamos para retirada de sangue: a punção cardíaca. Ao puncionarmos o coração com a agulha, lesamos as células musculares cardíacas causando este falso aumento desta transaminase. O método utilizado no trabalho mencionado anteriormente (De Rijk *et al.*, 2002) foi o de decapitação dos animais vivos sem anestesiá-los.

A dosagem da amilase dos animais também foi realizada. Esta é uma enzima que está presente em vários órgãos e tecidos, encontrando-se em maior concentração no pâncreas. A amilase existente no soro normal pode ter sua origem, pelo menos em parte, no fígado, posto que sua concentração não é afetada pela pancreatectomia (Miller e Gonçalves, 1999)

Os valores de amilase encontrados em todos os grupos não apresentaram alterações significativas, indicando que o veneno parece não agir sobre essa enzima. No entanto, o grupo de fêmeas não prenhes apresentou valor médio menor que os outros grupos, mostrando diferença significativa em relação ao grupo de machos. Com isso podemos sugerir que esta enzima comporte-se fisiologicamente diferente em fêmeas prenhes apresentando valores elevados.

Em condições normais, o teor de glicose no sangue mantém-se dentro de limites estreitos. Isso se deve à intervenção de um mecanismo regulador hormonal extremamente sensível e delicado, cujos principais integrantes são representados, de um lado, pela insulina (agente hipoglicemiante) e, de outro, pelos hormônios adrenocorticais, pré-hipofisários, adrenalina e glucagônio (agentes hiperglicemiantes). Em condições patológicas pode ocorrer um desequilíbrio desse sistema de ajuste, ou ser ele submetido a condições que ultrapassem suas possibilidades reguladoras, do que resultará elevação ou abaixamento do nível sanguíneo de glicose. Com isso a determinação da glicemia assume então extraordinário interesse diagnóstico (Miller e Gonçalves, 1999)

Em ratas prenhes a utilização de glicose pelo tecido adiposo e muscular é reduzida, facilitando a distribuição de glicose para uso fetal (Holness e Sugden, 1991). Mudanças na nutrição durante a gestação

mostram um importante papel na determinação do crescimento fetal (Wallace *et al.*, 1997) bem como na maior incidência de malformações fetais (Giavini, 1993).

Os grupos de mães que receberam veneno do escorpião *Tityus serrulatus* no 5º ou no 10º dia apresentaram um aumento na glicemia se comparados com os grupos de machos e com seus respectivos grupos controle (fêmeas prenhes que receberam salina nos mesmos dias). Os grupos de mães que receberam veneno também se mostraram significativamente diferentes em relação ao grupo de fêmeas não prenhes. Como já dito anteriormente, a gestação provoca diversas alterações na homeostase materna logo, já seria esperado um valor maior na glicemia de todos os grupos de fêmeas prenhes, fato que pode ser observado neste estudo. No entanto, nota-se que somente os valores de glicemia dos grupos que receberam veneno apresentaram significância. Então podemos sugerir que o veneno elevou ainda mais a glicemia destes grupos provocando tal fato. Também verificamos diferenças significantes entre os dois grupos de fêmeas prenhes que receberam salina. Esta diferença provavelmente ocorreu devido as diferentes fases gestacionais em que a glicemia foi analisada (5º ou 10º dia de gestação) evidenciando um efeito próprio da prenhez.

O aumento das taxas de glicemia pode ser devido ao aumento na liberação de neurotransmissores, provavelmente adrenalina, para a corrente sanguínea. Como dito anteriormente, a liberação de adrenalina em excesso faz com que os níveis de glicose sanguínea também aumentem. Na literatura temos relatos que algumas toxinas purificadas do veneno de *Tityus serrulatus* são capazes de provocar lesão pancreática (Possani *et al.*, 1991) Como já sabemos, o pâncreas é responsável pela produção de insulina (hormônio hipoglicemiante), logo, se o órgão está prejudicado, também pode ocorrer prejuízo nesta produção causando então o aumento da glicemia.

Outra técnica para avaliação da intoxicação materna foi realizada em parte através do hemograma. Este exame, em última análise, constitui o meio mais direto e mais prático de se estudar os elementos figurados do

sangue periférico - os glóbulos vermelhos, os glóbulos brancos e plaquetas. Estes elementos celulares sofrem alterações às vezes muito acentuadas, no decurso de praticamente todas as moléstias e por este motivo o hemograma é exame de rotina dos mais usuais (Guimarães e Guerra, 1990).

Sabe-se ainda que alguns venenos de serpentes e algumas toxinas também induzem a alterações hematológicas logo, torna-se viável a realização do hemograma para esta avaliação após o uso do veneno de escorpião (Ravel, 1997). Estas alterações também são causadas pela prenhez (De Rijk *et al.*, 2002).

Para uma correta interpretação do hemograma é importante, de início, que se conheçam os valores hematimétricos normais e os seus desvios fisiológicos e individuais, além da função de cada um dos elementos figurados do sangue periférico (Guimarães e Guerra, 1990).

Em condições normais, os glóbulos vermelhos são os mais numerosos elementos figurados do sangue. No rato Wistar, estas células podem medir de 6,3 a 6,8 micrômetros e a sua contagem global está por volta de 7 a 9 milhões (Baker *et al.* 1979), número muito superior aos valores de referência para humanos. Estas células contêm a hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio para os tecidos.

Baker *et al.* (1979) estudaram através de eletroforese, a hemoglobina do rato Wistar durante o desenvolvimento e a vida adulta. Eles observaram que dois tipos de hemoglobinas aparecem durante o período embrionário na eritropoiese e dois adicionais aparecem durante o período de hematopoiese no fígado, todas elas permanecendo durante a vida adulta.

Os valores de hematócrito refletem, em porcentagem, a massa total de células em relação ao volume total de sangue. Uma vez que o número de hemácias predomina largamente sobre os demais elementos figurados, o valor do hematócrito depende praticamente do volume ocupado pelas células vermelhas, sendo de grande importância para o estudo delas (Miller e Gonçalves, 1999).

Na gestação, as mudanças observadas refletem uma adaptação materna ao seu estado fisiológico. A principal mudança neste estágio é o

aumento do volume plasmático causando uma hemodiluição. Como consequência disso observamos redução nos níveis de hemoglobina, hematócrito e glóbulos vermelhos (Harewood *et al.*, 2000).

Na contagem global de hemácias observamos que todos os grupos de fêmeas mostraram-se significativamente diferente do grupo de machos. Isto se deve à diferença entre a quantidade de células para machos e fêmeas devido a variações fisiológicas.

A dosagem de hemoglobina também mostra diminuição significativa dos grupos de fêmeas prenhes em relação aos grupos de machos. No entanto verificamos que o grupo de fêmeas não prenhes mostrou valor muito próximo ao grupo de machos, evidenciando ainda mais a hemodiluição fisiológica presente na gestação.

O hematócrito das fêmeas que receberam salina no 5º ou no 10º dia gestacional mostrou-se diminuído em relação ao grupo de machos. Os demais grupos apresentaram valores próximos aos dos machos.

Os índices hematimétricos ou índices de Wintrobe são calculados a partir dos valores de hemoglobina, hematócrito e contagem global de hemácias e são úteis para se conhecer o tamanho das células, a quantidade e a concentração de hemoglobina. O volume corpuscular médio (VCM) é determinado dividindo-se o hematócrito pela contagem de eritrócitos, sendo o resultado expresso em micrômetros cúbicos (Guimarães e Guerra, 1990).

São muitas as causas que aumentam o VCM, dentre as principais podemos citar a deficiência de ácido fólico e vitamina B12 e em graus significativos de reticulocitose, sangramento agudo ou anemia hemolítica (Ravel, 1997).

As condições que diminuem o VCM também são diversas, dentre elas podemos citar a deficiência crônica de ferro que é um íon extremamente necessário ao feto. Na gestação quando a mulher não tem uma nutrição adequada, é freqüente ela apresentar índices menores e até deficientes deste mineral, visto que o bebê obtém da mãe o ferro para formação de seus tecidos (Gaw *et al.*, 2001).

A hemoglobina corpuscular média (HCM) é a quantidade, em peso, de hemoglobina e é expressa em picogramas e pode ser calculada pela razão entre os níveis sanguíneos de hemoglobina e o número total de hemácias. A HCM é influenciada pelo tamanho dos eritrócitos; um eritrócito grande com conteúdo normal de hemoglobina contém maior peso de hemoglobina do que uma célula menor com conteúdo normal desta proteína. Além disso, este índice também depende da quantidade de hemoglobina em relação ao tamanho da célula; uma célula hipocrômica tem menor peso de hemoglobina do que uma célula normocrômica de tamanho igual. Em geral, a HCM apresenta-se diminuída na microcitose e na hipocromia (Ravel,1997).

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) representa, em porcentagem, a concentração média de hemoglobina na hemácia e pode ser calculada pela relação entre a quantidade de hemoglobina e o valor do hematócrito (Ravel,1997).

Neste estudo nenhum dos grupos apresentou índices hematimétricos alterados.

Os leucócitos, um dos elementos figurados do sangue, desempenham papel essencial no mecanismo de defesa do organismo contra agressões infecciosas ou de outra natureza. No rato Wistar, os valores de referência estão por volta de 7 a 8 mil (Baker *et al.*, 1979), valores semelhantes aqueles encontrados em humanos. Realizamos a contagem destas células e não observamos mudanças significativas entre os grupos que receberam veneno e seus respectivos controles. Somente observamos que todos os grupos de fêmeas apresentaram contagem global destas células em número menor que o grupo de machos, fato não significativo. No entanto, alguns autores como Bertazzi *et al.* (2002) descrevem que a leucocitose é comumente encontrado no envenenamento escorpiónico. Logo, suspeitamos que se a análise sanguínea fosse realizada mais tardiamente após o envenenamento, encontraríamos alterações na contagem global destas células.

Realizamos também a contagem diferencial de leucócitos e dos valores de linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos que não foram alteradas significativamente em nenhum dos grupos.

As plaquetas são elementos extremamente importantes nos processos hemostásicos. A observação meticulosa de uma preparação de sangue bem estendida e corada nos permite obter informações valiosas a respeito do número e anormalidades morfológicas (Miller e Gonçalves, 1999). Nos nossos dados observamos que o grupo de fêmeas prenhes que recebeu salina no 5º dia gestacional apresentou valor médio de plaquetas extremamente elevado em relação aos outros grupos, apresentando significância estatística com o grupo de machos e fêmeas não prenhes. A determinação das plaquetas é extremamente imprecisa e está influenciada por vários artefatos de técnica, não descartamos a possibilidade desse tipo de problema ter ocorrido em nosso experimento visto que somente este grupo apresentou valores tão exacerbados.

Apesar de terem ocorrido alterações hematológicas, nota-se que em sua maioria são devido a homeostase alterada durante a prenhez e/ou desvios fisiológicos e individuais entre machos e fêmeas.

Tomando todos os dados em conjunto, percebemos que doses que causam um envenenamento leve provocam alterações discretas em parâmetros físicos e reflexológicos de filhotes e doses que provocam envenenamento moderado, alteram parâmetros do desempenho reprodutivo e parâmetros sanguíneos maternos. Isto nos faz acreditar que o fato de a dose ser maior não leva necessariamente a um aumento do efeito. Ele pode ocorrer ou não, independente da dose administrada.

Como foi citado, é crescente a exposição humana a peçonha do escorpião. Devido à toxicidade do seu veneno, os prováveis efeitos durante o período perinatal são preocupantes. Logo, este estudo contribui na geração de dados para elucidação de efeitos da toxicidade materna e da prole em casos de envenenamento escorpiônico, guardadas as devidas diferenças entre animais de experimentação e seres humanos.

6- Conclusão

Levando-se em consideração que:

Os filhotes de ratas que receberam 1,0 mg/kg de veneno no 10º dia de gestação apresentaram:

- Um aumento de peso no 20º dia de vida.
- Um aumento no tempo do reflexo de preensão palmar.
- Ausência de efeitos sobre a atividade motora

Os filhotes de ratas que receberam 1,0 mg/Kg de veneno no 16º dia de gestação apresentaram:

- Um aumento do peso no 20º dia de vida.
- Retardo na abertura de ouvidos e adiantamento no desdobramento de orelhas .
- Diminuição do tempo do reflexo de geotaxia negativa nos dias 6, 8 e 10 de vida.
- Diminuição do tempo do reflexo postural no 6º dia de vida.
- Aumento do tempo para o aparecimento do reflexo de preensão palmar no 8º dia de vida.
- Ausência de efeitos sobre a atividade motora

Concluimos que a dose de 1,0 mg/Kg responsável por um envenenamento leve, provoca alterações discretas em parâmetros físicos e reflexológicos de filhotes.

Levando-se em consideração que:

Os grupos que receberam 3,0 mg/Kg de veneno no 5º dia gestacional e foram submetidos à avaliação do desempenho reprodutivo apresentaram:

- Aumento do peso de fígado de filhotes.

Os grupos que receberam 3,0 mg/Kg de veneno no 10º dia gestacional e foram submetidos à avaliação do desempenho reprodutivo apresentaram:

- Aumento das perdas pós-implantação
- Aumento do peso de fígado de filhotes
- Anomalias esqueléticas nos ossos do crânio

Os grupos que receberam 3,0 mg/Kg de veneno no 5º dia gestacional e foram submetidos à avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos apresentaram:

- Aumento na glicemia materna quando comparados com o grupo de machos e com o grupo que recebeu salina no mesmo dia da gestação.

Os grupos que receberam 3,0 mg/Kg de veneno no 10º dia gestacional e foram submetidos à avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos apresentaram:

- Aumento na glicemia materna quando comparados com o grupo de machos e com o grupo que recebeu salina no mesmo dia da gestação.

Concluimos que doses que provocam envenenamento moderado como a de 3,0 mg/Kg alteram alguns parâmetros do desempenho reprodutivo e parâmetros sanguíneos maternos.

De uma maneira geral, o veneno, nas doses e períodos administrados, apesar de causar algumas alterações não é deletério para os fetos de mães expostas a ele.

7- Referências Bibliográficas

ABREU, J.G., KETPURA, N.I., REVERSADE, B, DE ROBERTIS, E.M.,
Connective tissue growth factor (CTGF) modulates cells signaling by BMP and
TGFB. Nat. Cell Biol., 2002;4: 599-604.

ALDER, S.; ZBINDEN, G. Methods for the evaluation of physical,
neuromuscular and behavior development of rats in early postnatal period.
In: Neubert, D., Merker, T.E. Methods in Prenatal Toxicology. Stuttgart
Thieme, 1997; 2: 175-85.

ALIVERTI, V.; BONANOMI, L.; GIAVINI, E.; LEONE, V. G.; MARIANI, L. The
extend of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic
studies on the rat. Teratology, 1979; 20: 237-242.

ALTEMAN, J.; SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the
laboratory rat. Animal Behavior, 1975; 23: 896-920.

ALVES, R.S.; NASCIMENTO, N.R.F.; BARBOSA, P.S.F.; KERNTOPF, M.R.;
LESSA, L.M.A.; SOUSA, C.M.; MARTINS, R.D.; SOUSA, C.M.; SOUSA,
D.F.; QUEIROZ, M.G.R.; TOYAMA, M.H.; FONTELES, M.C.; MARTINS,
A.M.C.; MONTEIRO, H.S.A. Renal effects and vascular reactivity induced by
Tityus serrulatus venom. Toxicon, 2005; 46: 271-276.

BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R.; HENNESSY, A.; ARMISTSTEAD, J.;
HORVATH, J.S.; TILLER, D.J. The laboratory rat, 1 ed, New York, Academic
Press. 1979: 105-118.

BELL, A.W.; BAUMAN, D.E. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *Journal Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1997; 2: 265-278.

BERNARDI, M. M. Exposição aos elementos durante o período perinatal. In: SOUZA-SPINOZA, H; GÓRNIAC, S. L. AND BERNARDI, M. M. (Eds.) *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan; 1999: 566-574.

BERTAZZI, D.T.; PANDOCHI, A. I. A., AZZOLINI, A.E.C.S.; TALHAFERRO, V. L.; LAZZARINI, M.; ARANTES, E.C.; Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon*, 2002; 41: 501-508.

BIKFALVI, A.; KLEIN, S.; PINTUCCI, G; RIFKIN, D.B. Biological Roles of Fibroblast growth factor-2. *Endocrine Reviews*, 2005; 18: 26-45.

BOTTNER, M; KRIEGLSTEIN, K; UNSICKER, K. The transforming growth factor B s: structure, signaling and roles in nervous system development and functions. *Journal Neurochemistry*, 2000; 75: 2227-2240.

BÜCHERL, W. Classification, Biology, and venom extraction of scorpions. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. *Venomous animals and their venoms: Venomous Invertebrates*. New York. Academic Press, 1971. 3: 317-347.

CABRERA, R. J.; RODRÍGUEZ-ECHANDÍA, E. L.; JATUFF, A. S. G.; FÓSCOLO, M. Effects of prenatal exposure to a mild chronic variable stress on body weight, preweaning mortality and rat behavior. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1999; 32: 1229-1237.

CANDIDO, D.M. Escorpiões. In: Joly, C.A., Dicudo, C.E.M. (eds) *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo*. 1999: 25-34

CARBONE, E.; WANKE, E.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L. D.; MAELICKLE, A. Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature*, 1982; 296: 90-91.

CARNEY, E. W. Maternal Physiological Disruption. In: KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P. Drug toxicity in embryonic development. New York: Springer-Verlag, 1997; 1: 573-589.

CARSON, D. D.; BAGCHI, I.; DEY, S. K.; ENDERS, A. C.; FAZLEABAS, A. T.; LESSEY, B. A.; YOSHINAGA, K. Review Embryo Implantation. *Developmental Biology*, 2000; 223: 217-237.

CARVALHO, F. F. ; NENCIONI, A. L. A. ; LEBRUN, I. ; SANDOVAL, M. R. L.; DORCE, V. A. C. Behavioural, electroencephalographic, and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1998 60: 7-14.

CASTRO, V.L.S.S. Avaliação perinatal dos efeitos neurocomportamentais do Aldrin em ratos (doutorado) –São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, 1991.

CATTERALL, W. A. Neurotoxins that act on voltage sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1980; 20:15-43.

CHAO, S. T.; JUCHAU, M. R. Placental Drug Metabolism. In: JOHNSON, E. M.; KOCHHAR, D. M. Teratogenesis and reproductive toxicology. New York, 1983; 31.

CHEN, L.F.; GREENE, W.C. Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nature*, 2004; 5: 392-401.

CHIODO, F.; VERUCHI,G.; MORI, F.; ATTARD,L.; RICCHI,E. Infective diases during pregnancy and their teratogenic effects. *Annali Dell Instituto Superiore di Sanità*, 1993; 29:57-67.

COHEN, S. Isolation and biological effects of an epidermal growth-stimulating protein. *National Cancer Institute Monograph*, 1960; 13: 13-37.

COHEN, S; ELLIOTT, G.A. The stimulation of epidermal keratinisation by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *The Journal Investigative Dermatology*, 1963; 40: 1-5.

CORRÊA, M.M.; SAMPAIO, S.V.; LOPES,R.A.; MANCUSO, L.C.; CUNHA, O.A.B.; FRANCO, J.J.; GIGLIO, J.R. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin Tutyustoxin-I. *Toxicon*, 1997; 37: 1053-1067.

COURAUD, F.; JOVER, E. Mechanism of action of scorpion toxins. In: TU, T. A. *Handbook of natural toxins: Insect poisons, allergens and other invertebrate venoms*, 2 Ed. New York: Marcel Dekker, 1983: 659-678.

CRUTTENDEN, K. *Exposição pré-natal da mãe ao veneno do escorpião Tityus serrulatus: efeitos na prole de ratos (mestrado)*. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003.

CUPO, P; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; MENEZES, J.B.; HERING, S.E. Escorpionismo. In: Barravieira, B. *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro, 1994: 229-312.

CUPO, P.; HERING, S.E. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, 2002; 40: 823-830.

D SUZE, G.; MONCADA, S.; GONZALEZ, C.; SEVCIK, C.; AGUILAR, V.; ALAGON, A. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon*, 2003; 41: 367-375.

DE RIJK, E.P.; VAN ESCH, E; FLIK, G. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. *Toxicology Pathology*, 2002; 30: 271 – 82.

DEBIN, J. A.; MAGGIO, J. E.; STRICHARTZ, G. R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *American Journal of Physiology*, 1993; 264: 361-369.

DEIRÓ, T.C.B.J; MANHÃES- DE- CASTRO, R.; CABRAL- FILHO, J.E.; BARRETO-MEDEIROS, J.M., SOUZA, S.L.; MARINHO, S.M.O.C.; CASTRO, F.M.M.; TOSCANO, A.E.; JESUS- DEIRO, R.A.; BARROS, K.M.F.T. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiology & Behaviour*, 2006; 87: 338-344.

DIAZ-CUETO, L.,GERTON, G.L.The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. *Archives of Medical Research*,2001; 32:619-626.

DORCE, V. A. C.; SANDOVAL, M. R. L. Brazilian scorpion venoms: pharmacological aspects. *Ciência e Cultura*, 1992; 44: 187-191.

DRAGO, F.; DI LEO, F.; GIARDINA, L. Prenatal stress induced body weight deficit and behavioural alterations in rats: the effect of diazepam. *European Neuropsychopharmacol*, 1999; 9:239-245.

FRANKOVÁ, S. Maternal behavior in females of the laboratory rat selected for high and low activity and defecation rates. *Activitas Nervosa Superior*, 1985; 27: 186-198.

FREIRE – MAIA, L; CAMPOS, J.A. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In: OWNBY, C.L. and ODELL, G.V. (Eds). *Natural Toxins. Characterization, Pharmacology and Therapeutics*. Oxford: Pergamon Press. 1989, p. 139-159.

FREIRE –MAIA, L. Peripheral effects of Tityus serrulatus scorpion venom. *Journal of toxicology- Toxins Reviews*, 1995; 14: 423-435.

FRIDE,E.; WEINSTOCK,M. The effects of prenatal exposure to predictable or unpredictable stress on early developmental in the rat. *Developmental Psychobiology*, 1984; 17: 651-660.

FUKUHARA, Y.D.M.; DELLALIBERA- JOVILIANO, R.; CUNHA, F.Q.C.; REIS, M.L.; DONADI, E.A. The kinin system in the envenomation caused by the Tityus serrulatus scorpion sting. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004; 196: 390-395.

GAW, A.; COWAN, R.A.; O REILLY, D.S.J.; STEWARD, M.J.; SHEPHERD, J. *Bioquímica Clínica*, 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GHALIM, N.; EL HAFNY, B; SEBTI, F.; HEIKEL, J; LAZAR, N.; MOUSTANIR, R.; BENSLIMANE, A. Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2000; 62: 277-283.

GIAVINI, E. Diabetes in pregnancy: experimental aspects. *Annali Dell Instituto Superiore di Sanità*, 1993; 29:27-34.

GONZÁLEZ, B; SOLANO-AGAMA,M.D.C; DEL PLIEGO, M.G.; MENDONZA-GARRIDO, M.E. Differences in cell migration of culture pituitary cells from infantile nd adult rats: participation of the extracellular matrix and epidermal growth factor. *International journal of Developmental Neuroscience*, 2004; 22: 231-239.

GOODSELL, D.S.The molecular perspective: Epidermal Growth Factor. *Stem cells.* , 2003.; 21: 702-703.

GOYFFON, M; VACHON, M.; BROGLIO, N. Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. *Toxicon*, 1982; 20: 337-344.

GUERON, M; YARON, R. Cardiovascular manifestations of severe scorpion sting? Clinicopathological correlation. *Chest*. 1970; 57: 156-162.

GUIMARAES, R.X.; GUERRA, C.C.C. Clínica e Laboratório- Interpretação Clínica das provas Laboratoriais, 4 ed. São Paulo: Sarvier, 1990, p.273 – 274.

HAREWOOD, W.J.; GILLIN, A.; HENNESY, A.; ARMISTEAD, J.; HORVATH, J.S.; TILLER, D.J. The effects of the menstrual cycle, pregnancy and early lactation on hematology and plasma biochemistry in the baboon. (*Papio hamadryas*). *Journal of Medical Primatology*, 2000; 29: 415-420.

HERING, S. E; M.M. AZEVEDO MARQUES, J.B. MENEZES, P. CUPO. Características clínicas e epidemiológicas de 967 casos de escorpionismo. In: V Congresso Brasileiro de Toxicologia. Bahia, Salvador, 1987: 23.

HERRERA, E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development- A review. *Placenta*, 2002: 23:9-19.

HOLNESS, M.J.; SUGDEN, M.C. Progressive suppression of muscle glucose utilization during pregnancy. *The Biochemical Journal*, 1991; 280: 549-552.

INGMAN, W.V; ROBERTSON, S.A. Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 2002; 24: 904-914.

ISMAIL, M.; ELLISON, A. C. AND TILMISANY, A. K. Teratogenicity in the rat of the venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi*. *Toxicon*, 1983; 21:177-189.

ISMAIL, M.; OSMAN, O.H.; EL ASMAR, M.F. Pharmacological studies of the venom from the scorpion *Buthus minax*. *Toxicon*, 1973; 11: 15.

ISMAIL, M; OSMAN. O.H. GUMAA, K.A.; KARRAR, M.A. Some pharmacological studies with scorpion (*pandinus exitialis*) venom. *Toxicon*, 1974; 12: 75.

JI, Y.H.; HATTORI, KE, X.; TERAKAWA, S. Molecular characteristics of four new depressant insect neurotoxins purified from venom of *Buthus martensi* Karsch by HPLC. *Science in China*, 1994; 37: 955-963.

RADHA KRISHNA MURTHY, K; KANKOKAR, R.C.; ZARE, A.M.; MALATHI, A.; BALASUBRAMANIANI, P.; YEOLECAR, M.E. Reversal of cardiovascular and haemodynamic disturbances by scorpion antivenin administration in myocarditis due to envenomation by indian red scorpion (*Buthidae* family) venom. *Recent Advances in toxinology research*; 1992; 2: 61-69.

KIMMEL, C. A.; WILSON, J. G. Skeletal Deviations in Rats: Malformations or Variations? *Teratology*, 1973; 8: 309-316.

KIRSCH, G. E.; SKATTEBOL, A.; POSSANI, L. D.; BROWN, A. M. Modification of Na⁺ channel gating by an α scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. *Journal of General Physiology*, 1989; 93:67-83.

KOFMAN, O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2002; 26: 457-470.

LAZARINI, C.A. Efeitos da exposição materna pré-natal à deltametrina sobre o desenvolvimento pré e pós-natal e toxicidade tardia da prole de ratos (doutorado). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1997.

LEMONICA, I. P. Embriofetotoxicidade. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, 1996, p 85-94.

LOURENÇO, W.R; CLOUDSLEY- THOMPSON, J.L.; CUELLAR, O.; VON EICKSTEDT, V.D.R.; BARRAVIEIRA, B.; KNOX, M.B. The evolution of

scorpionism in Brazil in recent years. The journal of venomous animals and toxins, 1996: 2:2.

LOURENÇO, WR. The Scorpion Families and their geographic distribution. The journal of venomous animals and toxins, 2001; 7: 3-23.

LUCAS, S. M; SILVA JR., P. I. Escorpiões de interesse médico no Brasil. In: Schvartsman, S. Plantas Venenosas e animais peçonhentos. São Paulo: Sarvier, 1992, p. 211-215.

MACHADO, A. Neuroanatomia Funcional; 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000, p. 209.

MACHADO, R.P.; CUNHA, R.O; VIEIRA, O.J.O.; RIBEIRO, L.A.; TANAUS, M Epidemiologia do acidente escorpiônico em Uberaba e Municípios próximos, 1995 a 1997. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2000; 33: 399-400.

MAGALHÃES, M.M.; PEREIRA, M. E. S., AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; CAMPOLINA, D.; A.; BUCARETCHI, F.; GAZZINELLI, R.T.; MELO, J. R. C.; Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting.. Toxicon, 1998; 37: 1155-1164.

MANSON, J. M.; KANG, Y. J. Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: HAYES, A. W. Principles and methods of toxicology. New York: Raven Press, 1989: 311-358.

MEHLER, M.F.; KESSLER J.A. Cytokines in the brain development. Advances in Protein Chemistry, 1998; 52: 223-251.

MILLER, C.; MOCZYDLOWSKI, E.; LATORRE, R.; PHILLIPS, M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. Nature, 1985; 313: 316-318.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R.; Laboratório para o clínico; 8 ed. Rio de Janeiro: Atheneu,1999, p. 66-70.

MULDER, E. J. H.; MEDINA, P. G. R.; HUIZINK, A. C.; VAN DEN BERGH, B. R. H.; BUITELAAR, J. K.; VISSER, G. H. A. Prenatal maternal stress: pregnancy and the (unborn) child. *Early Human Development*, 2002; 70:3-14.

NASELLO, A.G., Metodologia para estudos de Toxicologia Perinatal. Biológico : São Paulo, 1997, 45-48.

NENCIONI, A. L. A.; CARVALHO, F. F.; LEBRUN, I.; DORCE, V. A. C.; SANDOVAL, M. R. L. Neurotoxic effects of three fractions isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Pharmacology and Toxicology*, 2000; 86: 149-155.

OSMAN, O.H.; ISMAIL, M; EL-ASMAR, M.F.; IBRAHIM, S.A. Effect on the rat uterus of the venom from the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon*, 1972; 10: 363-366.

PATIN, V., VINCENT, A., LORDI, B., CASTON, J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? *Developmental Brain Research*, 2004; 149: 85-92.

PFEFFER, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2003;14: 185-191.

POSSANI, L.D.; MARTINS, B.M.; FLETCHER, M.D.; FLETCHER JR, P.L. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by Toxins Purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991; 266(5): 3178-3185.

POSSANI LD, BECERRIL B, DELEPIERRE M, TYTGAT J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur J Biochem.*, 1999; 264(2):287-300.

QUEIROZ, L. R. S. 100 animais brasileiros publicados no Estadão. In: O ESTADO DE SÃO PAULO. São Paulo, 1997.

RAVEL, R. Laboratório Clínico- Aplicações clínicas dos dados laboratoriais 6. ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 1997, p. 8-16.

REITER,L.W.; MACPHAIL,R.C. Factors influencing motor activity measurements in neurotoxicology - Nervous system toxicology, New York, Raven Press, 1982, p. 45-65.

REVELO, M. P.; BAMBIRRA, E. A.; FERREIRA, A. P.; DINIZ, C. R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon*, 1996; 34(10): 119-125.

ROCHAT, H.; BERNARD, P.; COURAUD, F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. In: CECCARELLI, B.; CLEMENTI, F. *Advances in Cytopharmacology*,New York, Raven Press. , 1979; 3: 325-334.

ROCHAT, H.; DARBON, H.; JOVER, E.; MARTIN, M. F.; BABLITO, J.; COURAUD, F. Interaction of scorpion toxins with the sodium channel. *Journal of Phisiology*, 1984; 79: 334-337.

RUTLEDGE, J. C. Developmental toxicity induced during early stages of mammalian embryogenesis. *Mutations Research*, 1997; 396: 113-127.

SANDOVAL, M. R. L.; DORCE, V. A. C. The envenomation by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat: age and Sex influence. *Memórias do Instituto Butantan*, São Paulo,1993; 55: 5-10.

SMART, J.L.; da SILVA, V.A.; MALHEIROS, L.R.; PAUMGARTTEN, F.J.R. & MASSEY, R.F. Epidermal growth advances some aspects of development but others in both rats and hamsters. *Journal of Developmental Physiology*., 1989; 11: 153-158.

SOARES, M.R.M.; AZEVEDO, C.S.; MARIA, M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2002; 35(4): 359-363.

SORENSEN, R.G; SCHNEIDER,M.J; ROGOWSKI, R.S and BLAUSTEIN, M.P. Snake and scorpion neurotoxins as probes of rat brain synaptosomal potassium channels In: *Progress in clinical Biological Research*, 1990; 334:279-301.

STAPLES, R. E.; SCHENELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technology*, Baltimore, 1964; 39: 61-63.

SZABO, A. J.; GRIMALDI, R. D. The metabolism of placenta. *Advances in Metabolic Disorders*, 1970; 4: 185-228.

SZABO, K. T. Congenital malformations in laboratory and farm animals. San Diego: Academic Press, 1989.

TAYLOR, P. Skeletal examination. *Practical teratology*. Grã Bretanha; 1986; 10: 77-100.

TEIXEIRA JR, A. L., FONTOURA, B.F; FREIRE-MAIA, L.; MACHADO, C.R.S.; CAMARGOS, E.R.S.; TEIXEIRA, M.M. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon*, 2001; 39: 703-709.

TORCHINSKY, A; TODER, V. To die or not to die: the function of the transcription factor NFkB in embryos exposed to stress. *American Journal of Reproductive Immunology.*, 2004; 51: 138-143.

TORRES, J.B; MARQUES, M.G.B; MARTINI, R.K; BORGES, V.A. Acidente por *Tityus serrulatus* e suas implicações epidemiológicas no Rio Grande do Sul. *Revista Saúde Publica*, 2002; 36(5): 631-633.

TRONCON, L.E.A.; SANTOS, A.A.; GARBACIO, V.L.; SECAF, M.; VERCEZE, A.V.; CUNHA-MELO, J.R. Inhibition of gastric emptying and intestinal transit in anesthetized rats by *Tityus serrulatus* scorpion toxin. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2000; 33(9): 1053-1058.

VALDIVIA, H.; KIRBY, M. S.; LEDERER, W. J.; CORONADO, R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel of skeletal and cardiac muscle. Proceeding of National Academy of Science of USA.89, 1992; 12185-12189.

VALDIVIA, H.; POSSANI, L. D. Peptide toxin as probes of ryanodine receptor. Trends in Cardiovascular Medicine, 1998; 8:111-118.

VITAL BRAZIL, O. Peçonhas. In Monografia do acervo da Biblioteca do Instituto Butantan, São Paulo, 1981.

WALLACE, J.M.; DA SILVA, P.; AITKEN, P.; CHEYNE, M.A. Maternal endocrine status in relation to pregnancy outcome in rapidly growing adolescent sheep. The Journal of Endocrinology, 1997; 155: 359-68.

WALTON, K. D.; LIEBERMAN, D.; LLINÁS, A.; BEGIN, M.; LLINÁS, R. R. Identification of the critical period for motor development in neonatal rats. Neuroscience, 1992; 51(4): 763-767.

WARD, R. M.; MIRKIN, B. L. Farmacologia Perinatal/Neonatal. In: BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. (Ed). Farmacologia humana: da molecular à clínica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1997; 750-760.

WEINSTOCK, M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. Prog Neurobiol., 2001;65(5):427-51.

WEN, F.H; SANTALUCIA, M. Vigilância dos acidentes por animais peçonhentos. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2005.

WILSON, J. G. Methods for administering agents and detecting malformation in experimental animal. In: WILSON, J. C; WARKANY, J. Teratology: principles and techniques. Chicago: Univ. of Chicago Press, 1965.

ZHU, J. H.; STADLIN, A. Prenatal heroin exposure. Effects on development, acoustic startle response, and locomotion in weanling rats. Neurotoxicology and Teratology, 2000; 22:193-203.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)