

ANA LETICIA CORONADO DORCE

Participação de fatores de crescimento e de citocinas nas alterações observadas na prole de ratas tratadas com o veneno do escorpião *Tityus bahiensis* no período gestacional

Tese 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 Doutor em Ciências.

**Área de Concentração:** Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valquíria Abrão Coronado Dorce

São Paulo

2013

ANA LETICIA CORONADO DORCE

Participação de fatores de crescimento e de citocinas nas alterações observadas na prole de ratas tratadas com o veneno do escorpião *Tityus bahiensis* no período gestacional

Tese 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 Doutor em Ciências.

**Área de Concentração:** Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valquíria Abrão Coronado Dorce

São Paulo

2013

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Dorce, Ana Leticia Coronado

Participação de fatores de crescimento e de citocinas nas alterações observadas na prole de ratas tratadas com o veneno do escorpião *Tityus bahiensis* no período gestacional / Ana Leticia Coronado Dorce - São Paulo, 2013.

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública  
Orientadora: Valquíria Abrão Coronado Dorce

1. Venenos de escorpião/toxicidade.
2. *Tityus bahienses*
3. Prenhez
4. Citocinas
5. Peptídeos e proteínas de sinalização
6. Ratos wistar

SES/CCD/CD-272/13

*“A mente que se abre a uma nova idéia,  
jamais volta ao seu tamanho original.”*

*Albert Einstein*

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas especiais que passaram em minha vida e me deram o privilégio de conhecê-las nessa longa caminhada:

*“A minha mãe, ao meu pai e a minha irmã pelos momentos felizes e inesquecíveis que passamos juntos e que me proporcionaram muita alegria e amor durante toda minha vida”.*

*“Ao meu marido Dino pelo amor, amizade, incentivo e compreensão e por me ajudar em todos os momentos e a superar os obstáculos da vida”.*

*“A Dr<sup>a</sup> Ana Leonor Abrahão Nencioni e a Dr<sup>a</sup> Valquíria Abrão Coronado Dorce pela amizade, compreensão e ensinamentos. Agradeço pelo profissionalismo e por terem acreditado em mim e, pela contribuição profissional e pessoal em minha vida”.*

## **AGRADECIMENTO**

A todos os amigos e pesquisadores do Instituto Butantan pela maravilhosa companhia de vocês durante todo esse tempo.

A Dr<sup>a</sup> Ana Leonor Abrahão Nencioni pela amizade ensinamentos e companheirismo durante todos esses anos de Butantan. Pela orientação técnica e pela ajuda na realização deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Valquíria Abrão Coronado Dorce agradeço pelos ensinamentos e dedicação durante todo esse tempo de Butantan e de vida. Pela orientação e ajuda na realização desse trabalho.

As ajudantes de pesquisa Elisa e Eleonora pela colaboração na realização dos experimentos. Pela amizade e companheirismo durante todo esse período.

Ao técnico de pesquisa Eduardo pela ajuda e ensinamentos durante a realização dos experimentos e pela amizade e companheirismo durante a realização desse trabalho.

Ao Instituto Butantan e a Fundação Butantan.

A todos da Secretaria de Pós-Graduação da área de concentração em Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Aos professores dos cursos de Pós-Graduação que contribuíram para minha formação acadêmica.

Agradeço ao apoio financeiro da CAPES e FAPESP

## RESUMO

### **Participação de fatores de crescimento e citocinas nas alterações observadas na prole de ratas tratadas com o veneno do escorpião *Tityus bahiensis* no período gestacional**

No Brasil, o escorpionismo é um problema de saúde pública. O escorpião *T. serrulatus* é considerado o mais perigoso, mas um grande número de acidentes também acontece com o *T. bahiensis*. O objetivo do estudo foi verificar possíveis efeitos do veneno do escorpião *T. bahiensis* no desempenho reprodutivo materno e nos níveis de citocinas e fatores de crescimento em embriões de mães tratadas durante a gestação. Para os parâmetros reprodutivos foram utilizadas fêmeas prenhes injetadas com uma dose de 2,5mg/Kg (s.c.) do veneno no 5º (GD5) ou no 10º (GD10) dia gestacional. O grupo controle foi injetado com salina a 1,46% (1ml/Kg) em ambos os dias. No 21º dia gestacional, os filhotes foram retirados por laparotomia e divididos em dois grupos que receberam tratamento específico para a análise visceral e esquelética. Para avaliação dos níveis de citocinas e de fatores de crescimento, as fêmeas prenhes foram injetadas com salina (1ml/Kg), LPS (100µg/kg) ou veneno (2,5mg/Kg) no 10º (GD10) ou 16º (GD16) dia gestacional. Os filhotes foram removidos por laparotomia 6, 12 ou 24 horas após o tratamento materno. As amostras foram maceradas em um homogenizador de tecido e centrifugadas. Os níveis de citocinas e fatores de crescimento foram determinados por ensaios imunoenzimáticos. Nos parâmetros reprodutivos não houve alterações no peso materno durante a gestação, no número de corpos lúteos, número de filhotes, peso do útero e dos filhotes. Houve diminuição no número de implantações e reabsorções no grupo GD5. Houve aumento no peso das placentas em GD5 e GD10. No desenvolvimento dos filhotes foram observadas aumento no peso do coração e pulmão em GD5 e GD10 e no peso do fígado em GD10. Não foram observadas anomalias e malformações internas ou externas nos filhotes de ambos os grupos experimentais. Em GD10 não foram observadas alterações nos níveis de citocinas 6 horas após a aplicação do veneno, mas verificou-se diminuição do nível de INF- $\gamma$  24 horas depois. Em GD16 houve aumento do nível de IL-1 $\alpha$  6 horas depois da injeção do veneno e diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-10 e INF- $\gamma$  24 horas depois. Em 12 horas não houve alterações nos níveis de citocinas. O método utilizado não foi capaz de detectar os níveis de fatores de crescimento. Portanto, um envenenamento moderado pelo veneno do escorpião *T. bahiensis* é capaz de causar alterações sutis nos parâmetros reprodutivos maternos e no desenvolvimento fetal e causar algumas alterações nos níveis de citocinas de embriões 6 e 24 horas após a aplicação do veneno.

**Palavras chaves:** venenos de escorpião/toxicidade, prenhez, citocinas, fatores de crescimento, prole de ratos, *Tityus bahiensis*.

## ABSTRACT

### **Participation of growth factors and cytokines in alterations observed in offspring of rats treated with *Tityus bahiensis* scorpion venom during the pregnancy**

In Brazil scorpionism is a public health problem. The scorpion *T. serrulatus* is considered the most dangerous, but a large number of accidents also occur with *T. bahiensis*. The objective of this work was to verify the possible effects of the *T. bahiensis* scorpion venom on the maternal reproductive parameters and on the cytokines levels and growth factors in embryos after the treatment of pregnancy females. To the reproductive parameters it was used pregnant females injected with a dose of 2.5mg/Kg (s.c.) of the venom. The experimental groups were injected with venom on the 5<sup>th</sup> (GD5) or on the 10<sup>th</sup> (GD10) gestational day. The control group was injected with NaCl 1.46% on both days. On the 21<sup>st</sup> gestational day, the pups were taken out by laparotomy and were divided into two groups that received specific treatments for skeletal or visceral analyses. To evaluate the cytokines levels, pregnant females were injected with saline (1ml/kg), LPS (100µg/kg) or crude venom (2.5mg/kg) on the 10<sup>th</sup> (GD10) or 16<sup>th</sup> (GD16) gestational day. The pups were removed by laparotomy 6, 12 or 24 hours after the mother's treatment. The samples (embryo/placenta) were macerated by a tissue homogenizer and centrifuged. The cytokine levels were determined by enzyme immunoassays. In the reproductive parameters no changes were observed in the maternal weight during the gestational period, corpora lutea, number of pups, uterus weight and pups weight. There was a decrease on the number of implantation and resorption in GD5. There was alteration on the placenta's weight in GD5 and GD10. In pups development there were observed alterations in the heart and lung weight on GD5 and GD10 and on the liver weight on GD10. There were not observed external or internal anomalies and malformations in the offspring of both experimental groups. The cytokines levels were not altered after 6 hours in GD10. In GD16 there was an increase in the IL-1 $\alpha$  levels. After 24 hours it was observed a decrease in INF- $\gamma$  levels in GD10. In GD16 it was observed decrease in the levels of TNF- $\alpha$ , IL-10 and INF- $\gamma$ . After 12 hours, were not observed alterations in the cytokines levels in GD16. The levels of growth factors were not altered in any of the analyzed groups. The moderate envenomation by *T. bahiensis* scorpion venom is able to cause subtle changes on the maternal reproductive development and on the fetal development and causes some alterations in cytokines levels after 6 and 24 hours in embryos analyzed.

**Key-words:** scorpion venom/toxicity, pregnancy, cytokines, growth factors, rat's offspring, *Tityus bahiensis*.



## Lista de Abreviaturas

BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CTGF	Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo
EGF	Fatores de Crescimento Epidérmicos
FGF	Fatores de Crescimento de Fibroblastos
GH	Hormônio de Crescimento
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IGFBP	Fator de Crescimento de Proteína Tipo Insulina
IL-1	Interleucina - 1
IL-10	Interleucina - 10
IL-12	Interleucina - 12
IL-13	Interleucina - 13
IL-4	Interleucina - 4
IL-5	Interleucina - 5
IL-6	Interleucina - 6
LIF	Fator Inibidor de Leucemia
LIF	Fator Inibitório de Leucemia
LPS	Lipopolisacarídeos
NFKB	Fator Nuclear kappa B
NGF	Fator de Crescimento Neuronal
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformante Beta
TNF	Fator de Necrose Tumoral

## ÍNDICE

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
2.3. Justificativa.....	17
3. Material e Métodos.....	18
3.1. Sujeitos experimentais.....	18
3.2. Drogas e Reagentes.....	18
3.3. Procedimentos.....	19
3.3.1. Cruzamento de animais e diagnóstico de prenhez.....	19
3.3.2. Tratamento.....	19
3.3.3. Avaliação da toxicidade materna.....	21
3.3.4. Laparotomia e Avaliação do desempenho reprodutivo materno.....	21
3.3.5. Preparação dos filhotes.....	22
3.3.5.1. Diafanização e Análise esquelética.....	22
3.3.5.2. Fixação e Análise Visceral.....	22
3.3.6. Preparação das amostras para avaliação dos níveis citocinas e de fatores de crescimento .....	23
3.3.6.1 - Teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliação dos níveis de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ .....	25
3.3.6.2- Teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliação dos níveis de NGF e BDNF.....	24
3.4. Delineamento Experimental.....	26
3.4.1. Experimento 1 – Avaliação do desempenho reprodutivo materno e das alterações morfológicas de sua prole após a injeção de 2,5 mg/kg do veneno bruto do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> no 5 <sup>o</sup> ou no 10 <sup>o</sup> dia gestacional.....	26

3.4.2. Experimento 2 – Avaliação dos níveis de citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ em embriões com 10 ou com 16 dias cujas mães 10 <sup>o</sup> ou no 16 <sup>o</sup> dia de gestação.....	26
3.4.3. Experimento 3 – Avaliação dos níveis NGF e BDNF em embriões com 10 ou com 16 dias cujas mães receberam 2,5 mg/Kg de veneno bruto do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> no 10 <sup>o</sup> ou no 16 <sup>o</sup> dia de gestação.....	27
3.5. Análise Estatística.....	27
4. Resultados.....	28
4.1. Experimento 1 - Avaliação do desempenho reprodutivo materno e da incidência de malformações e anomalias após a injeção de 2,5 mg/Kg do veneno bruto do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> no 5 <sup>o</sup> ou no 10 <sup>o</sup> dia de prenhez.....	28
4.2. Experimento 2 - Avaliação dos níveis de citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ em embriões com 10 ou com 16 dias cujas mães receberam 2,5 mg/Kg de veneno bruto do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> no 10 <sup>o</sup> ou no 16 <sup>o</sup> dia de gestação.....	34
4.3. Experimento 3 - Avaliação dos níveis NGF e BDNF em embriões com 10 ou com 16 dias cujas mães receberam 2,5 mg/Kg de veneno bruto do escorpião <i>Tityus bahiensis</i> no 10 <sup>o</sup> ou no 16 <sup>o</sup> dia de gestação.....	48
5. Discussão.....	49
6. Conclusões.....	61
7. Referências Bibliográficas.....	63
8. Anexos.....	87

## 1. INTRODUÇÃO

O escorpionismo é considerado um sério problema de saúde pública no Brasil (Machado et al., 2000). Os acidentes escorpiônicos são importantes em virtude da grande frequência com que ocorrem e de sua potencial gravidade principalmente entre os mais jovens e os idosos (Sandoval e Dorce, 1993). As espécies de escorpião mais importantes existentes no Brasil são *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Tityus stigmurus* e *Tityus obscurus* (Fan et al., 1996; Torres et al., 2002, Candido, 2008; Ministério da Saúde, 2009) sendo o *T. serrulatus* considerado o mais peçonhento da América do Sul devido à alta toxicidade do seu veneno (Lucas e Silva Júnior, 1992).

Dados de 2004 do Ministério da Saúde indicavam ocorrência anual de mais de 28.000 casos de acidentes com escorpiões (Fan e Santalucia, 2005), correspondendo a aproximadamente 34% dos acidentes por animais peçonhentos no Brasil. Em 2006, segundo o Ministério da Saúde, essa ocorrência passou a ser de 36.000 casos notificados (Ministério da Saúde, 2009) correspondendo a 38,8% dos acidentes por animais peçonhentos. Esse índice é maior que os acidentes ofídicos que é de 29,3% e por aranhas que é de 19,2% (SINAN, 2008). Pelas estatísticas mais recentes, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificações, o SINAN, os acidentes com escorpiões passaram de 51.000 casos (SINAN, 2011). O maior número de notificações provém das regiões Nordeste e Sudeste do país, sendo os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Alagoas e Pernambuco responsáveis por grande parte dos acidentes escorpiônicos (Ministério da Saúde, 2009).

Os escorpiões pertencem à classe Arachnida e ordem dos Scorpiones (Lourenço, 2001). A família Buthidae é a mais significativa, já que possui espécies com veneno altamente tóxico ativo sobre o homem, podendo ser fatal em alguns casos. O gênero *Tityus*, pertencente a esta família, possui

cerca de 60 espécies sendo a *T. bahiensis* e a *T. serrulatus* as duas principais responsáveis pelos acidentes com humanos no Brasil.

O *T. serrulatus* (figura 1), também conhecido como escorpião amarelo, reproduz-se por partenogênese e é o que provoca o maior número de acidentes e de maior gravidade (Candido, 2008; Ministério da Saúde, 2009) com registro de óbitos, principalmente em crianças. Sua distribuição demográfica, antes restrita a Minas Gerais, devido à sua boa adaptação a ambientes urbanos e sua rápida e grande proliferação, hoje está ampliada para Bahia, Ceará, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Pernambuco, Sergipe, Piauí, Rio Grande do Norte, Goiás, Distrito Federal e, mais recentemente, alguns registros foram relatados para Santa Catarina (Ministério da Saúde, 2009).



**Figura 1:** *Tityus serrulatus*

O *T. bahiensis* (figura 2) possui o corpo marrom-avermelhado com manchas pretas nas patas e mede cerca de 6 a 7 centímetros. Possui espécimes machos e fêmeas (Perty, 1834; Lourenço, 2001). É o escorpião que mais causa acidentes no Estado de São Paulo, sendo também encontrado em Minas Gerais, Goiás, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, e Rio Grande do Sul (Candido, 2008; Ministério da Saúde, 2009).



**Figura 2:** *Tityus bahiensis*

A maioria dos escorpiões tem hábitos noturnos e se alimentam de baratas, pequenas aranhas, grilos e outros insetos (Candido, 2008; Ministério da Saúde, 2009). Podem viver sem comida por vários meses, mas não são tolerantes à falta de água (Bucherl, 1971).

O homem propicia ambientes favoráveis ao aparecimento do escorpião. O lixo e entulho gerados pela ação antrópica possibilitam o aparecimento de insetos e aranhas, constituintes principais da dieta escorpiônica (Lucas e Meier, 1995). Com todos estes fatores a seu favor, nota-se grande explosão demográfica da espécie (Soares et al., 2002). Com o desenvolvimento de hábitos domiciliares é cada vez mais frequente a presença de escorpiões em áreas urbanas. Dados do Ministério da Saúde relatam 56% dos acidentes com escorpião em áreas urbanas e 34% em áreas rurais (Fan e Santalucia, 2005).

O veneno dos escorpiões é produzido por um par de glândulas dentro da base do aparelho inoculador. Através de uma contração violenta dos músculos ao redor das glândulas, o veneno é ejetado no interior de um duto comum e é conduzido para o meio externo por uma abertura subterminal da farpa do ferrão (Lucas e Meier, 1995).

A extração do veneno para a pesquisa científica e para a produção do soro é feita por estimulação elétrica do telson e a quantidade média obtida, por escorpião, é de 0,33 mg de veneno bruto para o escorpião *T. bahiensis* e de 0,43 mg para o escorpião *T. serrulatus* (Lucas e Meier, 1995; Candido, 2008).

Os acidentes escorpiônicos podem ser classificados em leve, moderado ou intenso, de acordo com a severidade das manifestações clínicas (FUNASA, 2001). Vários fatores influenciam na gravidade dos acidentes, dentre eles, o local da picada, espécie e tamanho do escorpião, quantidade de veneno inoculado, massa corpórea da vítima, estação do ano em que ocorreu o acidente, idade e sensibilidade da vítima ao veneno do animal (Magalhães, 1946; Amaral et al., 1993,1994; Bouaziz et al., 1996; Fernandez-Bouzas et al., 2000, Osnaya-Romero et al., 2001; Mesquita et al., 2003).

A dor é um sintoma sempre presente no envenenamento e a intensidade com que ela se manifesta depende da quantidade de veneno inoculado no tecido e não somente da sensibilidade de cada indivíduo. A dor 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 o agravamento do quadro, os doentes podem passar de agitação psicomotora a profundo torpor. Pode 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).

No envenenamento severo por *T. bahiensis* e *T. serrulatus* as pessoas apresentam alterações do ritmo cardíaco e respiratório, podendo progredir para falência cardíaca, edema pulmonar e choque, isso acompanhado de abundantes e frequentes vômitos e diarreia, salivação excessiva, hipertensão arterial, agitação alternada com prostração e tremor (Brasil, 1993) e por vezes convulsão (Freire-Maia e Campos, 1989).

O *T. bahiensis*, assim como outros membros desse gênero, inoculam apenas uma pequena quantidade de veneno a cada picada e por isso a maioria dos acidentes envolvendo humanos adultos não é letal. Os acidentes por escorpião da nossa fauna são importantes em virtude da grande frequência com que ocorrem e de sua potencial gravidade principalmente em crianças (Goyffon et al., 1982; Lourenço et al., 1996; Ghalim et al., 2000).

Quando ocorre o acidente, o tratamento realizado visa neutralizar o mais rápido possível a toxina circulante, combater os sintomas do envenenamento e dar suporte às condições vitais dos pacientes.

Todas as vítimas de picada por escorpião, mesmo que o quadro clínico seja considerado leve, devem ficar em observação hospitalar nas primeiras 4 a 6 horas, principalmente as crianças. Nos casos moderados, é recomendável a observação por no mínimo 24 horas e, nos casos mais sérios, com instabilidade do sistema cardiorrespiratório, é indicado o monitoramento contínuo do paciente (Brasil, 1993; Brasil, 2001). Nos casos sintomáticos a dor local pode ser combatida com anestésico sem vasoconstritores, como a lidocaína ou a bupivacaína, injetados no local da picada ou sob a forma de bloqueio nervoso; também pode ser utilizado analgésico por via oral ou parenteral, dependendo da intensidade da dor. O combate à dor como medida única adotada é geralmente suficiente para todos os casos leves e para a maioria dos casos moderados em adultos (Cupo et al., 2003).

O soro antiescorpiônico, ou antiaracnídico, é indicado em todos os casos graves. Nos moderados geralmente é utilizado apenas em crianças abaixo dos 7 anos, por constituírem o grupo de risco. É indicado, antes da soroterapia, combater a dor utilizando-se anestésico local e mantendo o paciente sob observação contínua. A dose recomendada em um acidente moderado é de 4 ampolas de soro e nos acidentes graves são utilizadas 8 ampolas, por via intravenosa, sem diluição, durante 15 a 30 minutos. A dose é a mesma para adultos e crianças (Cupo et al., 2003).

Os sintomas são devidos à ação do veneno nos centros autonômicos, onde há liberação de mediadores como adrenalina, noradrenalina, acetilcolina, cininas e prostaglandinas (Chaudry et al., 1989). Além dos efeitos periféricos, existem evidências que os venenos possam ter ação sobre o sistema nervoso central (Sandoval e Dorce, 1992; Carvalho et al., 1998, Nencioni et al., 2000, Lourenço et al., 2002; Nencioni et al., 2009).

Lourenço et al. (2002) mostraram que o veneno do escorpião *T. bahiensis* possui um potencial convulsivante maior que o veneno do



escorpião *T. serrulatus*. Frações purificadas deste veneno, quando injetadas por via endovenosa, têm atividade convulsivante agindo direta ou indiretamente no sistema nervoso central e outras causam lesões neuronais (Lourenço et al., 2002).

As peçonhas dos escorpiões são direcionadas primeiramente à obtenção de seus alimentos, entretanto nota-se uma grande quantidade de toxinas anti-mamíferos adquiridas provavelmente em processos evolutivos para sua defesa contra possíveis predadores como gambás e outros (Ji et al., 1994).

Os venenos dos escorpiões são compostos por uma mistura de proteínas básicas, peptídeos e outros componentes menores como sais, açúcares, inibidores de proteases, mucopolissacarídeos, pequenas quantidades de hialuronidase e de fosfolipase, moléculas de baixo peso molecular como serotonina e histaminas e neurotoxinas (revisado por Cologna et al., 2009).

Cada veneno de escorpião pode conter várias neurotoxinas. Estas são moléculas de polipeptídios básicos com peso molecular por volta de 7000 Da, constituídas por cadeias únicas ligadas por pontes dissulfídicas (revisado por Cologna et al., 2009). As peçonhas dos escorpiões contêm dois principais tipos de neurotoxinas que atuam em canais de sódio, chamadas de alfa e beta, além de toxinas que agem nos canais de potássio, cloreto e cálcio (Carbone et al., 1982; Rochat et al., 1984; Miller et al., 1985; Kirsch et al., 1989; De Bin et al., 1993; Valdivia e Possani, 1998). Ao se ligar nos canais existentes nas membranas axonais, determinam uma liberação anormal de neurotransmissores e conseqüente desequilíbrio na concentração de outros íons (revisado por Dorce e Sandoval, 1992).

A inoculação do veneno escorpiônico produz uma injúria no tecido que induz a uma resposta inflamatória sistêmica com a conseqüente liberação de citocinas (D'Suze et al., 2003). A liberação de citocinas é mais acentuada em casos de envenenamento severo do que nos mais brandos (Meki e Mohey-Eldean, 1998), sugerindo que é necessária certa

concentração de veneno para induzir a resposta inflamatória (D'Suze et al., 2003).

As citocinas são peptídeos ou glicoproteínas produzidas por todas as células do corpo e têm efeitos reguladores sobre muitos tipos de células. Sua produção é desencadeada quando as células são ativadas por diferentes estímulos, como agentes infecciosos, tumores ou estresse. Atuam na comunicação entre as células, promovendo a indução ou regulação da resposta imune.

De acordo com as suas ações ou propriedades, as citocinas podem ser classificadas em pró ou anti-inflamatórias. As proinflamatórias, tais como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF), são as principais responsáveis em iniciar uma defesa eficaz contra patógenos exógenos. No entanto, a superprodução destes mediadores pode ser prejudicial e levar ao choque, à falência múltipla dos órgãos e à morte (Pinsky et al., 1993; Marty et al., 1994). Ao contrário, as anti-inflamatórias, que incluem a interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10), são cruciais para a regulação do processo inflamatório e pela manutenção da homeostase para o funcionamento adequado dos órgãos vitais, mas uma resposta excessiva pode resultar na supressão da função imune do corpo (Howard et al., 1993; Bone, 1996). A IL-6 tem efeitos pró e anti-inflamatório (Barton, 1997; Gay et al., 2006).

O equilíbrio entre as atividades pró e anti-inflamatória determina o grau e extensão da inflamação, e, portanto, podem levar a efeitos clínicos diferentes (Petricevich, 2006; Sanjabi et al., 2009). As citocinas anti-inflamatórias neutralizam os efeitos das proinflamatórias e, portanto, a concentração relativa de uma citocina para o seu inibidor ou antagonista irá determinar o seu efeito final (Petricevich, 2010).

A produção de citocinas pelo sistema imune contribui significativamente para a saúde e para a doença. A saúde exige que a produção de citocinas seja equilibrada e baixos níveis são necessários para manter a homeostase. A superprodução de algumas citocinas aumenta a severidade de algumas doenças de leve para letal (Petricevich, 2010).

A fisiopatologia do envenenamento escorpiônico é complexa, envolvendo uma sequência de eventos, mas há poucas dúvidas de que a inoculação do veneno geralmente progride para uma resposta inflamatória sistêmica nos casos mais severos. Nos seres humanos envenenados ou em animais experimentais expostos ao veneno bruto e/ou a toxinas purificadas de diferentes escorpiões a resposta inflamatória sistêmica é um dos principais eventos desta sequência. A interação dos componentes do veneno com as células e as proteínas do soro inicia uma série de reações que, geralmente, podem levar à lesão e morte celular (Petricevich, 2010).

Venenos de escorpiões podem estimular o eixo neuroendócrino e sistema imunológico pela sua capacidade de liberar catecolaminas, corticosteróides, bradiginina e prostaglandinas. Todos esses agentes são mediadores imunológicos e induzem a liberação de citocinas (Petricevich, 2010).

A citocina proinflamatória IL-1 foi encontrada no soro de humanos e camundongos injetados com o veneno e/ou com as toxinas do escorpião *T. serrulatus*. Níveis elevados desta citocina foram observados em macrófagos de camundongos expostos ao veneno do *T. serrulatus* e suas principais toxinas (Petricevich et al., 2007; Petricevich et al., 2008). Altos níveis de IL-1 foram encontrados no plasma de pacientes que tiveram um envenenamento moderado ou severo pelo escorpião *T. serrulatus* (Fukuhara et al., 2003). Níveis elevados de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram observados em soros de camundongos expostos ao veneno do escorpião mexicano *Centruroides noxius* (Petricevich, 2006).

No soro de pacientes envenenados pelo escorpião *T. serrulatus* e em animais experimentais expostos ao veneno dos escorpiões *Androctonus australis hector*, *Centruroides noxius* e *T. serrulatus* foram observados níveis alterados de IL-10 (Petricevich, 2010). Altos níveis de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) também foram observados em envenenamentos causados em animais experimentais e em humanos por diferentes venenos de escorpião como *Centruroides noxius* e *T. serrulatus* (Petricevich e Peña, 2002; Fukuhara et

al., 2003; Petricevich, 2006). Até o momento não há relato de liberação de fatores de crescimento (ou neurotrofinas) pela ação do veneno.

Casos de envenenamento escorpiônico têm grande possibilidade de ocorrer com mulheres na fase fértil e gestacional pelo fato dos escorpiões terem hábitos peridomiciliares. É nesse ambiente que geralmente elas passam grande parte do tempo.

Ao tratar da prole de mães injetadas com veneno de escorpião deve se pensar na toxicidade do desenvolvimento pré e pós-natal e também em todas suas possíveis ações periféricas e centrais como em suas consequências para o feto e para o filhote. Para um desenvolvimento normal do feto após a fecundação, é preciso que haja duas condições: herança genética e meio ambiente intrauterino adequado. Nos mamíferos o desenvolvimento ocorre em quatro fases: implantação, organogênese, desenvolvimento fetal e neonatal (Manson e Kang, 1989).

A fase de implantação começa na fecundação do óvulo e vai até o implante do blastocisto no útero materno. Nesta fase um agente tóxico pode provocar embriofetalidade, sendo bastante rara a ocorrência de teratogênese. A organogênese começa com a proliferação celular indo até a formação de órgãos rudimentares. Nesta, agentes podem levar a teratogênese ou a embriofetalidade e ocorre também a maioria das anomalias esqueléticas e viscerais. No desenvolvimento fetal e neonatal os órgãos começam a apresentar crescimento tecidual e maturação. As anomalias neste período são mais sutis do que as que ocorrem no período de organogênese (Manson e Kang, 1989). Estas anomalias sutis, às vezes, não são detectadas no desenvolvimento do animal por observação macro ou microscópica. Neste caso, é preciso fazer estudos comportamentais, bioquímicos e de biologia molecular após o nascimento (Nasello, 1997).

Em ratos o implante do blastocisto no útero acontece até o quinto dia da gestação, a fase de organogênese vai do sexto até o décimo sexto dia, e deste dia até o vigésimo primeiro acontece a fase fetal (Manson e Kang, 1989). Contudo, mesmo tendo estes períodos pré-determinados, sabe-se

que cada órgão tem um período crítico específico onde ocorre a formação de estruturas típicas e seu crescimento.

Qualquer influência que o conceito possa sofrer da organogênese até a amamentação pode causar desde anomalias sutis até teratogênese (Bernardi, 1999). Para um bom desenvolvimento de um ser vivo é fundamental ter uma complexa coordenação de divisões, migrações e interações celulares, regulação gênica e diferenciação. Qualquer substância que possa interferir nestes processos pode causar malformações no embrião. Com isso, a preocupação e investigação de agentes exógenos capazes de causar mortes ou anomalias comportamentais e estruturais no neonato, têm aumentando.

Estudos mostram que o estresse embrionário modula a expressão de um grande número de citocinas, entre elas o TNF- $\alpha$ , o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e a IL-1, que operam no meio intrauterino e no embrião (Torchinsky e Toder, 2004). Independente de sua natureza, os estresses embrionários perturbam primeiro o processo apoptótico levando a um aumento da taxa de mortalidade de populações de células alvo. Ao mesmo tempo, o embrião tem uma surpreendente habilidade para compensar a morte celular excessiva. Com isso, esse estresse pode resultar ou não em perda gestacional ou mau desenvolvimento fetal (Torchinsky e Toder, 2004).

Algumas citocinas como as da família TNF têm papel importante no desenvolvimento do embrião (Pfeffer, 2003). Citocinas próinflamatórias e alguns fatores de crescimento são capazes de ativar fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B). O NF $\kappa$ B é um fator que regula diversos processos como apoptose, proliferação e diferenciação celular (Chen e Greene, 2004).

Na gestação, o sistema imunológico tem um papel importante que assegura um desenvolvimento normal da gestação e também promove o desenvolvimento de complicações (Kwak-Kim et al., 2005). O sucesso da gestação está relacionado com o equilíbrio entre as citocinas produzidas pelas células tipo "T-helper1" (Th1), derivadas das células T, como o INF- $\gamma$ ,

IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Raghupathy, 2001; Denney et al., 2011) e as citocinas produzidas pelas células tipo “T-helper 2” (Th2), derivadas da célula T, como a IL-4, IL-5 e IL-13, que estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento fetal (Agarwal, 2000). Também estão envolvidas em outros aspectos da gravidez, como o implante do óvulo, amadurecimento cervical, e ativação uterina (Keelan et al., 2007). As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 são fundamentais nas primeiras fases da gestação e participam da implantação do blastocisto, mas podem contribuir para perdas prematuras até o terceiro mês de gestação (Moreli et al., 2012).

Hormônios e citocinas controlam um ou mais aspectos do processo de implantação do blastocisto no útero. As células do endométrio materno são reguladas diretamente por hormônios ovarianos e indiretamente por fatores de crescimento e citocinas. A implantação do blastocisto gera uma reação inflamatória no endométrio e certas citocinas como IL-1, IL-11, TNF, fator inibitório de leucemia (LIF) e o fator de crescimento de proteína tipo insulina (IGFBP) são consideradas como significantes moduladores do fenômeno imune intrauterino (Makrigiannakis et al., 2006).

As citocinas da classe IL-1 estão intimamente envolvidos tanto na pré-implantação e na implantação do óvulo, como também no desenvolvimento do embrião (Krussel et al., 2003). O RNA mensageiro (mRNA) da IL-1 $\beta$  foi detectado no endométrio humano a partir do 23º dia de gestação (Kauma et al., 1990) e todos os componentes da família da IL-1 têm sido identificados na pré-implantação dos embriões humanos (de los Santos et al., 1996). Imagina-se que a IL-1 pode permitir uma comunicação entre o endométrio e o blastocisto na pré-implantação (Krussel et al., 2003) aumentando a receptividade do endométrio, enquanto que o blastocisto ainda está em rota para o útero (Simon et al., 1997; Domingues et al., 2005).

A IL-10 é importante no começo da gestação por estar envolvida em vários aspectos importantes desse período, o que inclui a formação placentária. A IL-10 tem um papel protetor na unidade placentária-fetal, por inibir a secreção de citocinas inflamatórias como a IL-6, TNF- $\alpha$  e a INF- $\gamma$  (Agarwal et al., 2000). A IL-10 também atua na manutenção e no

desenvolvimento da gestação. Durante esse período sua ação imunossupressora tem um papel importante na regulação e equilíbrio de citocinas pro e anti-inflamatórias, o que leva a um desenvolvimento adequado da gestação e no crescimento e modelamento placentário, que também são importantes para um resultado favorável na gestação (Moreli et al., 2012). Os mecanismos placentários também estão envolvidos na regulação da resposta imunológica na gestação (Wegmann et al., 1993).

O nível de TNF- $\alpha$  aumenta com o desenvolvimento da gestação e a fonte primária de produção dessas citocina parece ser a placenta (Moller, 2000). O TNF- $\alpha$  regula um número de células funcionais, incluindo células que fazem parte da proliferação, diferenciação e apoptose (Patil e Parameswaran, 2010).

As citocinas também têm um papel fundamental no desenvolvimento dos neurônios, incluindo a proliferação, sobrevivência, diferenciação e crescimento axo-dendrítico e regulação das sinapses neuronais (Gilmore et al., 2003). Citocinas inflamatórias, produzidas pelo sistema imune materno ou fetal, tem um papel importante no mecanismo de infecção materna, especialmente ao causar danos na substância branca cerebral do feto (Dammann e Leviton, 1998; Gomes et al., 1998). A infecção materna pode alterar o desenvolvimento de neurônios de um jeito que aumenta o risco de desordens no neurodesenvolvimento do feto (Gilmore et al., 2003).

O período de desenvolvimento do cérebro que é vulnerável e mais sensível aos estimulantes externos, incluindo substâncias químicas, é conhecido como o surto de crescimento do cérebro. Alguns eventos que ocorrem durante este período incluem a proliferação das células da glia e a diferenciação neuronal com o desenvolvimento de axônios e dendritos além da sinaptogênese (Dobbing, 1974). Estes acontecimentos, em ratos, ocorrem geralmente durante o período pós-natal aproximadamente entre o 4º e o 10º dia de vida. Esse período é equivalente, em seres humanos, ao terceiro trimestre da gestação (Bayer et al., 1993;. Dobbing e Sands, 1979).

Os fatores de crescimento, como as neurotrofinas, têm suas ações envolvidas com processos de crescimento, reparo e diferenciação celular

(Gerton e Cueto, 2001). Têm um papel crucial na manutenção adequada do processo de diferenciação e de sobrevivência neuronal no desenvolvimento do sistema nervoso central (Chao, 1992). As neurotrofinas são uma família de moléculas usualmente expressas no sistema nervoso (Rehn e Rees, 2005) e têm um papel fundamental no desenvolvimento deste, na regulação, diferenciação e sobrevivência neuronal assim como no desenvolvimento das sinapses e na sua manutenção (Lewin e Barde, 1996; Thoenen, 2000; Tucker, 2002; Gilmore et al., 2003) agindo no desenvolvimento e plasticidade cerebral (Lewin e Barde, 1996; Thoenen, 2000; Tucker, 2002; Aksu et al., 2012). Podem exercer funções significantes na unidade placentária/fetal.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é abundante no cérebro e nos nervos periféricos e normalmente contribui para o desenvolvimento normal, crescimento e sobrevivência dos neurônios (Henningan et al., 2007). O fator de crescimento neuronal (NGF) é tido como mediador do crescimento celular e de diferenciação de células-alvo, incluindo neurônios e células não neuronais, e tem efeitos sobre a neurogênese e a morfogênese durante o período embrionário do rato (Katz et al., 1990; Wheeler e Bothwell, 1992; Miralles et al., 1998).

Estudos indicam que o BDNF materno chega ao cérebro do feto através da barreira placentária e pode contribuir para seu desenvolvimento (Kodomari et al., 2009).

No trato reprodutivo materno, o NGF participa dos mecanismos de fertilização por ativação do cito-esqueleto mediando a locomoção dos espermatozoides, favorecendo a implantação de óvulo e inibindo a rejeição através do sistema imunitário (Levi-Montalcini, 1987). Como é expresso no útero gravídico, o NGF materno pode desempenhar um papel na formação da placenta em camundongos através da transformação de células gigantes em células trofoblásticas (Kanai-Azima et al., 1997).

O fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) pertence a uma grande família com papel importante no crescimento de muitos órgãos e sistemas (Abreu et al., 2002). Suas principais funções estão relacionadas ao



controle do ciclo celular, diferenciação, regulação do desenvolvimento, formação de matriz extracelular e angiogênese (Bottner et al., 2000). Outros membros dessa superfamília estão envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso (Mehler et al., 1998). O sinergismo entre uma isoforma desse fator com o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) pode ter como consequência efeitos no controle ou descontrole da proliferação e/ou diferenciação celular (Abreu et al., 2002).

Outra família de fatores de crescimento, os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), é responsável por mediar várias respostas celulares durante o período de desenvolvimento do embrião. Desempenham um papel crítico na morfogênese pela regulação da proliferação, diferenciação e migração celular. Um membro dessa família, o FGF-2, tem efeitos em vários tecidos como o cerebral, promovendo diferenciação e sobrevivência neuronal; muscular, promovendo a miogênese; ósseo, atuando na condrogênese; epitelial, fazendo reparos teciduais (Bikfalvi et al., 2005).

Os fatores de crescimento epidérmicos (EGF) são polipeptídios, primeiramente isolados das glândulas submaxilares de camundongos adultos, que estimulam a proliferação e queratinização de vários tecidos *in vivo* e *in vitro* (Cohen, 1972). Os EGF são parte de uma complexa rede de fatores de crescimento que ajudam a modular o crescimento celular (Goodsell, 2003). Alguns membros da família dos EGF têm múltiplos efeitos no desenvolvimento embrionário (Gerton e Cueto, 2001) e de filhotes (Smart et al., 1989).

Já foi demonstrado que o veneno escorpiônico tem capacidade de causar anomalias congênitas e reabsorção fetal quando inoculado em ratas prenhes (Ismail, 1983; Cruttenden et al., 2008). Trabalhos realizados em nosso laboratório com veneno de escorpiões da nossa fauna tem mostrado que estes podem causar alterações nos períodos pré e pós-natal de ratos. Os dados obtidos até agora mostram que tanto doses que causam envenenamento leve como moderado provocam alterações morfológicas nos conceptos (Cruttenden et al., 2008) e alterações no desenvolvimento físico e

comportamental da prole de mães tratadas no período gestacional (Barão et al., 2008; Dorce et al., 2009; Dorce et al., 2010).

Em vista de termos encontrado alterações nos filhotes tanto na fase pós-natal (Dorce et al., 2009) como na idade adulta (Dorce et al., 2010) nos propusemos a investigar se a administração materna do veneno do escorpião *T. bahiensis* poderia causar alterações no desempenho reprodutivo materno e na morfologia da prole.

Uma vez que alterações morfológicas e comportamentais podem estar relacionadas a alterações nos fatores de crescimento e citocinas maternas ou fetais procuramos investigar se a administração do veneno poderia interferir nos níveis de fatores de crescimento como o fator de crescimento neuronal (NGF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e de citocinas como a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

Estudos nesta área são fundamentais para um melhor entendimento dos processos de envenenamento e para contribuir para melhores tratamentos dos casos de escorpionismo uma vez que o problema está se tornando cada vez mais sério no país. Devido à alta toxicidade do veneno e à crescente exposição humana à peçonha dos escorpiões é preocupante o provável efeito do veneno durante o período gestacional. Com isso, esse estudo pode contribuir para o esclarecimento e geração de informações sobre o envenenamento escorpiônico em relação à toxicidade materna e da prole, guardadas as devidas diferenças entre animais experimentais e seres humanos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

Estudar o desempenho reprodutivo materno e a morfologia da prole de ratos a partir da administração materna de veneno bruto do escorpião *T. bahiensis* e avaliar os níveis de fatores de crescimento e citocinas em embriões provenientes de mães que receberam o veneno durante o período gestacional.

### 2.2. Objetivos Específicos

- a) Estudar o desempenho reprodutivo materno e a morfologia da prole de ratos após a administração materna de 2,5mg/kg do veneno bruto do escorpião *T. bahiensis* no 5º ou 10º dias de gestação.
- b) Avaliar os níveis das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em embriões com 10 ou 16 dias provenientes de mães que receberam 2,5mg/kg de veneno no 10º ou 16º dia gestacional.
- c) Avaliar os níveis de NGF e BDNF em embriões com 10 ou 16 dias de gestação provenientes de mães que receberam 2,5mg/kg de veneno no 10º ou 16º dia gestacional.

### **2.3. Justificativa**

Esses dias foram escolhidos pois em estudos anteriores foram observada alterações comportamentais e do desenvolvimento físico de filhotes de mães tratadas nestes dias. O quinto dia de gestação corresponde ao último dia do período de implantação do blastocisto no útero durante o qual qualquer substância nociva leva à embriofetalidade. O décimo dia de gestação corresponde ao meio do período de organogênese, que consiste em uma série de processos definidos sequencialmente e na formação dos órgãos propriamente dita. O décimo sexto dia corresponde à fase de desenvolvimento neonatal, que consiste no período onde ocorre principalmente a maturação e o desenvolvimento cerebral.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Sujeitos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar (machos e fêmeas), pesando entre 250 e 300g, para cruzamentos e obtenções dos embriões e neonatos usados nos experimentos. Os animais adultos foram acondicionados a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo de luz claro e escuro de 12 horas, no Biotério do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan. Água e comida foram fornecidas “ad libitum” durante todo o procedimento experimental.

#### 3.2. Drogas e Reagentes

- Veneno bruto liofilizado do escorpião *T. bahiensis*, (obtido pelo Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan e fornecido pela Comissão de veneno);
- Solução Salina 1,46% (Cloreto de Sódio NaCl (1,46g) – Dinâmica; água destilada);
- Éter Etílico P.A. - Synth;
- Acetona P.A. – Synth;
- Líquido de Bouin (Ácido Pícrico puro P.A. - Dinâmica; Formaldeído P.A. 37% - Synth; Ácido Acético Glacial P.A. – Synth);
- Solução de hidróxido de potássio (0,8%) – Sigma – Aldrich;
- Alizarina (Solução saturada) ( $\text{C}_{14}\text{H}_8$ ) – Synth;
- Solução de Álcool Etílico 80% (Álcool Etílico P.A. – Synth; água destilada);
- Solução de Álcool Etílico 90% (Álcool Etílico P.A. – Synth; água destilada);
- Solução Clareadora (2:2:1) (Álcool Etílico P.A. – Synth; Glicerina P.A. – Synth, Álcool Benzílico P.A. – Synth);
- Solução de Formaldeído a 10% (Formaldeído P.A. 37% - Synth, água destilada);
- Coquetel de Inibidores de proteases - Sigma – Aldrich;

- PBS (Cloreto de Sódio Cristal (8 g) – Dinâmica; Cloreto de Potássio P.A. – Synth, (KCl 0,2 g); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>12H<sub>2</sub>O (2,89 g) - Merck);
- Lipopolissacarídeo (LPS) obtido de *Escherichia coli*, sorotipo 005: B5; Sigma – Aldrich.

### **3.3. Métodos**

#### **3.3.1. Cruzamento de animais e diagnóstico de prenhez**

As ratas foram agrupadas em gaiolas de polietileno (40x50x20cm) 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.

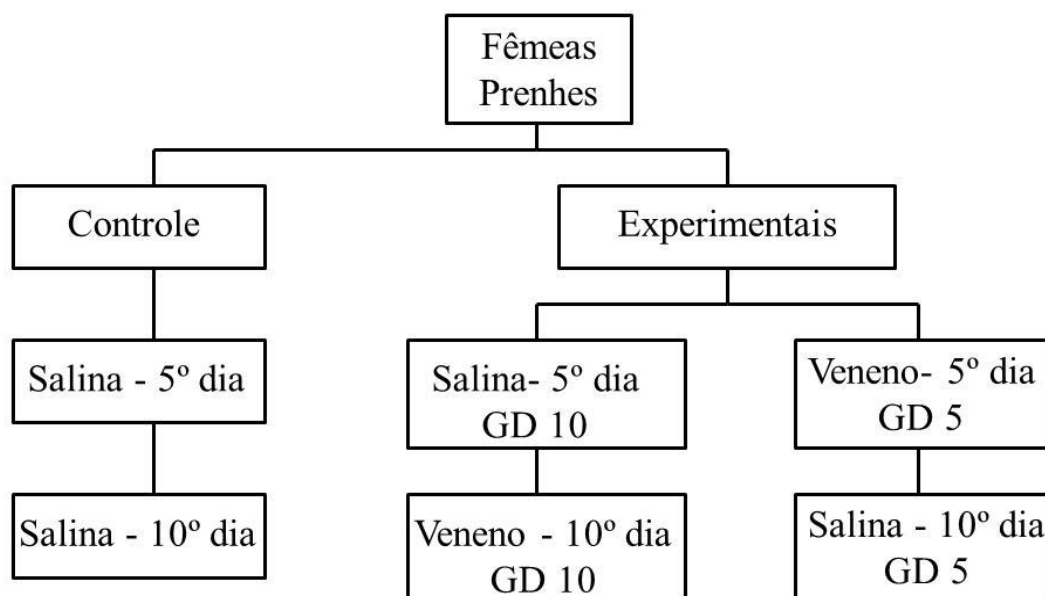
O lavado vaginal foi realizado aproximadamente às 8 horas da manhã e consistiu na injeção de 60 microlitros de solução salina, com ajuda de uma pipeta, no canal vaginal da rata e a retirada do material com esta mesma pipeta. O líquido foi colocado em lâmina de vidro e observado ao microscópio óptico onde se verificou a presença de espermatozoides e de células relacionadas à fase estral do ciclo da fêmea (caracterizada como 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.

#### **3.3.2. Tratamento**

A avaliação do desempenho reprodutivo materno e da morfologia de sua prole foi realizada em 3 grupos com 10 fêmeas prenhes cada:

- a) Grupo Controle: que recebeu injeção de solução salina 1,46% (1,0 ml/Kg s.c.) no 5<sup>o</sup> e no 10<sup>o</sup> dia gestacional;

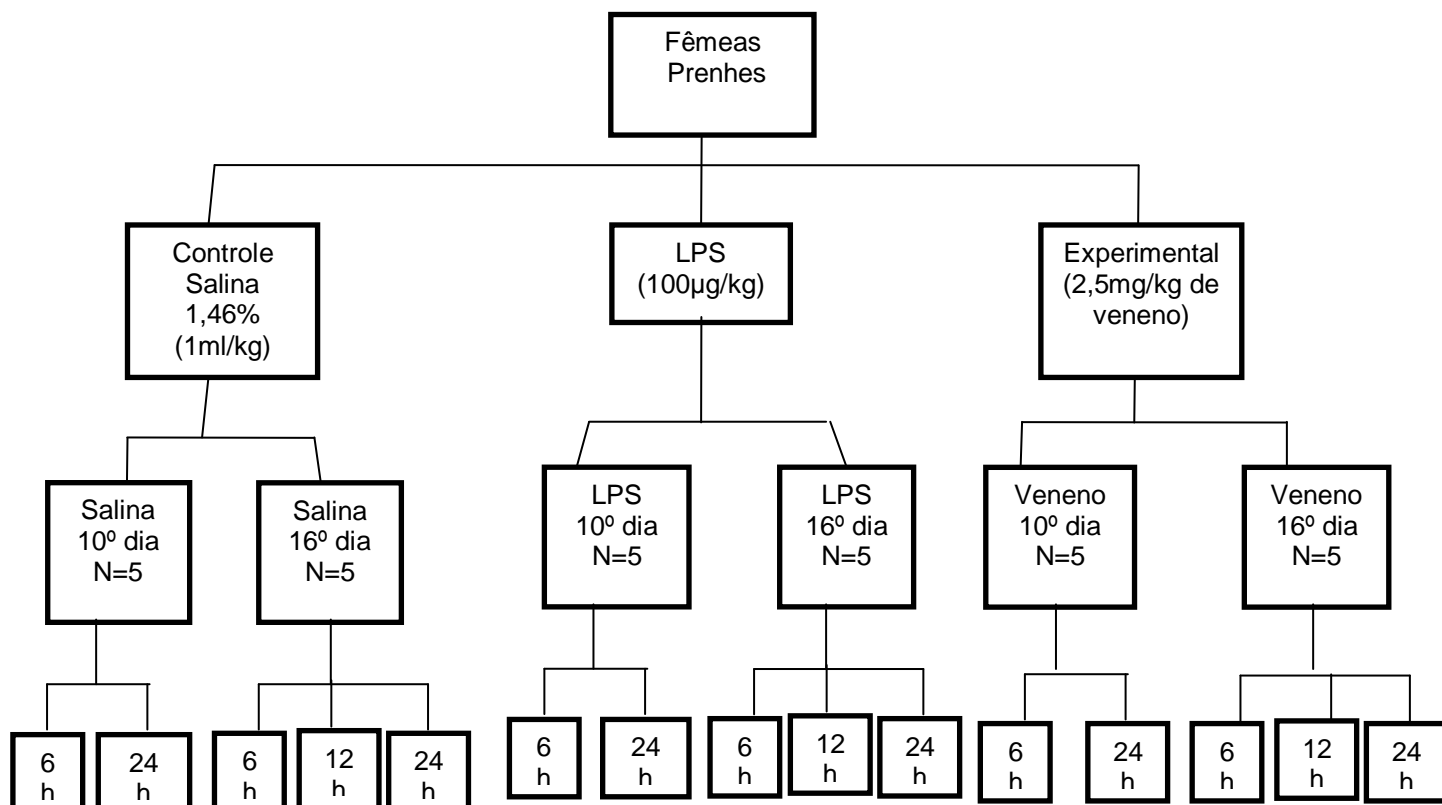
- b) Grupo Experimental (GD5): que recebeu injeção de veneno (2,5 mg/Kg s.c.) no 5º dia e salina 1,46% no 10º dia gestacional;
- c) Grupo experimental (GD10): que recebeu injeção de salina 1,46% no 5º e veneno (2,5 mg/Kg s.c.) no 10º dia de gestação.



As avaliações dos níveis de NGF, BDNF e de citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) foram realizadas em 6 grupos com 5 fêmeas prenhes cada:

- a) Grupo Controle Negativo: que recebeu injeção de solução salina 1,46% (1,0 ml/Kg s.c.) no 10º dia gestacional;
- b) Grupo Controle Negativo: que recebeu injeção de solução salina 1,46% (1,0 ml/Kg s.c.) no 16º dia gestacional;
- c) Grupo Controle Positivo: que recebeu injeção de solução de LPS (100  $\mu$ g/Kg i.p.) no 10º dia gestacional;
- d) Grupo Controle Positivo: que recebeu injeção de solução de LPS (100  $\mu$ g/Kg i.p.) no 16º dia gestacional;
- e) Grupo Experimental (GD10): que recebeu injeção de veneno (2,5 mg/Kg s.c.) no 10º dia gestacional;

- f) Grupo Experimental (GD16): que recebeu injeção de veneno (2,5 mg/Kg s.c.) no 16º dia gestacional.



Para a dosagem de fatores de crescimento e citocinas foram utilizados 12 embriões de cada fêmea prenhe sendo que para cada dosagem foi utilizado um mix de 2 filhotes. A avaliação desses fatores foi realizada nos embriões juntamente com suas placentas.

A dose, 2,5 mg/Kg, foi determinada com base na  $DL_{50}$  e em experimentos anteriores em nosso laboratório e corresponde àquela que causa um envenenamento moderado, sem levar à morte das mães. Os dias de injeção foram os mesmos utilizados em estudos anteriores, também realizados em nosso laboratório.



### 3.3.3. Avaliação da toxicidade materna

A avaliação da toxicidade materna foi realizada através da avaliação do ganho de peso das mães durante o período gestacional.

As fêmeas prenhes foram pesadas nos dias 0, 5, 10, 16 e 21 da gestação para evolução ponderal do peso materno.

Estas mesmas fêmeas foram utilizadas para a avaliação do desempenho reprodutivo materno.

### 3.3.4. Laparotomia e Avaliação do Desempenho Reprodutivo Materno

No vigésimo primeiro dia de gestação, as ratas foram submetidas à laparotomia. Para isso, os animais foram sacrificados através de inalação de CO<sub>2</sub> e imediatamente os cornos uterinos foram expostos e os filhotes retirados junto a suas placentas. Os filhotes foram contados, pesados e analisados externamente quanto à sua aparência geral, sexo e vitalidade. As placentas foram pesadas e analisadas quanto à sua aparência geral.

Foi verificada a presença ou não de reabsorções e pontos de implantação no útero.

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

As perdas pré e pós-implantações foram calculadas, respectivamente, segundo as fórmulas abaixo:

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

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

### 3.3.5. Preparação dos filhotes

Após o procedimento descrito anteriormente cada ninhada foi dividida aleatoriamente em dois grupos distintos para análise de possíveis malformações esqueléticas (3.3.5.1) ou malformações viscerais macroscópicas (3.3.5.2).

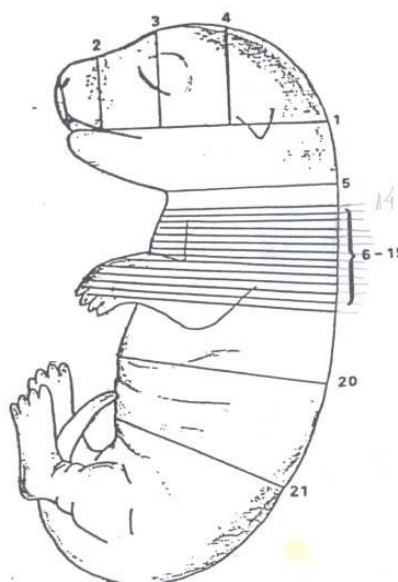
#### 3.3.5.1. Diafanização e Análise Esquelética

Para preparação dos filhotes utilizamos um procedimento proposto por Staples e Schenel (1964). Baseado neste método os corpos dos filhotes foram mergulhados em acetona e após 24 horas foram eviscerados. Os rins, o fígado, os pulmões e o coração foram pesados. A acetona foi substituída por uma solução de KOH a 0,8% em quantidade suficiente para cobrir os filhotes e nesta foram adicionadas 4 gotas de solução saturada de alizarina. Esta solução foi trocada quatro vezes com intervalo mínimo de 24 horas entre trocas. Em seguida a solução foi substituída pela solução clareadora (álcool etílico, glicerina e álcool benzílico P.A.). As análises foram baseadas na contagem dos pontos de ossificação como proposto por Aliverti et al., (1979) o 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).

#### 3.3.5.2. Fixação e Análise Visceral

Os corpos dos filhotes foram colocados em solução de Bouin para fixação das estruturas viscerais e descalcificação dos ossos. Após quatro

dias essa solução foi substituída por álcool 80% sendo substituída por solução de 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 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 (figura 3).



**Figura 3:** Esquema da posição dos cortes para análise visceral pelo método proposto por Wilson (1965).

### **3.3.6. - Preparação das amostras para avaliação dos níveis de fatores de crescimento e citocinas**

No 10<sup>o</sup> ou 16<sup>o</sup> dia de gestação, as ratas designadas para estas análises foram submetidas à laparotomia após serem sacrificadas através de inalação de CO<sub>2</sub>. Os cornos uterinos foram expostos e embriões (10<sup>o</sup> dia) ou fetos (16<sup>o</sup> dia) foram retirados junto com suas placentas.

O sangue materno foi coletado por punção cardíaca em seringas plásticas e transferido para tubos plásticos contendo citrato de sódio (3,8%) como anticoagulante e centrifugado a 4.470 G por 15 minutos em temperatura ambiente. O plasma obtido foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até os ensaios.

Os tecidos (fetos ou embriões e placentas) foram colocados em solução inibidora de protease, preparada a partir de uma solução de tampão fosfato com adição de coquetel inibidor de proteases Sigma (100  $\mu\text{l}$  de coquetel para 34 ml de PBS). As amostras foram maceradas por um homogeneizador de tecidos (Polytron) em 3 pulsos de 10 segundos cada e o homogenato foi centrifugado a 6.707 G por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi recolhido, aliquoteado e estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até os ensaios.

#### *3.3.6.1 - Teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliação dos níveis de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ .*

Os níveis de citocinas foram determinados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com o fabricante dos kits (IBL International GMBH, Alemanha).

Para a realização dos ensaios imunoenzimáticos foram utilizados o sobrenadante dos tecidos macerados e o plasma materno.

Cada placa de microtitulação, de cada citocinas, foi revestida com as amostras e com a curva padrão de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . As placas foram lavadas e foi adicionado a cada poço o anticorpo monoclonal para cada citocina (biotina). Após uma incubação de 2h à temperatura ambiente, as placas foram lavadas e adicionou-se a cada poço a enzima estreptavidina para uma ulterior incubação de 1h a temperatura ambiente. Após a adição da enzima estreptavidina, substrato e solução de parar, a quantidade de cada citocina foi determinada por absorbância a 450 nm. A curva padrão demonstra uma relação direta entre a densidade óptica (OD) e a concentração.

### 3.3.6.2- *Teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) para avaliação dos níveis de NGF e BDNF.*

Os níveis dos fatores de crescimento, NGF e BDNF, foram determinados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com o fabricante dos kits (Chemicon International, USA).

Para a realização dos ensaios imunoenzimáticos foram utilizados o sobrenadante dos tecidos macerados.

As placas de microtitulação foram revestidas durante 24h com as amostras e com a curva padrão de BDNF ou NGF. As placas foram então lavadas com diluente de amostra por 4 vezes e foi adicionado a cada poço o anticorpo monoclonal anti-BDNF ou anticorpo de coelho anti-NGF (biotina) e incubados durante 3h à temperatura ambiente. Depois da lavagem um anticorpo conjugado com a enzima estreptavidina foi adicionado a cada poço e incubados à temperatura ambiente por 1h. Após a adição da estreptavidina, substrato e solução de parar, a quantidade de cada neurotrofina foi determinada por absorvância a 450 nm. A curva padrão demonstra uma relação direta entre a densidade óptica (OD) e a concentração.

### 3.4. Delineamento experimental

*3.4.1. Experimento 1 – Avaliação do desempenho reprodutivo materno e da incidência de malformações e anomalias na prole após a injeção de 2,5 mg/Kg do veneno bruto do escorpião Tityus bahiensis no 5º ou no 10º dia de prenhez.*

Após a confirmação de prenhez conforme procedimento descrito no item 3.3.1, as fêmeas (10 por grupo) foram distribuídas, conforme descrito no item 3.3.2. Os animais deste experimento receberam injeção subcutâneas de 2,5 mg/Kg de veneno bruto no 5º ou no 10º dia de gestação e os animais do grupo controle receberam 1,0 ml/Kg de solução salina, por via subcutânea, nos mesmos dias.

Para determinação da existência de toxicidade materna foi avaliado o ganho de peso 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 3.3.4 e a ninhada foi dividida aleatoriamente: uma parte, aproximadamente 8 filhotes, foi submetida a análise visceral conforme item 3.3.5.2., outra parte, aproximadamente 8 filhotes, foi submetida a análise esquelética conforme item 3.3.5.1. Na medida do possível, as duas amostras foram proporcionais.

*3.4.2. Experimento 2 – Avaliação dos níveis de citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em embriões com 10 dias ou em fetos com 16 dias cujas mães receberam 2,5 mg/kg de veneno bruto do escorpião Tityus bahiensis no 10º ou no 16º dia de gestação.*

Após a confirmação de prenhez (item 3.3.1), as fêmeas (5 por grupo) foram distribuídas conforme descritos no item 3.3.2. Os animais do grupo experimental receberam injeção subcutânea de 2,5 mg/Kg de veneno bruto no 10º ou no 16º dia de gestação. Os animais do grupo controle receberam

1,0 ml/Kg de solução salina, por via subcutânea, no 10<sup>o</sup> ou no 16<sup>o</sup> dia de gestação. Os animais do grupo controle positivo receberam 100 µg/kg de solução de LPS, por via intra-peritonial, no 10<sup>o</sup> ou no 16<sup>o</sup> dia de gestação.

A laparotomia foi realizada 6, 12 ou 24 horas após a injeção. Os embriões e as placentas foram extraídos e as amostras foram preparadas conforme item 3.3.6. Foi realizado o teste de ELISA conforme item 3.3.6.1.

*3.4.3. Experimento 3 – Avaliação dos níveis NGF e BDNF em embriões com 10 dias ou em fetos com 16 dias cujas mães receberam 2,5 mg/Kg de veneno bruto do escorpião Tityus bahiensis no 10<sup>o</sup> ou no 16<sup>o</sup> dia de gestação.*

Após a confirmação de prenhez (item 3.3.1), as fêmeas (5 por grupo) foram distribuídas conforme descritos no item 3.3.2. Os animais do grupo experimental receberam injeção subcutânea de 2,5 mg/Kg de veneno bruto no 10<sup>o</sup> ou no 16<sup>o</sup> dia de gestação. Os animais do grupo controle receberam 1,0 ml/Kg de solução salina, por via subcutânea, no 10<sup>o</sup> ou no 16<sup>o</sup> dia de gestação. Os animais do grupo controle positivo receberam 100 µg/kg de solução de LPS, por via intra-peritonial no 10<sup>o</sup> ou no 16<sup>o</sup> dia de gestação.

A laparotomia foi realizada 6, 12 ou 24 horas após a injeção. Os embriões e as placentas foram extraídos e as amostras foram preparadas conforme item 3.3.6. Foi realizado o teste de ELISA conforme item 3.3.6.2.

### **3.5. Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando-se primeiramente o teste de Bartlett. Após essa análise, para os dados de análise esquelética e visceral, com distribuição não paramétrica foi utilizado o teste de Fisher. Para os demais dados com distribuição paramétrica foi utilizado o teste de ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer. A probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerada capaz de mostrar as diferenças significantes entre os grupos, para todas as comparações realizadas.

## 4. RESULTADOS

*4.1. Experimento 1 - Avaliação do desempenho reprodutivo materno e da incidência de malformações e anomalias na prole após a injeção de 2,5 mg/Kg do veneno bruto do escorpião Tityus bahiensis no 5º ou no 10º dia de prenhez.*

Na análise do desempenho reprodutivo os resultados obtidos indicam que não houve diferença significativa no ganho de peso materno entre ambos os grupos tratados com o veneno e o grupo controle (figura 4).

Em relação aos parâmetros reprodutivos maternos em fêmeas que receberam o veneno no 5º dia gestacional, houve diminuição do número de reabsorções e de implantações e aumento das perdas pré-implantação (tabela 1). Quanto aos outros parâmetros não foi verificada nenhuma alteração (tabela 1). O peso do útero dessas mães também não foi diferente do controle (tabela 1).

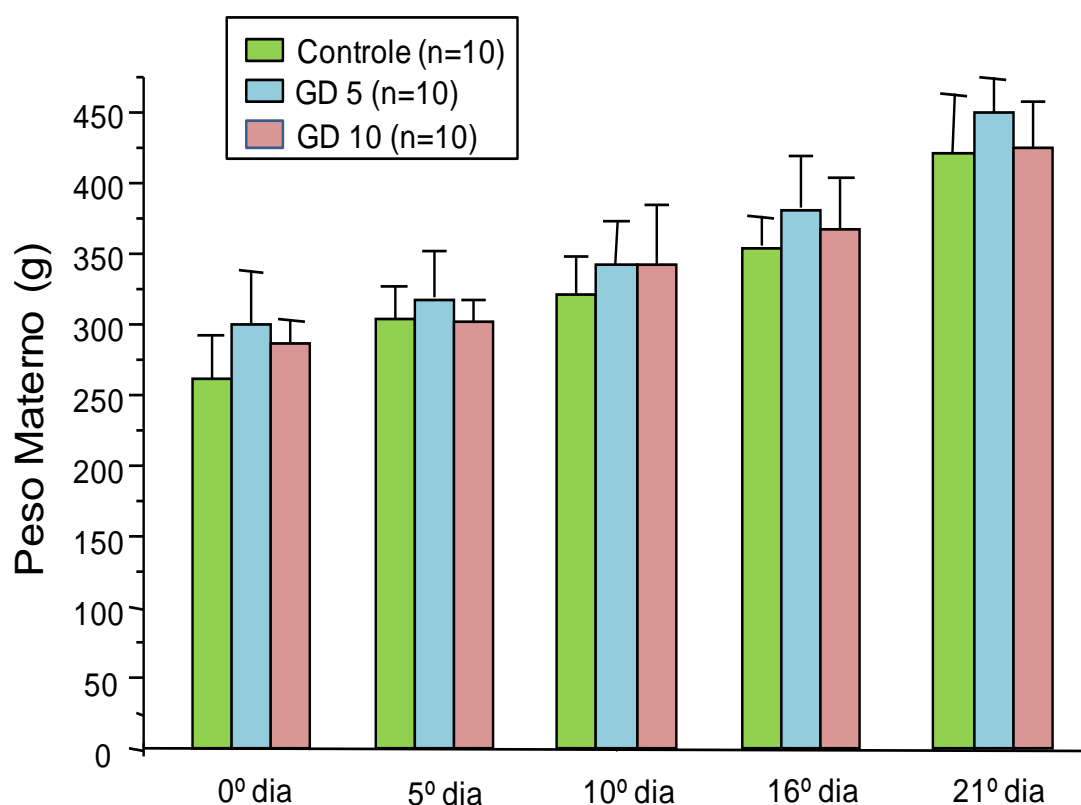
Nas fêmeas que receberam o veneno no 10º dia gestacional não foram observadas alterações nos parâmetros reprodutivos (tabela 1). O peso do útero dessas fêmeas também não foi diferente do controle (tabela 1).

No grupo de fêmeas tratadas no 5º dia de gestação foram obtidos 119 fetos. Neste grupo houve aumento significativo do peso dos filhotes e do peso das placentas (tabela 2; figura 5) em relação ao controle. Houve, também, aumento significativo do peso dos pulmões e coração desses filhotes (figura 5). Os demais órgãos não apresentaram alterações (tabela 2; figura 5). Em relação à análise macroscópica, os órgãos apresentaram aparência normal. Na análise esquelética e visceral, não foram observadas alterações (tabela 3).

No grupo de fêmeas que receberam o veneno no 10º dia gestacional foram obtidos 129 filhotes. O peso dos filhotes e das placentas teve um aumento significativo em relação ao controle (tabela 2; figura 5). Em relação ao peso dos órgãos dos filhotes houve um aumento de fígado, pulmões e



coração (tabela 2; figura 5). Os rins não sofreram alterações (tabela 2; figura 5). Em relação à análise macroscópica, os órgãos apresentaram aparência normal. Quanto à análise esquelética e visceral, não foram observadas alterações (tabela 3).



**Figura 4:** Evolução ponderal do peso materno, em gramas, de mães tratadas com o veneno bruto do escorpião *Tityus bahiensis* no 5º ou no 10º dia gestacional. Os dados se referem à média  $\pm$  desvio padrão da média. n= número de fêmeas por ninhada. Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

**Tabela 1-** Análise dos parâmetros do desempenho reprodutivo materno após injeção de 2,5 mg/Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus bahiensis* no 5<sup>o</sup> ou 10<sup>o</sup> dia gestacional.

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle (n=10)</b>	<b>GD 5 (n = 10)</b>	<b>GD 10 (n=10)</b>
Reabsorções	0.9±0.3	0.1±0.1*	0.2±0.1
Implantações	14.2±0.5	11.9±0.7*	13.0±0.5
Corpos Lúteos	14.8±0.4	14.7±0.6	14.3±0.4
Filhotes	13.3±0.6	12.9±0.6	12.8±0.6
Filhotes vivos	13.3±0.6	12.9±0.6	12.7±0.6
Peso do útero	99.5±4.3	95.2±6.6	94.8±3.6
Perdas Pré-implantação	0.03±0.02	0.14±0.03*	0.09±0.03
Perdas Pós-implantação	0.08±0.02	0.12±0.09	0.03±0.01

Os dados se referem à média ± desvio padrão da média. n= número de fêmeas.

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

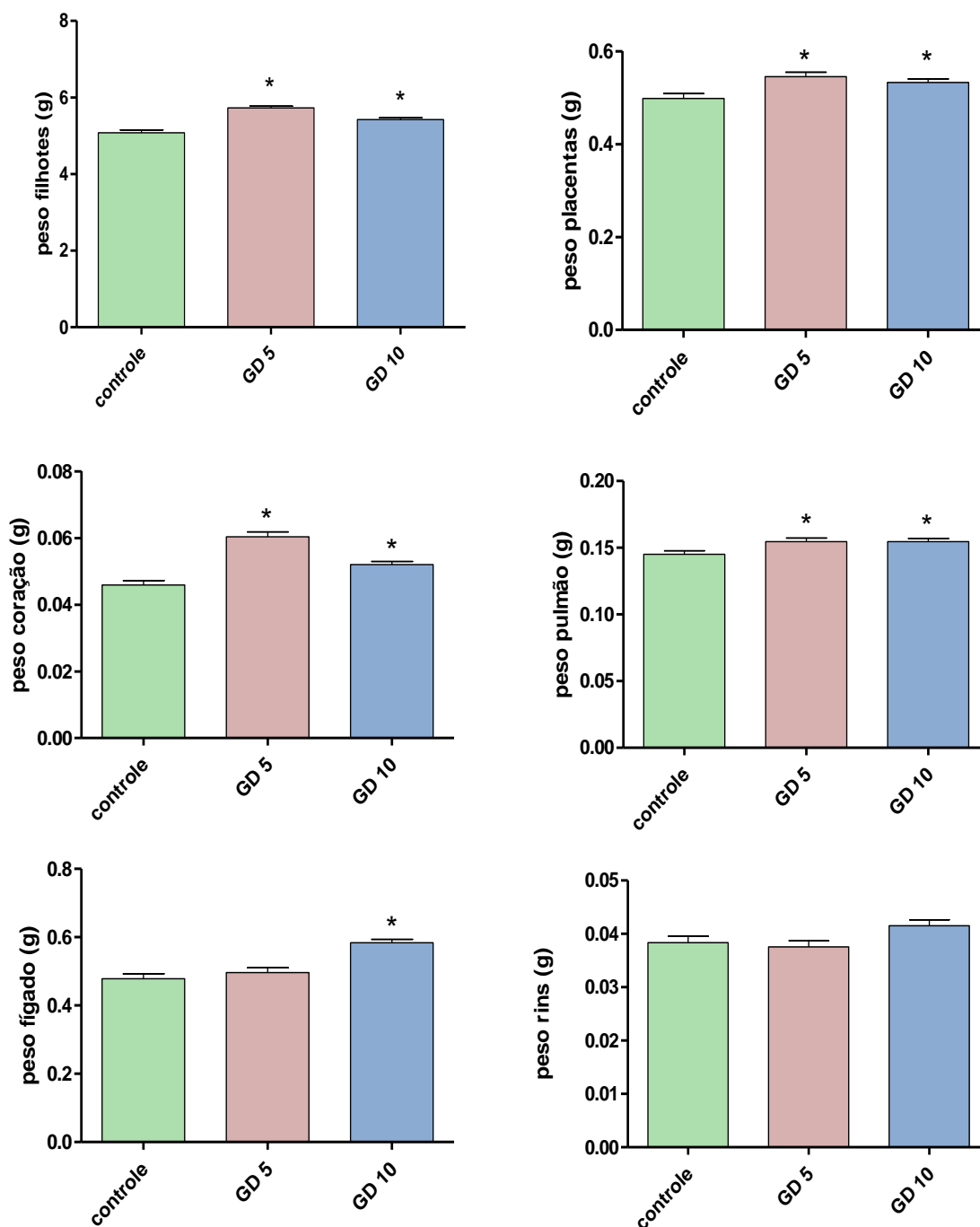
**Table 2** – Peso dos filhotes, placentas e dos órgãos da prole de mães tratadas com o veneno do escorpião *Tityus bahiensis* (2.5 mg/kg), no 5<sup>o</sup> (GD5) e/ou 10<sup>o</sup> (GD10) dia gestacional.

<b>Peso</b>	<b>Controle</b>	<b>N</b>	<b>GD5</b>	<b>n</b>	<b>GD10</b>	<b>N</b>
Peso dos filhotes (g)	5.10±0.07	133	5.70±0.04*	119	5.44±0.04*	129
Peso das placentas (g)	0.49±0.01	133	0.54±0.01*	119	0.53±0.01*	129
Peso absoluto do fígado (g)	0.47±0.01	66	0.49±0.01	60	0.58±0.01*	65
Peso relativo do fígado (%)	8.63±2.06	66	8.78±1.87	60	10.49±1.34*	65
Peso absoluto dos pulmões (g)**	0.14±0.002	66	0.15±0.02*	60	0.15±0.02*	65
Peso relativo dos pulmões (%)**	2.63±0.35	66	2.71±0.38	60	2.78±0.34	65
Peso absoluto do coração (g)	0.04±0.001	66	0.06±0.01*	60	0.05±0.01*	65
Peso relativo do coração (%)	0.83±0.16	66	1.06±0.16*	60	0.93±0.14*	65
Peso absoluto dos rins (g)**	0.04±0.001	66	0.03±0.01	60	0.04±0.01	65
Peso relativo dos rins (%)**	0.69±0.02	66	0.67±0.15	60	0.74±0.15	65

Dados se referem à média ± desvio padrão. n = número de filhotes

\* Significativamente diferente do controle; p<0.05. Teste de ANOVA seguido do teste de Tukey Kramer

\*\* Os rins e pulmões foram pesados aos pares



**Figura 5:** Pesos dos filhotes e de seus órgãos provenientes de mães que receberam injeção de 2,5 mg/Kg do veneno bruto do escorpião *Tityus bahiensis* em diferentes períodos da gestação. Os dados se referem à média  $\pm$  desvio padrão da média. \* Significativamente diferente do controle ( $p < 0,05$ ) - Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

**Tabela 3** – Análise visceral e esquelética dos filhotes de fêmeas tratadas com o veneno do escorpião *Tityus bahiensis* (2,5 mg/kg) no 5<sup>o</sup> ou 10<sup>o</sup> dia gestacional.

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>GD5</b>	<b>GD10</b>
<b>Malformações externas</b>			
Número de fetos afetados	0/133	2/119	0/129
Número de ninhadas afetadas	0/10	1/10	0/10
<b>Anomalias externas</b>			
Número de fetos afetados	0/133	0/119	0/129
Número de ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10
<b>Malformações esqueléticas</b>			
Número de fetos afetados	0/66	0/46	0/53
Número de ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10
<b>Anomalias esqueléticas</b>			
Número de fetos afetados	0/66	0/46	0/53
Número de ninhadas afetadas	0/10	0/10	0/10
Ossificação incompleto dos ossos da cabeça	0/66	0/46	0/53
Costelas onduladas	0/66	0/46	0/53
Costelas fundidas	0/66	0/46	0/53
Vértebras compartilhadas	0/66	0/46	0/53
Costelas rudimentares	0/66	0/46	0/53
<b>Malformações viscerais</b>			
Número de fetos afetados	0/66	2/59	0/65
Número de ninhadas afetadas	0/10	1/10	0/10
<b>Anomalias viscerais</b>			
Número de fetos afetados	1/66	2/59	3/65
Número de ninhadas afetadas	1/10	2/10	3/10
Hemorragia cerebral	1/66	3/59	3/65

Teste Fisher.

4.2. *Experimento 2 - Avaliação dos níveis de citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em embriões com 10 dias ou fetos com 16 dias cujas mães receberam 2,5 mg/Kg de veneno bruto do escorpião Tityus bahiensis no 10<sup>o</sup> ou no 16<sup>o</sup> dia de gestação.*

Os níveis das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no plasma de fêmeas prenhes ficaram abaixo do nível de detecção do método, em ambos os grupos experimentais.

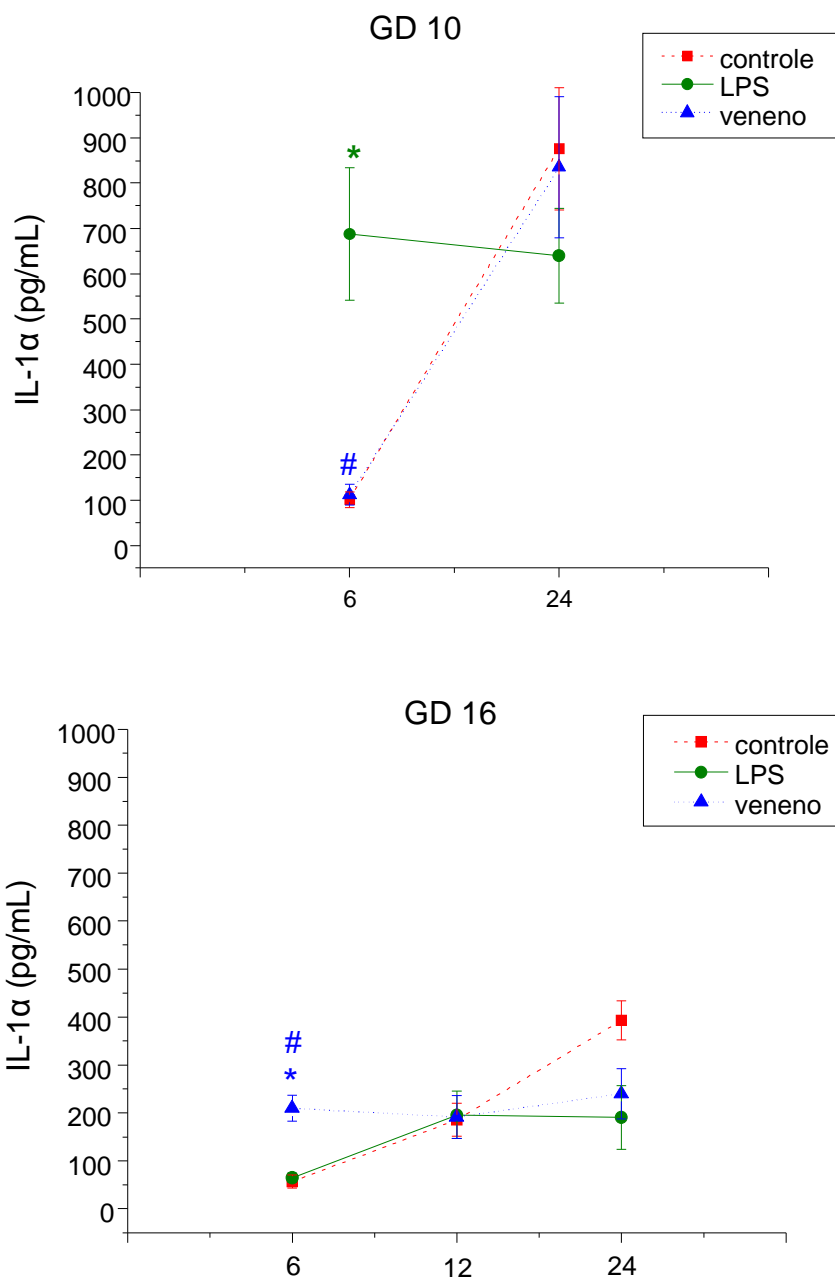
Na avaliação dos níveis de citocinas foi utilizado o conjunto embrião ou feto junto com sua respectiva placenta para as análises.

No grupo de mães tratadas no 10<sup>o</sup> dia gestacional, após 6 horas da aplicação do veneno, não foram observadas alterações significantes nos níveis de nenhuma das citocinas (figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11) em relação ao grupo controle. Após 6 horas da aplicação do LPS observou-se diminuição dos níveis de IL-1 $\alpha$  (figura 6), IL-1 $\beta$  (figura 7) e TNF- $\alpha$  (figura 11) no grupo experimental em relação ao grupo de LPS. Após 24 horas da aplicação do veneno, os níveis de IL-1 $\alpha$  (figura 6), IL-1 $\beta$  (figura 7), IL-6 (figura 8), IL-10 (Figura 9) e TNF- $\alpha$  (figura 11), não sofreram alterações significativas em relação ao grupo controle; entretanto, houve uma diminuição do nível de INF- $\gamma$  (figura 10). Após 24 horas da aplicação do LPS, houve aumento do nível de IL-1 $\beta$  (figura 7) e diminuição do nível de INF- $\gamma$  (figura 10) em relação ao grupo controle.

No grupo de mães tratadas no 16<sup>o</sup> dia de gestação, após 6 horas da aplicação materna do veneno, os níveis de, IL-1 $\beta$  (figura 7), IL-6 (figura 8), IL-10 (figura 9), INF- $\gamma$  (figura 10) e TNF- $\alpha$  (figura 11), não sofreram alterações significantes em relação ao grupo controle; entretanto houve um aumento do nível de IL-1 $\alpha$  (Figura 6). Após 6 horas da aplicação do LPS, não foram observadas alterações no nível de nenhuma citocina (figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11) em relação ao grupo controle. Entretanto, houve aumento do nível de IL-1 $\alpha$  (figura 6) e diminuição do nível de IL-6 (figura 8) no grupo experimental em relação ao grupo de LPS.

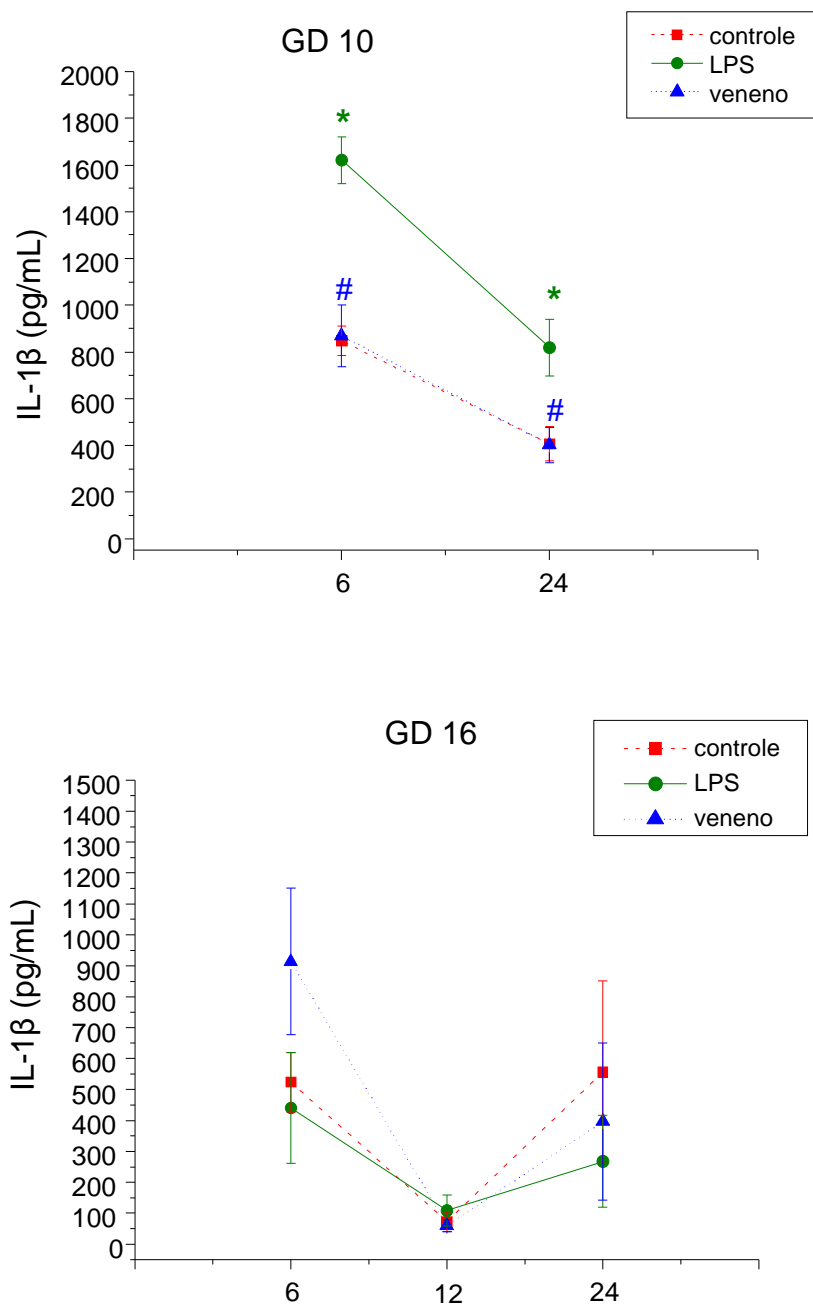
Após 12 horas da aplicação do veneno, os níveis de, IL-1 $\alpha$  (Figura 6), IL-1 $\beta$  (figura 7), IL-6 (figura 8), IL-10 (figura 9), INF- $\gamma$  (figura 10) e TNF- $\alpha$  (figura 11), não sofreram alterações significantes em relação ao grupo controle. Após 12 horas da aplicação do LPS, não foram observadas alterações no nível de nenhuma citocina (figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11) em relação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças entre os grupos tratados com veneno e LPS (figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Após 24 horas da aplicação do veneno, os níveis de IL-1 $\alpha$  (figura 6), IL-1 $\beta$  (figura 7), IL-6 (figura 8), não sofreram alterações significativas em relação ao grupo controle; entretanto, houve uma diminuição do nível de IL-10 (figura 9), INF- $\gamma$  (figura 10) e TNF- $\alpha$  (figura 11). Após 24 horas da aplicação do LPS, foi observada uma diminuição do nível de IL-10 (figura 9) e TNF- $\alpha$  (figura 11) em relação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças entre os grupos tratados com veneno e LPS, (figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11).

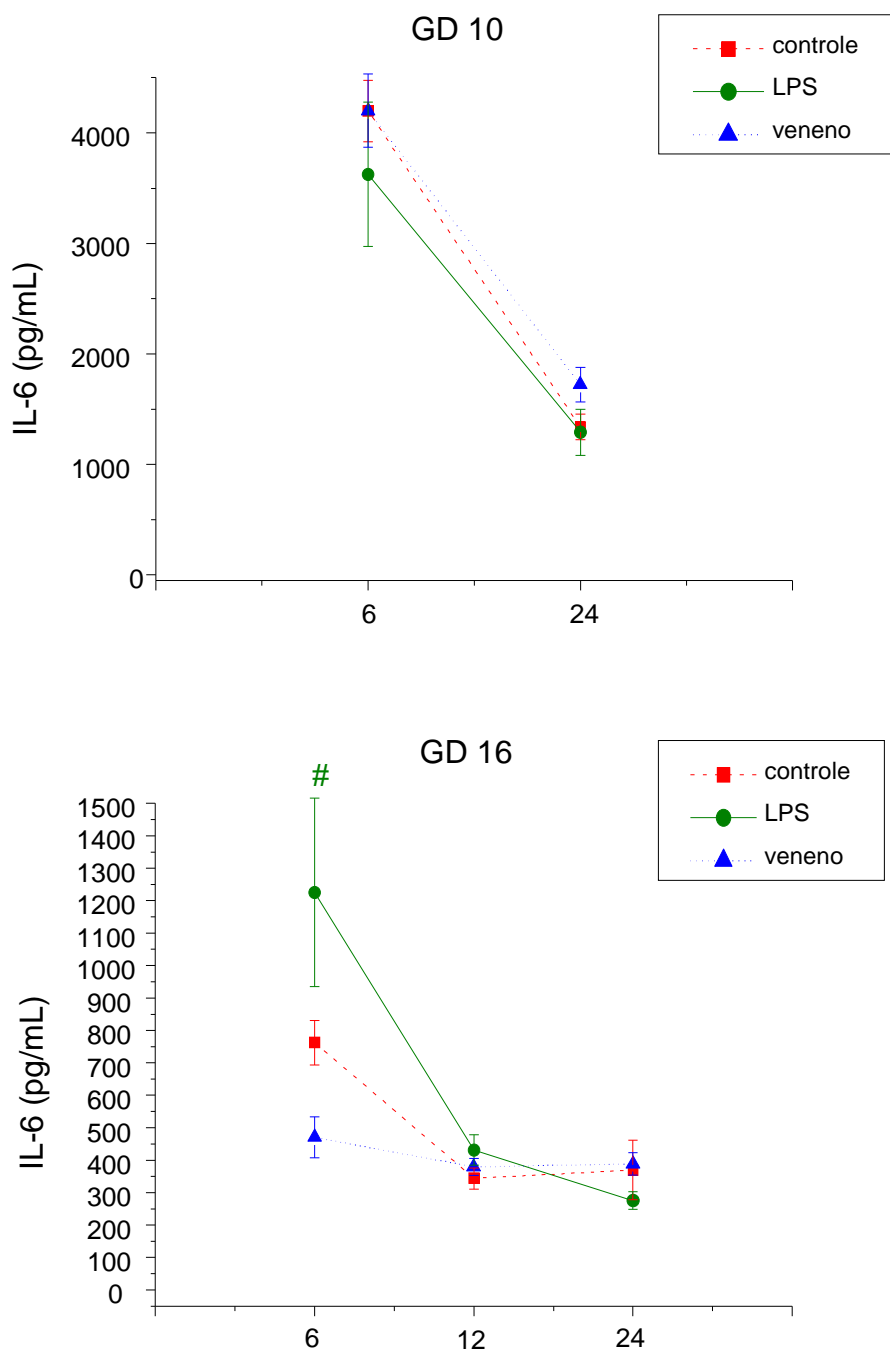


**Figura 6:** Nível de IL-1 $\alpha$  (pg/mL) em embriões com 10 ou 16 dias de gestação, 6, 12 ou 24 horas após as mães receberem salina (1 ml/Kg), LPS (100  $\mu$ l/Kg) ou veneno bruto do escorpião *T. bahiensis* (2,5 mg/Kg) no 10<sup>o</sup> ou no 16<sup>o</sup> dia gestacional. Os dados se referem à média  $\pm$  erro padrão da média. \* Significativamente diferente do controle ( $p < 0,05$ ); # Significativamente diferente do LPS ( $p < 0,05$ ) - Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

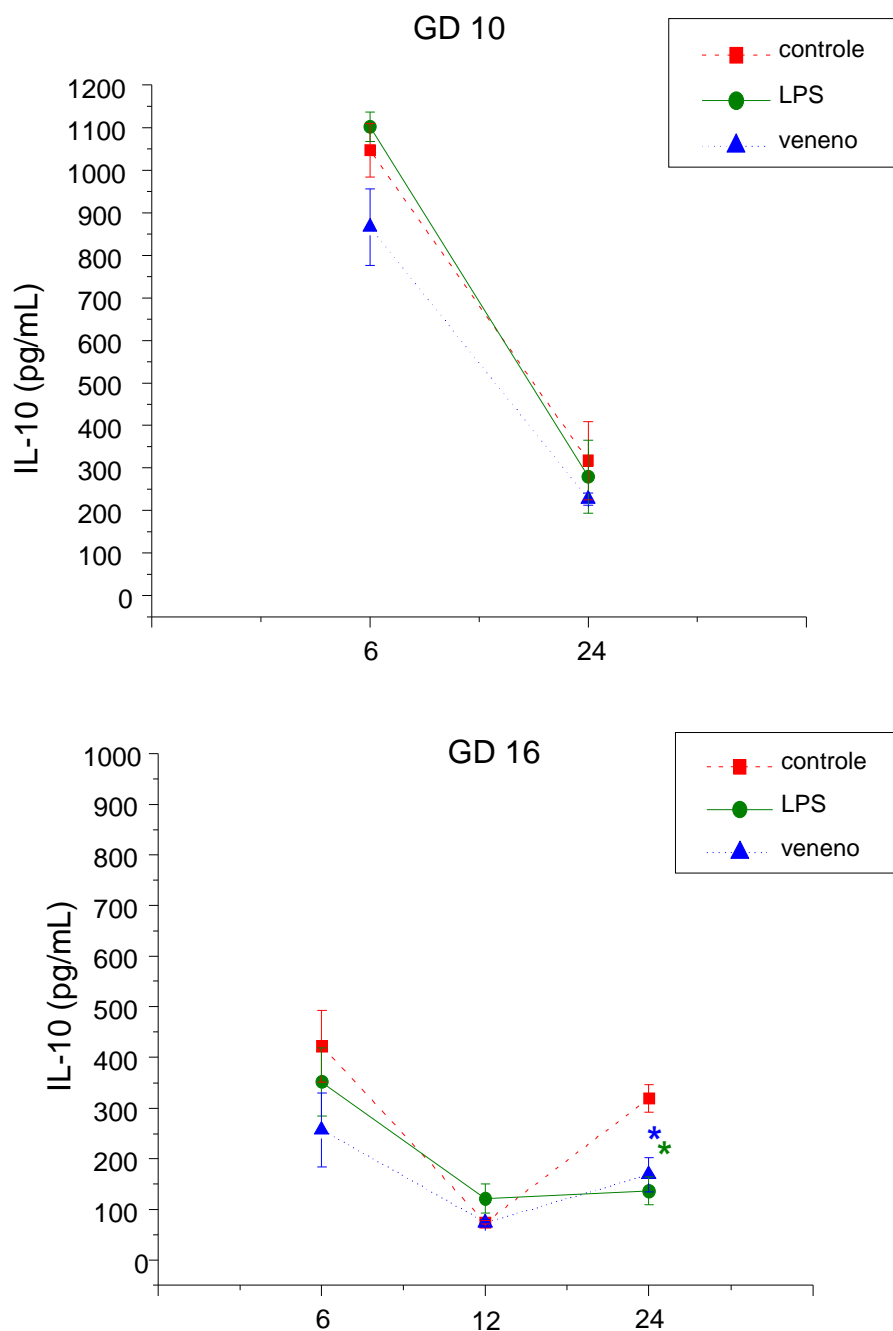




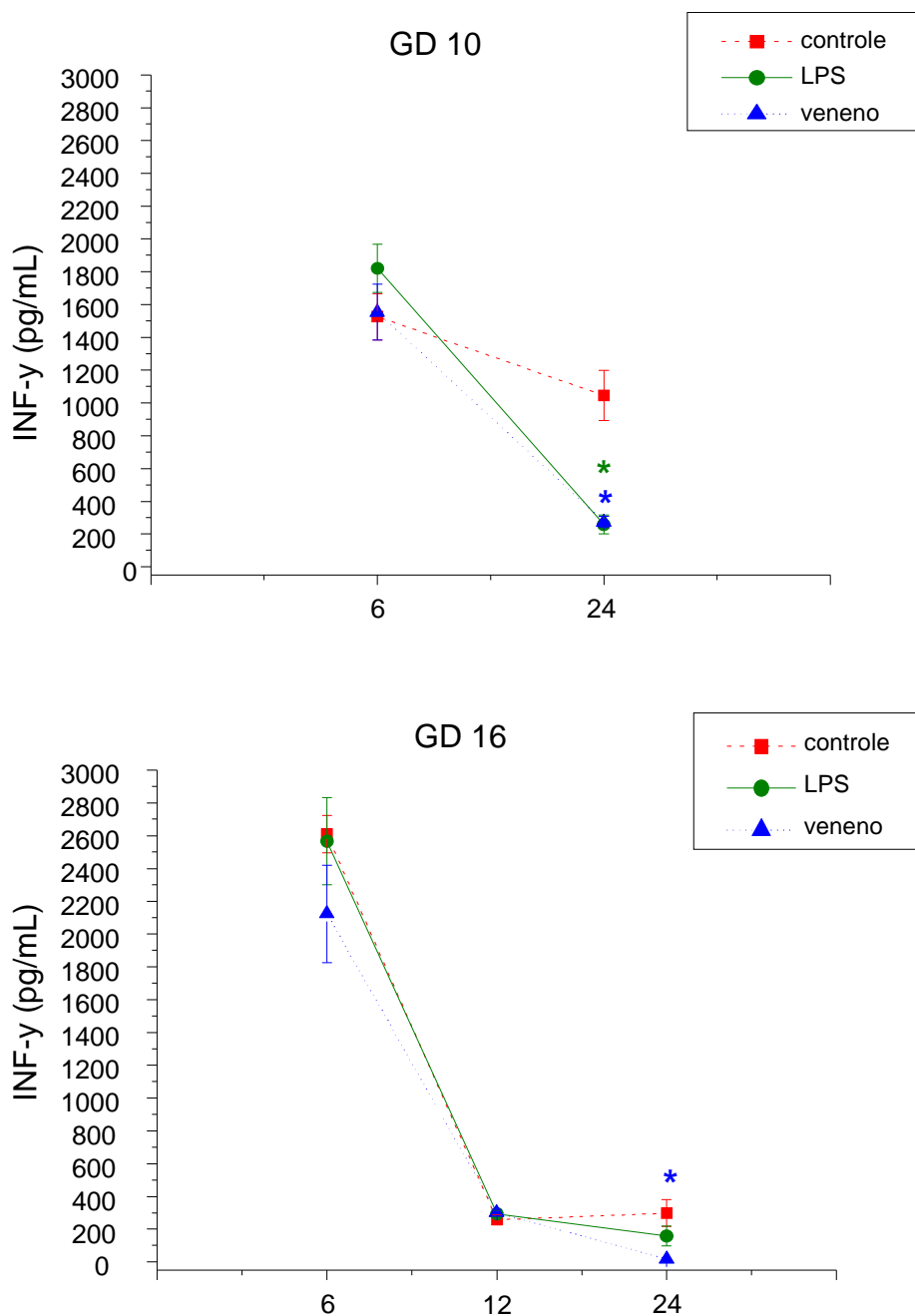
**Figura 7:** Nível de IL-1 $\beta$  (pg/mL) em embriões com 10 ou 16 dias de gestação, 6, 12 ou 24 horas após as mães receberem salina (1ml/Kg), LPS (100 $\mu$ l/Kg) ou veneno bruto do escorpião *T. bahiensis* (2,5mg/Kg) no 10<sup>o</sup> ou 16<sup>o</sup> dia gestacional. Os dados se referem à média  $\pm$  erro padrão da média. \* Significativamente diferente do controle ( $p < 0,05$ ); # Significativamente diferente do LPS ( $p < 0,05$ ) - Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.



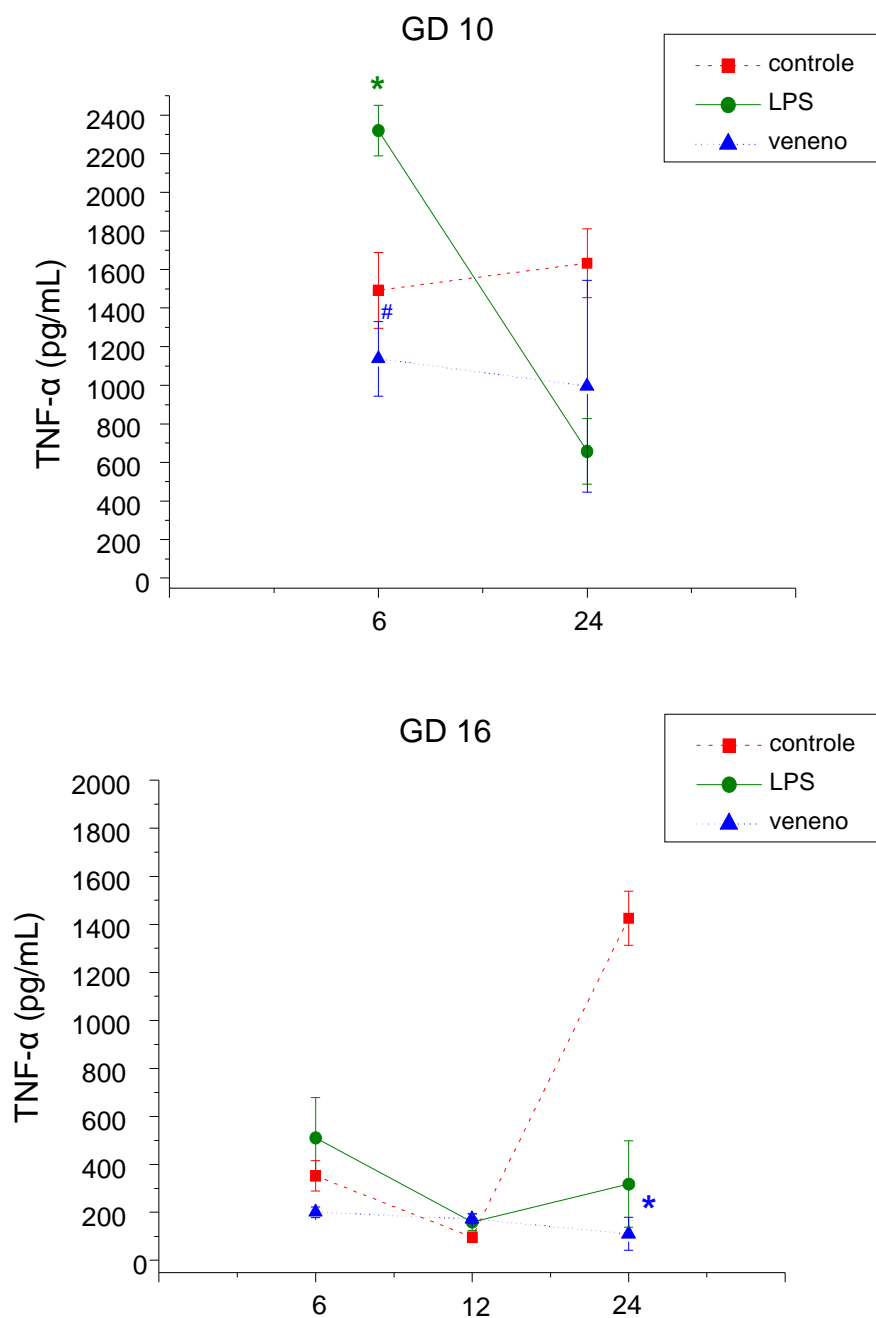
**Figura 8:** Nível de IL-6 (pg/mL) em embriões com 10 ou 16 dias de gestação, 6, 12 ou 24 horas após as mães receberem salina (1 ml/Kg), LPS (100 µl/Kg) ou veneno bruto do escorpião *T. bahiensis* (2,5 mg/Kg) no 10º ou 16º dia gestacional. Os dados se referem à média  $\pm$  erro padrão da média. #Significativamente diferente do LPS ( $p < 0,05$ ) - Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.



**Figura 9:** Nível de IL-10 (pg/mL) em embriões com 10 ou 16 dias de gestação, 6, 12 ou 24 horas após as mães receberem salina (1 ml/Kg), LPS (100 µl/Kg) ou veneno bruto do escorpião *T. bahiensis* (2,5 mg/Kg) no 10º ou 16º 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.



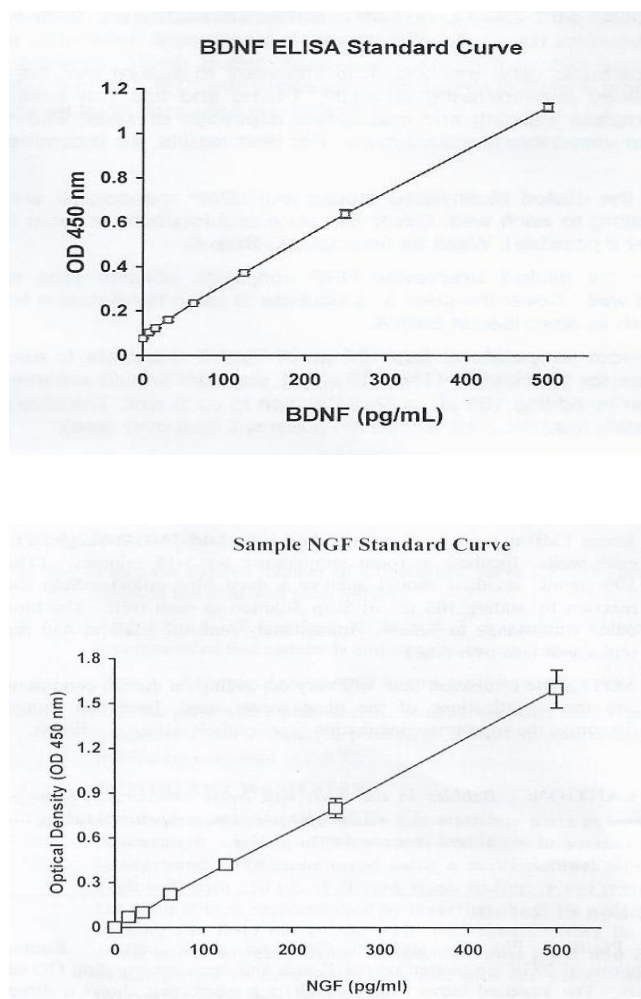
**Figura 10:** Nível de INF- $\gamma$  (pg/mL) em embriões com 10 ou 16 dias de gestação, 6, 12 ou 24 horas após as mães receberam salina (1 ml/Kg), LPS (100  $\mu$ l/Kg) ou veneno bruto do escorpião *T. bahiensis* (2,5 mg/Kg) no 10<sup>o</sup> ou 16<sup>o</sup> dia gestacional. Os dados se referem à média  $\pm$  erro padrão da média. \*Significativamente diferente do controle ( $p < 0,05$ ) - Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.



**Figura 11:** Nível de TNF- $\alpha$  (pg/mL) em embriões com 10 dias de gestação, 6, 12 ou 24 horas após as mães receberam salina (1 ml/Kg), LPS (100  $\mu$ l/Kg) ou veneno bruto do escorpião *T. bahiensis* (2,5 mg/Kg) no 10<sup>o</sup> ou 16<sup>o</sup> dia gestacional. Os dados se referem à média  $\pm$  erro padrão da média. \* Significativamente diferente do controle ( $p < 0,05$ ). #Significativamente diferente do LPS - Teste ANOVA seguido de teste de Tukey Kramer.

4.3. Experimento 3 - Avaliação dos níveis NGF e BDNF em embriões com 10 ou com 16 dias cujas mães receberam 2,5 mg/Kg de veneno bruto do escorpião *Tityus bahiensis* no 10<sup>o</sup> ou no 16<sup>o</sup> dia de gestação.

Os níveis de fatores de crescimento, NGF e BDNF, em embriões de mães tratadas no 10<sup>o</sup> ou no 16<sup>o</sup> dia gestacional ficaram abaixo do nível de detecção do método, em ambos os períodos de análise e em ambos os grupos experimentais. As figuras abaixo mostram a curva padrão e a quantidade em pg/mL que o kit é capaz de detectar. Valores abaixo e acima dessas concentrações ficam fora da análise.



**Figura 12:** Curva padrão da concentração de BDNF e NGF em pg/mL

## 5. DISCUSSÃO

Os escorpiões são animais perigosos e amplamente distribuídos pelo mundo.

O escorpionismo é considerado um grave problema de saúde pública ao redor do mundo, inclusive no Brasil (Machado et al., 2000) onde a maioria dos acidentes acontece com as espécies *Tityus serrulatus* e *T. bahiensis* (Von Eickstedt et al., 1996). Os acidentes que acontecem com crianças e idosos geralmente tem alta severidade (Sandoval e Dorce, 1993).

Esses animais se adaptam facilmente aos ambientes urbanos onde encontram seu alimento facilmente. A importância dos acidentes com os escorpiões está na frequência em que ocorrem e em sua gravidade. Ainda assim, são raros os estudos a respeito do veneno de escorpiões em gestantes ou em fêmeas prenhes.

Alguns estudos com o escorpião *Androctonus amoreuxi* indicam anomalias congênitas e reabsorção fetal quando o veneno é inoculado em doses repetidas em ratas prenhes (Ismail et al., 1983). Outros estudos com escorpiões como o *Buthus minax* e o *Leiurus quinquestriatus* mostram a capacidade que o veneno tem de induzir o aborto em mulheres grávidas (Osman et al., 1972; Ismail et al., 1973, 1974).

No entanto, em uma extensa revisão da literatura entre os anos de 1966 e 2002, Langley (2004) descreveu que não houve relatos de consequências adversas em mãe ou fetos em acidentes ocorridos durante a gravidez em humanos. Ben Nasr et al. (2007) observaram que doze pacientes grávidas envenenadas por escorpião desenvolveram intensa dor pélvica e sangramento vaginal, mas não ocorreu morte materna ou fetal, nem foi observado nascimento prematuro.

No Brasil, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, em doses que levam a um envenenamento leve em ratas prenhes, administrado em diferentes fases da gestação, causa alterações nos conceitos, no desempenho reprodutivo materno (Cruttenden et al., 2008) e na prole (Barão et al., 2008). Já o

veneno do *T. bahiensis*, em doses que levam a um envenenamento materno moderado, administrado no 10<sup>o</sup> e no 16<sup>o</sup> dias da gestação, causa alterações no desenvolvimento físico e no comportamental dos filhotes (Dorce et al., 2009) e na idade adulta desta prole (Dorce et al., 2010).

Em vista disso, é importante haver estudos nesta área, já que existem poucos dados na literatura sobre a exposição pré-natal ao veneno do escorpião causando danos pós-natais. Com isso, poderíamos ter dados científicos para auxiliar na conduta médica, em casos clínicos com gestantes que sofressem algum acidente escorpiônico.

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 à vida intrauterina (Carney, 1997).

O agente utilizado nos estudos de efeitos perinatais deve ser administrado em doses com as quais não sejam observados efeitos tóxicos na mãe ou no conceito. A administração de doses que levam ao aparecimento de sintomas acentuados de intoxicação não permite concluir se as alterações apresentadas pelos filhotes seriam devidas à ação embriofetotóxica da substância em estudo ou às alterações na homeostase materna causadas pela intoxicação, o que viria a comprometer as trocas materno/fetais (Lemônica, 1996).

Neste trabalho a dose utilizada de 2,5 mg/kg do veneno do *T. bahiensis*, causou alterações sistêmicas após a injeção, sem levar à morte materna. Com esta dose, a maioria dos animais testados apresentou secreção pelo nariz e olhos, dor local, taquicardia, aumento da frequência respiratória, falta de ar e rigidez muscular nas patas, principalmente nas traseiras, além de ficarem lambendo o local da injeção. Estes sinais e sintomas são compatíveis com um envenenamento moderado. Os animais apresentaram estes sintomas de 5 a 10 minutos após a injeção. Após esse



tempo, o comportamento voltou ao normal. A via de administração do veneno escolhida simula aquela que ocorre em acidentes domésticos.

Os dias de injeção foram determinados para assim serem comparados com estudos prévios realizados em nosso laboratório com o veneno do *Tityus serrulatus* (Cruttenden et al., 2008). Esses dias foram baseados no período de desenvolvimento do rato, segundo Manson e Kang (1989). O 5º dia é quando ocorre a implantação do blastocisto na parede uterina da rata. É um processo que envolve movimentos altamente coordenados em que células específicas do embrião fazem contato com o tecido especializado da mãe, o útero. Esta coordenação envolve a produção regulada de fatores de crescimento, citocinas e hormônios, tanto pelo embrião como pelos tecidos maternos. Ao mesmo tempo, receptores para estes fatores são expressos por tecidos apropriados, de modo a propagar os sinais de implantação (Carson et al., 2000). O 10º dia está no período de organogênese, no qual ocorre grande proliferação celular e formação de órgãos rudimentares. É um período crítico para a formação de vários órgãos como olhos, palato, sistema urogenital e cérebro. O 16º dia é o início do período de desenvolvimento fetal ocorrendo principalmente a diferenciação e a maturação cerebral (Manson e Kang, 1989).

Na avaliação de toxicidade materna nossos dados experimentais mostraram que os pesos maternos, tanto das mães que receberam injeção de veneno no 5º dia quanto das que o receberam no 10º dia gestacional, não apresentaram alterações significantes em relação ao controle em nenhum dos períodos analisados. Um dos sinais mais evidentes de toxicidade materna é a alteração no ganho de peso, expresso por redução no mesmo em relação ao grupo controle (Goulart, 1999). Portanto, o veneno não causou toxicidade materna na dose administrada.

Entretanto, no grupo de mães GD5 houve uma diminuição no número reabsorções e de implantações e um aumento no número de perdas pré-implantação, que pode ser explicado pelo fato de que a exposição a substâncias nocivas no presente período pode levar a letalidade (Manson e Kang, 1989).

As perdas pré-implantação estabelecem a relação entre o número de óvulos liberados e fecundados com a quantidade de embriões que conseguiram se implantar.

Na maior parte dos estudos com grupos de substâncias químicas, os resultados relatam redução do número de implantações mais do que malformações anatômicas, relacionando o período de implantação 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).

A implantação do blastocisto elicia uma reação inflamatória asséptica no endométrio, e citocinas como a IL-1, IL-11, TNF, LIF (fator inibidor de leucemia) e de IGFBP são considerados moduladores significativos dos fenômenos imunitários intrauterinos (Fazleabas et al., 2004; Makrigiannakis et al., 2006). Alguns trabalhos demonstram que venenos de escorpião afetam as citocinas (Magalhães et al., 1999; D'Suze et al., 2003; D'Suze et al., 2004; Petricevich, 2010), e esta alteração pode ser responsável pelas perdas observadas.

As citocinas, mesmo as inflamatórias, são constituintes normais da placenta (Crainie et al., 1990; Opsjln et al., 1993; Jokhi et al., 1994; Bennett et al., 1999; Dame et al., 1999) e tem um papel importante na manutenção desse complexo ambiente, mas quando os níveis saem do normal, o feto pode estar em perigo. A resposta materna a infecções resulta em aumento dos níveis de citocinas placentárias, principalmente as citocinas proinflamatórias. Níveis elevados de citocinas inflamatórias placentárias, principalmente a IL-6, estão relacionadas com abortos espontâneos (Jonakait, 2007), o que pode justificar a redução do número de implantações no útero observada em nossos experimentos.

Apesar da redução do número de implantações nas fêmeas observadas, o número de filhotes não foi alterado, pois foi compensado pela diminuição no número de reabsorções.

Não foram observadas alterações no número de implantações e reabsorções no grupo de fêmeas tratadas no 10º dia gestacional, já que este

período de tratamento não compreende mais a fase de implantação do blastocisto.

Em relação ao desenvolvimento fetal, foram observadas alterações no peso de fetos, bem como de suas placentas e de alguns órgãos, em ambos os grupos experimentais GD5 e GD10.

Muitos processos metabólicos são realizados pela placenta, vários dos quais são considerados essenciais para o um desenvolvimento fetal apropriado (Gude et al., 2004; Myllynen et al., 2005), como a de transferir nutrientes e metabólitos para o seu desenvolvimento; proteger o feto de infecções virais, bacterianas e de protozoários e de manter um ambiente hormonal apropriado para o desenvolvimento normal (Jonakait, 2007).

Para o feto a placenta é uma combinação de trato gastrointestinal, rins, pulmões, fígado, baço e timo, e é um órgão endócrino multifuncional. Este órgão transporta nutrientes, como aminoácidos, vitaminas, carboidratos, lipídios e minerais para a circulação fetal e é responsável pelo metabolismo de proteínas, hidratos de carbono, lipídios, prostaglandinas, ácidos nucléicos e hormônios esteróides (Gude et al., 2004; Myllynen et al., 2005). Um aumento no peso da placenta pode indicar uma mudança no metabolismo destas substâncias, sem que indique, no entanto, se as alterações são benignas ou prejudiciais (Cruttenden et al., 2008).

Nas fases pré e pós-natal, os órgãos estão se formando e se diferenciando, e, assim, podem ser atingidos por substâncias presentes na circulação materna através da placenta durante a gestação ou através do leite durante a lactação. Além disso, indivíduos expostos durante os períodos críticos de desenvolvimento são mais vulneráveis a ação de substâncias químicas em função de menor capacidade metabólica e excretora e da ausência de muitos mecanismos de retro alimentação do sistema endócrino (Zenick e Clegg, 1989).

Em estudos de toxicidade geral e da reprodução, sabe-se que o peso corpóreo e o peso de órgãos são sensíveis indicadores do potencial tóxico de substâncias (Andersen et al., 1999; Bailey et al., 2004; Holson et al., 2006; Chung et al., 2007). Como dito antes, um dos sinais mais evidentes de

toxicidade é a alteração no ganho de peso, expresso pela redução do mesmo (Goulart, 1999).

No presente estudo houve um aumento no peso dos fetos o que seria uma consequência de um aumento no peso dos órgãos ou, uma consequência de um aumento no músculo ou massa gorda dos filhotes. O papel dos fatores que regulam o crescimento fetal é importante, e o hormônio de crescimento (GH) é um destes fatores de regulação (Waters e Kaye, 2002). Estudos através de várias espécies mostram que o GH é um importante determinante do tamanho do filhote. O sistema IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) é outro importante fator de crescimento endócrino e parócrino que regula o crescimento fetal e placentário (Gicquel e Le Bouc, 2006). A interferência do veneno com esses fatores pode ser uma possível explicação para o aumento de peso de órgãos, mas uma investigação mais rigorosa seria necessária para comprovar este fato.

O trato respiratório é formado a partir de uma envaginação da parede da faringe no 10<sup>o</sup> dia da gestação, dia de administração do veneno. Os pulmões acumulam níveis elevados de veneno de escorpião (Nunan et al., 2003), e o sistema respiratório parece ser especialmente sensíveis ao veneno (Freire-Maia, 1995; De Matos et al., 2001), uma vez que a maioria dos acidentes fatais são devidos a complicações cardiovasculares com problemas respiratórios consequentes. O mecanismo pelo qual o veneno aumenta o peso do pulmão não é claro, mas o desenvolvimento do pulmão pode ser alterado de várias maneiras, incluindo a liberação de glucocorticóides (Newman e Johnson, 1983), o que presumivelmente ocorre após contato com o veneno.

Um estudo realizado em nosso laboratório (Cruttenden et al., 2008) demonstrou um aumento no peso dos pulmões e placentas de fetos cujas mães receberam uma dose de 1,0 mg/kg do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. No mesmo trabalho, uma dose de 3,0 mg/kg do mesmo veneno apresentou efeitos semelhantes, sem alterar o peso dos outros órgãos. Isso nos leva a acreditar que uma dose mais elevada não significa

necessariamente causar um efeito maior. O efeito pode ocorrer ou não, independentemente da dose administrada.

Embora o aumento de peso de órgãos fetais não seja tradicionalmente relacionado com dano fetal, a possibilidade de o resultado observado, um aumento no peso do pulmão, fígado e peso do coração, ser uma consequência do veneno não pode ser excluída. Esse efeito poderia ser mais bem estudado por exames histopatológicos dos órgãos alterados e verificando o metabolismo materno no mesmo período de desenvolvimento em que os presentes resultados foram obtidos.

Em nosso estudo, não houve evidências de malformações esqueléticas ou viscerais na prole de mães tratadas com veneno de *T. bahiensis*. O desenvolvimento fetal não foi prejudicado, o que poderia também ser demonstrado pela contagem dos centros de ossificação, que não revelou alterações. De acordo com alguns autores (Kimmel e Wilson, 1973; Szabo, 1989), anomalias espontâneas e malformações podem eventualmente ocorrer em ratos de laboratório. Assim, é improvável que este tipo de ocorrência tenha qualquer ligação com a exposição pré-natal ao veneno.

Desta forma, uma hipótese para os efeitos observados na prole de mães tratadas durante o período gestacional, em ambos os dias de tratamento, poderia ser uma consequência do veneno agindo sobre fatores de crescimento e/ou citocinas. No caso das mães tratadas no 16º dia de gestação, o período de exposição é menos crítico para a formação de órgãos. Já nas mães tratadas com o veneno no 10º dia gestacional, o veneno poderia estar agindo sobre a produção de fatores de crescimento interferindo na organogênese. Nesse sentido, os venenos de escorpião produzem injúria tecidual que leva a resposta inflamatória com consequente liberação de catecolaminas, bradicinina e prostaglandinas que induzem a liberação IL-1 e IL-6 (D' Suze et al., 2003).

Para observar uma possível ação do veneno sobre esses mediadores e se estes estariam agindo sobre as citocinas e os fatores de crescimentos foram realizadas dosagens dos níveis de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ,

INF- $\gamma$ , NGF e BDNF, onde estes agentes poderiam estar agindo sobre a gestação e, também analisar suas relações com o desenvolvimento fetal. Para isso, foram utilizados embriões provenientes de mães tratadas com o veneno do *T. bahiensis* no 10<sup>o</sup> ou no 16<sup>o</sup> dia gestacional.

Estudos sugerem que a liberação de citocinas está relacionada a uma determinada concentração de veneno no sangue, ou seja, uma concentração necessária para induzir uma resposta inflamatória (D'Suze et al., 2003). As fêmeas tratadas com o veneno possivelmente apresentaram sinais de inflamação, já que a administração do veneno, assim como a do LPS, causa uma injúria local, levando a uma resposta inflamatória do organismo.

Com os resultados obtidos com a dosagem dos níveis de citocinas, é possível dizer que, após a administração materna do veneno do escorpião *T. bahiensis*, houve alterações nos níveis de algumas delas. Alterações desse tipo foram também observadas após o envenenamento por outros *Tityus* (Magalhães et al., 1999; D'Suze et al., 2003; Fukurara et al., 2003) e com os escorpiões do gênero *Leiurus* e *Buthotus* (Barbouche et al., 1996; Magalhães et al., 1999).

Durante diversas fases do período de gestação as citocinas exercem papéis fundamentais para o bom desenvolvimento da gestação, visto que participam de processos de implante do blastocisto, formação e desenvolvimento embrionário, particularmente no desenvolvimento do sistema nervoso central (Pefeffer, 2003).

Na literatura, ainda não está claro que as citocinas inflamatórias produzidas pela mãe são capazes de atingir o feto (Jonakait, 2007), contudo nossos resultados são capazes de fornecer uma nova perspectiva para isso.

Em vista disso, 6 horas após a exposição de fêmeas no 16<sup>o</sup> dia gestacional ao veneno do escorpião *T. bahiensis*, houve aumento da IL-1 $\alpha$  em seus embriões. Após 24 horas, houve diminuição no nível de INF- $\gamma$  em embriões de fêmeas tratadas no 10<sup>o</sup> dia gestacional e diminuição dos níveis de IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em fêmeas tratadas no 16<sup>o</sup> dia gestacional.

Mesmo os grupos que foram tratados com lipopolisacarídeos (LPS), um estimulante da resposta inflamatória, apresentaram diminuição dos níveis de algumas citocinas em comparação ao grupo controle, que recebeu solução salina. Essa diminuição pode ter sido pelo tempo em que as dosagens foram feitas, 6 e 24 horas após o tratamento. Esse tempo pode ser suficientemente grande para a resposta gerada pelo organismo aos estímulos dados atingir o pico máximo e voltar aos níveis próximos ao basal.

Parece-nos que o pico máximo acontece antes das 6 horas, não havendo diferença entre o grupo de veneno e controle. Dados recentes da literatura nos mostram que o pico TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  em macerado de tecido cerebral ocorrem por volta de 4 horas após o tratamento com LPS (Erickson e Banks, 2011). Dados semelhantes foram obtidos em nosso laboratório, mostrando que 4 horas após a administração intracerebral de uma toxina isolada do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, em tecido macerado de hipocampo, houve aumento significativo dos níveis de INF- $\gamma$  (comunicação pessoal, Rodriguez RV.).

Nossos resultados demonstram que após 6 horas da aplicação do veneno no 16<sup>o</sup> dia gestacional, ocorre um pico no nível das citocinas testadas e que esse nível diminui 12 horas e, se mantém baixo 24 horas após a aplicação do veneno. Já no grupo injetado no 10<sup>o</sup> dia gestacional esse pico também ocorre após 6 horas e parece que o nível dessas citocinas é normalizado 24 horas após a aplicação do veneno.

Com isso, nossos resultados nos levam a pensar que nas dosagens realizadas com nossas amostras ocorreu um efeito rebote (efeito fisiológico do organismo), no qual, após ser atingido o pico dessas citocinas (concentração alta das mesmas), na tentativa de amenizar a resposta inflamatória, o organismo cessa a produção e liberação dessas citocinas.

Portanto, quando as amostras foram coletadas para a dosagem seus níveis já se encontravam diminuídos, justificando assim o fato de que os níveis de citocinas encontrados nas amostras dos grupos tratados com veneno bruto e principalmente LPS encontram-se menores que os níveis encontrados no grupo controle, considerados quase que níveis fisiológicos.

Alguns trabalhos mostram que quando a mãe é submetida a situações de estresse durante o período gestacional podem ocorrer alterações nos níveis de citocinas (como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ ) que estão presentes no embrião e no meio intrauterino (Torchinsky e Toder, 2004). As alterações apresentadas nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  nos mostram que no envenenamento causado pelo escorpião *T. bahiensis* durante o período de gestação os níveis de citocinas nos filhotes são alterados, e dessa forma as citocinas podem estar relacionadas de forma direta ou indireta com as alterações que o envenenamento escorpiônico pode causar nesses filhotes.

Ainda não está certo na literatura que as citocinas inflamatórias produzidas pela mãe são transferidas para o feto (Jonakait, 2007). Alguns estudos sugerem que a inflamação materna aumenta os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no líquido amniótico e no cérebro fetal (Gayle et al., 2004; Beloosesky et al., 2006). Em ratos, a IL-6 passa para o feto em períodos iniciais e medianos da gestação, mas não em períodos mais tardios, indicando assim, uma importante diferença na exposição à citocinas, que vai depender do período ao que a mãe foi exposta à infecção ou inflamação (Rubin et al., 1999; Meyer et al., 2006).

A passagem de citocinas pela barreira placentária parece não estar envolvida na explicação de sua aparição no cérebro do feto. Enquanto os astrócitos são proeminentes fontes de citocinas no cérebro adulto, no cérebro embrionário eles não aparecem até a última fase do desenvolvimento cerebral. Por outro lado, o cérebro embrionário é repleto de células da microglia, que são capazes de produzir citocinas no local (Jonakait, 2007). O aumento da ativação da microglia, tanto para adultos como para recém-nascidos, protege o sistema nervoso central de lesões induzidas por inflamações excessivas (Fan et al., 2005a,b; Cai et al., 2006; Chechneva et al., 2006; Hua e Walz, 2006; Chu et al., 2007; Fan et al., 2007; Weng e Kriz, 2007). Estudos epidemiológicos têm associado infecções sistêmicas durante a gravidez com o risco de desordens neuropatológicas na prole (Dammann e Leviton, 1998 e 2000; Wu et al., 2003; Gibson et al., 2006; Chua et al., 2012).



A exposição a eventos adversos, cedo na vida, pode afetar profundamente o desenvolvimento do cérebro, levando a efeitos de longa duração na estrutura e no comportamento neuronal e desempenha um papel importante na etiologia de transtornos do humor e ansiedade (Bremmer e Narayan, 1998). Como já foi demonstrado o veneno do *T. bahiensis* causa alterações comportamentais na prole na idade adulta, de mães tratadas no período gestacional (Dorce et al., 2010).

A diminuição da capacidade da função cerebral, induzida pelo estresse precoce na vida, pode levar a distúrbios cognitivos posteriores na vida (Bremmer e Narayan, 1998). Estudos tem se focado no aumento do nível de citocinas inflamatórias na unidade materno/fetal e no seu potencial de causar prejuízos no desenvolvimento cerebral (Luheshi e Rothwell, 1996; Cai et al., 2000; Bell et al., 2004; Huleihel et al., 2004; Smith et al., 2007).

O estresse está associado a altos níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e, a baixos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 na circulação, em amostras coletada durante os períodos da gestação (Coussons-Read et al., 2005). Esse fato indica que a inflamação durante a gestação pode afetar o desenvolvimento cerebral do feto. Ambos, o estresse materno e o processo inflamatório devem ter sérias implicações para a saúde da prole até a idade adulta (Coe e Lubach, 2005; Weinstock, 2005).

O estresse gestacional também pode interferir nos resultados da gravidez através do aumento espontâneo de abortos (Euken e Riegler, 1973; de Catanzaro, 1988; Guo et al., 1993; Patin et al., 2002), no baixo peso ao nascimento (Herrenkohl, 1979; Pollard, 1984; Fameli et al., 1995), alta mortalidade (Pollard, 1984; Guo et al., 1993) e retardo no desenvolvimento reflexológico dos filhotes (Meeniczek e Ward, 1994). A ocorrência dos efeitos do estresse depende do começo, intensidade e duração do estresse durante o período gestacional (Henry et al., 1994; Weinstock, 1997; Pardon et al., 2000; Smith et al., 2004)

Com base nos resultados do presente estudo, não podemos dizer se os efeitos observados são devidos à passagem de algum componente do veneno para os filhotes ou se é apenas um efeito indireto resultante da

resposta inflamatória ou do estresse materno ao veneno. No entanto, Ismail et al. (1983) descreveram que o efeito teratogênico do veneno, observado após uma exposição prolongada de ratas grávidas ao veneno do escorpião *A. amoreuxi*, parece ser o resultado do seu efeito metabólico e de sua ação sobre os eletrólitos corporais das mães, em vez de um efeito direto sobre os fetos.

Embora tenhamos procurado evitar o estresse, quer por meio das condições ambientais em que os animais foram mantidos e tratados ou usando uma dose de veneno que aparentemente tem uma baixa toxicidade materna, o estresse ainda é um fator possível para os resultados obtidos. Este fato é devido à inevitabilidade de certos procedimentos, tais como a injeção do veneno, que mesmo com uma dose leve sempre provoca desconforto para os animais. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de que, apesar de o veneno ter pouco efeito sobre as fêmeas prenhes, teve um efeito mais marcante sobre a prole, seja através da indução de estresse ou por meio de uma ação direta.

As alterações encontradas poderiam ser causadas pelo estresse materno, podendo assim, levar as alterações encontradas nos níveis de citocinas e nas encontradas no desempenho reprodutivo materno apresentadas nesse trabalho, como também, nas alterações encontradas na prole (Dorce et al., 2009) e na idade adulta dos filhotes (Dorce et al., 2010)

## 6. CONCLUSÕES

Levando se em consideração que:

As fêmeas tratadas no 5º dia gestacional com 2,5 mg/kg do veneno do escorpião *T. bahiensis* no período gestacional apresentaram no desempenho reprodutivo:

- diminuição do número de reabsorções;
- diminuição do número de implantações;
- aumento do número das perdas pré-implantação;
- aumento do peso dos filhotes;
- aumento do peso das placentas;
- aumento no peso dos pulmões e coração dos filhotes.

As fêmeas tratadas no 10º dia gestacional com 2,5 mg/kg do veneno do escorpião *T. bahiensis* no período gestacional apresentaram no desempenho reprodutivo:

- aumento do peso dos filhotes;
- aumento do peso das placentas;
- aumento do peso de fígado, pulmões e coração dos filhotes.

Podemos concluir que a administração de uma dose de 2,5 mg/kg do veneno bruto do escorpião *T. bahiensis* no período gestacional, responsável por um envenenamento moderado, provoca alterações discretas nos parâmetros reprodutivos maternos e em filhotes provenientes destas mães tratadas nesses períodos gestacionais.

Levando se em consideração que:

Embriões de fêmeas tratadas no 10º dia gestacional com 2,5 mg/kg do veneno do escorpião *T. bahiensis* no período gestacional, apresentaram quanto a avaliação dos níveis de citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ :

- diminuição do nível de INF- $\gamma$  após 24 horas da aplicação do veneno;

Embriões de fêmeas tratadas no 16º dia gestacional com 2,5 mg/kg do veneno do escorpião *T. bahiensis* no período gestacional, apresentaram quanto a avaliação dos níveis de citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ :

- aumento do nível de IL-1 $\alpha$ , após 6 horas da aplicação do veneno;
- diminuição do nível de IL-10, após 24 horas da aplicação do veneno;
- diminuição do nível de INF- $\gamma$ , após 24 horas da injeção do veneno;
- diminuição do nível de TNF- $\alpha$ , após 24 horas da aplicação do veneno.

Podemos concluir que a administração materna de uma dose de 2,5 mg/kg do veneno bruto do escorpião *T. bahiensis* no período gestacional, responsável por um envenenamento moderado, provoca alterações em alguns dos níveis de citocinas em embriões após 6 ou 24 horas da aplicação materna do veneno nos períodos gestacionais estudados.

Levando se em consideração que:

O método utilizado não foi capaz de detectar os níveis de NGF e de BDNF em embriões de fêmeas tratadas no 10<sup>o</sup> ou 16<sup>o</sup> dias gestacional com 2,5 mg/kg do veneno do escorpião *T. bahiensis*;

Podemos concluir que com a metodologia utilizada não foi possível determinar se a administração materna de uma dose de 2,5 mg/kg do veneno bruto do escorpião *T. bahiensis* no período gestacional responsável por um envenenamento moderado, provoca alterações nos níveis dos fatores de crescimento aqui analisados, após 6, 12 ou 24 horas da aplicação do veneno.

De modo geral, o período e a dose administrada as mães, causa alteração no desempenho reprodutivo materno e nos níveis de citocinas de embriões, o efeito do veneno e do estresse materno não parece ser de caráter deletério para as mães e para os conceptos em ambos os períodos analisados. mas o veneno é capaz de causar alterações no desenvolvimento reflexológico dos filhotes e no desenvolvimento comportamental desse animais na idade adulta.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU JG, KETPURA NI, RESERSADE B, DE ROBERTIS EM. Connective tissue growth factor (CTGF) modulates cells signaling by BMP and TGFB. *Nature Cell Biology*, 2002; 4: 599-604.

ADI-BESSALEM S., HAMMOUDI-TRIKI D., LARABA-DJEBARI F. Pathophysiological effects of *Androctonus australis hec-tor* scorpion venom: tissue damages and inflammatory response. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2008; 60: 373–380.

AGARWAL R, LOGANATH A, ROY AC., WONG YC, NG SC. Effect of T-helper 1 cytokines on secretion of T-helper 2 cytokines by term trophoblast cells in culture. *Gynecological Endocrinology*, 2000; 14: 305–310.

AKSU I, BAYKARA B, OZBAL S, CETIN F, SISMAN AR, DAYI A, GENCOGLU C, TAS A, BÜYÜK E, GONENCARDA S, UYSAL N. Maternal treadmill exercise during pregnancy decreases anxiety and increases prefrontal cortex VEGF. *Neuroscience Letters*, 2012; 516: 221-225.

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

ALVES RS, NASCIMENTO NRF, BARBOSA PSF, KERNTOPF MR, LESSA LMA, SOUSA CM, MARTINS RD, SOUSA CM, SOUSA DF, QUEIROZ MGR, TOYAMA MH, FONTELES MC, MARTINS AMC, MONTEIRO HSA. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, 2005; 46: 271-276.

AMARAL CF, DE RESENDE NA, FREIRE-MAIAL. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion Sting in children. *American Journal of Cardiology*, 1993; 71: 242-245.

AMARAL CF, DIAS MB, CAMPOLINA D, PROIETTI FA, DE REZENDE NA. Children with adrenergic manifestations of envenomation after *Tityus serrulatus* scorpion Sting are protected from early anaphylactic antivenom reactions. *Toxicon*, 1994; 32: 211-215.

ANDERSEN H, LARSEN S, SPLIID H, CHRISTENSEN ND. Multivariate statistical analysis of organ weights in toxicity studies. *Toxicology*, 1999;136: 67-77.

ASADULLAH K, STERRY W, VOLK HD. Interleukin-10 therapy—review of a new approach. *Pharmacological Reviews*, 2003; 55: 241–269.

BAILEY SA, ZIDELL RH, PERRY RW. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? *Toxicologic Pathology*, 2004; 32: 448-466.

BARÃO AA, BELLOT RG, DORCE VA. Developmental effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rat offspring. *Brain Res Bull.*, 2008; 76: 499-504.

BARBOUCHE, M. R; HAGUIGA, H; NOUIRA, S; KRIFI, M. N; ABROUG, F; BOUCHOUCHA, S; DELLAGI, K. Inflammatory cytokines and scorpion envenomation: analysis of serological levels in 46 Tunisian patients. *Toxicon*, 1996; 34: 156-157.

BARROS VED, FERREIRA BR, LIVONESI M, FIGUEIREDO TM. Cytokine and nitric oxide production by mouse macrophages infected with Brazilian flaviviruses. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2009; 51: 141-147.

BARTON BE. IL-6: insights into novel biological activities. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1997; 85: 16–20.

BAUMANN H., GAULDIE J. The acute phase response. *Immunology Today*, 1994; 15: 74–80.

BAYER SA, ALTMAN J, RUSSO RJ, ZHANG X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat, *Neurotoxicology*, 1993; 14: 83–144.

BELL MJ, HALLENBECK JM, GALLO V. Determining the fetal inflammatory response in an experimental model of intrauterine inflammation in rats. *Pediatr. Res.*, 2004; 56: 541-546.

BELOOSESKY R, GAYLE DA, AMIDI F, NUNEZ SE, BABU J, DESAI M, ROSS MG. N-Acetyl-cysteine suppresses amniotic fluid and placenta inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide in rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2006; 194: 268–273.

BEN NASR H, HAMMAMI TS, REBAI T, BOUAZIZ M, KASSIS M, ZEGHAL KM. Scorpion envenomation symptoms in pregnant women. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2007; 13: 94-102.

BENNETT WA, LAGOO-DEENADAYALAN S, WHITWORTH NS, STOPPLE JA, BARBER WH, HALE E, BRACKIN MN, COWAN BD. First-trimester human chorionic villi express both immunoregulatory and inflammatory cytokines: a role for interleukin-10 in regulating the cytokine network of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1999; 41: 70–78.

BERNADI MM, PALERMO-NETO J. Effects of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment and open field behavior of rats. *Psychopharmacology*, 1999; 65: 247–250.

BHANDARI V, ELIAS JA. Cytokines in tolerance to hyperoxia-induced injury in the developing and adult lung. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006; 41: 4–18.

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

BILATE AMB. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de Reumatologia Clínica*, 2007; 8: 47-51.



BONE RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Annals of Internal Medicine*, 1996; 125: 680–687.

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.

BOUAZIZ M, GUETAT N, CHELLY H, TRIKI S, JEDDI HM. Electrocardiogram (ECG) after severe scorpion sting (104 cases). *Toxicon*, 1996; 34: 157-158.

BREMNER JD, NARAYAN M. The effects of stress on memory and the hippocampus throughout the life cycle: implications for childhood development and aging. *Dev. Psychopathol.*, 1998; 10: 871-875.

BUCARETCHI F, BARACAT ECE, NOGUEIRA RJN, CHAVES A, ZAMBRONE FAD, FONSECA MRCC, TOURINHO FS. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, 1995; 37: 331- 336.

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. p. 317-347.

CAI Z, LIN S, FAN LW, PANG Y, RHODES PG. Minocycline alleviates hypoxic-ischemic injury to developing oligodendrocytes in the neonatal rat brain. *Neuroscience*, 2006;137: 425–435.

CAI Z, PAN ZL, PANG Y, EVANS OB, RHODES PG. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatric. Res.*, 2000; 47: 64-72.

CANDIDO DM. Escorpiões: ocorrência das espécies de importância médica, acidentes no Estado de São Paulo, obtenção de veneno e manutenção em cativeiro. [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria do Estado de São Paulo; 2008.

CARBONE C, WANKE E, PRESPIPINO G, POSSANI LD, MAELICKE A. Selective blockage of voltage-dependent potassium channel by a novel scorpion toxin. *Nature*, 1982; 296: 90-91.

CARNEY EW. Maternal physiological disruption. In: KAVLOCK RJ, DASTON GP. *Drugs toxicity in embryonic development*. New York: Springer-Verlag, 1997; 1: 573-589.

CARSON DD, BAGCHI I, DEY SK, ENDERS AC, FAZLEBAS AT, LESSEY BA, et al. Embryo implantation. *Dev Biol.*, 2000; 223: 217–37.

CARVALHO FF, NENCIONI, ALA, LEBRUN I, SANDOVAL MRL, DORCE VAC. Behavioral, electroencephalographic, and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1998; 60: 7-14.

CHAO M.V., Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation, *Neuron.*, 1992. p 583–593.

CHAUDRY IH, STEPHAN RN, HARKEMA JM, DEAN RE. Immunological alterations following simple hemorrhage. In: Faist, F., Ninneman, J., Green, D. (Eds.), *Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis*, Springer, Berlin, 1989. p. 363–373.

CHECHNEVA O, DINKEL K, CAVALIERE F, MARTINEZ-SANCHEZ M, REYMANN KG. Anti-inflammatory treatment in oxygen–glucose-deprived hippocampal slice cultures is neuroprotective and associated with reduced cell proliferation and intact neurogenesis. *Neurobiol Dis.*, 2006; 23: 247–259.

CHU LS, FANG SH, ZHOU Y, YU GL, WANG ML, ZHANG WP, WEI EQ. Minocycline inhibits 5-lipoxygenase activation and brain inflammation after focal cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2007; 28: 763–772.

CHUNG MK, KIM CY, KIM J. Reproductive toxicity evaluation of a new camptothecin anticancer agent, CKD-602, in pregnant/lactating female rats and their offspring. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 2007; 59: 383-395.

COE CL, LUBACH GR. Prenatal origins of individual variation in behavior and immunity. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2005; 29: 39-49.

COURAD F, JOVER E. Mechanism of Action of Scorpion Toxins. In: TU AT, DEKKER M. (Eds.) *Handbook of Natural Toxins, II. Insect Poisons, Allergens and Other Invertebrate Venoms*, 2<sup>a</sup> ed. New York and Basel: Marcel Dekker, 1983. p. 659-678.

COUSSONS-READ ME, OKUN ML, NETTLES CD. Psychosocial stress increases inflammatory markers and alters cytokine production across pregnancy. *Brain Behav. Immun.*, 2007; 21: 343-350.

CRAINIE M, GUILBERT L, WEGMANN TG. Expression of novel cytokine transcripts in the murine placenta. *Biol. Reprod.*, 1990; 43: 999–1005.

CRUTTENDEN K, NENCIONI ALA, BERNARDI MM, DORCE VAC. Reproductive toxic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. *Reprod. Toxicol.*, 2008; 25: 497-503.

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

D'SUZE G, SALAZAR V, DÍAZ P, SEVCIK C, AZPURUA H, BRACHO N. Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon*, 2004, 15:44(8): 851-60.

DAME JB, CHRISTENSEN RD, JUUL SE. The distribution of granulocytemacrophage colony-stimulating factor and its receptor in the developing human fetus. *Pediatric Res.* 1999; 46: 358–366.

DAMMANN O, LEVITON A. Infection remote from the brain, neonatal white matter damage, and cerebral palsy in the preterm infant. *Semin. Pediatr. Neurol.* 1998; 5: 190–201.

DAMMANN O, LEVITON A. Role of the fetus in perinatal infection and neonatal brain damage. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2000; 12: 99-104.

DE BIN JA, MAGGIO JE, STRICHARTZ GR. Purification and characterization of chlorotoxin a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *American Journal of Physiology*, 1993; 264: 361-369.

DE CATANZARO D. Effect of predator exposure upon early pregnancy in mice. *Physiol. Behav.*, 1988; 43: 691–696.

DE LOS SANTOS MJ, MERCADER A, FRANCES A, PORTOLES E, REMOHI J, PELLICER A, et al. Role of endometrial factors in regulating secretion of components of the immunoreactive human embryonic interleukin-1 system during embryonic development. *Biol Reprod* 1996; 54: 563–574.

DE MATOS IM, TALVANI A, ROCHA OO, FREIRE-MAIA L, TEIXEIRA MM. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. *Toxicon*, 2001; 39:863–867.

DENNEY JM, NELSON EL, WADHWA PD, et al. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. *Cytokine*, 2011; 53: 170–177.

DINARELLO CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, 2009; 27: 519–550.

DINARELLO CA. Mutations in cryopyrin: bypassing roadblocks in the caspase 1 inflammasome for interleukin-1<sub>β</sub> secretion and disease activity. *Arthritis and Rheumatism*, 2007; 56: 2817–2822.

DOBBING J, SANDS J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.*, 1979; 3: 79–83.

DOBBING J. The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics*, 1974; 53: 2–6.

DOMINGUEZ F, YANEZ-MO M, SANCHEZ-MADRID F, SIMON C. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *FASEB J.*, 2005; 19: 1056–1060.

DORCE AL, BELLOT RG, DORCE VA, NENCIONI AL. Effects of prenatal exposure to *Tityus bahiensis* scorpion venom on rat offspring development. *Reprod Toxicol*, 2009, 28: 365-370.

DORCE AL, DORCE VA, NENCIONI AL. Effects of in utero exposure to *Tityus bahiensis* scorpion venom in adult rats. *Neurotoxicol Teratol.*, 2010, 32: 187-192.

DORCE VAC, SANDOVAL MRL. Brazilian scorpion venoms: pharmacological aspects. *Ciência e Cultura*, 1992; 44: 187-191.

ERICKSON MA; BANKS WA. Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: Multiplex quantification with path analysis. *Brain Behavior and Immunity*, 2011; 25: 1637-1648.

EUKER JS, RIEGLE GD. Effects of stress on pregnancy in the rat. *J. Reprod. Fert.*, 1973; 34: 343–346

FAMELI M, KITRALI E, STYLIANOPOULOU F. Maternal behavior of dams treated with ACTH during pregnancy. *Physiol. Behav.*, 1995; 57: 397–400.

FAN HW, CARDOSO JLC, ARAÚJO FAA. Epidemiology of scorpion envenomations in Brazil. *Toxicon*, 1996; 34: 160-161.

FAN HW, SANTALUCIA M. Vigilância dos acidentes por animais peçonhentos. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005.

FAN LW, PANG Y, LIN S, TIEN LT, MA T, RHODES PG, CAI Z. Minocycline reduces lipopolysaccharide-induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *J. Neurosci. Res.*, 2005B; 82: 71–82.

FAN R, XU F, PREVITI ML, DAVIS J, GRANDE AM, ROBINSON JK, VAN NOSTRAND WE. Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid. *J. Neurosci.*, 2007; 27: 3057–3063.

FAZLEABAS AT, KIM JJ, STRAKOVA Z. Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment—a review. *Placenta*, 2004; 25(Suppl.A): 26–31.

FERNANDEZ-BOUZAS A, MORALES-RESENDIZ ML, LLAMAS-IBARRA F, MARTINES-LOPES M, BALLESTEROSMARESMA A. Brain infarcts due to scorpion Sting in children: MRI. *Neuroradiology*, 2000; 42: 118-120.

FREIRE-MAIA L, CAMPOS JA. 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.

FUKUHARA YDM, REIS ML, DELLALIBERA-JOVILIANO R, CUNHA FQC, DONADI E. A. Increased plasma levels of IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*, 2003; 41: 49–55.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos: 1998. Brasília; 2001. 2ª ed.

GAY J, KOKKOTOU E, O'BRIEN M, POTHOUKAKIS C, KARALIS KP. Interleukin-6 genetic ablation protects from trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice: putative effect of antiinflammatory cytokines. *NeuroImmunoModulation*, 2006; 13: 114–121.

GAYLE DA, BELOOSESKY R, DESAI M, AMIDI F, NUNEZ SE, ROSS MG. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotrophin releasing hormone in the fetal rat brain. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2004; 286: 1024–1029.

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

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.

GIBSON CS, MACLENNAN AH, GOLDWATER PN, HAAN EA, PRIEST K, DEKKER GA. Neurotropic viruses and cerebral palsy: population based case-control study. *BMJ*, 2006; 332: 76-80.

GICQUEL C, LE BOUC Y. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res*, 2006; 65 (Suppl 3): 28-33.

GILMORE JH, JARSKOG LF, VADLAMUDI S. Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat. *Journal of Neuroimmunology*, 2003; 138: 49-55.

GOLDMAN D, CHO Y, ZHAO ML, CASADEVALL A, LEE SC. Expression of inducible nitric oxide synthase in rat pulmonary *Cryptococcus neoformans* granulomas. *American Journal of Pathology*, 1996; 148: 1275–1282.

GOMEZ R, ROMERO R, GHEZZI F, YOON BH, MAZOR M, BERRY SM. The fetal inflammatory response syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998; 179: 194-202.

GOODSELL DS. The molecular perspective: epidermal growth factor. *Stem Cells*, 2003; 21: 702-703.

GOULART FC. Efeitos da administração pré-natal de um antagonista GABA<sub>a</sub>: Avaliação comportamental, bioquímica e morfológica da prole de ratos. [Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1999.

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

GUDE NM, ROBERTS CT, KALIONIS B, KING RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004; 114: 397–407.

GUO A, NAPPI RE, CRISCUOLO M, FICARRA G, AMRAM A, TRENTINI GP, PETRAGLIA F, GENAZZANI AR. Effect of chronic intermittent stress on rat pregnancy and postnatal development. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 1993; 51: 41–45.

HELLER NM, QI X, JUNTTILA IS, ET AL. Type1 IL-4Rs selectively activate IRS-2 to induce target gene expression in macrophages. *Science Signaling*, 2008; 1: p.17.

HENNIGAN A, O'CALLAGHAN RM, KELLY AM. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochem Soc Trans.*, 2007; 35:424–427.

HENRY C, KABBAJ M, SIMON H, LE MOAL M, MACCARI S. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young adult rats. *J. Neuroendocrinol.*, 1994; 6: 341–345.



HERING SE, AZEVEDO-MARQUES MM, MENEZES JB, CUPO P. Características clínicas e epidemiológicas de 967 casos de escorpionismo. In: Anais do V Congresso Brasileiro de Toxicologia. Bahia. Brasil; 1987. p. 23.

HERRENKOHL LR. Prenatal stress reduces fertility and fecundity in female offspring. *Science*, 1979; 206: 1097–1099.

HOLSON JF, NEMEC MD, STUMP DG, KAUFMAN LE, LINDSTROM P, VARSHO BJ. Significance, reliability and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. In: HOOD RD, ed. *Developmental and reproductive toxicology: a practical approach*. 2ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 329-424.

HOOD RD. Principles of developmental toxicology revisited. In: HOOD, R.D., ed *Developmental and reproductive toxicology: a practical approach*. 2ed Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 3-14.

HOWARD M, MUCHAMUEL T, ANDRADE S, MENON S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *Journal of Experimental Medicine*, 1993; 177: 1205–1208.

HUA R, WALZ W. Minocycline treatment prevents cavitation in rats after a cortical devascularizing lesion. *Brain Res.*, 2006; 1090: 172–181.

HULEIHEL M, GOLAN H, HALLAK M. Intrauterine infection/inflammation during pregnancy and offspring brain damages: possible mechanisms involved. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2004; 2: p.17.

ISMAIL M, ABD-ELSALAM MA, MORAD AM. Do changes in body temperature following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus* influence the causes of toxicity? *Toxicon*, 1990; 28: 1265-1284.

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

ISMAIL M, OSMAN OH, EL ASMAR MF. Pharmacological studies of the venom from the scorpion *Buthus minax*. *Toxicon*, 1973; 11-15.

ISMAIL M, OSMAN OH, GUMAA KA, KARRAR MA. Some pharmacological studies with scorpion (*pandinus exitialis*) venom. *Toxicon*, 1974; 12:75.

JI YH, HATTORI KEX, TERAOKAWA 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.

JOKHI PP, KING A, LOKE YW. Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes. *Hum. Reprod.*, 1994; 9: 1660–1669.

JONAKAIT GM. The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanisms. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 2007; 25: 415-425.

KANAI-AZUMA M, KANAI Y, MATSUDA H, KUROHMARU M, TACHI C, YAZAKI K, HAYASHI Y. Nerve growth factor promotes giant-cell transformation of mouse trophoblast cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997; 231: 309–315.

KATZ DM, ERB M, LILLIS R, NEET K. Trophic regulation of nodose ganglion cell development: evidence for an expanded role of nerve growth factor during embryogenesis in the rat. *Experimental Neurology*, 1990; 110: 1–10.

KAUMA S, MATT D, STROM S, EIERMAN D, TURNER T. Interleukin-1 beta, human leukocyte antigen HLA-DR alpha, and transforming growth factor-beta expression in endometrium, placenta, and placental membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1990; 163:1430–1437.

KEELAN JA, MITCHELL MD. Placental cytokines and preeclampsia. *Front Biosci*, 2007; 12: 2706–2727.

KHERA KS. Maternal toxicity a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratology*, 1985; 31:129-153.

KIMMEL CA, WILSON JG. Skeletal deviations in rats: malformations or variations? *Teratology*, 1973, 8: 309-315.

KIRSCH GE, SKATTEBOL A, POSSANI LD, BROWN AM. Modification of Na<sup>+</sup> channel gating by a  $\alpha$  scorpion toxin from *Tityus serrulatus*. *Journal of General Physiology*, 1989; 93: 67-83.

KODOMARI I, WADA E, NAKAMURA S, WADA K. Maternal supply of BDNF to mouse fetal brain through the placenta. *Neurochem Int.*, 2009; 54:95–98.

KRUSSEL JS, BIELFELD P, POLAN ML, SIMON C. Regulation of embryonic implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003; 110 (Suppl. 1): 2–9.

KWAK-KIM JYH, GILMAN-SACHS A, KIM CE. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. *Chemical Immunology and Allergy*, 2005; 88: 64–79.

LANGLEY RL. A review of venomous animals and stings in pregnant patients. *Wilderness Environ. Med.*, 2004; 15: 207-215.

LEMONICA IP. Embriofetotoxicidade. In: OGA S. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu. 1996. p. 85-94.

LEVI-MONTALCINI R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 1987; 237: 1154–1162.

LEWIN GR, BARDE YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1996; 19: 289–317.

LOURENÇO GA, LEBRUN I, DORCE VAC. Neurotoxic effects of fractions isolated from *Tityus bahiensis* scorpion venom (Perty, 1834). *Toxicon*, 2002; 40: 149 – 157.

LOURENÇO WR, CLOUDSLEY-THOMPSON JL, CUELLAR O, VON EICKSTEDT VDR, BARRAVIEIRA B, KNOX MB. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. *The Journal of Venomous Animals and Toxins*, 1996.

LOURENÇO WR. The Scorpion Families and their geographic distribution. *The Journal of Venomous Animals and Toxins*, 2001; 7:3-23.

LUCAS S, DA SILVA PI. Escorpiões de interesse médico no Brasil. In: SCHVARTSMAN S. *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. São Paulo: Sarvier. 1992. p. 211-215.

LUCAS SM, MEIER J. Biology and distribution of scorpions of medical importance. In: MEIER J, WHITE J. *Handbook of Clinical Toxicology of Animals Venomous and Poison*. New York: CRC Press. 1995. p. 205 - 219.

LUHESHI G, ROTHWELL N. Cytokines and fever. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1996; 109: 301-307.

MACHADO RP, CUNHA RO, VIEIRA OJO, RIBEIRO LA, 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 MM, PEREIRA MES, AMARAL CFS, et al. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*, 1999; 37: 1155–64.

MAGALHÃES O. Escorpionismo IV. Memórias. Monografias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1946.

MAKRIGIANNAKIS A, MINAS V, KALANTARIDOU SN, NIKAS G, CHROUSOS GP. Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol Metab*, 2006; 17:178–85.

MANSON JM, KANG YJ. 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.

MARTY C, MISSET B, TAMION F, FITTING C, CARLET J, CAVAILLON JM. Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. *Critical Care Medicine*, 1994; 22: 673–679.

MAYEUR S, LUKASZEWSKI MA, BRETON C, STORME L, VIEAU D, LESAGE J. Do neurotrophins regulate the feto/placental development? *Medical Hypotheses*, 2011; 76: 726-728.

MEHLER MF, KESSLER JA. Cytokines in the brain development. *Advances in Protein Chemistry*, 1998; 52: 223-251.

MEKI AR; MONHEY-EL-DEAN ZM. Serum interleukin-1 beta, interleukin-6, nitric oxide and alphas-antitrypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon*, 1998; 36: 1851-1859.

MELNICZEK JR, WARD IL. Patterns of anogenital licking mother rats exhibit towards prenatally stressed neonates. *Physiol. Behav.*, 1994; 56: 457–461.

MESQUITA MBS, MORAES TS, Moraes MFD. Centrally injected tityustoxin produces the systemic manifestations observed in severe scorpion poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003; 187: 58-66.

MEYER U, NYFFELER M, ENGLER A, URWYLER A, SCHEDLOWSKI M, KNUESEL I, YEE BK, FELDON J. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J. Neurosci.*, 2006; 26: 4752–4762.

MILLER C, MOCZYDLOWSKI E, LATTORE R, PHILLIPS M. *Nature*. 1985; 313: 316-318.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Centro de Vigilância Epidemiológica, Instituto Butantan. Manual de Vigilância Epidemiológica. Acidentes por animais Peçonhentos. Identificação, Diagnóstico e Tratamento. São Paulo, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação-Geral das Doenças Transmissíveis por Vetores e a Antropozoonoses/CGDT/Devesp/SVS/MS. Manual de Controle de Escorpiões. Brasília, Brasil, 2009.

MIRALLES F, PHILIPPE P, CZERNICHOW P, SCHARFMANN R. Expression of nerve growth factor and its high-affinity receptor Trk-A in the rat pancreas during embryonic and fetal life. *The Journal of Endocrinology*, 1998; 156: 431–439.

MOLLER D E. Potential role of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2000; 11: 212–217.

MORELI JB, RUOCCO AMC, VERNINI JM, RUDGE MVC, CALDERON IMP. Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in pregnancy: Aspects of Interest in Clinical Obstetrics. International Scholarly Research Network, *Obstetrics and Gynecology*, 2012; 2012: 1-5.

MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA., COFFMAN RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, 2005; 175: 5–14.

MOSMANN TR, COFFMAN RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Advances in Immunology*, 1989; 46: 111–147.

MYLLYNEN P, PASANEN M, PELKONEN O. Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta*, 2005; 26: 361–371.

NAOUN PC. Citocinas e Interleucinas. Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto – São Paulo, 2009.

NASELLO AG. Metodologia para estudos de Toxicologia Perinatal. *Biológico*, 1997; 59: 45-48.

NENCIONI ALA, CARVALHO FF, LEBRUN I, DORCE VAC, SANDOVAL MRL. Neurotoxic effects of three fractions isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Pharmacology and Toxicology*, 2000; 86: 149-155.

NENCIONI ALA; LOURENÇO GA; LEBRUN I; FLORIO JC; DORCE VAC. Central effects of *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* scorpion venoms after intraperitoneal injection in rats. *Neuroscience Letters*, 2009; 463: 234–238.

NEWMAN LM, JOHNSON EM. Abnormal lung function induced by prenatal insult. In: Johnson EM, Kochhar DM, editors. *Teratogenesis and reproductive toxicology*. New York: Springer-Verlag, 1983: 237–58.

NUNAN EA, MORAES MF, CARDOSO VN, MORAES-SANTOS T. Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Life Sci* 2003; 73: 319–25.

OPSJLN SL, WATHEN NC, TINGULSTAD S, WIEDSWANG G, SUNDAN A, WAAGE A, AUSTGULEN R. Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am. J. Obstetr. Gynecol.*, 1993: 397–404.

OSMAN OH, ISMAIL M, EL-ASMAR MF, IBRAHIM SA. Effect on the rat uterus of the venom from the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon*, 1972; 10: 363-366.

OSNAYA-ROMERO J, MEDINA-HERNANDEZ T, FLORES-HERNANDEZ SS, LEON-ROJAS G. Clinical symptoms observed in children envenomated by scorpion Sting, at the children's hospital from the State of Morelos, México. *Toxicon*, 2001; 39: 781-785.

PARDON MC, GERARDIN P, JOUBERT C, PEREZ-DIAZ F, COHEN-SALMON C. Influence of prepartum chronic ultramild stress on maternal pup care behavior in mice. *Biol. Psychiatry.*, 2000; 47: 858–863.

PATIAL S, PARAMESWARAN N. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 2010; 20: 87–103.

PATIN V, LORDI B, VINCENT A, THOUMAS JL, VAUDRY H, CASTON J. Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. *Dev. Brain Res.*, 2002; 139: 1–8.

PEI Y. Effect of nerve growth factor (NGF) on the development of preimplantation rabbit embryos in vitro. *Vet Res Commun.*, 2010; 34:11–18.

PETRICEVICH VL, HERNANDEZ CRUZ A, CORONAS FIV, POSSANI LD. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon*, 2007; 50: 666–675.

PETRICEVICH VL, PEÑA CF. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Mediators of Inflammation*, 2002; 11: 173–180.

PETRICEVICH VL, REYNAUD E, CRUZ AH, POSSANI LD. Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from *Tityus serrulatus*. *Clinical and Experimental Immunology*, 2008; 154: 415–423.

PETRICEVICH VL. Balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in mice treated with *Centruroides noxius* scorpion venom. *Mediators of Inflammation*, 2006; 2006, Article ID 54273, 11 pages.



PETRICEVICH VL. Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, 2004; 3: 325–332.

PETRICEVICH VL. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2002; 11: 23–31.

PETRICEVICH VL. Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators Inflamm*, 2010; 2010: Article ID 903295.

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

PINSKY MR, VINCENT JL, DEVIERE J, ALEGRE M, KAHN RJ, DUPONT E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*, 1993; 103: 565–575.

POLLARD I. Effects of stress administered during pregnancy on reproductive capacity and subsequent development of the offspring of rats: prolonged effects on the litters of a second pregnancy. *J. Endocrinol.*, 1984; 100: 301–306.

RAGHUPATHY R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Seminars in Immunology*, 2001; 13: 219–227.

REHN AE, REES SM. Investigating the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 2005; 32: 687–696.

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

ROUMEN RMH, HENDRIKS T, VAN DER VEN-JONGEKRIJG J, et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma: relation with subsequent adult respiratory

distress syndrome and multiple organ failure. *Annals of Surgery*, 1993; 218: 769–776.

RUBIN SA, BAUTISTA JR, MORAN TH, SCHWARTZ GJ, CARBONE KM. Viral teratogenesis: brain developmental damage associated with maturation state at time of infection. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 1999; 112: 237–244.

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

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

SANJABI S, ZENEWICZ LA, KAMANAKA M, FLAVELL RA. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- $\alpha$ , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current Opinion in Pharmacology*, 2009; 9: 447–453.

SIMON C, GIMENO MJ, MERCADER A, O'CONNOR JE, REMOHI J, POLAN ML, et al. Embryonic regulation of integrins beta 3, alpha 4, and alpha 1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997; 82: 2607–2616.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificações, 2008. Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. Portal Saúde. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>. Acesso em 12 jun 2012.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificações, 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. Portal Saúde. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela02\\_casos\\_escorpiao2000\\_2011\\_01\\_04\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela02_casos_escorpiao2000_2011_01_04_2011.pdf). Acesso em 12 jun 2012.

SMART JL, da SILVA VA, MALHEIROS LR, PAUMGARTTEN FJR, MASSEY RF. Epidermal growth advances some aspects of development but

others in both rats and hamsters. *Journal of Developmental Physiology*, 1989; 11: 153-158.

SMITH JW, SECKL JR, EVANS AT, COSTALL B, SMYTHE JW. Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 2004; 29: 227–244.

SMITH SE, LI J, GARBETT K, MIRNICS K, PATTERSON PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J. Neurosci.*, 2007; 27: 10695-10702.

SOARES MRM, AZEVEDO CS, MARIA M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2002; 35: 359-363.

STAPLES RE, SCHENELL VL. Refinements in rapid clearing technique in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol.*, 1964; 39: 61-3.

SZABO KT. Congenital malformations in laboratory and farm animals. San Diego: Academic Press; 1989.

TAYLOR P. Practical teratology. London: Academic Press; 1986.

TEIXEIRA JR AL, FONTOURA BF, FREIRE-MAIA L, MACHADO CRS, CAMARGOS ERS, TEIXEIRA MM. Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon*, 2001; 39: 703-709.

THOENEN H. Neurotrophins and activity-dependent plasticity, *Prog. Brain Res.*, 2000; 128: 183–191.

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 JB, MARQUES MGB, MARTINI RK, BORGES VA. Acidente por *Tityus serrulatus* e suas implicações epidemiológicas no Rio Grande do Sul. *Revista Saúde Publica*, 2002; 36: 631-633.

TRONCON LEA, SANTOS AA, GARBACIO VL, SECAF M, VERCEZE AV, CUNHA-MELO JR. Inhibition of gastric emptying and intestinal transit in anesthetized rats by *Tityus serrulatus* scorpion toxin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2000; 33: 1053-1058.

TUCKER KL. Neurotrophins and the control of axonal outgrowth, *Panminerva Med.*, 2002; 44: 325–333.

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

VEZAANI A, BALOSSO S, RAVIZZA T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav. Immun.*, 2008; 22: 797-803.

VON EICKSTEDT VDR, BARRAVIEIRA B, KNOX MB. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. *Journal of Venomous animals and toxins*, 1996; 2: p.2.

WATERS MJ, KAYE PL. The role of growth hormone in fetal development. *Growth Horm IGF Res*, 2002; 12: 137-146.

WEGMANN TG, LIN H, GUILBERT L, MOSMANN TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology Today*, 1993; 14: 353–356, 1993.

WEINSTOCK M. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1997; 21: 1–10.

WEINSTOCK M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of offspring. *Brain Behav. Immun.*, 2005; 19: 296-308.

WENG YC, KRIZ J. Differential neuroprotective effects of a minocycline-based drug cocktail in transient and permanent focal cerebral ischemia. *Exp. Neurol.*, 2007; 204: 433–442.

WHEELER EF, BOTHWELL M. Spatiotemporal patterns of expression of NGF and the low affinity NGF receptor in rat embryos suggest functional roles in tissue morphogenesis and myogenesis. *Journal of Neuroscience*, 1992;12: 930–945.

WILSON JG. Methods for administering agents and detecting malformation in experimental animal. In: WILSON JC, WARKANY J. Eds. *Teratology: principles and techniques*. Chicago: University of Chicago Press, 1965.

WU YW, ESCOBAR GJ, GREYER JK, CROEN LA, GREENE JD, NEWMAN TB. Chorioamnionitis and cerebral palsy in term and near-term infants. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, 2003; 290: 2677-2684.

ZENICK H, CLEGG ED. Assessment of male reproductive toxicity: a risk of assessment approach. In: HAYES AW, ed. *Principles and methods of toxicology*, 2.ed. New York: Raven Press, 1989. p.275-309.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

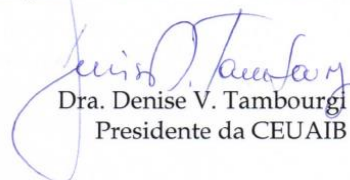
### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Participação de fatores de crescimento e transcrição nas alterações observadas na prole de mães tratadas com o veneno do escorpião *Tityus bahiensis*”, protocolo nº 513/08, sob a responsabilidade de Ana Leonor Abrahão Nencioni e Ana Letícia Coronado Dorce, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 18/09/2008.

We certify that the research entitled “Growth and transcriptions factors participation in the alterations observed in the offspring of dams treated with *Tityus bahiensis* scorpion venom”, protocol nº 513/08, under the responsibility of Ana Leonor Abrahão Nencioni and Ana Letícia Coronado Dorce, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 09/18/2008.

Vigência do Projeto: 10/2008 – 12/2011	Nº de animais/espécie 222 fêmeas: 111 machos / rato – Wistar
---	---

São Paulo, 23 de setembro de 2008.

  
Dra. Denise V. Tambourgi  
Presidente da CEUAIB

De acordo:

  
Dr. Otávio Azevedo Mercadante  
Diretor do Instituto Butantan

## Anexo 2 – Renovação do certificado de aprovação do comitê de Ética



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
 Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505  
 ceuaib@butantan.gov.br

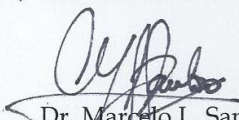
#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Participação de fatores de crescimento e transcrição nas alterações observadas na prole de mães tratadas com o veneno do escorpião *Tityus bahiensis*", **protocolo n° 513/08**, sob a responsabilidade de Ana Leonor Abrahão Nencioni e Ana Letícia Coronado Dorce – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 08/02/2012.

We certify that the research entitled "Growth and transcriptions factors participation in the alterations observed in the offspring of dams treated with *Tityus bahiensis* scorpion venom", **protocol number 513/08**, under the responsibility of Ana Leonor Abrahão Nencioni and Ana Letícia Coronado Dorce – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research – is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 02/08/2012.

Vigência do Projeto: 10/08 a 12/12	N° de animais/espécie	ADITIVO/OBSERVAÇÃO
Laboratório de Farmacologia	222 ratos Wistar (F); 111 ratos Wistar (M)	Alteração de vigência

São Paulo, 16 de fevereiro de 2012.

  
 Dr. Marcelo L. Santoro  
 Coordenador da CEUAIB



**Anexo 3– Trabalho submetido à publicação na revista Journal Applied Toxicology**

**Effects of the pre-natal exposure to *Tityus bahiensis* scorpion venom on maternal reproductive development and on offspring morphology in rats**

**Ana Leticia C. Dorce (1, 2), Valquiria A. C. Dorce. (1), Ana Leonor A. Nencioni (1)**

(1) Laboratory of Pharmacology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil; (2) Pos-Graduation Program of the Disease Control Coordination of São Paulo State Public Health Secretary, São Paulo, Brazil.

**CONFLICTS OF INTEREST:** There is no conflict.

**CORRESPONDENCE TO:**

Ana Leonor Abrahão Nencioni  
Laboratory of Pharmacology  
Butantan Institute, Av. Dr. Vital Brasil, 1500  
05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Phone: 55 11 37267222 Extension 2133. Fax: + 55 11 3726 1505  
Email: [analeonor@butantan.gov.br](mailto:analeonor@butantan.gov.br).



**Abstract**

Scorpion envenoming is a public health problem in Brazil, where *Tityus serrulatus* is considered the most dangerous scorpion in this country. Although a large number of scorpion stings also occur with *Tityus bahiensis*, there are few studies in literature about the toxic effects of its venom. The objective of this work was to determine the possible toxicological effects of *T. bahiensis* scorpion venom administered to pregnant dams on maternal reproductive performance and the morphological development of pups. The venom was given to dams on the 5<sup>th</sup> or on the 10<sup>th</sup> gestational day (GD). On the 21<sup>st</sup> gestational day, they were submitted to laparotomy, and the pups were taken out together with their placenta. Pups and placentas were counted, weighed and externally analyzed. The sex and the vitality of pups were evaluated, and each litter was then randomly divided into two different groups for visceral or skeletal analyses. The corpora lutea present in each of the ovaries were counted to determine the number of eggs that were eliminated. It was observed a decrease in the number of implantations in the GD5 group. An increase in the weight of the pups and placentas was observed in the GD5 and GD10 groups. There was an increase in the weight of the heart and lungs in the GD5 and GD10 groups and in the weight of the liver in the GD10 group. Thus, the moderate envenomation by *T. bahiensis* scorpion venom caused changes in maternal reproductive development and fetal development.

**KEY WORDS:** scorpion venom; *Tityus bahiensis*; pregnancy; reproductive development; embryofetotoxicity.

## Introduction

Scorpions are dangerous animals distributed around the world. Scorpion stings are considered a severe health problem around the world. In Brazil, *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* are the most venomous existing scorpion species, and are responsible for the majority of stings (Von Eickstedt et al., 1996). These accidents happen frequently and with severity especially among children and elderly people (Sandoval and Dorce, 1993).

Human activity leading to an increase in trash and waste attracts insects and spiders, the main prey of scorpions, and the possibility of occupancy of niches inside human dwellings causes an overlapping of the human and scorpion populations, thereby increasing the probability of incidents (Lourenço et al., 1996), where the possibility of envenomation of pregnant women is great.

Scorpion stings are characterized by intense local pain and, in some cases, by systemic effects. These include lung edema, partially due to severe cardiovascular alterations and to the release of catecholamines and kinins. Increasing pulmonary vascular permeability and complex respiratory arrhythmias such as tachypnea, hyperpnea, periodic respiration and respiratory paralysis, resulting from the stimulation of afferent visceral receptors (Freire-Maia, 1995) or, alternatively, due to the action of the venom on the central nervous system, are also observed (Sandoval and Dorce, 1993; Dorce and Sandoval, 1994; Carvalho et al., 1998; Nencioni et al., 2000; Lourenço et al., 2002; Nencioni et al., 2009).

Scorpion venoms are composed of neurotoxins that affect sodium channels (Rodriguez de la Vega and Possani, 2005), or block potassium channels (Rodriguez de la Vega and Possani, 2004). In both cases, the consequence is an increase in neurotransmitter release from neurons (Couraud and Jover, 1983; Possani et al., 1992; Tan et al., 2006).

The scorpion sting produces tissue injury that can induce a systemic inflammatory response with the consequent release of cytokines (D'Suze et al., 2003). It also stimulates the release of catecholamines, bradykinins and

prostaglandins, which induce the release of IL-1 and IL-6 (Chaudry et al., 1989).

Although there are several studies concerning the effects and the mechanism of action of the venoms and their toxins, it is not well known whether they cause any harm to the offspring whose mothers have been stung during pregnancy, either accidentally or experimentally (Ismail et al., 1983; Ben Nasr et al., 2007; Barão et al., 2008; Cruttenden et al., 2008; Dorce et al., 2009; Dorce et al., 2010).

Studies have demonstrated that *T. serrulatus* scorpion venom evokes alterations in reproductive parameters and fetal morphology (Barão et al., 2008; Cruttenden et al., 2008) and that the venom of *T. bahiensis* elicits alterations in physical and reflexologic development in the perinatal period (Dorce et al., 2009) and in the behavioral and neuronal development of offspring in adult life (Dorce et al., 2010).

Thus, this study was designed to investigate whether the venom of the scorpion *T. bahiensis* administered once to pregnant female rats at a dose that causes a moderate envenomation may lead to deleterious effects in the reproductive development of the dams and in their offspring.

## **Material and methods**

### *Animals, mating and pregnancy diagnosis*

The male (n=15) and female (n=30) Wistar rats used weighed 250–270 g, were about 90 days old, and were housed under controlled temperature (20±2°C) and with a 12:12 dark:light schedule and free access to food and water. After acclimatization for one week, two female rats were placed together with one male in the afternoon. In the morning of the following day, females showing evidence of mating (vaginal plug or vaginal smear with sperm cells) were randomly assigned in rotation to the study groups (n=10). This day was recorded as gestation day 0 (GD0). During gestation, two dams were housed per plastic cage (40X50X20 cm). All the experimental procedures were conducted with prior permission of the

institution's Ethics Committee for Experiments on Animals (Protocol No. 513/08).

#### *Venom and solution*

The venom was obtained from the Arthropod Laboratory (Butantan Institute) by electrical stimulation of the telson of mature *T. bahiensis* scorpions and supplied by the Venom Commission of the Butantan Institute. It was lyophilized immediately after extraction and dissolved in 1.46% NaCl before use. *T. bahiensis* venom is soluble in saline only at this concentration.

#### *Treatment*

Females received a single subcutaneous injection of 2.5 mg/kg of dried *T. bahiensis* venom on the 5<sup>th</sup> (GD5) or 10<sup>th</sup> (GD10) gestational day. The control group received subcutaneous injection of 1.46% NaCl on both days. The subcutaneous route was chosen because this is the way by which the venom is injected in accidents.

#### *Reproductive parameters*

The dams were weighed on GD0, GD5, GD10, GD16 and GD21. On GD21, females were deeply anesthetized with carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and submitted to laparotomy for section of ovaries and uterus. The gravid uterus was weighed. The uterine horns were cut, and the fetuses and their placenta were removed, weighed and examined for gross abnormalities. The number of implantation sites, resorptions, and dead and live fetuses was recorded in both uterine horns. The ovaries were dissected and the number of corpora lutea was recorded. The pre-implantation losses (number of corpora lutea minus number of implantations/number of corpora lutea) and post-implantation losses (number of implantations minus number of live fetuses/number of implantations) were calculated. After euthanasia, half of each litter was fixed in Bouin's solution for subsequent visceral examination by the Wilson serial section method (Wilson, 1965) and the other half litter was eviscerated, fixed in 70% ethanol, cleared with potassium chloride and

stained with alizarin red by the technique of Staples and Schenell (1964). The extent of ossification was evaluated using the parameters proposed by Aliverti et al. (1979). The kidneys, liver, lungs and heart of the fetuses used for ossification evaluation were individually weighed.

### *Statistical analysis*

Maternal reproductive parameters (number of implants, corpora lutea, resorptions, live fetuses, dead fetuses, pre-implantation loss and post-implantation loss) and the data on body or absolute and relative organ weight were analyzed by ANOVA followed by the Tukey-Kramer test. Skeletal and visceral anomalies and number of ossification centers were evaluated by the Fisher exact test. The significance level for all tests was set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### *Maternal effects*

Treatment with venom on GD5 or GD10 did not affect maternal body weight gain with gestation ( $p > 0.05$  – Fig. 1). No deaths were induced, and no other signs of toxicity, such as differences in food and water intake (data not shown), were apparent in the rats. The general state and activity did not change in the treated groups. The length of gestation was the same for the control and experimental groups. The number of pups per litter and the sex ratios of the litters were not significantly different between the control and experimental groups ( $p > 0.05$ , data not shown).

### *Effects of Tityus bahiensis scorpion venom, given on GD5 and GD10, on maternal reproductive development*

In the GD5 group, dams had a decrease in the number of implantations and an increase in the number of pre-implantation losses (Table 1). The other reproductive parameters showed no significant alterations (Table 1).

In the GD10 group, there were no significant alterations in the reproductive parameters (Table 1).

*Effects of Tityus bahiensis scorpion venom, given on GD5 and GD10, on fetal morphology*

In the GD5 group, the pups' weight showed a significant increase (Table 2) as well as the weight of the placenta (Table 2), lungs (only absolute weight) and heart (Table 2). The liver and the kidneys did not show significant alterations (Table 2). There were no cases of anomalies or external malformations (Table 3). Macroscopic visceral analysis demonstrated that the organs had a normal appearance (Table 3). Skeletal analysis did not show any alterations in the bone structure of the pups (Table 3).

In the GD10 group, the pups' weight showed a significant increase (Table 2) as well as the weight of the placenta (Table 2), and liver, lungs (only absolute weight) and heart (Table 2). The kidney did not show significant alterations (Table 2). There were no cases of anomalies or external malformations (Table 3). Macroscopic visceral analysis indicated that the organs had a normal appearance (Table 3). In the skeletal analysis, no alterations were observed in the bone structure of the pups (Table 3).

The presence of anomalies in the skeleton and viscera of both control and experimental groups was relatively common but appeared in similar proportion.

## **Discussion**

*T. serrulatus* and *T. bahiensis* are well adapted to urbanized environments, and thus, there is an increasing probability of exposure of humans and pets to these venoms, also during pregnancy (Barão et al., 2008).

Not much is known about the effects of pre-natal exposure to scorpion venom, and no information is available to aid in the rational treatment of victims stung during pregnancy (Cruttenden et al., 2008). Therefore, the present study aimed to assess the possible toxic effects of *T. bahiensis* scorpion venom on dams injected with venom during pregnancy and on their offspring.

A single non-lethal dose of the venom was employed to simulate a natural condition of envenomation. The intoxication of the dam on a more serious level was deliberately avoided so as not to compromise any positive result. The venom injection probably caused some pain to the animals, as evidenced by vocalization and attempts to run, which dissipated at the end of the application. This behavior was not observed in control dams.

The venom injection was carried out at two different stages of pregnancy, based on the rat development period, in accordance with Manson and Kang (1989). The 5th day of gestation corresponds to the end of the blastocyst implantation period in the uterus. Exposure to harmful substances in this period may lead to embryo lethality, with rare occurrence of teratogenesis. The 10<sup>th</sup> day of gestation coincides with the middle of the organogenesis period, which consists in a series of processes culminating in the formation of organs. Substances administered during this period may lead to teratogenesis, when the lesions caused by them allow the survival of the affected individual, or to embryo lethality, if the lesion is not compatible with embryo survival (Rutledge, 1997).

Studies in the literature reveal that some scorpion venoms are able to cause malformations and/or harmful effects on the offspring of experimental animals when the dams are inoculated during pregnancy. Ismail et al., (1983) demonstrated that the venom of *Androctonus amoreuxi* caused a large number of fetal resorptions, underweight fetuses and skeleton defects when injected consecutively from the ninth to the twenty-first day of gestation in dams. He also found that the venom of *Buthus minax* caused skeleton malformation in goats and induced fetal resorption in pregnant women stung by this scorpion (Ismail, 1983). Scorpion venoms also have some effects on

uterine contractility (Marei and Ibrahim 1979; Meki et al., 1995; Mendonça et al., 1995). However, in an extensive review of the literature between the years of 1966 and 2002, Langley (2004) described that no adverse consequences were reported in either mother or fetuses in accidents occurring during pregnancy. Ben Nasr *et al.* (2007) observed that two scorpion-envenomed pregnant patients developed intense pelvic pain and vaginal bleeding, but neither maternal and fetal death nor preterm fetal delivery was observed among twelve patients.

With regard to Brazilian scorpions, *T. serrulatus* venom has been demonstrated to cause some alteration in reproductive parameters and in pups' development when injected during pregnancy (Barão et al., 2008; Cruttenden et al., 2008), and *T. bahiensis* venom causes some alterations in offspring development during the perinatal phase (Dorce et al., 2009) and in adult life (Dorce et al., 2010).

*T. bahiensis* scorpion venom exposure did not affect the survival of pregnant females, the length of gestation, the number of pups per litter, or maternal body weight gain. One of the obvious signs of maternal toxicity is a decrease in body weight gain (Chernoff et al., 2008), which was not observed in our experiments. Meanwhile, there was a decrease in the number of implantations and an increase in the number of pre-implantation losses at the end of the blastocyst implantation period (GD5 dams group), which can be explained by the fact that exposure to harmful substances in this period may lead to lethality (Manson and Kang, 1989).

Blastocyst implantation in the maternal uterus is a process that involves highly coordinated movements in which specific cells of the embryo make contact with a specialized tissue of the mother, the uterus. This coordination involves regulated production of growth factors, cytokines and hormones, by both embryo and maternal tissues. At the same time, receptors for these factors must be expressed by the appropriate tissues so as to propagate the implantation signals (Carson et al., 2000). Blastocyst implantation itself elicits an aseptic inflammatory-like reaction in the endometrium, and cytokines such as IL-1, IL-11, TNF, LIF (leukemia



inhibitory factor) and IGFBP (insulin-like growth factor protein) are considered to be significant modulators of the intrauterine immune phenomena (Fazleabas et al., 2004; Makrigiannakis et al., 2006). Some works have demonstrated that scorpion venoms affect cytokines (Magalhães et al., 1999; D'Suze et al., 2003; D'Suze et al., 2004; Petricevich, 2010), and this alteration may be responsible for the losses observed. Despite the decrease in the number of implantations per dam observed, the number of pups was not altered.

In relation to fetal development, changes were observed in the weight of fetuses as well as of the placenta and of some organs, in both gestational groups (GD5 and GD10).

Many metabolic processes are performed by the mammalian placenta, several of which are considered essential for proper fetal development. For the fetus, the placenta is a combination of gastrointestinal tract, kidneys, lungs, liver, spleen and thymus, and it is a multifunctional endocrine organ. The placenta transports nutrients such as amino acids, vitamins, carbohydrates, lipids and minerals to the fetal circulation. The placenta is responsible for the metabolism of proteins, carbohydrates, lipids, prostaglandins, nucleic acids and steroid hormones (Gude et al., 2004; Myllynen et al., 2005). An increase in placenta weight may indicate a change in the metabolism of these substances, without, however, indicating whether they are benign or harmful changes (Cruttenden et al., 2008).

The increase in the fetuses' weight observed in this study would be a consequence of an increase in the weight of the organs or, alternatively, a consequence of an increase in muscle or fat mass. It is important to note that the venom did not increase the weight gain of the dams. The role of factors regulating fetal growth is important, and growth hormone (GH) is one of these regulatory factors (Waters and Kaye, 2002). Studies across several species show that GH is an important determinant of litter size. It acts at all stages of development of litter size (Waters and Kaye, 2002). The IGF (insulin-like-growth factor) system is another of the most important endocrine and paracrine growth factor systems regulating fetal and placental growth

(Gicquel and Le Bouc, 2006). The interference of the venom with these factors may be a possible explanation for the increased weight of organs, but an accurate investigation is necessary to corroborate this fact.

The effect of the venom on the lungs and heart is interesting. The respiratory tract forms from an evagination of the pharynx wall on day 10 of gestation, the day of administration of the venom. The lungs accumulate high levels of scorpion venom (Nunan et al., 2003), and the respiratory system appears to be especially sensitive to the venom (Freire-Maia, 1995; De Matos et al., 2001), since most fatal accidents are due to cardiovascular complications with consequent respiratory involvement. The mechanism by which the venom increases lung weight is not clear, but the development of the lung can be altered in many ways, including the release of glucocorticoids (Newman and Johnson, 1983), which presumably occurs after contact with the venom.

A study in our laboratory (Cruttenden et al., 2008) demonstrated an increase in the weight of the lungs and placentas of fetuses whose mothers had received a dose of 1.0mg/kg of *T. serrulatus* scorpion venom; however, 3.0mg/kg of the same venom had a similar effect and the weights of the other organs were not changed. This leads us to believe that a higher dose does not necessarily cause an increased effect. It may occur or not, independently of the dose administered. Although the increased weight of fetal organs is not traditionally related to fetal damage, the possibility that the observed result, an increase in liver, lung and heart weight, is a consequence of the venom cannot be ruled out. This effect could be better studied by histopathological examinations of the altered organs and by checking maternal metabolism in the same period of development that the present results were obtained.

In our study, there was no evidence of skeletal or visceral malformations in offspring of dams treated with *Tityus bahiensis* venom. Fetal development was not impaired; this could also be demonstrated by counting the centers of ossifications, which disclosed no alterations. The visceral anomalies seen in the experimental groups were very similar in amount and nature as in the control group, which does not support the notion that the

venom has a teratogenic effect. According to some authors (Kimmel and Wilson, 1973; Szabo, 1989), spontaneous anomalies and malformations eventually occur in laboratory rats. Thus, it is unlikely that this type of occurrence had any link to prenatal exposure to the venom.

Based on the present results, we cannot say whether the observed effects are due to some venom component passing to the offspring or whether it is just an indirect effect resulting from the response of the mother to the venom. However, Ismail *et al.* (1983) described that the teratogenic effect of the venom, observed after a prolonged exposure of pregnant rats to *A. amoreuxi* venom, appears to be the result of its metabolic effect and action on the body electrolytes of the dams, rather than a direct effect on the fetuses.

Although we did our best to avoid stress, either by means of the environmental conditions in which the animals were maintained and treated or by using a venom dose that had apparently low maternal toxicity, stress was still a possible factor accounting for the results obtained. This fact is due to the inevitability of certain procedures such as the injection of the venom, which even at a mild dose always causes discomfort to the animals. Also, we cannot rule out the possibility that although the venom had little effect on the dams, it had a more marked effect on the offspring, either by inducing stress or through a direct action.

In conclusion, a moderate dose of *Tityus bahiensis* venom caused subtle changes in maternal reproductive development and in fetal development in rats. However, as some distinct alterations were observed, further studies are warranted which should include higher doses of the venom, other gestational days and the influence of cytokines in the development of the fetuses to elucidate the effects of the venom.

## **Acknowledgements**

This work was supported by a grant from CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel). This work is part of a PhD thesis presented by Ana Leticia Coronado Dorce to the Post-Graduation Program of the Disease Control Coordination of São Paulo State Public Health Secretary, CCD – SES, São Paulo State). Dr. A. Leyva provided English editing of the manuscript.

## References

Aliverti V, Bonanomi L, Giavini E, Leone VG, Mariani L. 1979. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology* 20: 237- 242.

Barão AA, Bellot RG, Dorce VAC. 2008. Developmental effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rat offspring. *Brain Res Bull* 76: 499-504.

Ben Nasr H, Hammami TS, Rebai T, Bouaziz M, Kassis M, Zeghal KM. 2007. Scorpion envenomation symptoms in pregnant women. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 13: 94-102.

Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazlebas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. 2000. Embryo implantation. *Dev Biol* 223: 217–237.

Carvalho FF, Nencioni ALA, Lebrun I, Sandoval MRL, Dorce VAC. 1998. Behavioral, electroencephalographic, and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 60: 7-14.

Chaudry IH, Stephan RN, Harkema JM, Dean RE. 1989. Immunological alterations following simple hemorrhage. In: Faist, F., Ninneman, J., Green, D, editor. *Immune Consequences of Trauma Shock and Sepsis*. Berlin: Springer. P 363–373.

Chernoff, N., Rogers, E.H., Gage, M.I., Francis, B.M., 2008. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological significance of the “no observed adverse effect level”. *Reprod. Toxicol.* 25: 192-202.

Couraud F, Jover E. 1983. Mechanism of action of scorpion toxins. In: Tu TA, editor. *Handbook of natural toxins: Insect poisons, allergens and other invertebrate venoms*. New York: Marcel Dekker. p 659-678.

Cruttenden K, Nencioni ALA, Bernardi MM, Dorce VAC. 2008. Reproductive toxic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. *Reprod Toxicol* 25: 497-503.

D'Suze, G, Moncada S, Gonzalez C, Sevcik C, Aguilar V, Alagon A. 2003. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis

factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon* 41: 367–375.

D'Suze G., Salazar V, Díaz P, Sevcik C, Azpurua H, Bracho N. 2004. Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon* 15: 851-860.

De Matos IM, Talvani A, Rocha OO, Freire-Maia L, Teixeira MM. 2001. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. *Toxicon* 39: 863–867.

Dorce AL, Bellot RG, Dorce VAC, Nencioni ALA. 2009. Effects of prenatal exposure to *Tityus bahiensis* scorpion venom on rat offspring development. *Reprod Toxicol* 28: 365-370.

Dorce AL, Dorce VAC, Nencioni ALA. 2010. Effects of in útero exposure to *Tityus bahiensis* scorpion venom in adult rats. *Neurotoxicol Teratol* 32: 187-192.

Dorce VAC, Sandoval MRL. 1994. Effects of *Tityus serrulatus* crude venom on the GABAergic and dopaminergic systems on the rat brain. *Toxicon* 32: 1641-1647.

Fazleabas AT, Kim JJ, Strakova Z. 2004. Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment - a review. *Placenta* 25 (Suppl.A): S26–31.

Freire-Maia L. 1995. Peripheral effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J Toxicol Toxin Rev* 14: 423-435.

Gicquel C, Le Bouc Y. 2006. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res* 65 (Suppl 3): 28-33.

Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. 2004. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 114: 397–407.

Ismail M, Ellison AC, Tilmisany AK. 1983. Teratogenicity in the rat of the venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi*. *Toxicon* 21: 177-189.

Kimmel CA, Wilson JG. 1973. Skeletal deviations in rats: malformations or variations? *Teratology* 8: 309-315.

Langley R.L. 2004. A review of venomous animals and stings in pregnant patients. *Wilderness Environ Med* 15: 207-215.

Lourenço GA, Lebrun I, Dorce VAC. 2002. Neurotoxic effects of fractions isolated from *Tityus bahiensis* scorpion venom (Perty, 1834). *Toxicon*: 40, 149-157.

Lourenço WR, Cloudsley-Thompson JL, Cuellar O, Von Eickstedt VRD, Barraviera B, Knox MB. 1996. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. *J Venom Anim Toxins* 2: 121–134.

Magalhães MM, Pereira MES, Amaral CFS, Rezende NA, Campolina D, Bucarechi F, Gazzinelli RT, Cunha-Melo J.R. 1999. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 37: 1155-1164.

Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou SN, Nikas G, Chrousos GP. 2006. Hormonal and cytokine regulation of early implantation. *Trends Endocrinol Metab* 17: 178–185.

Manson J, Kang YS. 1989. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW, editor. *Principles and Methods of Toxicology*. New York: Raven Press p 311-359.

Marei ZA, Ibrahim SA. 1979. Stimulation of rat uterus by venom from the scorpion *L. quinquestriatus*. *Toxicon*: 17, 251-258.

Meki AR, Nassar AY, Roachat H. 1995. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides* 16: 1359-1365.

Mendonça M, Luz MM, Freire-Maia L, Cunha-Melo JR. 1995. Effect of scorpion toxin from *Tityus serrulatus* on the contraction of the isolated rat uterus. *Toxicon* 33: 355-361.

Myllynen P, Pasanen M, Pelkonen O. 2005. Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta* 26: 361–371.

Nencioni ALA, Carvalho FF, Lebrun I, Dorce VAC, Sandoval MRL. 2000. Neurotoxic effects of three fractions isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Pharmacol Toxicol* 86: 149-155.

Nencioni ALA, Lourenço GA, Lebrun I, Florio JC, Dorce VAC. 2009. Central effects of *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* scorpion venoms after intraperitoneal injection in rats. *Neurosci Lett* 463: 234-238.

Newman, LM, Johnson EM. 1983. Abnormal lung function induced by prenatal insult. In: Johnson EM, Kochhar DM, editors. *Teratogenesis and reproductive toxicology*. New York: Springer-Verlag p 237–258.

Nunan, EA, Moraes MF, Cardoso VN, Moraes-Santos T. 2003. Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Life Sci* 73: 319–325.

Petricevich VL. 2010. Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators Inflamm* 903295.

Possani LD, Fletcher PL, Fletcher M, Mochca-Morales J, Lucas SM, Coronas FV, Alagon AC, Martin BM. 1992. Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Mem Inst Butantan* 54: 35-52.

Rodriguez de la Vega RC, Possani LD. 2004. Current views on scorpion toxins specific for  $K^+$ -channels. *Toxicon* 43: 865-875.

Rodriguez de la Vega RC, Possani LD. 2005. Overview of scorpion toxins specific for  $Na^+$  channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon* 46: 831-844.

Rutledge JC. 1997. Developmental toxicity induced during early stages of mammalian embryogenesis. *Mutat Res* 396: 113-127.

Sandoval MRL, Dorce VAC. 1993. Behavioral and electroencephalographic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Toxicon* 31: 205-212.

Sandoval MRL, Dorce VAC. 1993. The envenomation by *Tityus serrulatus* scorpion venom: age and sex influence. *Mem Inst Butantan* 55: 5-10.

Staples RE, Schenell VL. 1964. Refinements in rapid clearing technique in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol* 39: 61-63.



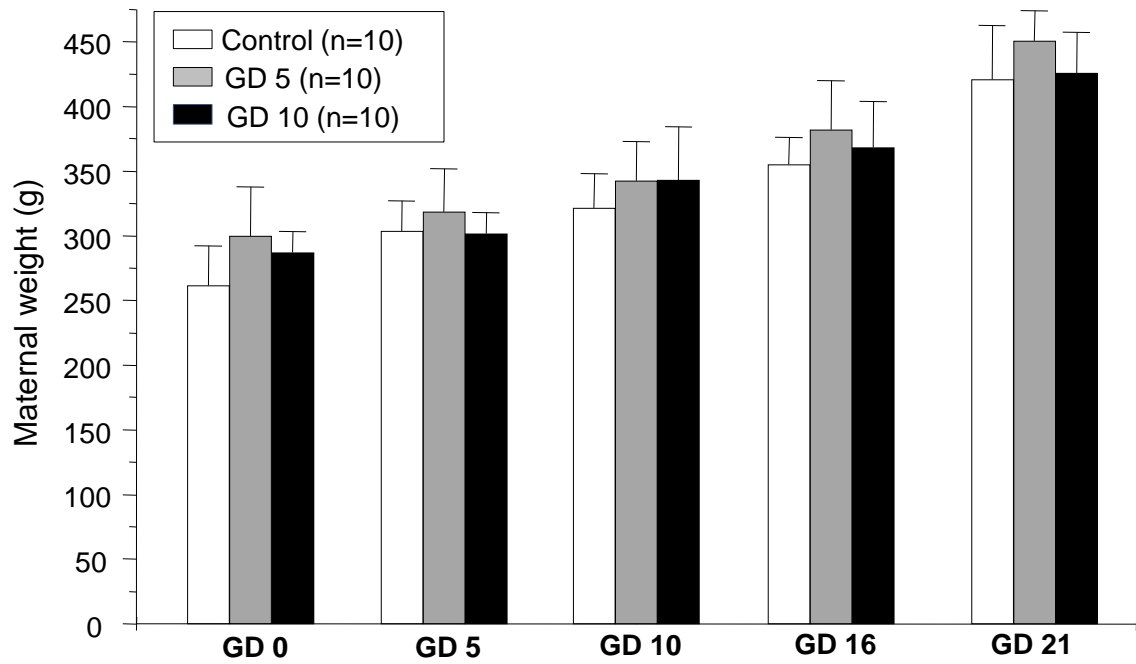
Szabo KT. 1989. Congenital malformations in laboratory and farm animals. San Diego Academic Press.

Tan PT, Ranganathan S, Brusica V. 2006. Deduction of functional peptide motifs in scorpion toxins. *J Pept Sci* 12: 420-427.

Von Eickstedt VR, Ribeiro LA, Candido DM. 1996. Evolution of scorpionism by *Tityus bahiensis* (Perty) and *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello) and geographical distribution of the two species in the state of São Paulo, Brazil. *J Venom Anim Toxins* 2: 92-105.

Waters MJ, Kaye PL. 2002. The role of growth hormone in fetal development. *Growth Horm IGF Res* 12: 137-146.

Wilson JG. 1965. Methods for administering agents and detecting malformation in experimental animal. In: Wilson JC, Warkany J, editor. *Teratology: principles and techniques*. Chicago: University of Chicago Press.



**Fig. 1:** Body weight gain (in grams) of mothers. They were treated with subcutaneous injection of 1.46% NaCl (control group) or 2.5 mg/kg *Tityus bahiensis* scorpion venom on the 5<sup>th</sup> and/or 10<sup>th</sup> gestational day (GD). Values represent the mean  $\pm$  SEM.

**Anexo 4 – Próximo trabalho a ser submetido à publicação****EVALUATION OF THE CYTOKINES LEVELS IN EMBRYOS OF  
MOTHERS TREATED WITH *Tityus bahiensis* SCORPION VENOM  
DURING THE PREGNANCY.**

**Ana Leticia C. Dorce (1, 2), Lucas A. Freitas (1,3), Eduardo O. Frare (1),  
Valquiria A. C. Dorce. (1), Ana Leonor A. Nencioni (1)**

(1) Laboratory of Pharmacology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil; (2) Pos-Graduation Program of the Disease Control Coordination of São Paulo State Public Health Secretary, São Paulo, Brazil; (3) Post-graduation Program in Toxinology of the Butantan Institute –São Paulo/SP – Brazil.

**CONFLICTS OF INTEREST:** There is no conflict.

**CORRESPONDENCE TO:**

Ana Leonor Abrahão Nencioni  
Laboratory of Pharmacology  
Butantan Institute, Av. Dr. Vital Brasil, 1500  
05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Phone: 55 11 37267222 Extension 2133. Fax: + 55 11 3726 1505  
Email: [analeonor@butantan.gov.br](mailto:analeonor@butantan.gov.br).