

Efeitos embriotóxicos do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*

Embriotoxic effects of *Crotalus durissus terrificus* snake venom

Renata Simões*
Yara Cury***
André Luiz dos Santos Capela e Ara**
Leoni Vilano Bonamim****
Maria Martha Bernardi*****

Resumo

Introdução – A atividade neurotóxica, miotóxica e coagulante do veneno das serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) são responsáveis pelas altas taxas de mortalidade observada em acidentes envolvendo estas serpentes. Estes acidentes, quando ocorrem na gravidez, podem levar ao aborto devido à interferência com a homeostasia materna e/ou à embriofetalidade, por efeito direto do veneno. **Materiais e Métodos** – Este trabalho estudou os efeitos tóxicos do (VCdt), administrado nas doses de 75 mg/kg or 200 mg/kg por via subcutânea em camundongas no terceiro dia da sua gestação (período de pré-implantação). O grupo controle foi tratado da mesma forma que os experimentais, porém com solução salina. No último dia da gestação as fêmeas foram submetidas a eutanásia e observadas as possíveis malformações ósseas e viscerais de sua prole. **Resultados e Conclusão** – Os resultados mostraram que a administração da menor dose do VCdt não causou alterações significantes no desenvolvimento ósseo e visceral dos animais. No entanto, quando expostos a maior dose este promoveu aumento significativo das anomalias e malformações, sugerindo que o envenenamento com esta dose no período inicial da gestação altera o desenvolvimento normal da prole de camundongos.

Palavras-chave: Veneno de *Crotalus durissus terrificus*/toxicidade; Venenos de serpentes; Prenhez; Teratogênese; Anormalidades fetais

Abstract

Introduction – The neurotoxic, myotoxic and coagulant activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom (VCdt) are responsible for the mortality rates observed in accidents involving the rattlesnake. Accidents during women pregnancy are a challenge, since animal venoms could lead to pregnancy interruption as a consequence of maternal homeostasis disorder and/or a direct embryotoxic effect of the venom. **Materials and Methods** – In order to evaluate the possible embryotoxic effects of VCdt, doses of 75 mg/kg or 200 mg/kg of the venom were administered by subcutaneous route at day 3 of mice pregnancy (preimplantation period). The control group received saline in the same volume and during the same period as their respective experimental groups. The animals were submitted to euthanasia at term. **Results and Conclusion** – The treatment of the females during the preimplantation period did not cause significant changes in fetuses development, but the higher dose of the venom increased the number of anomalies or malformations of the fetuses. These results suggest that the VCdt in the higher dose (200 mg/kg) altered the normal development of the concept after implantation.

Key words: *Crotalus durissus terrificus* venom/toxicity; Snake venoms; Pregnancy; Teratogens; Fetal abnormalities

Introdução

As serpentes *Crotalus* são responsáveis por cerca de 10% dos acidentes no Brasil¹³. O veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) foi o primeiro a ser relacionado pelos seus sinais pato-fisiológicos com atividade essencialmente de neurotóxica¹⁷. A miotoxicidade deste veneno foi posteriormente demonstrada em registros clínicos e de laboratório e em exames anátomo-patológicos³. A mais grave complicação do enve-

nenamento crotalídeo em seres humanos na América do Sul é a insuficiência renal aguda com necrose tubular, o que muitas vezes leva a paciente à morte. Contrariamente à maioria dos venenos de outras espécies de serpentes, o VCdt veneno não induz dor ou grave destruição tecidual no local da inoculação. As vítimas podem ainda descrever sensação de parestesia na zona afetada pela picada de cobra¹⁷. Além disso, existem relatos sobre o uso de VCdt veneno para controlar a dor⁴ e para induzir antinocicepção em animais^{8,16}.

* Graduandos do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Paulista(UNIP).

** Graduando de Ciências Biológicas da Universidade Mackenzie.

*** Doutora pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Pesquisadora do Laboratório de Patofisiologia do Instituto Butantan.

**** Professor Doutor do Curso de Medicina Veterinária da UNIP.

***** Doutora em Fisiologia pela Universidade de São Paulo. Professora Titular do Curso de Medicina Veterinária da UNIP. E-mail: bernarde@usp.com

Embriões, durante o período do desenvolvimento são muito suscetíveis a serem atingidos por agentes químicos. Existem poucos relatos na literatura sobre o efeito das picadas por serpentes no período inicial da gravidez humana. Com base nos prontuários de 157 pacientes atendidos no “João de Barros Barreto” Hospital Universitário, em São Paulo, Brasil, Pardal *et al.*¹⁵ (1997) avaliaram as conseqüências da picada de serpente peçonhentas na gravidez. Foram observadas que em 37,5% dos pacientes, 25% tinham manifestações moderadas, enquanto 12,5% apresentaram manifestações graves de envenenamento. Os pacientes desenvolveram sangramento vaginal em 100% dos casos, e de contração uterina, ameaça de aborto, diminuição dos movimentos fetais, ausência de batimentos cardíacos fetais e óbito fetal em 33,3% dos casos. Outro estudo realizado por James¹⁰ (1985) descreveu os efeitos dos acidentes ofídicos, em quatro mulheres grávidas. Vinte e quatro horas após o envenenamento, três mulheres queixaram-se de um abrandamento dos movimentos fetais, mas os sons cardíacos fetais estavam presentes. Algumas horas mais tarde, os movimentos fetais cessaram, mas após a administração do antiveneno, iniciaram-se novamente sendo normais em 48 horas. Estes bebês foram a termo em prazo normal. A última paciente grávida chegou ao hospital com hemorragia generalizada e tornou-se anurica com altos níveis de uréia sanguínea. O bebê nasceu morto, apesar de cuidado intensivamente. A paciente veio a óbito no dia subsequente. Estas observações sugerem que o veneno é capaz de atravessar a placenta, mas provavelmente em quantidades insuficientes para causar intoxicação sistêmica feto. No entanto, não é possível descartar uma interferência com o meio materno que poderia induzir os efeitos observados no feto.

Dunnihoo *et al.*⁶ (1992) revisaram 30 casos de envenenamento por picada de cobra na gravidez humana. Envenenamento por serpentes da família *Crotalidae* durante a gravidez conduzem a uma taxa de 43% de perda fetal e um coeficiente de mortalidade materna de 10%. A picada de *Pit viper* causa diátese hemorrágica em grávidas como uma conseqüência da atividade procoagulante deste veneno. Apesar dessas evidências, pouco foi encontrado na literatura sobre os efeitos perinatais do veneno de *VCdt* veneno. Este trabalho teve como finalidade avaliar se o veneno *VCdt* interfere com a gravidez ou desenvolvimento fetal. Para tanto foram administradas duas doses do *VCdt* (75 e 200 µg/kg) no terceiro dia de gravidez de camundongas, por via subcutânea, e observou-se seus efeitos na performance reprodutiva materna e no desenvolvimento dos filhotes.

Materiais e Métodos

Veneno

O veneno liofilizado de *Crotalus durissus terrificus* foi obtido do Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, e armazenado a -20°C. O veneno foi dissolvido em soro fisiológico estéril (0,85% w/v em solução NaCl) no momento da utilização e administrado por

via subcutânea. Ligeira perda de peso materno e sinais de comportamento como agressividade ou comportamento anormal foram considerados sinais de toxicidade.

Animais

Foram empregadas camundongas Swiss, virgens, sexualmente maduras, com peso entre 25-30g e machos da mesma espécie, pesando cerca de 30g, que foram mantidas em uma temperatura e luz controladas por sala (21 ± 4°C, 12 horas claro/escuro), com a água e alimentos *ad libitum*. Os animais utilizados neste estudo foram mantidos em conformidade com as diretrizes do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (Guide on Care and Use of Laboratory Animals Resources, National Research Council, USA).

Diagnóstico de gravidez e performance reprodutiva e materna

As fêmeas foram cruzadas durante a noite, e pela manhã foi observada a presença do plug vaginal indicativo de prenhez (considerado como sendo o primeiro dia de gestação). Estas foram então distribuídas em três grupos experimentais e tratadas no terceiro dia de gestação (período pré-implantação) com 75 µg/kg (grupo I) ou 200 (grupo II) µg/kg do *VCdt* ou solução salina a 0,9% (grupo controle), sc. Durante a gestação, as fêmeas foram pesadas nos dias 1 a 5 para determinar toxicidade materna. No 19º dia de gestação, foram anestesiadas e seus úteros removidos. Caso o feto não tivesse desenvolvimento ou a implantação não tivesse ocorrido seriam contados os números de implantações e fetos mortos. Foram calculados o ganho de peso total, correspondente ao ganho de peso durante a gravidez e ganho de peso corporal materno corrigido (ganho de peso total – peso de útero fechado). Foram registrados o número de implantes, reabsorções, fetos vivos e mortos. Os ovários foram também observados e os corpos lúteos contados.

Avaliação fetal

Os fetos foram pesados e examinados para malformações macroscópicas externas. Metade de cada ninhada foi fixada em solução Bouin para posterior exame visceral pelo método de secções seriadas de Wilson's²⁰ (1977), e a outra metade foi corada com alizarina vermelha pela técnica da Staples e Schnell¹⁸ (1964) para identificar alterações esqueléticas. Os fetos foram examinados macroscopicamente para anomalias externas, pesados individualmente bem como suas placentas. Os seguintes parâmetros foram observados: forma do crânio, implante de orelhas e palato, cauda e pés, perfuração anal, e outros. O grau de ossificação foi avaliado utilizando os parâmetros propostos por Aliverti *et al.*¹ (1979). A taxa de perda pré-implantação foi calculada como: n^o de corpos lúteos – n^o de implantes x 100/n^o de corpos lúteos, e a taxa de perda pós-implantação foi calculada como: ausência de implantação – n^o de fetos vivos x 100/n^o de implantes.

Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA para comparar o peso materno no final da gestação, peso fetal, perdas pré-implantação e pós-implantação, número de reabsorções e de corpos lúteos, número de fetos vivos e mortos, o número de fetos por ninhada e ganho de peso materno. O teste de Fisher foi utilizado para avaliar diferenças entre o número de fêmeas com ou sem perda pré ou pós-implantação, anormalidades esqueléticas e viscerais. O nível de significância foi fixado em $P < 0,05$.

Resultados

Ganho de peso materno e desempenho reprodutivo

A Tabela 1 apresenta os dados de desempenho reprodutivo de ratas expostas ao veneno de *VCdt* durante o período de pré-implantação da gestação. O ganho de peso materno total durante este período foi aumentado

pela maior dose de *VCdt* embora o peso real não tenha sido alterado nos dois tratamentos com o veneno. Além disso, o número de corpos lúteos, implantes e taxa de perda de pré-implantação e pós-implantação dos grupos experimentais não diferiram dos controles. Nenhuma morte fetal foi detectada após a exposição às duas doses do veneno. Finalmente, tanto o peso fetal bem como o das ninhadas não foi diferente entre os grupos (Tabela 1).

Incidência de malformações externas, esqueléticas e viscerais bem como de anomalias dos fetos

O exame dos centros de ossificação dos fetos dos dois grupos indicou que estes não apresentaram diferenças significativas entre eles; nenhuma malformação ou anomalia externa foram observadas. Apesar da detecção de anomalias esqueléticas em todos os grupos (grupos controle e experimental), foi observado aumento de anomalias do esterno e costelas em animais tratados com a dose mais elevada de veneno. Não foram encontradas

Tabela 1. Efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* no ganho de peso materno e na performance reprodutiva de camundongos Swiss

Grupos	Controle	Tratado (75 µg/kg)	Tratado (200 µg/kg)
Ganho de peso total (dia 0 ao 19 da gravidez) (g) (média ± dp) ¹	25,23 ± 7,34	27,33 ± 7,98	31,87 ± 6,35*
Peso real (ganho de peso total – feto) (g) (média ± dp) ¹	38,73 ± 2,89	37,57 ± 5,62	39,55 ± 3,54
Período de pré-implantação (dia 0 a 5 da gravidez) (média ± dp) ¹	2,57 ± 1,95	0,92 ± 1,39	0,20 ± 1,48
Número de fêmeas cruzadas	20	20	20
Corpora lutea ¹			
Número total	206	199	233
Média	13	12	14
(min; max)	(3,0;19,0)	(4,0;16,0)	(9,0;17,0)
Implantações ¹			
Número total	206	199	233
Média	13	12	14
(min; max)	(1,0;19,0)	(4,0;16,0)	(9,0;17,0)
Fetos vivos ¹			
Média	10	11	13
(min; max)	(1,0;16,0)	(4,0;16,0)	(5,0;17,0)
Fetos mortos ¹			
Número total	0	0	0
Reabsorções ¹			
Número total	45	24	38
Média	2,0	1,0	1,0
(min; max)	(0,0;9,0)	(0,0;6,0)	(0,0;6,0)
Pre-implantação ² (%)	7,83	0	0,35
Pos-implantação ² (%)	16,2	10,94	10,29
Peso da ninhada ¹ (g) (média ± dp)	1,47 ± 0,29	1,50 ± 0,22	1,45 ± 0,26
Peso fetal ¹ (g) (média ± dp)	1,41 ± 0,31	1,47 ± 0,23	1,40 ± 0,27

1. O veneno ou solução salina (grupo controle) foram administrados por via s.c. no terceiro dia da gravidez.

(*) $p < 0,05$ (diferença significativa em relação ao grupo controle); teste do χ^2 .

2. ANOVA seguida pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 2. Efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* na incidência de malformações e/ou anomalias externas, esqueléticas ou viscerais e nos centros de ossificação de fetos de camundongos

Grupos	Controle	Tratado (75 µg/kg)	Tratado (200 µg/kg)
Malformações externa ¹			
Fetos afetados	0/161	0/175	0/211
Ninhadas afetadas	0/18	0/17	0/17
Malformações esqueléticas ¹			
Fetos afetados	0/161	0/175	0/211
Ninhadas afetadas	0/18	0/17	0/17
Anomalias esqueléticas ¹			
Fetos afetados	38/161	49/175	83/211
Ninhadas afetadas	12/18	12/17	16/17
Ossificação incompleta do crânio ¹			
Fetos afetados	3/161	0/175	0/211
Ninhadas afetadas	1/18	0/17	0/17
Anomalias externas ¹			
Fetos afetados	28/161	32/175	73/211*
Ninhadas afetadas	11/18	12/17	15/17
Anomalias de vértebras ¹			
Fetos afetados	0/161	0/175	0/211
Ninhadas afetadas	0/18	0/17	0/17
Anomalias de costelas ¹			
Fetos afetados	8/161	15/175	25/211*
Ninhadas afetadas	4/18	6/17	7/17
14 ^a costela ¹			
Fetos afetados	2/161	7/175	9/211
Ninhadas afetadas	2/18	3/17	4/17
Malformações viscerais ¹			
Fetos afetados	0/161	0/175	0/211
Ninhadas afetadas	0/18	0/17	0/17
Anomalias viscerais ¹			
Fetos afetados	0/161	0/175	0/211
Ninhadas afetadas	0/18	0/17	0/17
Falanges ²	4 ± 0,00	3,94 ± 0,23	4 ± 0,00
Metacarpo ²	4 ± 0,00	3,94 ± 0,24	4 ± 0,00
Esternébrios ²	6,11 ± 0,32	5,83 ± 0,92	6,11 ± 0,47
Metatarso ²	4,0 ± 0,00	4,0 ± 0,00	4,0 ± 0,00
Vértebras caudais ²	3,66 ± 0,48	3,61 ± 0,50	3,61 ± 0,50

1. O veneno ou solução salina (grupo controle) foram administrados por via s.c. no terceiro dia da gravidez.

(*) p < 0.05 (diferença significativa em relação ao grupo de controle); teste do χ^2 .

2. ANOVA seguida pelo teste de Tukey – Kramer.

malformações e anomalias viscerais. Estes dados estão apresentados na Tabela 2.

Discussão

No presente estudo a dose de 75 g/kg de VCdt dose não foi capaz de induzir toxicidade materna desde que seu peso corporal não foi afetado. Este fato pode ser importante, pois em estudos anteriores do nosso grupo sobre os efeitos do veneno VCdt mostramos que esta dose, administrada por via sc, apresenta efeito antinoci-

ceptivo⁸. Por outro lado, a dose de 200 g/kg de peso corporal materno aumentaram, sugerindo uma leve toxicidade materna. Ambas as doses de veneno não prejudicaram o crescimento intra-uterino, pois os pesos dos fetos a termo, não foram diferentes para o grupo controle.

A placenta e as membranas extra-embrionárias são interfaces essenciais entre a mãe e o concepto. Estas membranas participam do processo de nutrição, transporte de nutrientes e controle hormonal. No nosso trabalho, não foram encontradas diferenças no peso fetal e da placenta sugestivo de ausência de efeitos embriotóxicos^{9,11-12,14}.

O período de pré-implantação da gravidez é considerado como um período de “tudo-ou-nada” ie., durante o mesmo a exposição materna aos agentes exógenos podem provocar letalidade embrionária ou desenvolvimento normal do embrião com um feto normal no parto¹⁹. Alguns pesquisadores relataram aumento no número de anomalias em fetos cujas mães receberam agentes químicos durante esse período⁷. Além disso, sabe-se que a exposição do embrião pré-implantado a drogas embriotóxicas pode também retardar o seu desenvolvimento, talvez pela diminuição no número de células do blastocisto². Dados obtidos por Pardal *et al.*¹⁵ (1997) mostraram que o veneno de serpentes pode causar aborto. No presente estudo, não foi observado efeito abortivo do veneno de *VCdt*, uma vez que as taxas de perda na pré e pós-implantação não foram estatisticamente diferentes nos dois grupos tratados durante este período com relação àqueles do grupo controle.

O exame externo das anomalias viscerais e esqueléticas indica que o veneno de *VCdt*, na dose de 200 µg/kg, induz embriotoxicidade, pois os fetos apresentaram anomalias de costelas e esternóbrios. Chernoff *et al.*⁵ (1981) sugeriram que a incidência da 14^a costela é uma manifestação tóxica no desenvolvimento e que esta anomalia persiste durante a vida do animal.

O retardo no desenvolvimento é geralmente feito com base no peso fetal. No entanto, este parâmetro por si só, não é conclusivo, pois pode estar relacionado com o tamanho da ninhada. Com o objetivo de fornecer uma ava-

liação adicional do índice de retardo do desenvolvimento em camundongos, Aliverti *et al.*¹ (1979) propuseram um método de pontuação com base no grau de ossificação fetal. Esta consiste na observação das seguintes áreas do esqueleto: esternóbrios, falanges proximais e distais, metacarpos, metatarsos e vértebras. A observação deve feita no 21^o dia de gestação, quando a ossificação é precoce, homogênea e uniforme. A este respeito, não foram detectadas diferenças nos centros de ossificação dos animais dos grupos experimentais e controle (dados não mostrados). Assim, nenhum atraso de desenvolvimento foi observado após as duas doses do veneno *VCdt*, fato que confirma os dados obtidos para o peso corporal dos fetos.

Conclusão

Conclui-se que o tratamento com 75 µg/kg dose do veneno não induziu toxicidade materna ou embriotoxicidade, contudo, a de 200 µg/kg interferiu no peso materno e das ninhadas sugerindo que ocorreu uma leve toxicidade para a mãe e fetos. As explicações para estes fatos ainda não são conhecidas e novas investigações são necessárias.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (Proc. 00/10289-8) e pela Vice Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Paulista.

Referências

- Aliverti V, Bonanomi L, Giavini E. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology*. 1979;20:237-42.
- Aranda JV, Hales BF, Gibbs J. *Developmental pharmacology*. I: Fanaroff AA, Marten RJ, Behrman RE, editors. *Behrman's neonatal – perinatal medicine: diseases of the fetus and infant*. Saint Louis: Mosby; 1983. p.150-68.
- Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra TM, Hering SE, Rossi MA, Laure CJ. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*. 1985;23:631-6.
- Brazil V. Do emprego da peçonha em terapêutica. *Biol Méd*. 1934;1:7- 21.
- Chernoff N. Significance of supernumerary ribs in rodent developmental toxicity studies: postnatal persistence in rats and mice. *Fundam Appl Toxicol*. 1981;17:448-53.
- Dunnihoo DR, Rush BM, Wise RB, Brooks GG, Otterson WN. Snake bite poisoning in pregnancy. A review of the literature. *J Reprod Med*. 1992;37: 653-8.
- Giavini E, Lemonica IP, Lou Y, Broccia ML, Prati M. Induction of micronuclei and toxic effects in embryos of pregnant rats treated before implantation with anticancer drugs: Cyclophosphamide, Cis-Platinum, Adriamycin. *Teratog. Carcinog. Mutagen*. 1990;10:417-26.
- Giorgi R, Bernardi MM, Cury Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 1993;31:1257-65.
- Goodman L A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial population. *Ann Math Stat*. 1964;35:716-25.
- James RF. Snake bite in pregnancy. *Lancet*. 1985;28:731.
- Kelman BJ. Effects of toxic agents on movements of material across the placenta. *Fed Proc*. 1979; 38:2246-50.
- Miller RK, Thiede HA. *Placenta: receptors, pathology and toxicology*. London; Saunders; 1981.
- Ministério da Saúde. *Manual de diagnóstico e tratamento de pacientes picados por animal peçonhentos*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 1998.
- Panigel N. Placental function: toxicology and pathology. In: Miller RK., Thiede HA, editors. *Placenta: receptors, pathology and toxicology*. London: Saunders;1981. p.275-87.
- Pardal PPO, Mazzeo T, Pinheiro ACL. Snakebite in pregnancy: a preliminary study. *J Venom Anim Toxins*. 1997;3:280-86.
- Picolo G, Giorgi R, Bernardi MM, Cury Y. The antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom is mainly due to supraspinaly integrated response. *Toxicon*. 1998;36:223-7.
- Rosenfeld G. Symptomatology, pathology, and treat of snake bites in South America. In: Bucherl W, Buckley EE. *Venomous animals and their venoms*. New York: Academic Press; 1971. v.2. p.345-84.
- 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.
- Wilson JG. Current status of teratology. In: Wilson JG, Fraser FC, editors. *Handbook of teratology*. New York: Plenum Press; 1977.
- Wilson JG. Method for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: Wilson JG, Warkany J, editors. *Teratology: principles and techniques*. Chicago: University of Chicago Press; 1965. p.251-78.

Recebido em 22/6/2007

Aceito em 25/8/2007



Embriotoxic effects of *Crotalus durissus terrificus* snake venom

Renata Simões*
Yara Cury***
André Luiz dos Santos Capela e Ara**
Leoni Vilano Bonamim****
Maria Martha Bernardi*****

Abstract

Introduction – The neurotoxic, myotoxic and coagulant activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom (VCdt) are responsible for the mortality rates observed in accidents involving the rattlesnake. Accidents during women pregnancy are a challenge, since animal venoms could lead to pregnancy interruption as a consequence of maternal homeostasis disorder and/or a direct embryotoxic effect of the venom. **Materials and Methods** – In order to evaluate the possible embryotoxic effects of VCdt, doses of 75 mg/kg or 200 mg/kg of the venom were administered by subcutaneous route at day 3 of mice pregnancy (preimplantation period). The control group received saline in the same volume and during the same period as their respective experimental groups. The animals were submitted to euthanasia at term. **Results and Conclusion** – The treatment of the females during the preimplantation period did not cause significant changes in fetuses development, but the higher dose of the venom increased the number of anomalies or malformations of the fetuses. These results suggest that the VCdt in the higher dose (200 mg/kg) altered the normal development of the concept after implantation.

Key words: *Crotalus durissus terrificus* venom/toxicity; Snake venoms; Pregnancy; Teratogens; Fetal abnormalities

Introduction

The *Crotalus* snakes are responsible for approximately 10% of the accidents in Brazil¹³. Venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) was first reported to have pathophysiological activity mainly of neurotoxic nature¹⁷. The myotoxic action of this venom was later demonstrated on clinical and laboratory records and on anatomical and pathological examination³. The most serious complication of crotalid bites in humans in South America is acute renal failure with tubular necrosis, which often leads to patient death. Contrary to most snake venoms from other species, the Cdt venom does not induce pain or severe tissue destruction at the site of inoculation. Victims can even describe sensation of paresthesia in the area affected by the snakebite¹⁷. Furthermore, reports exist on the use of Cdt venom to control pain⁴ and to induce antinociception in animals^{8,16}.

Embryos, during the development period are very susceptible to be reached by chemical agents. Few reports exist in the literature about the effect of snakes bite on the preimplantation period of human pregnancy. Based on the medical records of 157 patients attended at the “João de Barros Barreto” University Hospital, in São Paulo, Brazil, Pardal *et al.*¹⁵ evaluated the obstetrical consequences of snake envenomations. Alterations

of pregnancy were observed in 37.5% of patients; 25% of these patients had moderate manifestations, while 12.5% presented severe manifestations. The patients developed vaginal bleeding in 100% of cases, and uterine contraction, threatened abortion, decreased fetal movements, absence of fetal heartbeat and fetal death in 33.3% of cases. Another study carried out by James¹⁰, described the effects of snake bites on four pregnant women. Twenty four hours after envenomation, three women complained of slowing of fetal movements, but fetal heart sounds were present. A few hours later the fetal movements ceased but 6 hours after antivenom administration, fetal movements returned, being normal within 48 hours. These patients delivered, at term, normal babies. The last pregnant woman arrived at the hospital with generalized bleeding and became anuric with a high blood urea. She delivered a stillborn baby 4 hours later and, despite intensive care, the woman died in the next day. These observations suggest that venom is able to cross the placenta but probably in amounts insufficient to cause fetus systemic poisoning. However, it is not possible to discard an interference with the maternal milieu which could induce the fetal effects observed.

Dunnihoo *et al.*⁶ (1992) reviewed 30 reported cases of snakebite poisoning in human pregnancy. Poisoning by snakes of the *Crotalidae* family (rattlesnakes, cotton-

* Undergraduate students, Veterinary Medicine Course, University Paulista.

** Undergraduate student, Biological Sciences, University Mackenzie.

*** PhD, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo. Researcher of Laboratory of Pathophysiology, Butantan Institute.

**** PhD, Professor, Veterinary Medicine Course, University Paulista.

***** PhD in Physiology, University of São Paulo. Chairman, Professor, Veterinary Medicine Course, University Paulista. E-mail: bernarde@usp.com

mouth and copperheads) during pregnancy lead to a fetal wastage rate of 43% and a maternal mortality rate of 10%. Pit viper bites cause bleeding diathesis in pregnant woman as a consequence of the procoagulant activity of this venom. Despite these evidences, no reports about the perinatal effects of Cdt venom was found in the literature. In order to evaluate if the Cdt venom interfere with pregnancy or fetal development, doses of 75 µg/kg or 200 µg/kg of the venom were administered on the third day of Swiss mice pregnancy by subcutaneous route and its effects evaluated on the pre-implantation period.

Materials and Methods

Venom

Lyophilized venom of *Crotalus durissus terrificus* was obtained from the Laboratory of Herpetology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, and stored at -20°C. The venom was dissolved in sterile physiological saline (0.85% w/v NaCl solution) at the moment of use and administered by subcutaneous route. Slight loss of maternal weight and behavior signs as aggressiveness or abnormal behavior were considered toxicity signs.

Animals

Female Swiss mice, virgins, sexually matures, weighing between 25-30 g and males from the same specie, weighing about 30 g, were maintained in a temperature and light-controlled room (21 ± 4°C, 12-h light/dark), with water and food *ad libitum*. The animals used in this study were maintained in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animals Resources, National Research Council, USA.

Pregnancy diagnosis and maternal reproductive performance

The females were mated overnight, and the morning when a vaginal plug was observed was considered to be day 1 of pregnancy. The mated females were randomly assigned to three experimental groups and treated at the third day of pregnancy (preimplantation period). The treatments consisted in the s.c. administration of 75 µg/kg or 200 µg/kg of Cdt venom (experimental groups I and II, respectively) or saline 0,9% (control group), at the third day of pregnancy. During the pregnancy, the females were weighed on days 1 to 5 to determine maternal toxicity. On day 19 of pregnancy, the females were sacrificed and their uterus were removed; if the fetus development or visible implantation sites did not occur, the female were also submitted to euthanasia and their uterine horns were removed. The total weight gain, corresponding to the weight gain during pregnancy and the corrected maternal body weight gain (total weight gain - unopened uterus weight) were calculated. The number of implants, resorptions, and dead and live fetuses was then recorded.

The ovaries were also observed and the corpora lutea were counted.

Fetuses performance

The fetuses were weighed and examined for macroscopic external malformations. Half of each litter was fixed in Bouin's solution for subsequent visceral examination by Wilson's serial section method²⁰, and the other half was stained with Alizarin red by the technique of Staples and Schnell¹⁸ (1964) to identify skeletal alterations. The fetuses were examined macroscopically for external abnormalities, weighed individually such as its placentas. The following parameters were observed: skull form, ears and palate implantation, tail and foot conforming, anal drilling, and others. The degree of ossification was evaluated using the parameters proposed by Aliverti *et al.*¹. The rate of preimplantation loss was calculated as: n° of corpora lutea - n° of implantations \times 100/ n° of corpora lutea, and postimplantation loss rate was calculated as: n° of implantation - n° of live fetuses \times 100/ n° of implantations.

Statistical analysis

The data were analyzed by the ANOVA to compare maternal body weight at the end of pregnancy, fetus weight, preimplantation and postimplantation losses, number of resorptions and corpora lutea, number of live and dead fetuses, number of fetuses per litter and maternal weight gain. The Fisher test was used to evaluate differences between the number of females with or without loss pre or postimplantation, skeletal and visceral abnormalities. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Maternal weight gain and reproductive performance

Table 1 show data of reproductive performance of Cdt venom exposed mice during pregnancy preimplantation period. The total maternal weight gain during the preimplantation period was increased by the higher Cdt dose; the real weight were not modified by both Cdt venom doses. In addition, the number of corpora lutea, implantations and rate of preimplantation and postimplantation loss of experimental groups did not differ from controls. No fetuses dead were detected after the two venom doses. Finally, both the fetal and litter weights of experimental group were not different of the control animals (Table 1).

Incidence of external, skeletal and visceral malformations and/or anomalies of the fetuses

Examination of live fetuses for ossification centers did not show significant differences; none external malformations or anomalies were observed. Despite the detection of skeletal anomalies in all groups (control and experi-

Table 1. Effects of *Crotalus durissus terrificus* venom on maternal weight gain and reproductive performance of Swiss mice

Groups	Control	Treated (75 µg/kg)	Treated (200 µg/kg)
Total weight gain (day 0 to 19 of pregnancy) (g) (mean ± dp) ¹	25,23 ± 7,34	27,33 ± 7,98	31,87 ± 6,35*
Real weight (total weight gain – fetuses) (g) (mean ± dp) ¹	38,73 ± 2,89	37,57 ± 5,62	39,55 ± 3,54
Preimplantation period (day 0 to 5 of pregnancy) (mean ± dp) ¹	2,57 ± 1,95	0,92 ± 1,39	0,20 ± 1,48
Number of females mated	20	20	20
Corpora lutea ¹			
Total number	206	199	233
Median (min; max)	13 (3,0;19,0)	12 (4,0;16,0)	14 (9,0;17,0)
Implantations ¹			
Total numbers	206	199	233
Median (min; max)	13 (1,0;19,0)	12 (4,0;16,0)	14 (9,0;17,0)
Live fetuses ¹			
Median (min; max)	10 (1,0;16,0)	11 (4,0;16,0)	13 (5,0;17,0)
Dead fetuses ¹			
Total number	0	0	0
Resorptions ¹			
Total number	45	24	38
Median (min; max)	2,0 (0,0;9,0)	1,0 (0,0;6,0)	1,0 (0,0;6,0)
Preimplantation ² (%)	7,83	0	0,35
Posimplantation ² (%)	16,2	10,94	10,29
Litters weight ¹ (g) (mean ± dp)	1,47 ± 0,29	1,50 ± 0,22	1,45 ± 0,26
Fetal weight ¹ (g) (mean ± dp)	1,41 ± 0,31	1,47 ± 0,23	1,40 ± 0,27

1. The venom or saline solution (control group) were administered by s.c route in the third day of pregnancy.

(*) p < 0.05 (significant difference in relation to control group); χ^2 test.

2. ANOVA followed by Kruskal-Wallis test.

mental groups), an increased sternal and rib anomalies was observed in animals treated with the higher venom dose. No visceral malformation and visceral anomalies were founded. The incidence of external, skeletal and visceral malformations and/or anomalies of the fetuses are shown in Table 2.

Discussion

In the present study the 75 µg/kg Cdt dose was not able to induce maternal toxicity since dams body weight was not affected. This fact should be important because in previous studies of our group about the effects of Cdt venom we showed that this dose, administered by s.c. route, has an antinociceptive effect⁸. On the other hand, the dose of 200 µg/kg increased maternal body weight, suggesting a slight maternal toxicity. Both venom doses did not impaired intrauterine growth because the fetuses weight at term were not different from control group.

The placenta and the extra-embryonic membranes are

essential interfaces between the mother and the concept. These membranes participate of the nutrition process, nutrient transport and hormonal control. In our report, no significant data was reported in both fetal and placental weights that would evidence an embryotoxic effect^{9,11-12,14}.

The preimplantation period of pregnancy is considered to be an “all-or-none” period, ie., the period during which maternal exposure to exogenous agents may cause either embryo lethality or normal development of the embryo with a normal fetus at delivery¹⁹. Some investigators have reported an increase in the number of anomalies in fetuses whose mothers received chemical agents during this period⁷. In addition, it is known that exposure of the preimplantation embryo to embryotoxic drugs may also retard its development, perhaps by decreasing cell number in the blastocyst². Data obtained by Pardal *et al.*¹⁵ showed that snake venom can cause abortion. In the present investigation, an abortive effect of *Crotalus durissus terrificus* venom was not achieved, since the rate of preimplantation and postimplantation loss were not statistically different in both groups treated during these period.

Table 2. Effects of *Crotalus durissus terrificus* venom on the incidence of external, skeletal and visceral malformations and/or anomalies and ossification centers of the mice fetuses

Groups	Control	Treated (75 µg/kg)	Treated (200 µg/kg)
External malformations ¹			
Affected fetuses	0/161	0/175	0/211
Affected litters	0/18	0/17	0/17
Skeletal malformations ¹			
Affected fetuses	0/161	0/175	0/211
Affected litters	0/18	0/17	0/17
Skeletal anomalies ¹			
Affected fetuses	38/161	49/175	83/211
Affected litters	12/18	12/17	16/17
Incomplete skull ossification ¹			
Affected fetuses	3/161	0/175	0/211
Affected litters	1/18	0/17	0/17
External anomalies ¹			
Affected fetuses	28/161	32/175	73/211*
Affected litters	11/18	12/17	15/17
Vertebral anomalies ¹			
Affected fetuses	0/161	0/175	0/211
Affected litters	0/18	0/17	0/17
Rib anomalies ¹			
Affected fetuses	8/161	15/175	25/211*
Affected litters	4/18	6/17	7/17
14 th rib ¹			
Affected fetuses	2/161	7/175	9/211
Affected litters	2/18	3/17	4/17
Visceral anomalies ¹			
Affected fetuses	0/161	0/175	0/211
Affected litters	0/18	0/17	0/17
Visceral anomalies ¹			
Affected fetuses	0/161	0/175	0/211
Affected litters	0/18	0/17	0/17
Phalanges ²	4 ± 0,00	3,94 ± 0,23	4 ± 0,00
Metacarpal ²	4 ± 0,00	3,94 ± 0,24	4 ± 0,00
Esternebrys ²	6,11 ± 0,32	5,83 ± 0,92	6,11 ± 0,47
Metatarsal ²	4,0 ± 0,00	4,0 ± 0,00	4,0 ± 0,00
Caudal vertebrae ²	3,66 ± 0,48	3,61 ± 0,50	3,61 ± 0,50

1. The venom or saline solution (control group) were administered by s.c route in the third day of pregnancy.

(*) p < 0.05 (significantly different from control group), χ^2 test.

2. ANOVA followed by Tukey – Kramer test.

Examination of fetuses for external, visceral and skeletal anomalies indicates that Cdt venom, at the dose of 200 µg/kg, induces embryotoxicity, since the fetuses showed esternebrys and ribs abnormalities. Chernoff *et al.*⁵ (1981) suggest that the incidence of the 14th rib is a toxic manifestation in the development and that this anomaly persists during the lifetime of the animal.

The retard of intrauterus development is usually dear with base in the fetal weight. However, this parameter by itself is not conclusive, because it can be related with the size of the brood. With the objective of supplying an addi-

tional index for evaluation of retard of the development in mice, Aliverti *et al.*¹ (1979) proposed a method of scores with base in the degree of fetal ossification. This consists of the observation of the following areas of the skeleton: esternebrys, proximal and distal phalanges, metacarpus, metatars and flows vertebrae. The observation should be accomplished to the 21^o day of the gestation when the ossification is sufficiently early, homogeneous and uniform. In this respect, no differences were detected in the ossification centers of control and experimental animals (data not show). Thus no retard of development was observed

after the two doses of the Cdt venom which confirms the data obtained to the fetuses body weight.

Conclusion

We conclude that treatment with 75 µg/kg dose of the Cdt venom did not induce maternal or embryotoxicity, however, the 200 µg/kg dose interfered in maternal weight and litter showing that a light toxicity occurred for both mother and fetuses. The explanations for those

facts still are not known and further investigations are necessary.

Acknowledgements

This research was supported by a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (Proc. 00/10289-8) and from Vice Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Paulista.

References

- Aliverti V, Bonanomi L, Giavini E. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology*. 1979;20:237-42.
- Aranda JV, Hales BF, Gibbs J. Developmental pharmacology. I: Fanaroff AA, Marten RJ, Behrman RE, editors. *Behrman's neonatal – perinatal medicine: diseases of the fetus and infant*. Saint Louis: Mosby; 1983. p.150-68.
- Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra TM, Hering SE, Rossi MA, Laure CJ. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*. 1985;23:631-6.
- Brazil V. Do emprego da peçonha em terapêutica. *Biol Méd*. 1934;1:7- 21.
- Chernoff N. Significance of supranumerary ribs in rodent developmental toxicity studies: postnatal persistence in rats and mice. *Fundam Appl Toxicol*. 1981;17:448-53.
- Dunnihoo DR, Rush BM, Wise RB, Brooks GG, Otterson WN. Snake bite poisoning in pregnancy. A review of the literature. *J Reprod Med*. 1992;37: 653-8.
- Giavini E, LEMONICA IP, Lou Y, Broccia ML, Prati M. Induction of micronuclei and toxic effects in embryos of pregnant rats treated before implantation with anticancer drugs: Cyclophosphamide, Cis-Plantium, Adriamycin. *Teratog. Carcinog. Mutagen*. 1990;10:417-26.
- Giorgi R, Bernardi MM, Cury Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 1993;31:1257-65.
- Goodman L A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial population. *Ann Math Stat*. 1964;35:716-25.
- James RF. Snake bite in pregnancy. *Lancet*. 1985;28:731.
- Kelman BJ. Effects of toxic agents on movements of material across the placenta. *Fed Proc*. 1979; 38:2246-50.
- Miller RK, Thiede HA. *Placenta: receptors, pathology and toxicology*. London: Saunders; 1981.
- Ministério da Saúde. *Manual de diagnóstico e tratamento de pacientes picados por animal peçonhentos*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 1998.
- Panigel N. Placental function: toxicology and pathology. In: Miller RK., Thiede HA, editors. *Placenta: receptors, pathology and toxicology*. London: Saunders;1981. p.275-87.
- Pardal PPO, Mazzeo T, Pinheiro A C L. Snakebite in pregnancy: a preliminary study. *J Venom Anim Toxins*. 1997;3:280-86.
- Picolo G, Giorgi R, Bernardi MM, Cury Y. The antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom is mainly due to supraspinaly integrated response. *Toxicon*. 1998;36:223-7.
- Rosenfeld G. Symptomatology, pathology, and treat of snake bites in South America. In: Bucherl W, Buckley EE. *Venomous animals and their venoms*. New York: Academic Press; 1971. v.2. p.345-84.
- 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.
- Wilson JG. Current status of teratology. In: Wilson JG, Fraser FC, editors. *Handbook of teratology*. New York: Plenum Press; 1977.
- Wilson JG. Method for administering agents and detecting malformations in experimental animals. In: Wilson JG, Warkany J, editors. *Teratology: principles and techniques*. Chicago: University of Chicago Press; 1965. p.251-78.

Received in 22/6/2007

Accepted in 25/8/2007