

**KARLA VANESSA FERREIRA**

**Envenenamento experimental por *Bothrops jararaca* em camundongos  
prenhes: Eficácia do soro antiofídico**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para  
obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo

2011

**KARLA VANESSA FERREIRA**

**Envenenamento experimental por *Bothrops jararaca* em camundongos  
prenhes: Eficácia do soro antiofídico**

Tese apresentada à Universidade Federal de São  
Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção  
do título de Mestre em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Sima Godosevicius Katz

Co-Orientadora: Dra. Diva Denelle Spadacci-Morena

São Paulo

2011

Ferreira, Karla Vanessa

**Envenenamento experimental por *Bothrops jararaca* em camundongos prenhes: Eficácia do soro antibotrópico/** Karla Vanessa Ferreira – São Paulo, 2011.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Morfologia e Genética.

Título em inglês: Experimental *Bothrops jararaca* envenomation in pregnant mice: The effectiveness of antiothropic serum

1. Veneno de *B. jararaca*. 2. Soro antibotrópico. 3. Decídua antimesometrial. 4. Prenhez. 5. Camundongo.

Dedico este trabalho aos meus pais, Suely e Jorge, e a minha irmã Gabi, por todos esses anos de ajuda, incentivo e amor, que me impulsionaram a buscar vida nova a cada dia.

## **Agradecimentos**

A Dra Diva Denelle Spadacci-Morena, por toda a confiança depositada em mim, e dedicação demonstrada ao longo da execução do projeto. Serei eternamente grata.

A Profa. Dra. Sima Godosevicius Katz, pela orientação e incontáveis ajudas no decorrer deste trabalho.

A Profa. Dra. Janete Maria Cerutti, Coordenadora da Pós-Graduação em Morfologia e Genética da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), por possibilitar a realização do meu mestrado.

A Dra. Ida Sigueko Sano-Martins, antiga diretora do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, que me acolheu no laboratório e me deu oportunidade de desenvolver meu projeto.

Ao Dr. Luis Roberto de Camargo Gonçalves, atual diretor do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, que permitiu a finalização do meu projeto.

A Silvia Cristina B. Abuchaim, secretária da Pós-Graduação em Morfologia e Genética, pelas ajudas constantes.

Ao Dr. Carlos Jared, diretor do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, por permitir o uso do microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E

A Dra. Marta Maria Antoniazzi, pesquisadora do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, por permitir e ajudar no uso do microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E.

A Simone Jared, aluna do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, pela simpatia e grande disposição em me ajudar na obtenção das eletromicrografias no microscópio eletrônico de transmissão.

A Magna M. Soares, técnica do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, pela grande ajuda na confecção dos cortes histológicos.

As minhas queridas amigas do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, pelas inúmeras ajudas nas etapas do trabalho e pelos constantes momentos de descontração.

A todos os pesquisadores e alunos do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto, que sempre estiveram à disposição para ajudar.

Aos funcionários e funcionárias do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, sem os quais seria impossível realizar este trabalho.

Aos meus queridos pais, por apoiarem minhas decisões e me incentivarem, sempre com muito amor. Serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim.

A minha irmã, que mesmo distante fisicamente, sempre foi meu ponto de equilíbrio nas horas mais difíceis.

A algumas pessoas mais que especiais na minha vida, que são meu alicerce e minha motivação diária.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTox – CNPq/FAPESP), pelo auxílio financeiro.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## Lista de Abreviaturas

Bj = *Bothrops jararaca*

SAB = soro antitoxinico

dp = dia de prenhez

CTGs = células trofoblásticas gigantes

Fg = fibrinogênio plasmático

H&E = coloração pela hematoxilina e eosina



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 07-05-2009 10:58:29  
Página 1/2  
Id = 1012

São Paulo, 24 de Abril de 2009  
CEP 0130/09

Ilmo(s). Sr(a).  
Pesquisador(a) Karla Vanessa Ferreira  
Co-Investigadores: Dra Diva Denelle Spadacci-Morena;  
Disciplina/Departamento Histologia e Biologia Estrutural da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador Ausente

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado:  
**'ENVENENAMENTO EXPERIMENTAL POR Bothrops jararaca EM CAMUNDONGOS PRENHES: EFICÁCIA DO SORO ANTIBOTRÓPICO'**

CARACTERÍSTICA DO ESTUDO: Experimental, categoria B- estudo crônico

OBJETIVOS: Investigar o efeito do tratamento com soro antibotrópico, após envenenamento experimental por *Bothrops jararaca*, em camundongos prenhes. Serão avaliados: morfologia da decidua antimesometrial e a concentração de fibrinogênio dos camundongos no 9º dia de prenhez, e o estudo morfológico de fetos a pré-termo.

RESUMO: Estudo com 105 camundongos *Mus musculus*. Anestésico: xilazina e quetamina. Eutanásia: Câmara de CO<sub>2</sub>. Os animais serão acasalados e na manhã do 8º dia de prenhez os animais serão pesados e divididos em grupos: grupo BjV- os animais receberão uma única injeção intramuscular de 0,24 mg de veneno de Bj/Kg de peso do animal; grupo BjV + SAB - os animais receberão a dose de veneno de Bj e após 3 horas serão submetidos à soroterapia com soro antibotrópico; grupo Sal+ SAB- os animais receberão injeção intramuscular de solução salina estéril, e após 3 horas serão submetidos à soroterapia. Em todos os grupos, os animais serão pesados e sacrificados na manhã do 9º dp ou na manhã do 19ºdp. Após o sacrifício, os cornos uterinos serão removidos e dissecados para análise morfológica. Será colhida uma amostra de sangue para determinação de fibrinogênio. Será realizada análise esquelética nos fetos sob lupa estereoscópica.

FUNDAMENTAÇÃO RACIONAL: Os dados da literatura sugerem que o veneno de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* pode provocar sérias complicações durante a gestação e que a soroterapia é recomendada, mesmo quando o envenenamento é leve. Entretanto, o uso do soro antiofídico pode provocar choque anafilático, podendo levar a reações adversas, inclusive em mulheres gestantes.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos, apresentando carta de concordância do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

DETALHAMENTO FINANCEIRA: Sem financiamento externo - R\$ 992,51

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado

PRIMEIRO RELATÓRIO PREVISTO PARA: 29/04/2010, os demais relatórios deverão ser entregues ao CEP anualmente até o término do estudo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo



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

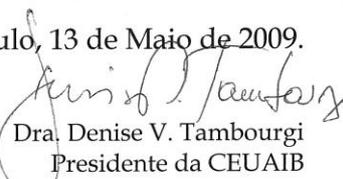
## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Envenenamento experimental por B. jararaca em camundongos prenhes: eficácia do soro antibotrópico" protocolo nº 322/06, sob a responsabilidade de Diva Denelle Spadacci, 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 08/08/2006.

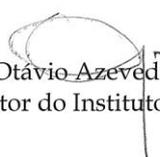
A CEUAIB aprovou, em reunião de 13/05/09, a alteração da vigência e do número total previsto de camundongos Swiss - fêmeas prenhes - de 75 para 117 (adicional de 42 animais), após análise do pedido com justificativa da responsável do projeto.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
08/2006 – 12/2009 Laboratório de Fisiopatologia	117/ camundongos Swiss fêmeas prenhes

São Paulo, 13 de Maio de 2009.

  
Dra. Denise V. Tambourgi  
Presidente da CEUAIB

De acordo:

  
Dr. Otávio Azevedo Mercadante  
Diretor do Instituto Butantan



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO BUTANTAN

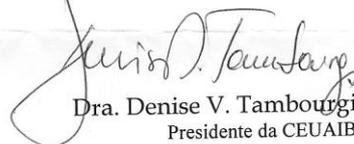
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil  
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

---

## CERTIFICADO

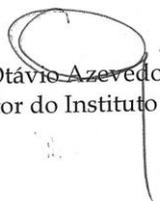
Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 322/06, sobre o projeto intitulado "Envenenamento experimental por *Bothrops jararaca* em camundongos prenhes: eficácia do soro antibotrópico", sob a responsabilidade de Diva Denelle Spadacci Morena está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 08/08/2006.

São Paulo, 09 de agosto de 2006.



Dra. Denise V. Tambourgi  
Presidente da CEUAIB

De acordo:



Dr. Otávio Azevedo Mercadante  
Diretor do Instituto Butantan

## Resumo

**Introdução:** Neste estudo foi avaliada a eficácia do soro antiofídico (SAB) em camundongos prenhes submetidos ao veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca* (Bj). Para tanto, o veneno foi administrado em camundongos no 7,5<sup>o</sup> dia de prenhez (dp), data importante, onde, de acordo com a literatura, alterações teratogênicas podem ocorrer. **Métodos:** Na manhã do 7,5<sup>o</sup>dp, um grupo de animais (VBj+SAB) recebeu, por via intramuscular, 0,24mg de veneno de Bj/kg de peso de animal e, após 3h foi tratado, por via endovenosa, com o SAB. Foram utilizados dois grupos controles onde os animais receberam salina estéril e foram submetidos ao soro, após 3h (Sal+SAB) e outro grupo onde os animais receberam o veneno de Bj e não foram tratados com soro (VBj). Após 24h dos tratamentos, foi avaliada a morfologia do útero (mais especificamente a interface materno-fetal, na região antimesometrial) e foi feita a avaliação hemostática (dosagem de fibrinogênio – Fg), em todos os animais pertencentes ao grupo VBj e parte dos animais pertencentes aos demais grupos. O restante dos animais pertencentes aos grupos VBj+SAB e Sal+SAB foram levados à pré-termo (18,5<sup>o</sup> dp), para avaliação externa e esquelética dos fetos, peso médio dos fetos, peso médio das mães e das placentas. **Resultados e Discussão:** Na manhã do 8,5<sup>o</sup>dp, o exame histológico da decídua antimesometrial dos animais do grupo VBj revelou a presença de áreas hemorrágicas, edema e proeminente infiltrado inflamatório, na interface materno-fetal. Ainda, nessa região, as células deciduais maduras (maternas) e as trofoblásticas gigantes (fetais) exibiam sinais evidentes de morte celular, confirmando a ação deletéria do veneno ofídico, no tecido uterino. Já a decídua antimesometrial dos animais pertencentes ao grupo VBj+SAB apresentou-se organizada à semelhança do grupo Sal+SAB. Assim, o SAB foi capaz de manter a morfologia do útero, na interface materno-fetal da região antimesometrial. Com relação à dosagem de fibrinogênio, o grupo VBj+SAB apresentou os níveis plasmáticos semelhantes ao grupo Sal+SAB, não havendo diferença significativa entre os grupos. Entretanto, os animais que receberam somente o veneno e não foram tratados com o soro (grupo VBj), apresentaram nível mais baixo de Fg havendo, entre esse grupo e os outros dois grupos estudados, diferença estatística significativa. Estes resultados mostraram que embora o veneno da Bj provoque consumo de Fg, o SAB foi capaz de restabelecer os níveis plasmáticos, o que deve contribuir para a manutenção da prenhez, uma vez que o Fg tem um papel crítico na manutenção da gestação. Entre os animais pertencentes aos grupos VBj+SAB e Sal+SAB que foram à pré-termo, não houve alteração do peso materno, ao longo da gestação, e também não ocorreu alteração do peso das placentas. Não houve também prevalência de regressão da prenhez entre os grupos. Entretanto, com relação ao peso médio dos fetos, houve uma redução do peso corpóreo no grupo controle, havendo diferença estatística significativa, quando comparado com o grupo VBj+SAB. Finalmente, não houve alteração externa ou esquelética, entre os grupos estudados. **Conclusão:** Os resultados acima relatados mostraram que o SAB foi capaz de preservar a prenhez, não provocando reações adversas nos animais e que é importante ser administrado, mesmo quando não são observados sinais de envenenamento materno.

**Palavras-Chave:** 1.Veneno de *B. jararaca*; 2.Soro antitoxinico; 3.Decidua antimesometrial; 4.Prenhez; 5.Camundongo

## Abstract

**Introduction:** Snakebite accidents are considered a rare event among pregnant women, but serotherapy is indicated even when envenomation is not severe. However, antivenom can cause maternal adverse reactions and consequently fetal death. Experimental *Bothrops jararaca* (Bj) envenomation can provoke marked morphological alterations in the antimesometrial (AM) region of uterus in pregnant mice which can culminate in the end of gestation. This investigation aimed to verify whether *Bothrops* antivenom (BAV) could restore the normal morphology of murine uterus, after Bj envenomation. **Methods:** On the morning of day 7,5 of pregnancy, animals received Bj venom (0.24mg Bj venom/kg body weight) i.m., and after 3 hours they were treated with BAV i.v. (VBj+BAV). Control groups received saline and was treated with BAV (Sal+BAV) or Bj venom (VBj). On day 8,5, uterine morphology was analyzed, especially at the maternal-fetal interface in the AM region. Plasma fibrinogen (Fg) was assayed in plasma samples of pregnant animals. Aiming to study the external appearance and the skeletal morphology of fetuses, as well as the incidence of fetal resorptions, another group of animals on day 7,5 received the same treatments mentioned and was sacrificed on day 18,5. **Results:** Histological analysis of most dams of the VBj group revealed the maternal and fetal tissues disorganized, showing hemorrhagic areas and a prominent inflammatory infiltrate at the maternal-fetal interface. Additionally, decidual cells (maternal) and trophoblastic giant cells (fetal) exhibited evident signs of necrosis. The antimesometrial decidua of most dams of the VBj+BAV revealed the maternal fetal tissues organized, similarly to the uteri of dams of the Sal+BAV group. Analyses of the external appearance and skeletal morphology of fetuses on day 18,5 showed no difference among groups; however, the dams that received Sal+BAV and were treated with ABS showed smaller fetuses than VBj+BAV group. Plasma Fg levels of the VBj+BAV group were similar to those of Sal+BAV group. However, experimental Bj envenomation showed lower plasma Fg levels. **Conclusion:** Our results indicated that the treatment with the antithrotophic serum was capable to maintain the development of the gestation, preserving the morphology in the maternal-fetal interface, in the animals.

**Keywords:** 1. *Bothrops jararaca* venom; 2. Antithrotophic serum; 3. Antimesometrial decidua; 4. Pregnancy; 5. Mouse

## I – Introdução

O gênero *Bothrops* é o maior representante da família Viperidae (subfamília Crotalinae) no nosso território, em número de espécies e subespécies (Hoge & Romano, 1972) e é responsável por cerca de 90% dos envenenamentos ocorridos no Brasil, correspondendo ao acidente ofídico de maior importância epidemiológica no país (Ministério da Saúde, 2001).

Em humanos e experimentalmente em animais, o envenenamento por serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*, induz hemorragia sistêmica e local (Rosenfeld, 1971; Ribeiro & Jorge, 1990; Cardoso *et al.*, 1993; Kamiguti & Sano-Martins, 1995), além de intensa reação no local da inoculação do veneno. Esses sintomas são devidos à presença de uma variedade de toxinas no veneno (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez & Lomonte, 1989; Ribeiro & Jorge, 1990; Farsky *et al.*, 1997).

As alterações na coagulação são devidas principalmente ao consumo dos fatores da coagulação. Já é bastante conhecido que o veneno botrópico possui a capacidade de ativar fatores da coagulação sangüínea atuando sobre o fibrinogênio, protrombina (Fator II), Fator X (Nahas *et al.*, 1964; Nahas *et al.*, 1979) e Fator VIII (Kirby *et al.*, 1979; Nishida *et al.*, 1994). Em 1936, von Klobusitzky & König isolaram uma serinoprotease (similar à trombina) do veneno da *Bothrops jararaca* que é capaz de consumir o fibrinogênio, provocando incoagulabilidade do sangue circulante.

Especificamente envolvendo o gênero *Bothrops*, relatos clínicos em mulheres grávidas revelaram que o veneno foi capaz de provocar aborto no início da gravidez (Otero *et al.*, 1992) e descolamento da placenta em fases mais tardias da gestação (Zugaib *et al.*, 1985; Otero *et al.*, 2002). Apesar da baixa frequência de acidentes ofídicos em mulheres grávidas, a grande quantidade de mortes fetais mostra que esse acidente tem importância médica relevante. Parrish & Khan (1966) afirmaram que as conseqüências sobre a gravidez são determinadas pela gravidade do envenenamento, o intervalo que antecede o tratamento, e o período da gestação em que a vítima se encontra.

Embora os efeitos do veneno de serpentes sobre a gestação não sejam completamente conhecidos, a exposição de mulheres grávidas a essas toxinas pode resultar em teratogênese, retardo no crescimento e mutação (Malz, 1967; Pantanowitz & Guidozi, 1996; Seneviratne *et al.*, 2002).

Assim como em humanos, a administração de veneno ofídico, experimentalmente em animais, causa frequentemente aborto ou reabsorção fetal, no início da prenhez (Penn *et al.*, 1971; Clavert & Gabriel-Robez, 1974; Mohamed & Nawar, 1975; Bauab *et al.*, 1997). Corroborando com estes estudos, Spadacci-Morena *et al.* (2006) mostraram que o veneno da *Bothrops jararaca*, quando administrado a camundongos no 8º dia de prenhez (dp), desencadeou, após 24h, reabsorção total ou parcial de fetos. Entretanto, entre aqueles animais nos quais ficou constatado que a gestação não foi interrompida pela ação do veneno, havia alguns animais que apresentavam alterações uterinas importantes, principalmente na interface materno-fetal, onde foram encontradas células decíduais e trofoblásticas em processo de necrose, e focos hemorrágicos com células típicas de processo inflamatório, que possivelmente poderiam comprometer o desenvolvimento geral do feto. Já no final da prenhez, o envenenamento pode antecipar o parto, dando origem a natimortos e animais com pouco tempo de sobrevivência (Bauab *et al.*, 1997), pode causar efeitos teratogênicos importantes, tais como anomalias esqueléticas, da face, cérebro e coração, além de fenda palatal (Clavert & Gabriel-Robez, 1974; Mohamed & Nawar, 1975; Simões *et al.*, 2008), comprometer o crescimento (Penn *et al.*, 1971; Ahmed *et al.*, 1974) ou mesmo provocar alterações nos diversos tecidos do feto (Ahmed *et al.*, 1974; Mohamed *et al.*, 1974; Nawar, 1980; El Hessy *et al.*, 1987). Spadacci-Morena (2005) mostrou que em camundongos prenhes submetidos a envenenamento leve (10% da DL<sub>50</sub>) por *B.jararaca* no 8ºdp, e levados à pré-termo (19ºdp), havia uma incidência, estatisticamente significativa (p=0,004) de reabsorção total de fetos em comparação com o grupo controle, ocorria reabsorção parcial de fetos, o que não foi observado no grupo controle, e, entre os fetos a pré-termo, havia uma tendência a comprometimento do crescimento dos mesmos.

A soroterapia é o tratamento mais efetivo na neutralização dos efeitos provocados pelos venenos ofídicos. No caso de acidentes por *Bothrops jararaca*,

Kamiguti *et al.* (1986) e Cardoso *et al.* (1993) mostraram que, após 12 horas do tratamento, o soro antiofídico foi capaz de restabelecer o nível plasmático de fibrinogênio, em pacientes que haviam sido acidentados por essa serpente e que apresentavam completo consumo de fibrinogênio.

Com relação a mulheres grávidas, estudos mostram que o veneno de serpentes pode provocar sérias complicações durante a gestação e que a soroterapia é recomendada, mesmo quando o envenenamento é leve, ou mesmo insuficiente para provocar sinais de envenenamento materno (James, 1985; McNally & Reitz, 1987). Entretanto, outros estudos mostram que o uso do soro antiofídico pode provocar choque anafilactóide (revisado em Fan, 2003), podendo levar a reações adversas, inclusive em mulheres gestantes, e nesse caso, resultar eventualmente em morte fetal (Entman & Moise, 1984).

Visando proporcionar um melhor entendimento dos efeitos resultantes após a soroterapia, tanto na mãe como no feto, além de possivelmente contribuir para uma abordagem terapêutica mais efetiva por ocasião do envenenamento em mulheres grávidas, nos propusemos a estudar o efeito da soroterapia, após envenenamento experimental por *Bothrops jararaca* em camundongos no 7,5<sup>o</sup>dp. No 8,5<sup>o</sup>dp, 24 horas após o envenenamento, foram estudadas as células decíduais antimesometriais maternas, as células trofoblásticas gigantes embrionárias, bem como a hemostasia do sangue materno e, no 18,5<sup>o</sup>dp, foi analisada a morfologia dos fetos que sobreviveram até esta etapa.

## II - Objetivo

Considerando o importante papel da soroterapia nos acidentes ofídicos, além dos trabalhos que divergem sobre o uso ou não do soro em mulheres grávidas, o objetivo geral do presente trabalho foi investigar o efeito do tratamento com soro antibotrópico, após envenenamento experimental por *Bothrops jararaca*, sobre o desenvolvimento da gestação em camundongos. Ainda, com base nas observações prévias de que o veneno botrópico induz, em camundongos prenhes, alterações morfológicas uterinas e hemostáticas importantes que podem culminar com a reabsorção fetal, os objetivos específicos, nos diferentes grupos estudados, foram:

- Avaliar a morfologia da decídua antimesometrial (mais especificamente das células decíduais maduras) e das células trofoblásticas gigantes, na interface materno-fetal, no 8,5<sup>o</sup>dp;
- Determinar a concentração de fibrinogênio plasmático materno, no 8,5<sup>o</sup>dp;
- Avaliar o efeito dos tratamentos sobre o peso materno, fetal e da placenta, de animais a pré-termo, isto é, no 18,5<sup>o</sup>dp;
- Avaliar a incidência de reabsorção fetal, nos animais no 18,5<sup>o</sup>dp, e
- Analisar a morfologia externa e esquelética de fetos a pré-termo.

### **III - Revisão da Literatura**

#### **1 – Ofidismo**

##### *1.1 – Biologia das Serpentes*

Apesar da existência de poucos registros fósseis, acredita-se que as serpentes surgiram no Período Cretáceo (há cerca de 135 milhões de anos). São relativamente recentes, principalmente se levarmos em conta que os primeiros répteis surgiram por volta de 315 milhões de anos, no Carbonífero (Melgarejo, 2009). Os répteis foram os primeiros vertebrados a conquistarem definitivamente o ambiente terrestre. Este fato ocorreu a partir do desenvolvimento do âmnio, um anexo embrionário que garantiu proteção ao embrião contra dessecação, choques mecânicos e aderência às paredes que o contém (Coborn, 1991; Franco, 2003).

As serpentes podem ter se originado de lagartos de vida subterrânea, que, como adaptação, tiveram o corpo extremamente alongado, redução das patas e olhos semi-atrofiados (Melgarejo, 2009). Além dessas adaptações, as especializações do crânio e do aparelho mandibular, assim como das glândulas salivares, permitiram a ingestão de presas inteiras e auxiliaram a digestão (Coborn, 1991).

Através da análise da morfologia craniana de um grande número de espécies de serpentes, Anthony (1955) chegou à conclusão que, desde muito cedo na evolução das serpentes, duas vias evolutivas se diferenciaram, de acordo com o tipo de dentição: uma proterodonte, que teria dado origem aos elapídeos, e outra opistodonte, originando os viperídeos. Do ponto de vista morfológico, além da forma extremamente alongada do corpo, da falta de membros locomotores e de possuírem escamas epidérmicas recobrando todo o corpo, as serpentes são caracterizadas pela ausência de pálpebras móveis e de ouvido externo (Melgarejo, 2009).

As serpentes são exclusivamente carnívoras, predando tanto vertebrados quanto invertebrados (Franco, 2003). Entre as diferentes espécies de serpentes, a alimentação é bastante variada, podendo ser composta por lesmas e outros moluscos gastrópodes, artrópodes, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos.

Em relação à estratégia de captura, existem desde espécies constritoras até envenenadoras (Melgarejo, 2009).

As serpentes habitam principalmente as regiões temperadas e tropicais, principalmente devido a sua dependência do calor externo para efetuar sua termorregulação. Assim como outros répteis, são animais ectotérmicos, diferentemente das aves e mamíferos que são endotérmicos. Atualmente, as serpentes se adaptaram para habitar diversos tipos de ambientes, com características muito distintas entre eles, como os ambientes terrestres, subterrâneos, arbóreos, águas continentais e oceânicas, com exceção das calotas polares, onde o frio excessivo impede a vida destes animais (Franco, 2003; Melgarejo, 2009).

O Brasil possui uma fauna riquíssima de serpentes e, apesar dos inúmeros estudos sobre o assunto, muitas espécies ainda são pouco estudadas ou mal conhecidas, embora essa situação venha se modificando nos últimos anos. Estima-se que essa fauna seja composta por cerca de 265 espécies, classificadas dentro de aproximadamente 73 gêneros, reunidos em 9 famílias (Hoge & Romano, 1978/79; Melgarejo, 2009). Destas famílias, apenas 2 (Família Elapidae e Família Viperidae) e 4 gêneros (*Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*) congregam as espécies consideradas peçonhentas, isto é, aquelas que produzem e armazenam toxinas em glândulas especializadas e possuem aparelhos apropriados para inoculá-las, resultando em intoxicações sérias no homem e em animais domésticos (Melgarejo, 2009).

A família Viperidae (sendo o gênero *Bothrops* o mais significativo) representa o grupo mais importante de serpentes para a saúde pública, pois são responsáveis pela grande maioria e pelos mais graves acidentes ofídicos registrados. Essa família é formada por serpentes com aparelho inoculador do tipo solenóglifo, podendo ser facilmente identificadas utilizando caracteres morfológicos externos, como a cabeça triangular recoberta por escamas pequenas e presença de fosseta loreal (Melgarejo, 2009).

Os viperídeos possuem um mecanismo de mordida muito eficiente. Os amplos movimentos dos ossos cranianos durante a mordida permitem a essas serpentes que suas presas, que permanecem paralelas ao crânio quando em

repouso, se tornem aptas para o ataque no momento do bote, graças a uma rotação da maxila em torno de sua articulação pré-frontal (Melgarejo, 2009).

Nos viperídeos, as glândulas de veneno localizam-se nos dois lados da cabeça, logo atrás dos olhos, na região temporal, diretamente abaixo da pele. O complexo mecanismo de transmissão do veneno da glândula para a presa permite aos viperídeos proezas como atacar e injetar o veneno em apenas 1/50 de segundo, ou abrir a boca apenas o ângulo suficiente para poder morder, conforme o tamanho da vítima (Kardong, 1975). Podem também regular voluntariamente a quantidade de veneno aplicada, desde uma mordida de advertência sem injeção até um ataque com descarga total de veneno da glândula (Melgarejo, 2009).

Dos acidentes ofídicos mais importantes provocados por viperídeos, a maioria é causada por serpentes do gênero *Bothrops*.

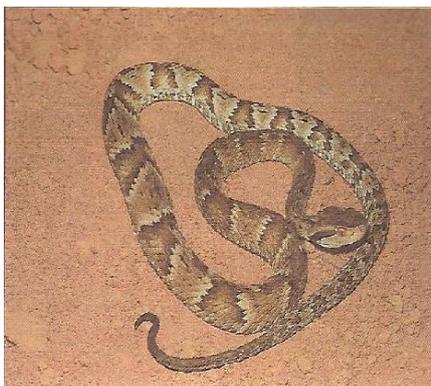
### 1.2– Serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*

As serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* compreendem cerca de 30 espécies e estão distribuídas por todo o território brasileiro (Pinho, 2001). É o maior representante da família Viperidae (subfamília Crotalinae) no nosso território, em número de espécies e subespécies (Hoge & Romano, 1972). Essas serpentes são caracterizadas por não possuírem modificações significativas na cauda, sendo formadas por escamas sub-caudais em pares (Melgarejo, 2009), não tem chocalho e as suas cores variam muito, dependendo da espécie e da região onde vivem (Pinho, 2001).

O gênero *Bothrops* possui algumas das espécies mais importantes do ponto de vista médico, já que correspondem a cerca de 90% dos 20 mil acidentes ofídicos anuais que o Brasil registra (Ministério da Saúde, 2001).

A *Bothrops jararaca* (Fig. 1), conhecida popularmente como jararaca, possui presas grandes, situadas anteriormente no maxilar superior, amplamente móveis, e providas de canal central por onde o veneno é conduzido. Possui aparelho inoculador do tipo solenóglifo, no qual as presas são móveis, permanecendo deitadas ao longo do maxilar superior, cobertas por uma bainha, podendo voltar-se para a frente no momento do bote (Jorge & Ribeiro, 1990).

Essa serpente possui um colorido bastante variável, apresentando desde tons castanhos claros até a coloração quase preta. É uma serpente bastante ágil, subindo facilmente em arbustos e telhados baixos, e de dieta variada, com a prevalência de sapos, quando jovens, e roedores, na fase adulta (Melgarejo, 2009).



**Fig. 1** – Serpente pertencente à espécie *Bothrops jararaca* (Fonte: Ministério da Saúde, 2001).

Esta espécie é a mais comum da Região Sudeste, habitando desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, sendo a principal causadora de acidentes nesta área geográfica (Fig. 2) (Melgarejo, 2009). Habitam zonas rurais e as periferias das grandes cidades, preferindo ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas, e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores. Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares (Cupo *et al.*, 1990; Ministério da Saúde, 2001).



**Fig. 2** – Distribuição da serpente *Bothrops jararaca* no Brasil (Fonte: Ministério da Saúde, 2001).

### 1.3– Venenos ofídicos

Os venenos de serpente geralmente são compostos por misturas complexas de componentes orgânicos, sendo formados por enzimas e polipeptídeos farmacologicamente ativos (Iwanaga & Suzuki, 1979; Bjarnason & Fox, 1988/89); e inorgânicos, como Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co e Zn (Friederich & Tu, 1971). Os venenos contêm mais de 90% do seu peso seco em proteínas. As frações não-proteicas, muito inferiores à protéica, são formadas por carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos livres e metais (Warrel, 1989).

Os venenos podem conter uma mistura das atividades neurotóxica, cardiotoxica, miolítica, coagulante, anticoagulante, hemostática e hemorrágica (Chippaux *et al.*, 1991), principalmente para imobilizar e ingerir suas presas, e também como mecanismo de defesa contra predadores (Mackessy, 1988; Hider *et al.*, 1991).

A composição dos venenos pode variar entre as famílias, gêneros e espécies ou até mesmo dentro de uma mesma espécie, devendo ser consideradas as variações individuais como a idade do animal, a sazonalidade, dieta, habitat, região geográfica e variabilidade genética (Chippaux *et al.*, 1991; Furtado *et al.*, 1991). Essas variações entre os constituintes e a quantidade destes no veneno podem ter sido influenciados por fatores biológicos, geográficos e sazonais, sendo importante para a pesquisa científica, além de auxiliar na elaboração de *pools* de veneno para a produção de soro antiofídico (Raw *et al.*, 1991).

### 1.4– Venenos de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*

Os venenos das serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* possuem três ações básicas: inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica.

A atividade inflamatória aguda é causada por um conjunto de frações do veneno, como aminas biogênicas pré-formadas do tipo histamina, fosfolipase A2, esterases, proteases, calicreínas, cininogenases e lectinas. Essas frações geralmente têm atividade indireta, induzindo a liberação de bradicinina,

prostaglandinas, leucotrienos e prostaciclina que atuam de maneira complexa (França & Málaque, 2009).

A atividade coagulante decorre da capacidade do veneno botrópico em ativar alguns fatores da coagulação sanguínea, resultando no consumo de fibrinogênio e na formação de fibrina intravascular, resultando em incoagulabilidade sanguínea. As substâncias presentes no veneno que apresentam essa característica são capazes de ativar o fibrinogênio, a protrombina e o fator X (Nahas *et al.*, 1964; Nahas *et al.*, 1979).

Já a atividade hemorrágica ocorre devido à ação de metaloproteinases denominadas hemorraginas. Esse componente do veneno apresenta a capacidade de romper a integridade do endotélio vascular, degradar vários componentes da matriz extracelular e também é um potente inibidor da agregação plaquetária (Lomonte, 1994), resultando em hemorragia.

Essas três atividades do veneno podem variar sua intensidade de acordo com a idade do animal (Furtado, 1987), com a distribuição geográfica das espécies (Daltry, 1996), e com o caráter individual das espécies (Furtado, 1987; Kamiguti, 1988; Kamiguti & Cardoso, 1989; Kamiguti *et al.*, 1994; Daltry, 1996).

Além das atividades básicas dos venenos botrópicos (inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica), foram encontradas frações específicas para algumas espécies, como a miotoxina na *B.jararacussu*, *B.moojeni* e *B.neuwiedi* (Homsibradeburgo *et al.*, 1988; Soares *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2000); e a fração anticoagulante, inibidora da ativação do fator X e da trombina, em *B.taeniatus* (Kamiguti *et al.*, 1985).

### 1.5– Epidemiologia dos acidentes por serpentes

Existem, no mundo, cerca de 3 mil espécies de serpentes, sendo que 410 são consideradas peçonhentas. A Organização Mundial de Saúde calcula que ocorra no mundo uma taxa de letalidade de 2,3% (Chippaux & Goyffon, 1998).

No Brasil, os acidentes por animais peçonhentos constituem um grave problema de saúde desde os mais remotos tempos (Bochner, 2003). A famosa carta datada de 31 de maio de 1569, escrita por José de Anchieta, em São Vicente, ao seu superior Padre Diego Laynes, em Roma, relata acidentes

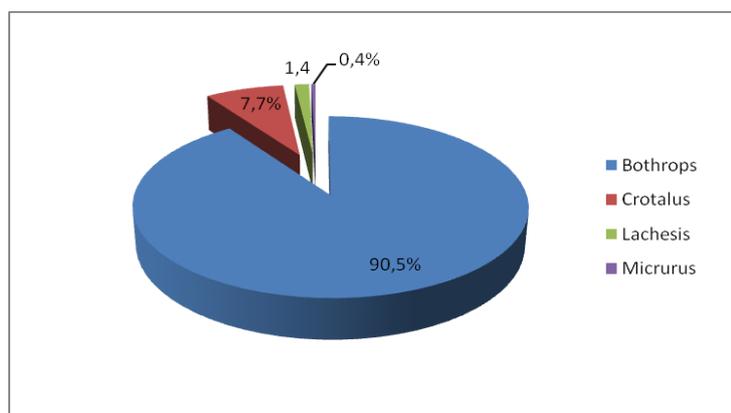
causados pelos diversos gêneros de serpentes venenosas existentes no Brasil, como a jararaca, a cascavel e a coral (Cardoso, 2003).

O primeiro estudo epidemiológico de acidentes ofídicos foi realizado por Vital Brazil em 1901, quando levantou o número de óbitos por picadas de serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo (Brazil, 1901). Em 14 de agosto de 1901, Vital Brazil entregou os primeiros tubos de soros anti-peçonhentos para o consumo (Vaz, 1950), e a partir de então passou a distribuir juntamente com as ampolas de soro, o *Boletim para Observação de Accidente Ophidico*, para ser preenchido com dados referentes ao acidente que levou ao uso deste antiveneno (Bochner & Struchiner, 2003).

Os acidentes ofídicos são considerados um grave problema de saúde pública nos países tropicais devido à frequência com que ocorrem e pelo grande índice de mortalidade que ocasionam (Pinho, 2001).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (2001), ocorrem entre 19 a 22 mil acidentes ofídicos por ano. Grande parte destes acidentes é devido a picadas de serpentes pertencentes aos gêneros *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, e outros) e *Crotalus* (cascavel), sendo raros os produzidos por *Lachesis* (surucucu, surucutinga) e *Micrurus* (coral).

Geralmente, quando o gênero da serpente é informado, *Bothrops* é responsável por 90,5% dos casos, *Crotalus* por 7,7%, *Lachesis* por 1,4% e *Micrurus* por 0,4% (Fig. 3). A letalidade geral foi de 0,45%, sendo maior nos acidentes crotálicos (1,87%) (Ministério da Saúde, 2001).



**Fig. 3** – Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente peçonhenta (Fonte: Ministério da Saúde, 2001).

A epidemiologia dos acidentes ofídicos se mantém inalterada ao longo dos últimos 100 anos no Brasil. Assim, os acidentes ocorrem com maior frequência no início e no final do ano, em pessoas do sexo masculino, em trabalhadores rurais, na faixa etária produtiva de 15 a 49 anos; atingem, sobretudo, os membros inferiores e a maioria desses acidentes é atribuída ao gênero *Bothrops* (Bochner & Struchiner, 2003). Segundo Azevedo-Marques *et al.* (1992), 85% das notificações de acidentes ofídicos feitas ao Ministério da Saúde, referem-se ao gênero *Bothrops* e somente 10% ao gênero *Crotalus*, para as regiões norte e centro do Estado de São Paulo.

Hoje em dia, os acidentes por animais peçonhentos continuam a constituir um sério problema de saúde pública no Brasil, tanto pelo número de casos registrados (em média 20 mil casos de acidentes com serpentes ao ano) quanto pela gravidade apresentada, podendo conduzir à morte ou a sequelas capazes de gerar incapacidade temporária ou definitiva para o trabalho e para as atividades habituais de lazer (Bochner, 2003).

#### *1.6– Fisiopatologia do envenenamento por Bothrops*

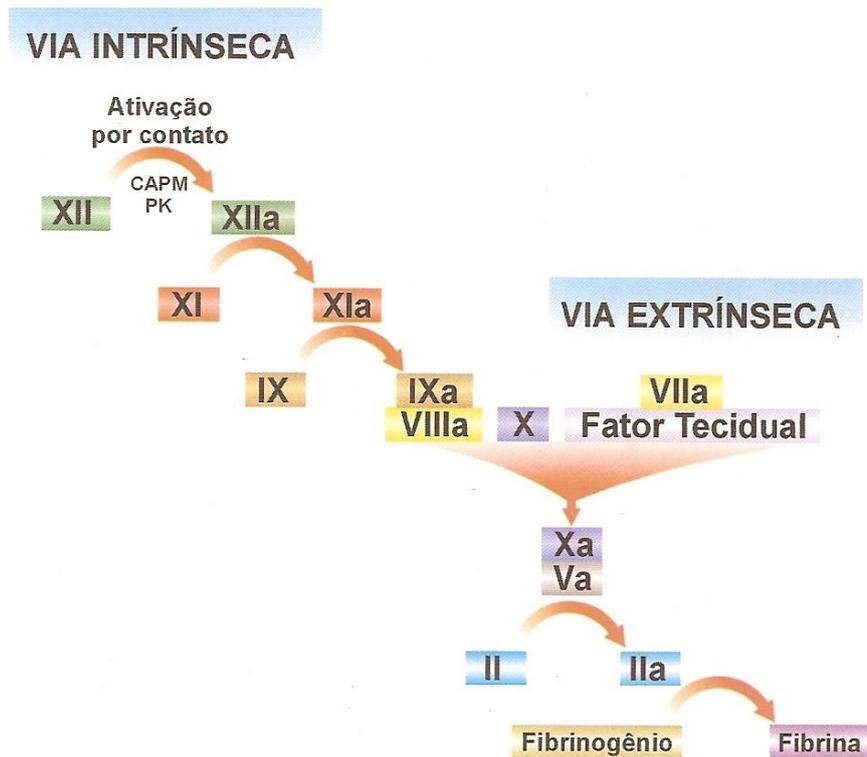
O quadro clínico que o acidente por envenenamento botrópico provoca é caracterizado pela presença de manifestações clínicas locais e sistêmicas (Ministério da Saúde, 2001). As manifestações clínicas locais predominantes causadas pelo envenenamento botrópico são: dor, edema, equimose, hemorragia e necrose que podem levar à amputação do membro acometido (Ribeiro & Jorge, 1990; Ministério da Saúde, 2001; Pinho, 2001; Castro, 2006). Dentre as manifestações sistêmicas, é possível citar: alteração na coagulação sangüínea, sangramento, choque e insuficiência renal (Rosenfeld, 1971; Ribeiro & Jorge, 1990; Kamiguti & Sano-Martins, 1995), sendo que esses distúrbios são proporcionais à quantidade de veneno inoculado e, através deles, é possível determinar a gravidade do envenenamento (Filho, 1997). Em gestantes, há risco de hemorragia uterina (Rosenfeld, 1971; Cardoso, 1990; França & Fan, 1992; Ministério da Saúde, 2001).

Baseado nos critérios fornecidos pelo Ministério da Saúde (2001), a gravidade do envenenamento botrópico pode ser classificada em:

- Leve: edema local discreto ou ausente, podendo haver hemorragia no local da picada; o tempo de coagulação pode estar normal ou alterado.
- Moderado: edema local evidente e hemorragia local ou sistêmica; o tempo de coagulação pode estar normal ou alterado.
- Grave: edema local e extensivo para todo o membro acometido, hemorragia local ou sistêmica e tempo de coagulação alterado.

Resumidamente, o veneno botrópico apresenta três atividades fisiopatológicas: proteolítica, hemorrágica e coagulante (Amaral *et al.*, 1986; Jorge & Ribeiro, 1990; Ministério da Saúde, 2001). A atividade proteolítica decorre da ação citotóxica direta nos tecidos por frações proteolíticas do veneno (jararagina e outras metaloproteinases, fosfolipases)(Bonfim *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2002; Castro, 2006). O veneno de serpentes do gênero *Bothrops* pode causar hemorragia local ou sistêmica em nível dos pulmões, cérebro e rins (Rosenfeld, 1971; Amaral *et al.*, 1987). A ação vasculotóxica é causada por fatores hemorrágicos denominados hemorraginas. Estas agem sobre vasos capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e causando posteriormente sua ruptura (Ohsaka, 1979; Ownby, 1982). A atividade coagulante é do tipo trombina. Através dela, o veneno pode transformar diretamente fibrinogênio em fibrina. A fração do veneno botrópico, que possui ação coagulante do tipo trombina, ativa a cascata de coagulação de maneira diferente da trombina fisiológica, não sendo neutralizada pela heparina (Nahas *et al.*, 1964; Nahas *et al.*, 1979).

Já é bastante conhecido que o veneno botrópico possui a capacidade de ativar fatores da coagulação sangüínea atuando sobre o fibrinogênio, protrombina (Fator II), Fator X (Nahas *et al.*, 1964; Nahas *et al.*, 1979), Fator VIII e plaquetas (Kirby *et al.*, 1979; Nishida *et al.*, 1994). Em 1936, pela primeira vez, Von Klobusitzky & Konig (1936) isolaram uma serinoprotease, com ação tipo trombina, do veneno da *Bothrops jararaca*. Essa serinoprotease, similar a trombina, atua diretamente sobre o fibrinogênio, clivando a região N-terminal da cadeia A $\alpha$  do fibrinogênio (Hessel & Blomback, 1971), liberando fibrinopeptídeo A e transformando o fibrinogênio em fibrina. Dessa forma, o fibrinogênio é consumido, provocando incoagulabilidade do sangue circulante (Fig. 4).



**Fig. 4** – Cascata da coagulação sangüínea onde estão representadas as vias extrínseca e intrínseca e a convergência das duas vias para a via comum (ativação do fator X), formando o complexo protrombinase (fatores Xa, Va). Os fatores da coagulação sangüínea estão representados por algarismos romanos e acompanhados da letra **a**, quando ativados (ZAGO *et al.*, 2001).

### 1.7– Acidentes provocados por serpentes, em mulheres grávidas

O acidente provocado por serpentes, em mulheres grávidas, é considerado um evento raro e as conseqüências sobre a vítima ainda são pouco conhecidas (Dunnihoo *et al.*, 1992; Pantanowitz & Guidozi, 1996; Duru *et al.*, 2008). Na África do Sul, as mulheres grávidas representam 0,4% dos casos de envenenamento por picadas de serpentes (McNally & Reitz, 1987), enquanto que na Índia, elas representam 1% dos casos (Bhat, 1974). Na América do Sul, a literatura mostra poucos relatos clínicos envolvendo mulheres grávidas acidentadas por serpentes. Entretanto, na maioria desses acidentes, as serpentes envolvidas eram pertencentes ao gênero *Bothrops* (Zugaib *et al.*, 1985; Otero *et al.*, 1992; 2002) e esses acidentes foram capazes de provocar aborto no início da gravidez (Otero *et al.*, 1992) e descolamento da placenta, nas fases mais tardias da gestação (Zugaib *et al.*, 1985; Otero *et al.*, 2002). Especificamente no Brasil, a literatura mostra alguns poucos relatos onde mulheres grávidas foram

acidentadas por serpentes. Pardal *et al.* (1997) fizeram um levantamento do número de acidentados por serpentes de janeiro de 1989 a maio de 1994, que foram atendidos em um Hospital Universitário, na cidade de Belém (PA). Dentre esses acidentados (157), 8 eram mulheres grávidas, sendo que 6 delas estavam no primeiro trimestre da gravidez e 2, no segundo trimestre. Dessas pacientes, 3 tiveram complicações obstétricas e apenas uma, com 20 semanas de gestação, apresentou manifestações severas que culminaram com a morte fetal. Em todos estes relatos, os autores não fizeram referência às espécies de serpentes envolvidas nos acidentes. Envolvendo especificamente a serpente *Bothrops jararaca*, a literatura apresenta apenas um caso, no qual a acidentada se encontrava na 32<sup>o</sup> semana de gestação, foi submetida à soroterapia após 6 horas do acidente, entretanto houve descolamento da placenta e, conseqüentemente, morte fetal (Zugaib *et al.*, 1985). Esses relatos mostram que, apesar da baixa freqüência dos acidentes entre essas mulheres, existem mortes fetais, indicando que estes acidentes têm importância médica relevante (Seneviratne *et al.*, 2002; Langley, 2010).

Nos casos onde mulheres grávidas são acidentadas por serpentes, Parrish & Khan (1966) afirmaram que as conseqüências sobre a gravidez são determinadas pela gravidade do envenenamento, pelo intervalo antes do tratamento e o período da gestação em que a vítima se encontra. Identificar o animal causador do acidente é um procedimento importante, pois facilita a dispensa de pacientes picados por serpentes não peçonhentas, viabiliza o reconhecimento das espécies de importância médica da região e auxilia na indicação mais precisa do antiveneno a ser administrado (Ministério da Saúde, 2001). É importante também salientar, que as características particulares do veneno das diferentes espécies de serpentes, também devem interferir no desfecho da gestação. Assim, nos envenenamentos onde ocorre o consumo de fibrinogênio, como no acidente botrópico (Kamiguti *et al.*, 1986; Maruyama *et al.*, 1990; Kamiguti *et al.*, 1992; Cardoso *et al.*, 1993), pode ocorrer aborto (Zugaib *et al.*, 1985; Otero *et al.*, 1992; 2002), pois o fibrinogênio tem um papel crítico na manutenção da gravidez (Inamoto & Terao, 1985; Kobayashi *et al.*, 1996; Inbal & Muszbek, 2003).

O efeito do envenenamento ofídico sobre o feto é determinado pelo período de desenvolvimento em que este se encontra. Os relatos clínicos mostram que acidentes no início da gravidez levam a um prognóstico desfavorável para o feto (Parrish & Khan, 1966; Malz, 1967; Dunnihoo *et al.*, 1992; Langley, 2010), especialmente quando há um envenenamento sistêmico no primeiro trimestre (Seneviratne *et al.*, 2002). Em muitos casos em que a mulher sofre aborto logo após o acidente, foi sugerido que alguns mecanismos tais como anóxia associada ao choque após o envenenamento, sangramento da placenta e parede uterina, e contração uterina, seriam responsáveis pelo aborto (Parrish & Khan, 1966; Langley, 2010). Seneviratne *et al.* (2002) relataram que aproximadamente 30% das mães que foram picadas por serpentes, tiveram um aborto espontâneo. James (1985) relatou efeitos adversos no feto mesmo na ausência de sinais de envenenamento sistêmico na mãe. Entretanto, não se sabe ao certo se o veneno atua de forma direta ou indireta sobre o feto; os efeitos diretos podem ser atribuídos ao veneno que afeta os receptores cito-adesivos, como as integrinas, expressas na superfície celular, que são necessárias para a interação célula-célula, sinalização e adesão celular, todos necessários para o desenvolvimento normal embrionário e fetal (Pantanowitz & Guidozzi, 1996).

Seneviratne *et al.* (2002) descreveram um caso clínico de picada de serpente em mulher grávida, que resultou em malformações no feto, como hidrocefalia e polidactilia. Malz (1967) relatou outro caso no qual uma criança nasceu com malformações múltiplas devido ao acidente provocado por serpente e morreu poucos dias depois do nascimento.

### *1.8– Envenenamento ofídico experimental, em animais prenhes*

A administração de veneno ofídico, experimentalmente em diferentes animais, causa frequentemente aborto ou reabsorção fetal, no início da prenhez (Penn *et al.*, 1971; Clavert & Gabriel Robez, 1974; Mohamed & Nawar, 1975; Bauab *et al.*, 1997; Spadacci-Morena *et al.*, 2006). Mohamed e cols. (1974) observaram que, após envenenamento experimental por *Naja nigricolis* em camundongos prenhes em diferentes estágios da gestação, o veneno também pareceu ser mais deletério no início da prenhez.

Por outro lado, no final da prenhez, o envenenamento pode antecipar o parto, dando origem a natimortos e a animais com pouco tempo de sobrevivência (Bauab *et al.*, 1997). Nesta fase, o envenenamento ainda pode causar efeitos teratogênicos importantes tais como anomalias esqueléticas, da face, cérebro e coração, além de fenda palatal (Clavert & Gabriel-Robez, 1974; Mohamed & Nawar, 1975; Simões *et al.* 2008), comprometer o crescimento (Penn *et al.*, 1971; Ahmed *et al.*, 1974) ou mesmo provocar alterações nos diversos tecidos do feto (Ahmed *et al.*, 1974; Mohamed *et al.*, 1974; Nawar, 1980; El Hassy *et al.*, 1987).

Corroborando para estes estudos, recentemente, Spadacci-Morena *et al.* (2006) mostraram que o veneno da *Bothrops jararaca*, quando administrado a camundongos no 8º dia de prenhez (rolha = dia 1) desencadeou, após 24h, diminuição na concentração plasmática de fibrinogênio e reabsorção total ou parcial de fetos. Entretanto, entre aqueles animais nos quais ficou constatada que a gestação não foi interrompida pela ação do veneno, havia alguns animais que apresentavam no útero, mais especificamente na interface materno-fetal, células deciduais e trofoblásticas em processo de necrose e focos hemorrágicos com células típicas de processo inflamatório, que possivelmente poderiam comprometer o desenvolvimento geral do feto. Quando estes animais foram levados à pré-terme (19º dia de prenhez), Spadacci-Morena (2005) observou que o veneno de *Bothrops jararaca* não foi capaz de provocar malformação externa ou esquelética nos fetos. Porém, quando comparados aos animais que não receberam o veneno, foram observados, dentro da mesma ninhada, animais menores ao lado de outros com tamanho equivalente para o período de desenvolvimento analisado. Entretanto, tanto no grupo que recebeu o veneno, como naquele que não recebeu, os centros de ossificação estavam presentes e completos.

## **2 – Soroterapia**

O temor e a curiosidade sobre o envenenamento ofídico e a necessidade de um tratamento para este, é bastante antiga no mundo. No Brasil, durante o

período colonial, o ofidismo era responsável por um grande número de óbitos, sendo uma das grandes pragas existentes na época (Wen, 2009). Nesse período, o tratamento para esses envenenamentos, era constituído por receitas caseiras, como o uso de ervas, rituais e manipulações utilizadas pela população para tentar neutralizar os efeitos do veneno (Santos-Filho, 1991).

Com o desenvolvimento da Microbiologia e Imunologia, entre os séculos XIX e XX, descobriu-se que utilizando os próprios organismos infectados, poderia se obter um alto grau de resistência aos agentes biológicos de certas doenças (Camargo, 1984; Wen, 2009). Além disso, foi observado que o sangue dos animais imunizados continha anticorpos, que além de destruir o organismo invasor, também apresentavam poder profilático, quando injetado no indivíduo doente (Wen, 2009). Essas observações foram válidas também para casos de envenenamento ofídico, onde um animal poderia ser protegido contra o envenenamento, se recebesse o soro de outros animais que haviam sido previamente imunizados com o veneno (Calmette, 1894; Phisalix & Bertrand, 1894).

A descoberta da soroterapia ocorreu em 1894, na França, por dois grupos de pesquisadores e institutos de pesquisa parisienses. De um lado Césaire Auguste Phisalix e Gabriel Bertrand, do Museu Nacional de História Natural, e do outro, Albert Calmette, do Instituto Pasteur (Bochner, 2003), sendo este último, o primeiro a utilizar antiveneno no tratamento de pacientes picados por serpentes (Wen, 2009).

A produção de soro antiofídico no Brasil começou em 1901, mesma época em que Vital Brazil publicou o *“Boletim para Observação de Acidente Ophidico”*, que era sempre enviado juntamente com as ampolas de soro, para serem preenchidos nos casos de acidentes ofídicos e, posteriormente, tratados com o antiveneno. Atualmente, as análises epidemiológicas ainda são baseadas nas variáveis descritas neste boletim, como o sexo e a idade da vítima, local da picada, gênero da serpente e evolução do envenenamento (Bochner, 2003).

Assim, a introdução da soroterapia no tratamento de acidentes por picadas de serpentes foi principalmente devida aos cientistas Albert Calmette e Vital Brazil (Vital Brazil, 1987).

A discussão sobre a especificidade dos soros deixou o Brasil em evidência, pois por um lado, Albert Calmette atribuía ao soro uma eficácia não específica, afirmando que este protegia o indivíduo contra todos os tipos de veneno. Por outro lado, Vital Brazil atribuía uma especificidade dos soros antiofídicos, de acordo com a serpente utilizada para sua produção (Vital Brazil, 1987; Bochner, 2003).

Apesar da tradição do Brasil na produção de soro antiofídico, somente em junho de 1986, devido à ocorrência da crise na produção de soro no país, que culminou com a morte de uma criança, foi implantado o Programa Nacional de Ofidismo. Assim, os acidentes ofídicos passariam a ser de notificação obrigatória no país (Cardoso *et al.*, 1993).

A soroterapia é o tratamento específico mais efetivo na neutralização da ação sistêmica de toxinas presentes no veneno de serpente e o tempo decorrido entre o acidente e a administração do soro é um fator importante para um prognóstico favorável do acidente (Warrell, 1996; Ministério da Saúde, 2001). No caso de picadas de viperídeos, o antiveneno deve ter a habilidade de reverter a coagulopatia, hemorragia, choque hipotensivo, e outros sinais de envenenamento sistêmico induzidos pelo veneno (Calvete, 2010).

Os antivenenos utilizados atualmente para o tratamento de envenenamentos por animais venenosos são anticorpos policlonais produzidos em cavalos, após imunização específica, seguido por fracionamento do plasma sanguíneo, tratado com pepsina, com sulfato de amônio (Raw *et al.*, 1991).

Os antivenenos podem ser monovalentes, produzidos pela imunização de um animal com um veneno de serpente, e contêm anticorpos específicos contra aquele veneno particular (Viravan *et al.*, 1986), ou polivalentes, que contêm anticorpos específicos capazes de neutralizar os venenos usados na imunização (Raweerith & Ratanabanangkoon, 2005).

Segundo estudos realizados por Raweerith & Ratanabanangkoon (2005), os antivenenos polivalentes podem ser preparados com potência semelhante ou comparável aos dos antivenenos monovalentes. Além disso, as reações adversas causadas pelos dois tipos de antivenenos podem ser similares, já que o conteúdo de proteínas no soro é semelhante e pode ser reduzido por bons processos de fabricação.

Kocholaty *et al.* (1968) testaram, experimentalmente, diferentes vias de administração demonstrando que as vias intravenosa e intraperitoneal propiciavam procedimentos adequados e reprodutíveis para o doseamento de antivenenos. Observaram, inclusive, que a via de inoculação teria importância decisiva na demonstração do efeito protetor na interação veneno-antiveneno, que por sua vez variaria de acordo com o tipo de veneno. De acordo com o Ministério da Saúde (2001), o tratamento específico dos pacientes acidentados por serpentes do gênero *Bothrops* consiste na administração, o mais precocemente possível, do antiveneno botrópico, por via endovenosa, pois, segundo Rosenfeld (1971), é preciso que o veneno seja neutralizado pelo antiveneno antes que tenha tempo de provocar lesões nas células e tecidos. Na falta deste, administra-se o antiveneno antibotrópico-crotálico ou antibotrópico-laquétrico, todos eles soros heterólogos, em ambiente hospitalar (Ministério da Saúde, 2001). A administração do soro por via endovenosa é a que propicia a neutralização do veneno em menor tempo, ou seja, maior velocidade de distribuição e biodisponibilidade do antiveneno (Wen, 2009).

É importante que se conheça o gênero a que pertence a serpente, para que se possa tomar medidas terapêuticas fundamentais em caso de acidente, visto que as manifestações apresentadas pelo acidentado são características de cada gênero, com relativamente poucas diferenças entre as espécies (Jorge & Ribeiro, 1990). Os soros heterólogos são concentrações de imunoglobulinas obtidos através da sensibilização de vários animais, sendo os mais utilizados os de origem equina. Porém, devido ao alto custo da produção de antivenenos em cavalos para alguns países, está sendo testado um modelo animal alternativo, como cabras e ovelhas, para a produção de antiveneno seguro e com custo mais baixo (Araújo *et al.*, 2010). No Brasil, os soros heterólogos são produzidos em apresentação líquida, ampolada, devendo ser conservados em geladeira, em temperatura de 2 a 8°C, com validade, em geral, de dois a três anos. A dose utilizada deve ser a mesma para adultos e crianças, visto que o objetivo do tratamento é neutralizar a maior quantidade possível de veneno inoculado, independentemente do peso do paciente. A sua aplicação deve ser preferencialmente realizada em postos de atendimento médico, e a dose total do soro deve ser infundida entre 20 e 30 minutos, sob estrita vigilância médica e de

enfermagem. O paciente deve ser mantido sob vigilância rigorosa durante e, no mínimo, por duas horas após a infusão do soro, pois neste período há maior possibilidade de aparecimento de reações precoces adversas ao soro. É recomendável que o paciente, após a soroterapia, permaneça em observação por 24 horas, para detecção de outras possíveis reações (Cupo *et al.*, 1991; Ministério da Saúde, 2001).

A quantidade de antiveneno administrada depende da gravidade do acidente, e deve ser suficiente para neutralizar o veneno e reverter qualquer sinal e sintoma de envenenamento (Pantanowitz & Guidozi, 1996). Otero-Patiño *et al.* (1998) sugerem que a dose de antiveneno deve ser baseada: (1) na quantidade máxima de veneno no tecido da vítima; (2) na observação clínica que essas doses poderiam prevenir ou melhorar o dano tecidual local; e (3) nos resultados de estudos experimentais em animais sobre a neutralização de efeitos letais do veneno. Preconiza-se a administração de 2 a 4 ampolas de soro nos casos leves, 4 a 8 ampolas nos casos moderados e 12 ampolas nos pacientes graves. O tratamento geral consiste em medidas de suporte para tratamento das alterações locais, como: limpar o local da picada com água e sabão, manter elevado e estendido o segmento picado, administração de analgésicos para aliviar a dor, hidratação e antibioticoterapia, no caso de infecção. Especificamente nos acidentes envolvendo serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*, a utilização do antiveneno botrópico, quando administrado logo após o acidente, é eficaz na neutralização dos efeitos sistêmicos, porém sua utilização não previne totalmente a ocorrência de complicações locais, tais como edema, mionecrose e ocorrência de áreas hemorrágicas, mesmo quando a terapia é iniciada rapidamente após o acidente (Eichbaun, 1947; Rosenfeld, 1971; Gutiérrez *et al.*, 1981; 1986b; Cardoso *et al.*, 1993; Domingos *et al.*, 1994; Jorge *et al.*, 1995). Segundo Rosenfeld (1971), o soro neutraliza seguramente o veneno, porém não regenera as células e tecidos lesados; ele previne as lesões, porém não as cura.

A pobre proteção do soro antibotrópico nas ações locais do veneno de *Bothrops jararaca* foi sugerida resultar de: (1) falta de anticorpos contra toxinas de baixo peso molecular que agem localmente, do antiveneno equino; (2) uma incapacidade do antiveneno de neutralizar os efeitos de substâncias endógenas

liberadas localmente pelo veneno; e (3) inabilidade dos anticorpos do antiveneno de *Bothrops jararaca* alcançarem a área afetada (Gutiérrez *et al.*, 1998).

Nos envenenamentos por serpentes cujo veneno apresenta algum tipo de atividade coagulante (Ex: *Bothrops jararaca*), o distúrbio da coagulação é utilizado como parâmetro para avaliação da eficácia da soroterapia (Wen, 2009). No Brasil, é indicado que a recuperação dos parâmetros da coagulação deva ocorrer em até 24h após a soroterapia. Se, após esse período, persistir a completa incoagulabilidade sanguínea, recomenda-se o emprego de dose adicional de antiveneno, sendo, em geral, igual ou menor àquela administrada inicialmente (Wen, 2009).

Devido à soroterapia heteróloga, tanto a reação anafilática quanto a anafilactóide podem ocorrer igualmente, porém algumas evidências sugerem que a maioria das reações adversas ao antiveneno seja de natureza anafilactóide. A expressão “reação anafilactóide” é utilizada para descrever um quadro clinicamente indistinguível da reação anafilática, porém a primeira não requer exposição prévia à substância alergênica e envolve outros mediadores que não a histamina, sendo provavelmente devido à ativação do sistema complemento (Wen, 2009).

Antigamente, eram frequentes as reações adversas provocadas pelos antivenenos no Brasil, provavelmente devido ao rudimentar processo de purificação do antiveneno que, na sua forma final, estaria contaminado com a albumina presente no soro equino (Wen, 2009).

As reações precoces podem ocorrer em indivíduos previamente sensibilizados ou não. Trata-se de um evento não previsível e cujo controle depende da detecção precoce da manifestação alérgica e de drogas para o tratamento imediato das reações (Dart & McNally, 2001; Wen, 2009). Para Caron *et al.* (2009), essas reações poderiam ser tratadas pela interrupção da infusão do antiveneno e a imediata administração de adrenalina, esteróides, e anti-histamínico e, uma vez tratada a reação, o tratamento com o antiveneno seria restabelecido.

As reações tardias são bem menos frequentes que as reações precoces, sendo comumente denominada como doença do soro (Wen, 2009). Esta é uma síndrome clínica que envolve febre, erupções cutâneas difusas, urticária intensa,

artralgia (dor nas articulações), hematúria, e sintomas inespecíficos que persistem por muitos dias (Dart & McNally, 2001).

Atualmente, os antivenenos consistem de imunoglobulinas purificadas ou fragmentos de anticorpos  $F(ab')_2$  e Fab. Assim, a incidência e a severidade das reações adversas associadas à administração do antiveneno heterólogo, reduziram drasticamente (Gutiérrez *et al.*, 2009).

### 2.1– Soroterapia em mulheres grávidas

Na literatura, os relatos clínicos são muito limitados, quando se trata de mulheres grávidas que foram submetidas ao tratamento com soro antiofídico (Duru *et al.*, 2008). Assim como nos demais casos envolvendo acidente ofídico, o tratamento aplicado nessas mulheres deve ser o mesmo, sendo este tratamento a melhor chance de sobrevivência tanto da mãe como do feto (Nasu *et al.*, 2004). Entretanto, tanto a reação anafilactóide, que é uma complicação já conhecida da soroterapia, assim como seu tratamento com adrenalina, pode comprometer a circulação placentária (Entman & Moise, 1984; Dunnihoo *et al.*, 1992).

De acordo com James (1985) e McNally & Reitz (1987), em mulheres grávidas, pequenas quantidades de veneno ofídico, insuficientes para provocar sinais de envenenamento materno, podem atravessar a placenta e causar danos ao feto. Nesses casos, James (1985) sugere que seja feita a soroterapia, mesmo que a mãe não apresente sinais de envenenamento. Entretanto, apesar de Parrish & Khan (1966) terem afirmado que o uso do soro antiofídico na gestação raramente provoca aborto, Entman & Moise (1984) relataram um caso de morte fetal em decorrência de reações adversas na mãe que foi submetida à soroterapia. Nesse caso, uma mulher de 32 anos, grávida de 28 semanas foi picada por um viperídeo (copperhead). No hospital, a paciente recebeu o antiveneno, 1 hora após a picada. Logo após a soroterapia, a paciente teve reações adversas e foi tratada com epinefrina. Seis semanas após o tratamento, a paciente deu a luz à um bebê que morreu 4 dias após o parto.

Duru *et al.* (2008) relataram um caso de recuperação completa do envenenamento, devido ao uso de soro antiofídico. Uma mulher de 27 anos e com 28 semanas de gestação foi picada no dorso da mão esquerda pela serpente

*Vipera lebetina obtusa*. O antiveneno anti-viperídico foi aplicado 4 horas após o acidente, e essa mulher deu a luz a uma criança saudável, a termo.

Lin *et al.* (2010) relataram um caso de uma paciente de 21 anos, grávida de 24 semanas, que foi picada por uma serpente. Essa paciente foi levada à emergência médica, após 8 horas do acidente, porém o tratamento com soro (aplicado 10 horas após a picada) foi retardado devido à incerteza sobre qual espécie de serpente se tratava o acidente. Entretanto, o quadro clínico que ela desenvolveu foi determinante para que ela fosse tratada com doses repetidas de antiveneno contra veneno de *Naja naja atra*. A paciente e o feto sobreviveram.

Habib *et al.* (2008) relataram um caso de uma mulher de 17 anos, grávida de 6 meses, que foi picada pela serpente africana *Echis ocellatus*, e hospitalizada 6 dias após o acidente. Ela não fez torniquete, mas havia incisões no local da picada. No dia da internação, a paciente estava fraca e muito pálida, e a perna que foi acidentada, estava muito inchada. A paciente foi tratada com a lenta infusão endovenosa do antiveneno monoespecífico EchiTab IgG *E.occelatus*. A paciente se recuperou do envenenamento e deu a luz a uma criança saudável.

Já Lurie & Bentur (2009) relataram um caso de uma mulher de 46 anos, grávida de 14 semanas, admitida ao hospital 4 horas após ter sido picada no pé direito, pela serpente *V.palestinae*. A paciente foi tratada com antiveneno administrado por via endovenosa, durante 2 horas. Oito dias após o tratamento, a paciente apresentou sintomas da doença do soro. Ela foi tratada com predisona por 5 dias, curando os sintomas. A gravidez foi a termo, e nasceu uma menina saudável.

Esses relatos acima mostram que fatores como tratamento tardio, fases iniciais de gestação, e envenenamento severo, são riscos de um prognóstico desfavorável para a gravidez (Nasu *et al.*, 2004).

## 2.2– Soroterapia experimental, em animais

Experimentalmente, em ratos machos, Batellino *et al.* (2003) demonstraram que o soro antibotrópico, administrado por via endovenosa, reverteu a maioria dos efeitos e distúrbios sistêmicos causados pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*, administrado na rede da microcirculação, como a coagulação intensa,

lesões hemorrágicas e reações inflamatórias. Vale ressaltar que o soro não conseguiu reverter os sintomas locais, mesmo quando foi administrado antes da aplicação do veneno, mostrando, dessa forma, uma deficiência e um atraso nas interações veneno de *B.jararaca*/soro antitoxinador e também uma dificuldade do antiveneno em atingir a área afetada.

A fim de pesquisar os principais isotipos presentes no soro antitoxinador fornecido pelo Instituto Butantan, Fernandes *et al.* (2000) isolaram o isotipo IgG(T) para avaliar sua capacidade neutralizante, em camundongos. Os resultados mostraram que o IgG(T) é o principal isotipo responsável pela neutralização da letalidade e de outras atividades do veneno, sugerindo então, a possibilidade de utilizar esse isotipo no tratamento de pacientes acidentados por picadas de serpentes do gênero *Bothrops*. Foi observada também a capacidade do isotipo IgG(T) de restabelecer o fibrinogênio plasmático, mesmo quando injetado após 4 horas do envenenamento, mostrando, dessa forma, a capacidade do IgG(T) em restabelecer os níveis de fibrinogênio plasmático, semelhante ao soro antitoxinador convencional.

Chaves *et al.* (2003), testaram a via intramuscular de administração do antiveneno, em locais onde o acesso aos centros médicos é limitado, já que essa é uma alternativa de tratamento rápido para os casos de envenenamento. Assim, os camundongos foram envenenados por veneno de *Bothrops asper*, e tratados imediatamente com a fração Fab do antiveneno, por via intramuscular (i.m.). Os autores chegaram à conclusão de que a via i.m. não é eficaz em neutralizar a letalidade e a toxicidade local, porém, a administração da fração Fab do antiveneno foi eficaz em neutralizar a ação desfibrinante, e parcialmente eficaz na neutralização da hemorragia local e mionecrose, quando administrado no local do envenenamento, logo após a injeção do veneno.

### 2.3– Considerações gerais a respeito da produção de soros

O correto uso dos antivenenos constitui, juntamente com um sistema de distribuição adequado, um componente essencial no controle total dos acidentes por serpentes (WHO, 2007). Segundo Gutiérrez *et al.* (2007), há a necessidade de desenvolver guias internacionais de produção de antivenenos, além de um

programa regional permanente para profissionais e técnicos que trabalham em laboratórios públicos que produzem antiveneno. Assim, em 2008 foi aprovado o guia para produção, controle e regulação de imunoglobulinas do veneno de serpentes, pelo Comitê de Padronização Biológica da OMS. Esse guia representa um passo significativo no avanço de esforços globais para aumentar a quantidade e a qualidade dos antivenenos, já que eles fornecem uma informação detalhada dos passos recomendados para a produção e controle dos antivenenos (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Os antivenenos são produzidos por muitos fabricantes, que inclui laboratórios pertencendo predominantemente a instituições públicas, e outros privados (Gutiérrez *et al.*, 2007). Alguns países e sub-regiões da América Latina são auto-suficientes em termos de suprimento de antivenenos, enquanto outros não são (Gutiérrez *et al.*, 2009).

Atualmente, são poucas as companhias interessadas na produção de antivenenos de serpentes (Theakston *et al.*, 2003; Visser *et al.*, 2004). Na América Latina, a produção é realizada essencialmente por instituições públicas (Jadhav & Kapre, 1991; Raw *et al.*, 1991; Chippaux & Goyffon, 1998), sendo que sua capacidade é limitada para os requerimentos dos países com pouco superávit (Morais & Massaldi, 2006). Dois dos principais produtores são o Instituto Butantan, no Brasil, e o Instituto Clodomiro Picado, na Costa Rica (Fernandes *et al.*, 2000); o primeiro produz um antiveneno botrópico através da imunização de cavalos com venenos de cinco espécies de *Bothrops* sp predominantes no sudeste do Brasil (Raw *et al.*, 1991), enquanto que o segundo produz um antiveneno polivalente com uma mistura de imunização contendo venenos de *Bothrops asper*, *Crotalus durissus durissus* e *Lachesis muta stenophrys* (Bolaños & Cerdas, 1980).

### **3 – Biologia da Reprodução em roedores**

#### *3.1– Período de Pré-Implantação*

No período de pré-implantação, o qual ocorre entre o 2º e o 4º dias de prenhez (dp) em roedores, são notadas modificações celulares, vasculares e na

matriz extracelular do estroma endometrial, provavelmente em preparação para receber o embrião (Martin & Finn, 1968; Zorn *et al.*, 1986b).

Neste período, é observada uma onda de proliferação de fibroblastos, precedido por uma onda similar de proliferação de células endoteliais. Essa proliferação está sob estrito controle hormonal. A fim de submeterem-se à divisão, as células do estroma endometrial devem ser expostas a uma sequência precisa de hormônios constituídos de estrógeno, secretado durante o proestro, progesterona, e novamente estrógeno (Finn, 1977). No 1ºdp (presença da rolha vaginal) do camundongo, as células epiteliais uterinas sofrem proliferação sob influência da secreção do estrógeno pré-ovulatório ovariano e essa proliferação, de certa forma, continua até o 2ºdp. Do 3ºdp em diante, com o aumento dos níveis de progesterona secretados pelo recém formado corpo lúteo, inicia-se a proliferação das células estromais que é intensificada no 4ºdp. Esses efeitos coordenados de estrógeno e progesterona resultam na cessação da proliferação celular do epitélio uterino, iniciando a diferenciação. Essa onda de proliferação aumenta a população de fibroblastos capazes de submeterem-se a decidualização (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

No 2ºdp, são frequentemente encontrados fibroblastos que possuem vacúolos citoplasmáticos contendo fibrilas colágenas (Zorn *et al.*, 1986b). Esses vacúolos são fosfatase ácida positivos, indicando que o colágeno foi fagocitado e digerido (Zorn *et al.*, 1989). A fagocitose de colágeno parece ter importância no remodelamento da matriz extracelular endometrial que sofre modificações adicionais durante a decidualização (Abrahamsohn & Zorn, 1993). Ainda no 2ºdp, o espaço intercelular é reduzido, quando comparado com o endométrio virgem, e os fibroblastos do estroma endometrial estão comprometidos com a fagocitose das fibrilas colágenas (Zorn *et al.*, 1986b).

No 3º e 4ºdp é comum ver células endoteliais se dividindo em capilares do estroma endometrial de camundongos (Lunam & Rogers, 1981). Com isso, foi observado um aumento da permeabilidade de vasos nestes animais (Finn & McLaren, 1967). A ocorrência de tal aumento da permeabilidade vascular endometrial, em uma variedade de espécies de roedores, sugere que isto pode ser de importância geral no estabelecimento da prenhez (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

No 4ºdp, usando picosirius para corar fibrilas colágenas, Martello & Abrahamsohn (1986) notaram uma diminuição no número de fibrilas colágenas, especialmente no estroma endometrial sub-epitelial de camundongos. Essas observações indicam que a composição da matriz do endométrio varia durante a prenhez (Abrahamsohn & Zorn, 1993). É importante notar que o remodelamento da matriz extracelular precede a implantação do blastocisto. Isso indica que a matriz, além do seu papel em promover suporte mecânico durante a embriogênese, é também importante para as mudanças uterinas necessárias para propiciar um ambiente receptivo para o embrião. A diminuição do conteúdo de fibrilas colágenas pode facilitar a transformação de células estromais em células decíduais e o desenvolvimento de vasos sanguíneos decíduais (Fainstat, 1963).

Juntamente com as fibrilas colágenas, os componentes do sistema elástico do estroma endometrial também são afetados durante o período de pré-implantação em camundongos. No útero de animais virgens, e de animais prenhes acima do 4ºdp, os 3 componentes do sistema elástico (fibras oxitalânicas, elaunínicas e fibras elásticas maduras) estão presentes no endométrio. As fibras oxitalânicas são abundantes na região sub-epitelial do endométrio. As fibras elaunínicas estão situadas mais profundamente no endométrio e as fibrilas elásticas são encontradas próximas ao miométrio. No 5ºdp, entretanto, não são mais observadas essas fibrilas entre as células decíduais maduras, apesar de continuarem presentes em locais mais distantes do local da implantação, ou seja, ao redor das células pré-decíduais e no estroma não decidualizado (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

### 3.2– Implantação

A implantação do blastocisto no endométrio é um evento altamente coordenado, dependente do programa embriônico intrínseco em conjunto com sinais extrínsecos do útero receptivo. O blastocisto é preparado para avançar no desenvolvimento somente após receber os sinais externos necessários, mais provavelmente do útero (Armant *et al.*, 2000).

Assim, o processo de implantação começa com os blastocistos sendo transportados da tuba uterina para a cavidade do útero, onde, geralmente, ficam

por um curto período de tempo. Isso dura por volta de 24-48h, durante os quais os blastocistos são distribuídos ao longo dos cornos uterinos e passam a se orientar em relação ao útero. Essa distribuição é provocada pelos movimentos do miométrio (Boving, 1971). Antes de sua fixação inicial ao epitélio luminal, os blastocistos se posicionam próximos às criptas, do lado antimesometrial, ou seja, a implantação inicia-se na parede uterina oposta à inserção do mesométrio (Mossman, 1937; Abrahamsohn & Zorn, 1993).

Durante a prenhez, a presença de um blastocisto ativo no útero é o estímulo para a implantação (Tranguch *et al.*, 2005). O útero está pronto para aceitar o embrião implantado somente durante um período limitado de tempo chamado "janela de implantação". Fora desse tempo, o endométrio pode ser indiferente ou até mesmo hostil para o embrião. Já está bem estabelecido que a concentração de estrógeno determina a duração da janela de receptividade. O útero só pode ser receptivo à implantação do blastocisto se for exposto a uma pequena quantidade de estrógeno antes de 24-48h do início da progesterona (Lea & Clark, 1991; Tranguch *et al.*, 2005).

O processo de implantação é dividido em 3 fases: aposição, fixação (adesão) e penetração (invasão).

- Aposição

A aposição é identificada como a adesão instável do blastocisto à superfície endometrial. Durante esse estágio, o trofoblasto fica justaposto ao epitélio uterino (Tabibzadeh & Babaknia, 1995; Dey *et al.*, 2004; Red-Horse *et al.*, 2004; Makrigiannakis & Minas, 2007).

É durante o estágio de aposição da implantação que a primeira interação estrutural ocorre entre células maternas e embrionárias. A aposição é caracterizada pelo aumento do contato entre as microvilosidades da superfície das células trofoblásticas e das epiteliais uterina, levando a suas interdigitações (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

- Fixação (adesão)

A fase de aposição é seguida por uma adesão estável ou fase de fixação. O contato entre o embrião e a superfície do epitélio uterino aumenta

gradualmente no começo da implantação e é causado, provavelmente, pela combinação da dilatação do blastocisto e o fechamento do lúmen uterino. A dilatação do blastocisto é devida principalmente ao transporte ativo de eletrólitos e água no blastocelo (Borland & Tasca, 1974). Acredita-se que a sinalização parácrina local entre o embrião e o endométrio ocorra para tornar a fixação mais forte.

O primeiro sinal notável para o início da implantação é o aumento localizado da permeabilidade vascular estromal no local da fixação do blastocisto (Sharkey & Smith, 2003). A reação de fixação ocorre na noite do 4ºdp em camundongos (1º dia – rolha vaginal), o qual resulta de uma íntima aposição do trofoectoderma do blastocisto com o epitélio luminal (Psychoyos, 1973; Schlafke & Enders, 1975; Enders, 1976; Das *et al.*, 1994). Nesse estágio, complexos juncionais, incluindo junções oclusivas, se desenvolvem entre as células trofoblásticas, a fim de estabelecer uma barreira física entre o meio interno e externo do blastocisto (Ducibella *et al.*, 1975; Magnuson *et al.*, 1978).

O lúmen uterino também desaparece nesse estágio da prenhez em regiões que contêm os embriões. Esse fechamento é provocado pela progesterona (Finn, 1977) e provavelmente resulta de muitas causas. Dessas, as mais importantes parecem ser: 1) reabsorção da secreção luminal como resultado de intensa endocitose pelas células do epitélio uterino (Parr & Parr, 1974) e 2) intenso edema que se desenvolve no endométrio circundando cada um dos blastocistos (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

Durante a implantação do camundongo e do rato, o trofoblasto pode permanecer na superfície do epitélio por um dia e, subseqüentemente, parar na lâmina basal desse epitélio por mais um dia (Schlafke & Enders, 1975).

- Penetração (invasão)

A penetração envolve a invasão do embrião através do epitélio luminal e da lâmina basal até o estroma, para estabilizar a relação vascular com a mãe. Células do trofoectoderma, provenientes do blastocisto, migram entre as células epiteliais, deslocando-as e penetrando na membrana basal (Nikas, 2000). Após o trofoblasto fazer contato com a lâmina basal epitelial, este parece submeter-se a um período de repouso, antes da lâmina ser invadida (Enders & Schlafke, 1967).

O trofoblasto, então, invade a membrana basal, até o contato com o estroma subjacente. Em resposta a essa invasão, células do estroma endometrial começam a decidualização. O tempo para completar a fixação e a decidualização é essencial para a viabilidade da prenhez (Enders, 2000; Sharkey & Smith, 2003).

A invasão do tecido conjuntivo endometrial, que está agora transformada em células deciduais, é o próximo passo para a implantação em roedores. A invasão resulta principalmente da ação da população de células trofoblásticas gigantes. Essas células se organizam como uma rede em volta das regiões abembrionárias do embrião. As células gigantes periféricas penetram entre as células deciduais, que neste momento formam uma camada avascular estreita em volta do embrião (a decídua primária). Prolongamentos das células gigantes também se alongam em direção aos vasos sanguíneos, fora da decídua primária. Desse momento em diante, o sangue materno começa a circular através de espaços na rede de células gigantes (Welsh & Enders, 1987). Todos esses eventos acontecem no endométrio, na região antimesometrial, que é a região inicial da fixação embrionária (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

As células endometriais maternas são reguladas diretamente pelos esteróides ovarianos e indiretamente por vários fatores de crescimento e citocinas. Os esteróides ovarianos exercem o principal papel regulatório, mobilizando diversas moléculas moduladoras (Murphy, 2000). A diferenciação do útero para sustentar a implantação do blastocisto é coordenada pelos hormônios progesterona e estrógeno. A sensibilidade uterina à implantação, em resposta aos hormônios esteróides ovarianos, é programado em 3 fases: pré-receptivo, receptivo e não-receptivo. O blastocisto pode implantar somente na fase receptiva, a qual é caracterizada por uma mudança molecular e morfológica do endométrio. Durante essa fase, a membrana plasmática das células epiteliais luminiais perdem as microvilosidades e desenvolvem grandes projeções citoplasmáticas chamadas pinopodios (Murphy, 2000).

Em camundongos, o estrógeno é um determinante crucial para a janela de implantação. De fato, tem sido demonstrado que concentrações de estrógeno podem determinar, dentro de uma variação muito pequena, a duração da janela na receptividade uterina em murinos (Ma *et al.*, 2003). No entanto, é possível restringir nossa visão de implantação e discernir algumas características gerais

considerando que, apesar das variações nos níveis e taxas de estrógeno e progesterona, da estrutura do endométrio, e do tamanho do blastocisto, a implantação em mamíferos sempre envolve uma interação direta do trofoblasto do blastocisto com o epitélio de revestimento do útero (Schlafke & Enders, 1975).

O útero possui tipos celulares heterogêneos que respondem diferentemente ao estrógeno e progesterona. Em camundongos e ratos, o estrógeno estimula a proliferação e a diferenciação do epitélio luminal e glandular, enquanto que no estroma, esse processo requer tanto o estrógeno quanto a progesterona. Após a implantação ter sido iniciada na noite do 4<sup>o</sup>dp, as células estromais que circundam o blastocisto implantado, começam a proliferar extensivamente e se diferenciam em células decíduais (Tranguch *et al.*, 2005). O desenvolvimento sincronizado do embrião do estágio de blastocisto com competência para implantar e a diferenciação do útero para o estado receptivo são críticos para esse processo (Psychoyos, 1986; Nardo *et al.*, 2006, Guzetoglu-Kayisli, 2007).

### 3.3– Decidualização

A implantação em roedores é acompanhada por alterações marcantes no endométrio. Isso consiste principalmente de modificações na forma, organização e metabolismo das células estromais residentes do tecido conjuntivo endometrial, levando à formação de uma forma distinta de tecido, a decídua. Vale ressaltar que os fibroblastos endometriais de roedores são diferentes dos fibroblastos observados em outras partes do corpo, porque o último não reage com a presença do embrião da mesma forma que o primeiro (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

Em roedores e humanos, as células do estroma do tecido conjuntivo endometrial são transformadas em células decíduais, em resposta à implantação do embrião (Bulmer & Dickson 1961; Welsh & Enders 1983). Essas células decíduais recém-formadas possuem morfologia e propriedades bioquímicas diferentes dos fibroblastos (Fazleabas *et al.*, 2004).

A decidualização começa na região estromal imediatamente ao redor da cripta mucosa onde os embriões estão implantados, isto é, é inicialmente

antimesometrial e sub-epitelial (Mossman, 1987). Ela é chamada de decídua primária ou zona decidual primária (Krehbiel, 1937; Parr & Parr, 1989). As primeiras células deciduais já estão presentes, quando o epitélio é deslocado e o trofoblasto atinge a lâmina basal. A zona decidual primária se torna circundada por uma região de células deciduais completamente transformadas (células deciduais maduras) as quais são as células dominantes da decídua antimesometrial (Abrahamsohn & Zorn, 1993). Essas células são alongadas e ficam paralelas umas às outras e ao maior eixo do embrião (que não é mais uma esfera). As células deciduais dessa região estão muito próximas e estabelecem junções comunicantes, junções do tipo desmossomos e junções oclusivas umas com as outras (Parr *et al.*, 1986; Tung *et al.*, 1986). A decidualização, então, se espalha antimesometrialmente em direção ao miométrio, e alguns dias depois uma reação notável também pode ser observada no endométrio mesometrial (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

A zona decidual primária contém capilares e vênulas, mas esses vasos estão “colabados” e não contêm sangue. Aqui, as células deciduais podem agir como uma barreira à passagem de macromoléculas (Parr *et al.*, 1986; Tung *et al.*, 1986; Parr & Parr, 1989). Isso pode servir para proteger o embrião contra a exposição a microorganismos, IgG materna e células imunocompetentes (Parr & Parr, 1989).

A decidualização em roedores tem características interessantes e importantes: 1) as células estromais endometrial têm que estar adequadamente preparadas pelos esteróides ovarianos; 2) sob condições naturais, só acontece ao redor dos embriões; 3) pode ser induzido artificialmente na ausência de embriões (como nos animais pseudo-prenhes) resultando na formação de um tecido (o deciduoma) muito similar à decídua verdadeira; 4) há um período definido durante o qual pode ser induzido em animais prenhes ou pseudo-prenhes; e 5) resulta na morfogênese de um novo tecido em um mamífero adulto, normal (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

Em roedores, muitas modificações observadas no útero durante a reação decidual têm características em comum com o processo inflamatório. Essas características incluem a alteração da permeabilidade vascular e edema (Psychoyos, 1960, 1961), modificações da parede das vênulas e proliferação das

células endoteliais (Abrahamsohn, 1983), e a participação de prostaglandinas (Kennedy, 1980; Sananés *et al.*, 1981) e da histamina (Kraicer & Shelesnyak, 1958). O arranjo das células decíduais ao redor do embrião é similar ao de macrófagos epitelióides que se acumulam ao redor de corpos estranhos em certos tipos de granulomas (Finn & Keen, 1963; Lobel *et al.*, 1967).

O tecido decidual é formado por células residentes (células decíduais) e por células migratórias, como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos, que também estão constantemente presentes no útero de animal virgem, além dos componentes da matriz extracelular (Krehbiel, 1937).

Como já dito anteriormente, as células decíduais se originam de fibroblastos estromais. A primeira modificação estrutural observada nas células estromais, após a administração de estradiol, é a reorganização do nucléolo, que desenvolve componentes granulares e fibrilares bem definidos. Outras modificações consistem no aumento do tamanho da célula, o arredondamento das células e de seus núcleos, e a diminuição da quantidade de espaço extracelular no estroma afetado (Lundkvist, 1978).

No nível ultraestrutural, as células decíduais exibem aumento em seu conteúdo de organelas envolvidas na síntese de macromoléculas, como o retículo endoplasmático, complexo de Golgi e lisossomos (Jollie & Bencosme, 1965; Enders & Schlafke, 1967; Finn & Lawn, 1967; Tachi *et al.*, 1970; Parkening, 1976; Kleinfeld *et al.*, 1976; Abrahamsohn, 1983; Abrahamsohn & Zorn, 1993); acúmulo de lipídeos, glicogênio, e filamentos intermediários (Parkening, 1976; Welsh & Enders, 1985; Blankenship *et al.*, 1990); e aposição de suas membranas plasmáticas formando as junções intercelulares (Jollie & Bencosme, 1965; Enders & Schlafke, 1967; Finn & Lawn, 1967; Tachi *et al.*, 1970; Kleinfeld *et al.*, 1976; Parkening, 1976; Abrahamsohn, 1983; Abrahamsohn & Zorn, 1993).

O citoplasma das células decíduais contém muitos polirribossomos e cisternas do retículo endoplasmático rugoso e liso. Complexos de Golgi e feixes de microfilamentos também estão presentes. O núcleo contém agrupamentos de cromatina e nucléolo proeminente. A superfície celular é muito irregular devido à presença de pequenas microvilosidades e grandes prolongamentos. Muitas junções aderentes e junções comunicantes estão presentes entre os corpos

celulares ou prolongamentos celulares. Lisossomos são encontrados em quase todas as células decíduais (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

As células decíduais antimesometriais completamente transformadas são poliédricas, justapostas e tem um núcleo esférico e eucromático. Seu nucléolo é proeminente, geralmente próximo ao envelope nuclear interno, e possuem regiões fibrilares e granulares muito distintas (Lundkvist, 1978). O citoplasma dessas células é rico em retículo endoplasmático (a maioria rugoso), complexo de Golgi, e mitocôndrias. Nenhum grânulo secretório foi observado em células decíduais de roedores, mas vacúolos elétrondensos com conteúdo heterogêneo se acumulam em células decíduais de ratos e camundongos (Abrahamsohn, 1983; Welsh & Enders, 1985). Estes podem ser lisossomos relatados na involução das células decíduais (Abrahamsohn, 1983; Katz & Abrahamsohn, 1987). Células decíduais costumam ter muitos filamentos intermediários que ocorrem em todo o citoplasma (Tachi *et al.*, 1970; Welsh & Enders, 1985). Esses formam feixes ou redes e estão geralmente concentrados ao redor do núcleo (Zorn *et al.*, 1990). Em muitas espécies (ex. ratos e hamsters), as células decíduais também acumulam grandes quantidades de glicogênio e gotículas lipídicas (Parkening, 1976; Welsh & Enders, 1985; Blankenship *et al.*, 1990).

Células decíduais antimesometriais estão justapostas entre si, resultando em uma notável diminuição no volume relativo de espaço extracelular (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

Células localizadas longe do embrião têm características morfológicas intermediárias entre as células decíduais maduras e os fibroblastos. Essas são chamadas células pré-decíduais. Elas são, por sua vez, rodeadas por uma camada de fibroblastos (células estromais não diferenciadas) (Welsh & Enders, 1985) que fica ao lado do miométrio (Abrahamsohn & Zorn, 1993). Essas células têm o formato de estrela, com longos prolongamentos, e são separadas por grandes espaços extracelulares. Seus núcleos são esféricos e contém principalmente eucromatina; seus nucléolos são marcadamente desenvolvidos e tocam a membrana nuclear interna (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

Circundando as células pré-decíduais, está a camada de fibroblastos. Essas estão também situadas adjacentes ao miométrio interno, e elas formam o estroma não decidualizado dos sítios de implantação. Usando marcação com

timidina  $^3\text{H}$ , O'Shea *et al.* (1983) mostraram que essas células sobrevivem à involução decidual e repovoam o endométrio até o parto.

No endométrio mesometrial, a decidualização se processa mais lentamente que aquela na região antimesometrial. Enquanto a decídua antimesometrial está presente na manhã do 5ºdp em camundongo, a manifestação da decídua mesometrial não é observada até o final do 7ºdp (Abrahamsohn & Zorn, 1993). Essa última formará a placenta, responsável pela sustentação e nutrição do feto, até o nascimento.

A região compreendida entre a decídua antimesometrial e a mesometrial, é ocupada por uma área rica em glicogênio. Além de conterem muitas organelas, semelhantemente às células deciduais antimesometriais, essas células são justapostas e possuem junções aderentes e comunicantes (Welsh & Enders, 1985).

Com a evolução da gestação, a decídua antimesometrial vai sofrendo modificações. Assim, no 6ºdp, os embriões estão localizados na cripta de implantação (Welsh & Enders, 1985) os quais estão circundados por células da decídua antimesometrial.

Já no 7ºdp, a cripta de implantação está ocupada pelos embriões, exceto mesometrialmente em relação ao cone de implantação, onde os restos da cavidade da cripta ainda são encontrados (Bevilacqua & Abrahamsohn, 1989).

Nos camundongos, do 5ºdp em diante, a morfologia das fibrilas colágenas na matriz extracelular do estroma endometrial mudam marcadamente. Fibrilas espessas com perfis muito irregulares são encontradas em pequenos espaços entre as células deciduais sub-epiteliais (Alberto-Rincon *et al.*, 1989). Essas fibrilas espessas parecem estar diretamente associadas com o processo de decidualização, como as fibrilas mais espessas são observadas na região de células deciduais maduras. Por outro lado, em porções do endométrio que não se decidualizam, essas fibrilas não mudam sua morfologia (Alberto-Rincon *et al.*, 1989). O diâmetro das fibrilas colágenas também aumenta durante o curso da prenhez; fibrilas presentes no 7ºdp são mais grossas que as do 5ºdp. Apesar do aumento no diâmetro das fibrilas estar relacionado com a decidualização do endométrio, isso não depende da presença dos blastocistos, já que essas fibrilas

estão presentes em decíduas induzidas artificialmente no camundongo (Alberto-Rincon *et al.*, 1989; Andrade *et al.*, 1991).

Apesar do espessamento das fibrilas colágenas ter sido descrito em muitas situações patológicas, o espessamento da fibrila, durante a decidualização, não caracteriza um estado patológico. Além de seu papel mecânico, essas fibrilas colágenas espessas podem ter outras funções na biologia da decídua que ainda não estão claras (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

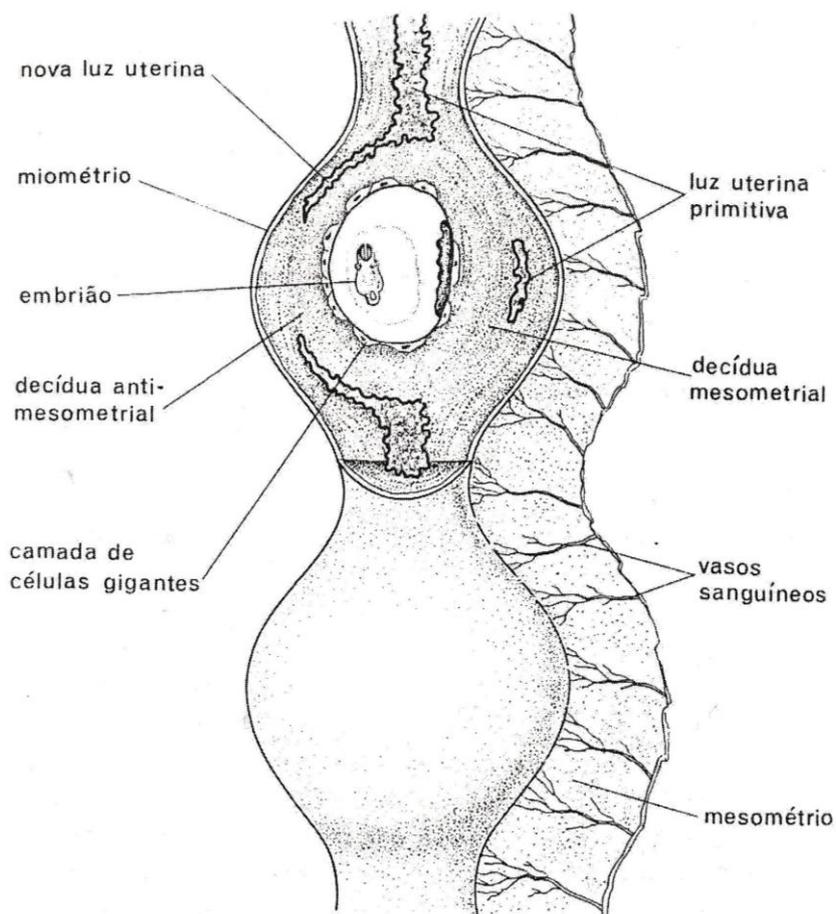
Vacúolos contendo colágeno estão presentes no citoplasma das células deciduais no 7ºdp. A habilidade das células deciduais para fagocitar fibrilas colágenas mostrou que essas células retêm propriedades de fibroblastos dos quais originaram. Apesar de não estar clara a importância da fagocitose de colágeno em roedores, acredita-se que esta pode ser um passo preparativo para a involução da decídua, provavelmente a fim de permitir a invasão controlada do trofoblasto e continuar o crescimento do embrião (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

No 8ºdp, muitas células deciduais localizadas próximas ao embrião mostram sinais muito avançados de degeneração (Bevilacqua & Abrahamsohn, 1989).

Por volta do 9º dp, a decídua antimesometrial atinge um alto grau de complexidade (Fig. 5) (Bridgman, 1948; Velardo *et al.*, 1953; De Feo, 1967; Kleinfeld *et al.*, 1976; Finn, 1977; O'Shea *et al.*, 1983; Cinquentti & Rinaldi, 1987; Abrahamsohn & Zorn, 1993) e tem uma função muito importante nas trocas metabólicas entre mãe e feto (Krehbiel, 1937), uma vez que a placenta, apesar de já ter iniciado o seu desenvolvimento (O'Shea *et al.*, 1983), ainda não é funcional. Portanto, alterações na decídua antimesometrial, até essa etapa da prenhez, podem provocar prejuízos, repercutindo na velocidade de desenvolvimento, sobrevivência e desempenho da prole.

Em camundongos, no 9ºdp, Katz & Abrahamsohn (1987) relataram células deciduais em processo de degeneração. Essas células eram redondas e perderam as microvilosidades. Os núcleos possuíam grânulos de cromatina espessos e aumento da quantidade de cromatina ocupando o núcleo inteiro. Em estágios mais avançados, o envelope nuclear estava rompido ou ausente.

No 10<sup>o</sup>dp, a decídua antimesometrial é mais delgada que no dia anterior. Células deciduais pequenas com o núcleo picnótico estão presentes na região decidual interna, próximos ao embrião (Katz & Abrahamsohn, 1987).



**Fig. 5** – Esquema de um segmento de um corno uterino gravídico de camundongo, aproximadamente no 9<sup>o</sup> dia de prenhez, contendo dois embriões implantados (Fonte: Katz, 1981).

### 3.4– Funções da decídua

Uma das funções atribuída à decídua é o controle do grau de invasividade do trofoblasto (Kirby & Cowell 1968; Finn 1971). De Feo (1967) e Finn (1971) revisaram as funções clássicas propostas para a decídua, e essas incluem: nutrição do embrião; separação de embriões em “sítios de implantação”, contribuindo para a formação de sistemas vasculares embrionários individuais durante o desenvolvimento placentário; restrição da invasão trofoblástica; e formação de uma zona de clivagem para a separação da placenta da parede

uterina, durante o parto. Outras funções decíduais tais como secreção (Wewer *et al.*, 1986; Carson *et al.*, 1987; Glasser *et al.*, 1987; Han *et al.*, 1987; Parr *et al.*, 1988; Crainie *et al.*, 1990; Croze *et al.*, 1990; Yelavarthi *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 2011), fagocitose (Katz, 1998; Spadacci-Morena & Katz, 2001), controle da invasão do trofoblasto (De Feo, 1967; Finn, 1971; Irwin *et al.*, 2001; Godbole *et al.*, 2011), e participação da resposta imunológica materna na prenhez (Parr & Parr, 1989; Szekeres-Bartho, 2002; Moffett & Hiby, 2007 ) também têm sido bastante estudadas.

### 3.5– Involução da Decídua

A decídua antimesometrial de camundongo sofre um notável crescimento seguido da implantação do blastocisto no 5ºdp, e o desenvolvimento máximo é atingido por volta do 9ºdp (Bridgman, 1948; De Feo 1967; Kleinfeld *et al.*, 1976; Finn 1977). A regressão da decídua antimesometrial se processa na mesma direção de sua formação, isto é, da região da interface materno-fetal para o miométrio (Katz & Abrahamsohn, 1981; 1987; Welsh & Enders, 1985) e entre o 11º e o 14ºdp a decídua não é mais observada nessa região (Bulmer & Dickson 1961; Hall, 1969; Welsh & Enders 1983; Loch, 1985).

A involução da decídua antimesometrial do camundongo ocorre desde seus primórdios, até o 12ºdp, por morte celular programada, denominada apoptose (Correia da Silva *et al.*, 2004). A desorganização progressiva das células decíduais individuais compreende o aparecimento de sinais precoces de dilatações da mitocôndria e das cisternas do retículo endoplasmático, até o completo rompimento da membrana celular e espalhamento das organelas. A regressão das células decíduais está associada com a presença do aumento da quantidade de lisossomos secundários e de autofagossomos no citoplasma. O retículo endoplasmático e a mitocôndria são as organelas mais comumente afetadas no citoplasma das células desorganizadas (Katz & Abrahamsohn, 1987).

Muitas células decíduais desorganizadas estão presentes na camada mais próxima do embrião, no 9ºdp, visto que elas são raramente observadas em outras camadas. No 10ºdp, essa desorganização celular aumenta e muitas células desorganizadas sozinhas ou em grupos, intercalam-se com as células

aparentemente saudáveis, na camada subjacente. A decídua antimesometrial é consideravelmente mais fina no 11ºdp. Nesse estágio, a maioria das células decíduais próximas da interface materno-fetal estão profundamente desorganizadas (Katz & Abrahamsohn, 1987).

Por volta do 14ºdp no camundongo e 16ºdp no rato, a decídua antimesometrial foi convertida em uma fina camada composta primariamente por células decíduais mortas (Welsh & Enders, 1985). As células decíduais mortas ou fragmentos dessas células são fagocitados pelas células trofoblásticas gigantes ao invés de serem fagocitadas por outras células ou degradadas em ácidos graxos (Robins & Cotran, 1979). O espaço criado é ocupado, aos poucos, pelo embrião em crescimento (Abrahamsohn & Zorn, 1993).

Quando a prenhez é induzida artificialmente, na ausência de um embrião, a involução também acontece, através do deciduoma (Verlado *et al.*, 1953), ocorrendo morte celular programada, por apoptose, nesse processo (Welsh & Enders, 1985, Chen *et al.*, 2001).

### 3.6. Trofoblasto

Em camundongos, após a fecundação, a célula ovo ou zigoto sofre uma série de rápidas divisões celulares mitóticas, no decorrer do deslocamento da tuba uterina para o útero. À medida que as divisões se sucedem, as células se tornam progressivamente menores. Cerca de 3 dias após a fecundação, o embrião, agora na fase de mórula, está entrando na cavidade uterina.

A mórula consiste de uma massa contendo 16 células ou blastômeros. A passagem de líquido entre as células forma uma grande cavidade, a cavidade blastocística. Logo que essa cavidade seja reconhecível (cerca de 4 dias após a fecundação), o embrião se encontra na fase de blastocisto (Rugh, 1968).

A perda da zona pelúcida do blastocisto é provavelmente o último evento que precede o começo da implantação em roedores, no 5ºdp. Na maioria dos roedores, a zona pelúcida é dissolvida enzimaticamente pelos componentes da secreção uterina (Rosenfeld & Joshi, 1977).

O blastocisto é constituído por uma camada de células achatadas externas, o trofoblasto (trofocodermia), e por um grupo de células localizadas centralmente,

a massa celular interna ou embrioblasto, que é o primórdio do embrião (Hillman *et al.*, 1972).

As células trofoblásticas são as primeiras a se diferenciarem no embrião. Elas se originam da primeira camada que reveste o embrião (trocotoderma). Essas células são essenciais para a manutenção e início de uma prenhez bem sucedida (Benirschke & Kaufman, 1995).

As interações entre os tecidos materno e embrionário são realizadas a partir das células trofoblásticas, do lado embrionário, e das células decíduais, maternas. Durante os estágios iniciais da implantação, a interação entre células embrionárias e maternas está limitada a aproximações ocasionais de prolongamentos celulares, ao passo que contatos mais extensivos estão presentes quanto mais avançado o estágio de invasão (Bevilacqua & Abrahamsohn, 1989).

Em camundongos, as células trofoblásticas localizadas no pólo abembrionário e nas regiões laterais do blastocisto são denominadas células trofoblásticas gigantes (CTGs) que, no início da prenhez, possuem características invasiva e migratória (Billington, 1971; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988; Kanai-Azuma *et al.*, 1994). Essas células são grandes e poligonais, e apresentam contornos bastante irregulares devido aos seus prolongamentos citoplasmáticos.

Já no 6ºdp, as CTGs estão em íntimo contato com as células decíduais.

No 7ºdp, as CTGs apresentam longos prolongamentos, que entram em contato com os de outras CTGs e formam uma rede, com amplos espaços, contendo células sanguíneas maternas

A primeira camada de células gigantes se apóia na membrana de Reichert, enquanto a camada mais externa toca a decídua.

Durante o 7º e o 8ºdp, observam-se regiões de contato íntimo entre CTGs e células decíduais no pólo abembrionário e nas paredes laterais embrionárias; ocorre o alastramento das CTGs ao longo da periferia do embrião. No 9ºdp, fica bem nítida a interação das CTGs com células decíduais saudáveis e com células ou grupo de células decíduais adjacentes, exibindo sinais de desorganização celular, intercaladas com as sadias (Katz & Abrahamsohn, 1987). As CTGs apresentam núcleo grande com nucléolos proeminentes. No citoplasma são geralmente observados muito polirribossomos livres, assim como mitocôndrias

exibindo crista tubular e retículo endoplasmático disperso pelo citoplasma (Katz & Abrahamsohn, 1987).

É importante salientar que durante a fase mediana da prenhez de camundongos, as CTGs são capazes de fagocitar hemácias e células deciduais em degeneração, migrando em direção aos espaços deixados por esses elementos. Katz (1995) e Spadacci-Morena & Katz (2001) observaram um aumento na atividade fagocítica de fibrilas colágenas pelas CTGs, em camundongos no 9ºdp submetidos a jejum e restrição alimentar, respectivamente, mostrando, dessa forma, a importância dessas células para a manutenção do embrião.

### 3.7. Teratogênese

Segundo Horovitz *et al.* (2005), define-se como malformação congênita a anomalia funcional ou estrutural do desenvolvimento do feto presente no nascimento.

Um teratogêno é qualquer agente ambiental, infeccioso ou nutricional capaz de produzir perturbações no desenvolvimento ou malformação congênita no feto, após a exposição da mãe ao agente (Moore & Persaud, 2000; Mahan & Escott-Stump, 2003).

Alterações na fisiologia ou homeostasia materna podem influenciar o desenvolvimento embrionário e fetal. Kalter & Warkany (1983) relataram que existe uma associação entre malformação fetal e doenças maternas, tais como diabetes, fenilcetonúria, sangramento vaginal e hipertermia.

A ação de um agente teratogênico sobre o embrião ou feto em desenvolvimento depende de diversos fatores, como: estágio de desenvolvimento do conceito, relação entre dose e efeito, genótipo materno-fetal e mecanismo patogênico específico de cada agente (Schuler-Faccini *et al.*, 2002).

As anomalias que aparecem com maior frequência em fetos submetidos a algum agente tóxico são: exencefalia, costelas fundidas, arcos vertebrais fundidos nas regiões torácica e lombar, anormalidade ocular e esternóbrio defeituoso.

Especificamente em camundongos, a organogênese se inicia no 7,5ºdp, porém, entre os 8º e 9ºdp, a organogênese está muito acelerada e os fetos são

bastante susceptíveis a agentes teratogênicos (Rugh, 1968); a administração de drogas, irradiação, deficiência nutricional, entre outros fatores, podem acarretar deficiências irreversíveis nesses animais, repercutindo, decisivamente, na formação do indivíduo adulto.

Apesar dos inúmeros estudos sobre a fisiopatologia do envenenamento em humanos, esses acidentes, em mulheres grávidas, são escassos, pois não são frequentes. Apesar da baixa frequência, a presença de fetos mal formados, além de mortes fetais, mostra que esse acidente tem importância médica relevante.

A exposição ao veneno de serpente, durante a gravidez, pode resultar em teratogênese, retardamento do crescimento fetal, ou até mutagênese (Pantanowitz & Guidozi, 1996). Seneviratne *et al.* (2002) realizaram um levantamento envolvendo acidente ofídico e mulheres grávidas no Sri Lanka, no período compreendido entre setembro de 1996 e abril de 2001, e relataram o caso de uma mulher picada pela serpente *Daboia russelii russelii* e que deu a luz a uma criança com malformações (hidrocefalia e polidactilia). Esse caso foi muito semelhante àquele relatado por Malz (1967), no qual uma mulher, no terceiro mês de gestação, picada por um viperídeo, deu a luz a um bebê com malformações múltiplas, incluindo a hidrocefalia, e que morreu poucos dias depois do nascimento.

Estudos em animais envolvendo serpentes mostraram que em fases mais tardias da gestação, o veneno pode causar efeitos teratogênicos importantes. Gabriel-Robez & Clavert (1969) relataram que a administração do veneno de *Vipera aspis* em camundongos prenhes produziu anomalias congênitas tais como fenda palatal e deformidades da face. Em camundongos na segunda metade da gestação que foram submetidos ao veneno de *N.nigricollis*, Clavert & Gabriel-Robez (1971) não observaram alterações externas nos fetos, entretanto, órgãos como fígado e rins mostraram alterações histológicas severas. Alterações viscerais também foram observadas por Mohamed & Nawar (1974), em camundongos submetidos ao mesmo veneno, nos dias 12, 14 e 16 da prenhez.

Além das modificações acima citadas, o veneno de algumas serpentes ainda pode comprometer o desenvolvimento do sistema nervoso central (Ahmed *et al.*, 1974; Nawar, 1980) e o crescimento dos fetos (Penn *et al.*, 1971; Ahmed *et al.*, 1974).

## **IV - Materiais e Métodos**

### **1- Animais**

Foram utilizados camundongos jovens (*Mus musculus*; var. albino), com aproximadamente 2½ a 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e obedeceram a fotoperíodos de 12/12 (claro - escuro).

Todos os animais foram anestesiados utilizando-se uma solução composta por xilazina (Rumpum®) e cloridrato de quetamina (Ketalar®), em uma proporção de 1:1, injetado por via intraperitoneal (50µL/20g de peso do animal). Quando necessário, os animais foram submetidos à eutanásia, em câmara de CO<sub>2</sub>.

A utilização dos animais seguiu as recomendações da Comissão Ética do Instituto Butantan (CEUAIB nº 322/06) e da UNIFESP-EPM (CEP 0130/09).

### **2- Acasalamento**

Os animais foram acasalados por volta de 18 horas, na proporção de quatro fêmeas virgens para um macho. As fêmeas foram examinadas pelas manhãs, para verificação da presença de rolha vaginal. O dia em que a rolha estava presente foi considerado como o dia 0,5 de prenhez. A partir deste momento, as fêmeas foram alojadas em gaiolas, individualmente.

### **3- Veneno**

Foi utilizado veneno bruto liofilizado de serpentes *Bothrops jararaca* (Bj) adultas, fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. O veneno foi mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  e a solução foi preparada (p/v) com salina estéril (154 mM NaCl, pH 7.4), no momento do uso.

### **4- Soro antiofídico**

O soro específico para neutralizar o veneno da serpente *Bothrops jararaca* foi fornecido pelo Instituto Butantan. A dose utilizada foi aquela preconizada na bula, ou seja, para a neutralização de 5mg de veneno ofídico utilizou-se 1mL de soro antiofídico, a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **5- Formação dos grupos de animais**

Na manhã do 7,5° dia de prenhez (dp), os animais foram pesados e divididos em 3 grupos:

1 - Grupo VBj + SAB. Os animais receberam uma única dose intramuscular (0,1mL) de 0,24mg de veneno de Bj/ kg de peso do animal. Essa dose, sub-letal, corresponde a 10% da  $DL_{50}$  e foi selecionada como sendo uma dose capaz de provocar alterações hemostáticas, mas, ao mesmo tempo, de preservar a prenhez na maioria dos animais (Spadacci-Morena *et al*, 2006). Após 3 horas, os animais foram submetidos à soroterapia. Para tanto, receberam, por via endovenosa, 4,5 $\mu\text{L}$  de soro antiofídico (SAB) dissolvidos em 100 $\mu\text{L}$  de salina estéril, para a

neutralização do veneno administrado, de acordo com o preconizado pelo fabricante do soro (Instituto Butantan).

2 - Grupo Sal + SAB. Os animais receberam uma única injeção intramuscular (0,1mL) de solução salina estéril. Após 3 horas, os animais foram submetidos à soroterapia, como já descrita anteriormente.

3 - Grupo VBj. Os animais receberam uma única injeção intramuscular (0,1mL) de 0,24mg de veneno de Bj/ kg de peso do animal. Este grupo foi inserido no protocolo experimental como controle do grupo 1, com o objetivo precípuo de verificar se o lote do veneno utilizado seria capaz de reproduzir os resultados já descritos por Spadacci-Morena *et al.* (2006), em cujo trabalho foi utilizada a mesma dose e o mesmo veneno. Para tanto foi realizada a análise histológica do útero desses animais bem como a dosagem de fibrinogênio plasmático, no 8,5<sup>o</sup>dp.

Os animais pertencentes aos grupos VBj+SAB e Sal+SAB foram sacrificados, respectivamente, nas manhãs do 8,5<sup>o</sup>dp (n=16 e n=14) e 18,5<sup>o</sup>dp (n=11 e n=11). Os animais pertencentes ao grupo VBj (n=18) foram todos submetidos à eutanásia na manhã do 8,5<sup>o</sup>dp.

## **6- Dosagem de Fibrinogênio Plasmático (Fg)**

Na manhã do 8,5<sup>o</sup>dp, uma amostra de sangue dos animais, pertencentes aos grupos VBj + SAB (n=11); Sal + SAB (n=9) e VBj (n=13), obtida por punção cardíaca, foi misturada a citrato trisódico (160mM) contendo 2% de soro antibotrópico (para neutralizar o veneno livre presente no sangue) na proporção de 9:1. O sangue citratado foi centrifugado a 2000g por 15 min a 4°C e o plasma estocado à -70°C, até o momento do uso. O método empregado para a dosagem de fibrinogênio nas amostras plasmáticas foi o descrito por Ratnoff & Menzie (1951). Resumidamente, o fibrinogênio presente nas amostras de plasma foi

convertido em fibrina pela adição de trombina exógena. A rede de fibrina insolúvel formada foi retirada e quantificada por método colorimétrico, pelo conteúdo de tirosina. Sucintamente, em um tubo contendo 0,5mL de vidro moído foi adicionado 10mL de NaCl 154mM; 0,2mL de plasma e 0,05mL de trombina bovina (720 NIH U/mL). Após homogeneização suave, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente, durante 30 minutos, para a formação da rede de fibrina. Após esse tempo, o coágulo formado foi lavado três vezes com 10mL de NaCl 154mM por centrifugação (2000g/10 minutos) e digerido em 1,0mL de hidróxido de sódio a 10%, em banho-maria fervente (10 minutos). A esse material foi acrescentado 7,0mL de água destilada, 3,0mL de carbonato de sódio (20%) e 1,0mL de reagente fenólico. Após 30 minutos, a absorbância do material foi determinada em espectrofotômetro Micronal B-382, em comprimento de onda de 650nm. A concentração de fibrinogênio foi calculada utilizando-se curva de padrão de tirosina.

## **7- Processamento do Material para Microscopia de Luz**

Os animais utilizados foram os mesmos submetidos à coleta de sangue, no 8,5<sup>o</sup>dp (VBj+SAB – n=11; Sal+SAB- n=9 e VBj – n=13). Os cornos uterinos dos animais pertencentes aos grupos estudados foram, a princípio, examinados para a constatação macroscópica, ou não, da prenhez. Foram utilizados somente os animais que, macroscopicamente, mantiveram a prenhez, isto é, aqueles que apresentaram sítios de implantação mostrando dilatações esféricas com dimensões semelhantes e regularmente distribuídos ao longo do eixo uterino. Os demais animais, isto é, aqueles cujos cornos uterinos apresentaram sinais de regressão, tais como, dilatações esféricas com diferentes tamanhos daquele normalmente observado em animais sadios no mesmo dia da prenhez, ou cornos uterinos inchados e com sítios de implantação ausentes, não foram utilizados.

As dilatações esféricas observadas ao longo dos cornos uterinos foram removidas, individualizadas e imediatamente imersas em solução fixadora de Bouin, onde permaneceram por aproximadamente 8 horas.

Após a fixação, o material foi desidratado em etanol, utilizando-se concentrações crescentes (70% a 100%), diafanizado em xilol e, a seguir, processado para inclusão em parafina. Após a inclusão, foram obtidos cortes transversais das peças, com aproximadamente 5µm de espessura, que foram, posteriormente, processados para a coloração com hematoxilina e eosina.

Após a coloração, o material foi novamente desidratado, diafanizado e montado de forma a se obter um preparado permanente. Os cortes foram observados e fotografados em microscópio de luz DM LS (Leica) com captador de imagem DFC420 (Leica) e programa de imagem Leica Application Suite versão 3.1.0.

## **8 - Processamento do material para Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Na manhã do 8,5<sup>o</sup>dp, os animais pertencentes ao grupo VBj+SAB (n=5); Sal+SAB (n=5) e VBj (n=5) foram anestesiados, como já descrito anteriormente, e os cornos uterinos foram expostos e analisados, para a constatação ou não da prenhez. Foram utilizados somente os animais que mantiveram a prenhez.

Imediatamente após a exposição dos cornos uterinos, foi gotejado fixador (GTA 2% em tampão Tyrode – pH7,2) na cavidade uterina. Em seguida, os cornos foram removidos e dissecados. Cada uma das dilatações esféricas neles observadas foi individualizada e, com auxílio de uma lupa estereoscópica, as peças foram recortadas, desprezando-se a região mesometrial. A região antimesometrial foi recortada utilizando-se um segmento em meia-lua do local de implantação, que foi mantido no fixador por aproximadamente 3 horas, a 4°C.

Após lavagens sucessivas em tampão Tyrode, pH 7,2, por cerca de 45 minutos, o material foi pós-fixado em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1% em tampão Tyrode, por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi lavado em solução salina isotônica, contrastado por 2 horas em solução aquosa de acetato de uranila a 1%, a temperatura ambiente, e lavado novamente em solução salina. As peças foram, então, desidratadas em álcool etílico em

concentrações crescentes (30% a 100%) e transferidas, posteriormente, para óxido de propileno.

A embebição foi feita, inicialmente, em uma mistura de óxido de propileno e resina Epon (EMBed-812) na proporção de 2:1, 1:1 e 1:2, à temperatura ambiente, com rotação, permanecendo na última etapa "overnight". Posteriormente, o material foi embebido em resina pura por cerca de 1 hora, com rotação. Após a embebição, os fragmentos foram dispostos em moldes de inclusão contendo resina e levados à estufa a 60°C para polimerização, por aproximadamente 5 dias. Os fragmentos do útero foram orientados de modo a obter cortes transversais dos mesmos.

Inicialmente foram feitos cortes semi-finos, com aproximadamente 0,5µm de espessura, até atingir a região em que a decídua se apresentou com uma de suas superfícies em contato com o embrião. Esses cortes foram corados à quente por uma mistura de azur II a 1% e azul de metileno a 1%, em solução aquosa de borato de sódio a 1%.

Os cortes ultrafinos, com aproximadamente 70nm de espessura, foram contrastados em citrato de chumbo por 10 minutos.

Tanto os cortes semifinos como os ultrafinos foram obtidos em um ultramicrotomo Porter-Blum MT1 (Sorvall).

Os cortes ultrafinos foram examinados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E, com programa de captura e análise de imagem ITEM, versão ITEM\_E\_23082007, fabricante Olympus Soft Imaging Solutions GmbH.

## **9- Processamento do material para morfologia dos fetos a pré-termo**

Na manhã do 18,5<sup>o</sup>dp, os animais pertencentes aos grupos VBj+ SAB (n=11) e Sal+SAB (n=11) foram pesados, anestesiados e submetidos a laparotomia. Os fetos e respectivas placentas foram cuidadosamente removidos e imediatamente pesados. Em seguida, os fetos foram examinados, para avaliar a

viabilidade dos mesmos e as possíveis alterações morfológicas externas. Após essa etapa, os fetos foram submetidos à eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, e realizada a análise esquelética. Para tanto, foram imersos em acetona por 24h, quando foram eviscerados. Em seguida, foram submetidos ao método de clareamento em KOH a 0,8%, contendo solução aquosa saturada de vermelho de alizarina (alizarin red S – Fluka), de acordo com o método descrito por Staples & Holtkamp (1963). Os animais, diafanizados, foram gentilmente secos e imersos em uma mistura de álcool etílico a 70% (2 partes), glicerina (2 partes) e álcool benzílico (1 parte). Os fetos foram examinados sob lupa estereoscópica, com aumento aproximado de 7x.

De acordo com Fritz & Hess (1970) e Aliverti *et al.* (1979), foram analisados os seguintes centros de ossificação: metacarpos, metatarsos, falanges proximais anteriores, falanges proximais posteriores, vértebras cervicais, vértebras caudais e esternóbrio.

Todos os elementos avaliados foram registrados e posteriormente comparados nos 2 grupos estudados.

Nos casos onde ficou constatada a regressão total da prenhez, os animais foram utilizados somente para avaliar o potencial tóxico dos tratamentos. Nesses casos, os ovários desses animais foram examinados para a constatação do corpo lúteo gravídico. Pontos de regressão observados no útero dos animais também foram registrados.

Os animais foram sacrificados dois dias antes da possível expulsão da prole, com o intuito de evitar canibalismo das ninhadas anormais.

## **10- Análises estatísticas**

### *10.1. – Dosagem de fibrinogênio plasmático, no 8,5<sup>o</sup>dp*

Para a realização da análise estatística dos níveis de fibrinogênio plasmático, nos 3 grupos estudados (VBj+SAB; Sal+SAB e VBj), foi utilizado o

programa SigmaStat versão 3.01. Os diferentes grupos estudados foram comparados através do teste ANOVA de vias repetidas.

#### *10.2. – Peso das placentas e dos fetos*

Com o objetivo de verificar se as placentas e os fetos dos animais pertencentes aos dois grupos estudados (VBj+SAB e Sal+SAB) possuíam pesos médios diferentes, foi utilizado o teste t de Student.

#### *10.3 – Peso das mães no 7,5<sup>o</sup> e 18,5<sup>o</sup>dp*

Foi feita uma análise de variância de medidas repetidas (procedimento GLM, Repeated measures analysis do software SAS) para verificar se havia diferenças dos pesos das mães entre os grupos VBj+SAB e Sal+SAB, no 7,5<sup>o</sup> e 18,5<sup>o</sup>dp.

Para todos os testes, fixou-se em 0,05 ou 5% ( $p \leq 0,05$ ) o nível de rejeição de hipótese de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significativos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

## **V – Resultados**

No presente trabalho, foi observado que todos os animais pertencentes aos diferentes grupos se apresentaram hígidos, não havendo registro de nenhuma morte entre eles.

### **1 - Morfologia do útero de camundongos no 8,5<sup>o</sup> dia de prenhez (dp)**

#### *1.1 – Aspecto macroscópico nos grupos VBj+SAB; Sal+SAB e VBj*

O útero dos camundongos pertencentes aos três grupos estudados apresentava-se constituído por dois cornos unidos na região caudal, numa peça única, o corpo do útero. Cada corno era sustentado pelo mesométrio (ligamento dorsal). Imaginando um plano central e longitudinal ao útero, e perpendicular ao mesométrio, podemos dividir a parede uterina em duas regiões: a mesometrial, onde se insere o mesométrio, e a antimesometrial, complementar à primeira.

Na maioria dos camundongos no 8,5<sup>o</sup>dp, os locais de implantação dos embriões puderam ser observados à vista desarmada, sob a forma de dilatações esféricas, com volumes equivalentes, e regularmente dispostos ao longo do maior eixo de cada um dos cornos uterinos (Fig. 6).

#### *1.2 – Análise microscópica da região antimesometrial do útero, no microscópio de luz*

A maior parte do estroma endometrial que circunda o embrião já sofreu o processo de decidualização, formando no útero duas regiões: a região mesometrial, que contém a decídua mesometrial e que dará origem à parte da

placenta, e a região antimesometrial, situada do lado oposto da mesometrial, que contém a decídua antimesometrial.

Neste trabalho foi realizada uma avaliação geral de todos os constituintes da região antimesometrial uterina, isto é, das camadas de células decíduais maduras, pré-decíduais e não decidualizadas. Entretanto, foram examinadas de forma mais particularizada, apenas as células mais próximas da interface materno-fetal, isto é, as primeiras camadas de células decíduais maduras. Devido à grande proximidade de células pertencentes ao pólo abembrionário do blastocisto, essas células, as células trofoblásticas gigantes, foram também avaliadas.

#### *1.2.1.– Animais que receberam o veneno de *Bothrops jararaca* no 7,5<sup>o</sup>dp e não foram tratados com soro antitoxinogênico (Grupo VBj)*

Após 24 horas da administração do veneno bruto de *Bothrops jararaca*, a análise histológica da região antimesometrial do útero de camundongos revelou os tecidos da interface materno-embrionária desorganizados. Nesta região era possível observar, frequentemente, focos hemorrágicos e edema, o que contribuiu para o deslocamento das primeiras camadas de células decíduais maduras (Figs. 7A e 7B). Nessas camadas, as células decíduais maduras estavam em contato com o foco hemorrágico e edema, mas ainda mantinham-se fracamente aderidas ao tecido uterino. A maioria delas, mais espaçadas do que o habitual, apresentava núcleo picnótico e citoplasma reduzido e acidófilo (Fig. 7B).

A membrana de Reichert, acidófila, muitas vezes apresentou-se dilatada ou mesmo rompida em algumas regiões. Entretanto a camada de células da endoderme estava presente, junto a essa membrana (Fig. 7B).

Aparentemente, as camadas de células decíduais maduras, mais distantes da interface mãe-feto, assim como as pré-decíduais e as não decidualizadas, exibiram morfologia semelhante à de um animal no mesmo período da prenhez, não submetido a nenhum tratamento (Fig. 7A).

Entre os focos hemorrágicos, muitas vezes foram observados grupos de células decíduais que se destacaram do tecido materno (Figs. 7B e 7C). Algumas dessas células decíduais ainda podiam ser reconhecidas; eram pouco volumosas

quando comparadas com aquelas que não estavam em contato com os focos hemorrágicos, e apresentavam variação de tamanho. O citoplasma apresentava-se basófilo e o núcleo ainda mantinha sua forma elíptica com cromatina frouxa entremeada por grumos esparsos de heterocromatina (Fig. 7C).

Grande quantidade de leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, foram frequentemente observados fora dos capilares, mais precisamente na interface, entre as células trofoblásticas gigantes e as células decíduais maduras mais próximas ao embrião (Figs. 7B, 8 e 9).

As camadas de células trofoblásticas gigantes (CTGs) presentes na interface apresentaram-se dissociadas. Dessa forma, as CTGs foram frequentemente observadas isoladas e imersas nos focos hemorrágicos. Essas células estavam em diversas fases de degeneração. A maioria se apresentava arredondada com pequenas e poucas projeções citoplasmáticas e o núcleo apresentava cromatina com vários graus de condensação (Fig. 8). Entre elas, algumas ainda podiam ser reconhecidas, mas o citoplasma já não possuía forma definida, e o núcleo apresentava grandes grumos de cromatina condensada (Fig. 9).

Próximas às células decíduais maduras mais próximas da interface e as CTGs, foram observadas células em estágios avançados de morte celular, o que não permitiu que essas células fossem identificadas (Fig. 10).

#### *1.2.2.- Animais que receberam o veneno de Bothrops jararaca e foram tratados com soro antitoxinico, no 7,5ºdp (VBj+SAB)*

A análise histológica do útero de camundongos que receberam o veneno de *B.jararaca* e que foram tratados com SAB após 3 horas, revelou que os tecidos da interface materno-fetal apresentavam-se organizados. Assim, na região antimesometrial uterina foi possível observar todos os componentes que formam a decídua antimesometrial (Fig. 11); do lado fetal, os constituintes vizinhos e os mais próximos da interface também estavam presentes (Fig. 11).

Por toda a região antimesometrial foi possível observar inúmeros capilares sanguíneos, que continham em seu interior leucócitos, além de hemácias (Fig. 11).

As células decíduais maduras mais próximas da interface se apresentaram organizadas em camadas, assim como as CTGs (Figs. 11 e 12). A membrana de Reichert apresentava-se íntegra, levemente acidófila, e com as células da endoderma apoiadas sobre uma das suas superfícies (Figs. 11 e 12).

As células decíduais maduras mais próximas ao embrião apresentavam-se bem afastadas umas das outras; eram volumosas e mostravam variação de tamanho entre si. Seus núcleos eram grandes e elípticos, com nucléolos evidentes e cromatina frouxa entremeada por grumos de heterocromatina. O citoplasma, bastante extenso, apresentava-se basófilo (Fig. 12). Entre as células decíduais com aparência saudável, algumas exibiam sinais de degeneração, como o núcleo com cromatina mais condensada e citoplasma acidófilo (Fig. 12). Debris celulares também estavam presentes nessa região (Fig. 12).

Entre as células decíduais, foi possível observar células endoteliais, constituintes dos muitos capilares sanguíneos existentes na decídua antimesometrial (Fig. 12).

As células trofoblásticas gigantes, localizadas entre a membrana de Reichert e a primeira camada de células decíduais maduras, apresentavam morfologia exuberante, muito semelhante à encontrada em animal não submetido a nenhum tratamento, no 8,5<sup>o</sup>dp (Fig. 12). Eram células muito volumosas, com formas irregulares e exibiam longos prolongamentos citoplasmáticos que muitas vezes delimitavam espaços contendo hemácias, formando lagos sanguíneos (Fig. 12). O núcleo, bastante grande, era constituído basicamente por cromatina frouxa, evidenciando-se grandes nucléolos. No citoplasma de algumas dessas células era possível observar a presença de grânulos acidófilos de tamanhos variados (Fig. 12). Ainda, o citoplasma era fracamente basófilo e muitas vezes foi possível observar uma estreita faixa circundando o núcleo, possivelmente a imagem negativa de filamentos intermediários (Fig. 13).

Entre as células trofoblásticas e as primeiras camadas de células decíduais, foi possível observar uma discreta quantidade de polimorfonucleares, principalmente neutrófilos (Fig. 13).

### *1.2.3 – Animais que receberam solução salina estéril e foram tratados com soro antibotrópico, no 7.5ºdp (Grupo Sal+SAB)*

Neste grupo, controle, os tecidos materno e fetal encontravam-se organizados. Assim, a região antimesometrial do útero desses animais mostrou as características morfológicas já descritas na literatura para camundongos prenhes não submetidos a nenhum tratamento, na mesma data de prenhez. Do lado materno, foi possível observar as células decíduais maduras ocupando grande área da decídua antimesometrial, além das células pré-decíduais, mais próximas umas das outras (Fig. 14).

Por toda a região antimesometrial foram observados inúmeros capilares. A maioria desses capilares exibia uma discreta quantidade de leucócitos polimorfonucleares em seu interior (Fig. 14).

As primeiras camadas de células decíduais maduras mais próximas ao embrião apresentavam-se mais afastadas umas das outras, quando comparadas às demais camadas, havendo entre elas grande quantidade de matriz extracelular; eram volumosas e mostravam variação de tamanho entre si. O citoplasma, extenso, apresentava-se basófilo. O núcleo dessas células era elíptico, com cromatina frouxa entremeada por grumos de heterocromatina (Figs. 14, 15 e 16).

Do lado embrionário, foram analisadas as camadas de CTGs cujos longos e finos prolongamentos citoplasmáticos entram em contato com os de outras CTGs formando uma rede com espaços contendo sangue materno; estas células próximas ou adjacentes às células decíduais, se apresentavam com enormes proporções quando comparadas às células decíduais e eritrócitos (Fig. 15). Nos espaços entre as células trofoblásticas gigantes, formando os lagos sanguíneos era possível notar além das hemácias alguns polimorfonucleares (Fig. 15). O citoplasma das CTGs, fracamente basófilo, apresentava grande número de grânulos heterogêneos distribuídos ao longo da periferia celular. Seu núcleo, volumoso, apresentava-se irregular, com cromatina frouxa e grandes nucléolos (Figs. 15, 16, 17 e 18).

A membrana de Reichert apresentava-se preservada e íntegra, estando em contato com as células trofoblásticas gigantes, em sua superfície voltada para o lado materno (Fig. 16).

Na interface materno-fetal, foram observados polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. Algumas vezes, esses leucócitos foram vistos em recessos ou concavidades das células trofoblásticas ou no interior do citoplasma dessas células (Figs. 17 e 18).

### *1.3- Análise ultraestrutural da região antimesometrial do útero*

#### *1.3.1- Animais do grupo VBj*

Ao microscópio eletrônico de transmissão, a análise das células decíduais maduras e das CTGs da interface materno-embriônica revelou que, entre as células saudáveis, havia muitas células em diferentes estágios de morte celular (Figs. 19 e 20).

Entre aquelas em degeneração, observou-se muitas vezes, que a membrana plasmática apresentava-se rompida ou já havia desaparecido, tornando os limites das células indefinidos (Figs. 19 e 20); o citoplasma mostrava-se bastante desorganizado, onde muitas vezes, não era mais possível reconhecer as organelas (Fig. 19) ao lado de outras onde organelas como lisossomos e segmentos de retículo endoplasmático podiam, ainda, serem reconhecidos (Fig. 20).

Em algumas células que se encontravam ainda no início da morte celular, as mitocôndrias ainda podiam ser reconhecidas, entretanto apresentaram-se inchadas e com parte de suas cristas já desaparecidas. Segmentos de retículo endoplasmático, com ribossomos aderidos ou não às suas superfícies, também puderam ser observados e apresentavam-se dilatados. Com relação ao núcleo das células decíduais maduras e das CTGs, a cromatina se apresentou em vários graus de condensação. Entre essas células também foram observados detritos celulares (dados não mostrados).

### 1.3.2- Animais pertencentes aos grupos VBj+SAB e Sal+SAB

O exame ultraestrutural da decídua antimesometrial mostrou que tanto as células decíduais maduras como as trofoblásticas apresentaram muitas características comuns e, portanto, a descrição que se segue abrangerá os dois grupos.

Na interface materno-embrionária foi possível observar que as células decíduais e as células trofoblásticas, apresentaram morfologia semelhante àquelas células, em animais nesse período de prenhez não submetidos a tratamento.

As células decíduais apresentaram núcleo com contornos irregulares ocupando a região central da célula. A heterocromatina estava esparsa no nucleoplasma, na forma de grumos, e também associada à membrana nuclear interna. Já a eucromatina foi encontrada dispersa no nucleoplasma (Figs. 21 e 23).

No citoplasma, o retículo endoplasmático rugoso era bem desenvolvido, ocupando grande extensão. Esse retículo formava uma rede extensa cujas cisternas se apresentaram geralmente dilatadas, e possuíam em seu interior, material de elétrons de densidade moderada (Figs. 21 e 23). Ocasionalmente, pequenos segmentos de retículo endoplasmático liso foram encontrados dispersos ou em continuidade com segmentos das cisternas rugosas.

As mitocôndrias, alongadas ou esféricas, exibiam as cristas transversais ao seu maior eixo (Fig. 21) e os lisossomos, de tamanho e conteúdo variados, foram observados no citoplasma dessas células decíduais (Fig. 23).

Nas superfícies das células decíduais foram vistas microvilosidades e projeções citoplasmáticas que conferiram irregularidade à superfície dessas células. Além disso, as células decíduais vizinhas apresentaram contigüidade formando, em determinadas regiões, junções especializadas (Fig. 23).

Entre as células decíduais, os espaços intercelulares se apresentaram bastante amplos, onde os componentes amorfo e fibrilar da matriz extracelular estavam presentes (Figs. 21 e 23). Ocasionalmente também foram encontradas células endoteliais que constituíam as paredes dos capilares (Fig. 23), presentes nessa região.

O complexo de Golgi se apresentava bem desenvolvido e era constituído por um número variável de cisternas achatadas, paralelas e cujas extremidades eventualmente apareciam dilatadas (Fig. 24).

As células trofoblásticas gigantes também apresentavam-se íntegras, exibindo núcleo grande com cromatina frouxa (Figs. 22 e 25), muitas vezes sendo possível observar a presença de nucléolos (Fig. 25).

No citoplasma, essas células continham grande quantidade de polirribossomos livres dispersos por todo o citoplasma, e lisossomos primários e secundários que variavam em número e tamanho, dependendo da região observada da célula (Fig. 22). As mitocôndrias eram geralmente esféricas, com invaginações da membrana interna formando túbulos (Fig. 22).

A superfície celular das células trofoblásticas mostrou-se bastante irregular, apresentando muitos prolongamentos e microvilosidades. Nas áreas de contato entre essas células foram frequentemente observadas junções de adesão (Fig. 22). Em algumas ocasiões, extensas projeções dessas células apresentavam-se em contato com a superfície da membrana de Reichert (Fig. 25).

## *2- Determinação do fibrinogênio plasmático em camundongos, no 8,5<sup>o</sup>dp.*

A dosagem do fibrinogênio plasmático nas amostras de sangue materno nos grupos VBj+SAB, Sal+SAB e VBj, no 8,5<sup>o</sup>dp, mostrou que entre aqueles animais que não receberam veneno e foram tratados com soro antibotrópico (grupo Sal+SAB), e aqueles que receberam o veneno e posteriormente foram tratados com soro antibotrópico (VBj+SAB), não houve diferença estatística (Sal+SAB – 1,266±0,309; VBj+SAB – 1,247±0,399). Entretanto, comparando-se o grupo VBj (0,604±0,140) com o Sal+SAB, e o grupo VBj com o VBj+SAB, observou-se que houve diferença significativa entre os grupos, como mostrado na Fig. 26.

## *3- Efeito do veneno da Bothrops jararaca sobre o desenvolvimento fetal, no decorrer da prenhez.*

### 3.1 – Avaliação da incidência de reabsorção fetal no 18,5º dia de desenvolvimento

A confirmação da prenhez foi feita através de exame macroscópico e histológico dos corpos lúteos gravídicos nos ovários.

A incidência de reabsorção total dos fetos não foi estatisticamente significativa ( $p=1$ ) nos animais pertencentes ao grupo VBj+SAB (3/11) em relação aos animais do grupo Sal+SAB (3/11).

Entre os animais pertencentes aos dois grupos estudados, além da reabsorção total, alguns animais apresentaram reabsorção parcial de fetos (VBj+SAB = 5/11; Sal+SAB = 7/11), entretanto não houve diferença significativa ( $p=0,65$ ). Nesses animais, foi possível observar segmentos do útero onde pontos escuros (acastanhados) eram observados e que correspondiam a embriões que não se desenvolveram ao lado de fetos totalmente desenvolvidos, na mesma mãe.

### 3.2 – Análise externa e esquelética dos fetos, no 18,5º dia de desenvolvimento.

Entre os fetos pertencentes a mães que foram submetidas ao veneno da *B.jararaca* ou à salina e, após 3 horas, foram tratadas com o soro antitoxínico, não foram encontradas alterações morfológicas externas. Todos os fetos que foram a pré-termo eram viáveis.

A análise esquelética também não revelou nenhuma alteração nos dois grupos estudados. Tanto nos animais pertencentes ao grupo VBj+SAB como Sal+SAB, todos os pontos de ossificação foram observados, estando presentes e completos (Fig. 27 e 28).

### 3.3 – Peso dos fetos e placentas

Os fetos foram pesados e observou-se que houve uma redução do peso corpóreo entre aqueles pertencentes ao grupo Sal+SAB ( $0,96g\pm 0,3$ ), quando comparados com aqueles do grupo VBj+SAB ( $1,15g\pm 0,1$ ), havendo diferença estatística entre os grupos estudados (Figura 29). Entretanto, entre as placentas

dos dois grupos estudados, o peso era semelhante – VBj+SAB = 0,18g±0,02 e Sal+SAB = 0,18±0,02, não havendo diferença significativa (Fig. 30).

Dentro de uma mesma ninhada, os fetos apresentavam tamanhos homogêneos e pesos semelhantes, nos dois grupos estudados.

#### *3.4– Peso materno*

Como esperado, houve um ganho de peso materno nos dois grupos estudados, no período compreendido entre o 8,5<sup>o</sup> e 18,5<sup>o</sup>dp (Fig. 31). Quando comparada a média de ganho de peso entre as mães pertencentes aos dois grupos, a análise estatística revelou que não houve diferença significativa (p=0,75) (Tabela 1).

# **FIGURAS**

## **Cornos uterinos**

**Fig. 6.** Útero de camundongo no 8,5<sup>o</sup>dp, exibindo os locais de implantação dos embriões (\*), dispostos ao longo do maior eixo dos cornos uterinos. Ovário (Ov). Tuba uterina (Tu).



## **VBj**

**Figs. 7-10.** Fotomicrografias de cortes transversais da região antimesometrial de camundongos no 8,5<sup>o</sup>dp, tratados apenas com o veneno de *B.jararaca*, no 7,5<sup>o</sup>dp. Coloração: H&E.

**Fig. 7A.** Aspecto da região da interface materno-fetal e camada de células deciduais maduras. A extensa área hemorrágica e o edema deslocaram as primeiras camadas de células deciduais maduras (CD). As células trofoblásticas gigantes não são observadas nessa fotomicrografia.

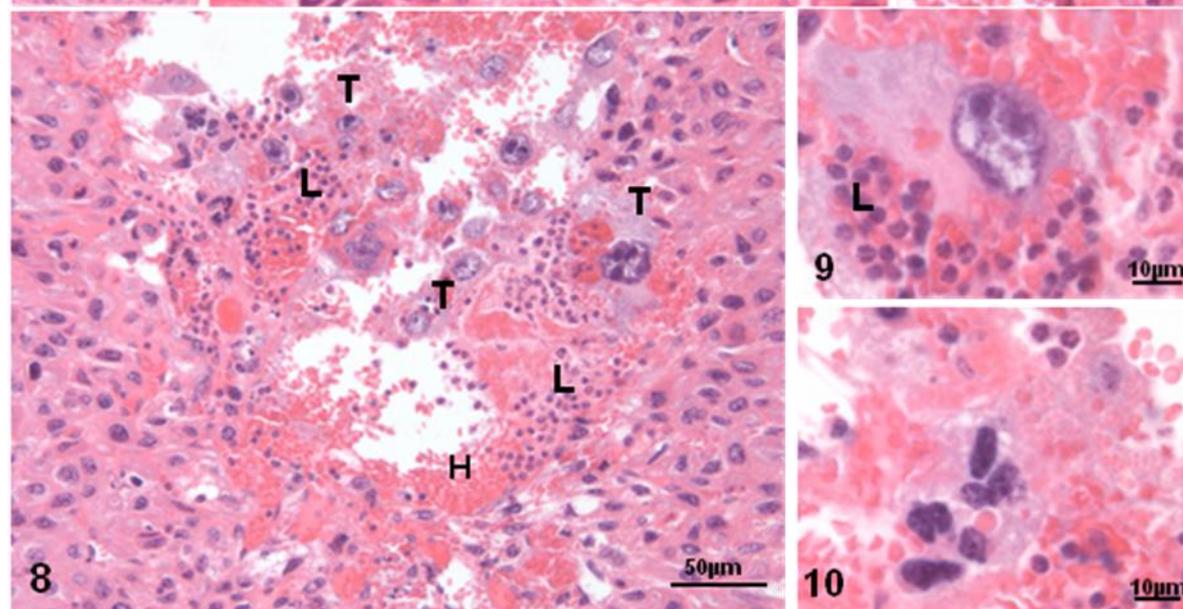
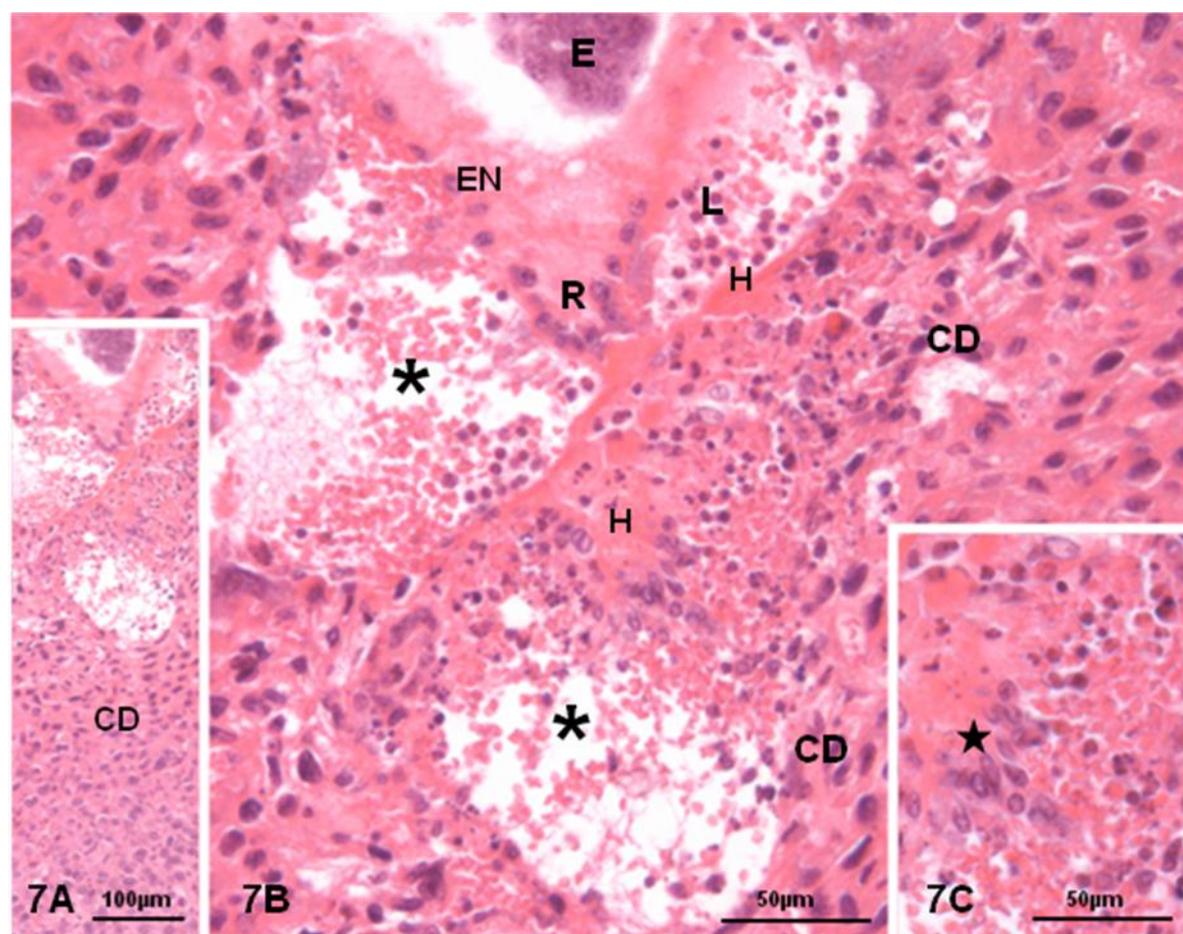
**Fig. 7B.** Maior aumento da região da interface materno-fetal observada em 7A. Notamos uma grande desorganização com extensa área hemorrágica (H) e edema (\*); as células deciduais maduras (CD) apresentavam-se em diversos estágios de degeneração. A membrana de Reichert (R) apresentava-se dilatada, com a presença de células da endoderme (EN). Leucócitos (L). Embrião (E).

**Fig. 7C.** Detalhe da figura anterior mostrando células deciduais que se destacaram do tecido materno (estrela).

**Fig. 8.** Camadas de células trofoblásticas gigantes (T), na interface materno-embriônica, em degeneração, dissociadas e imersas nos focos hemorrágicos (H). Entre as células trofoblásticas gigantes foram observados muitos leucócitos (L) fora dos vasos sanguíneos.

**Fig. 9.** Detalhe de uma célula trofoblástica gigante em fase inicial de degeneração, apresentando núcleo com grandes grumos de cromatina condensada e citoplasma com aspecto vítreo. Ao redor dessa célula foram observados muitos leucócitos (L) fora dos capilares.

**Fig. 10.** Detalhe de um grupo de células em estágio avançado de morte celular, onde foi possível observar núcleos picnóticos e porções reduzidas de citoplasma.



## **VBj+SAB**

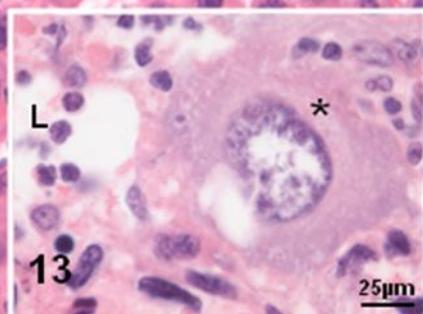
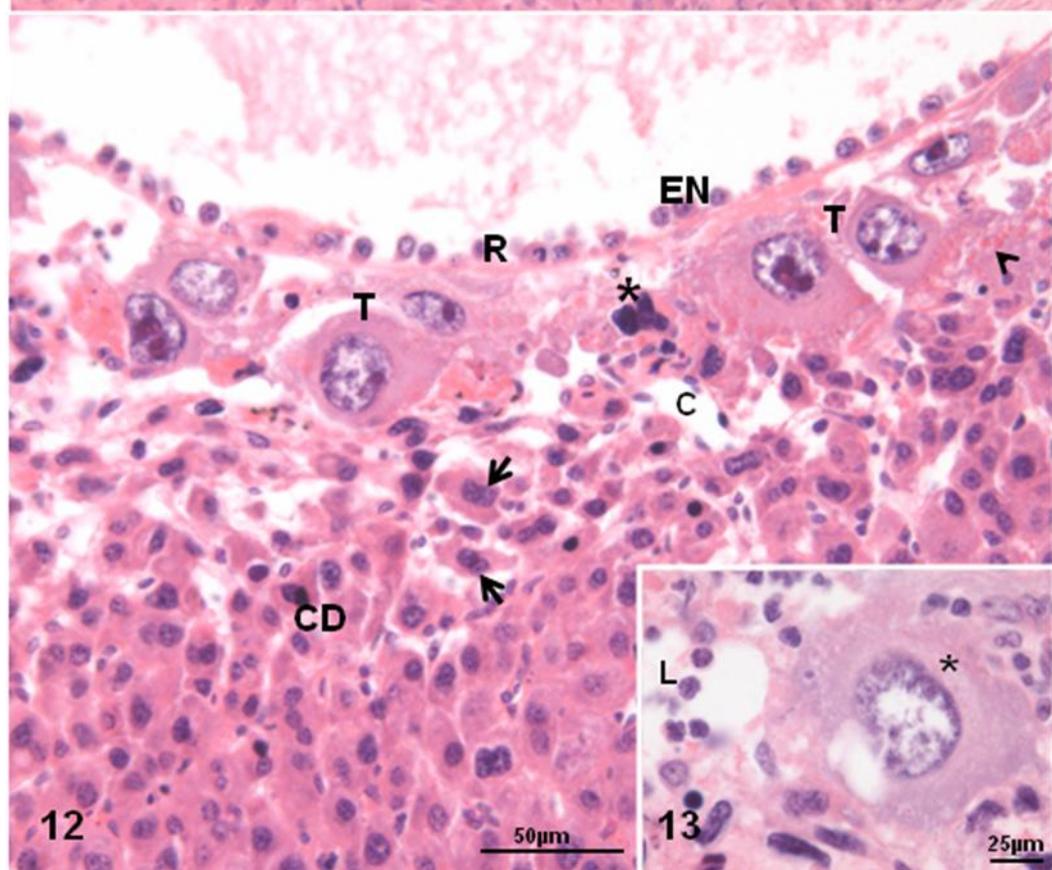
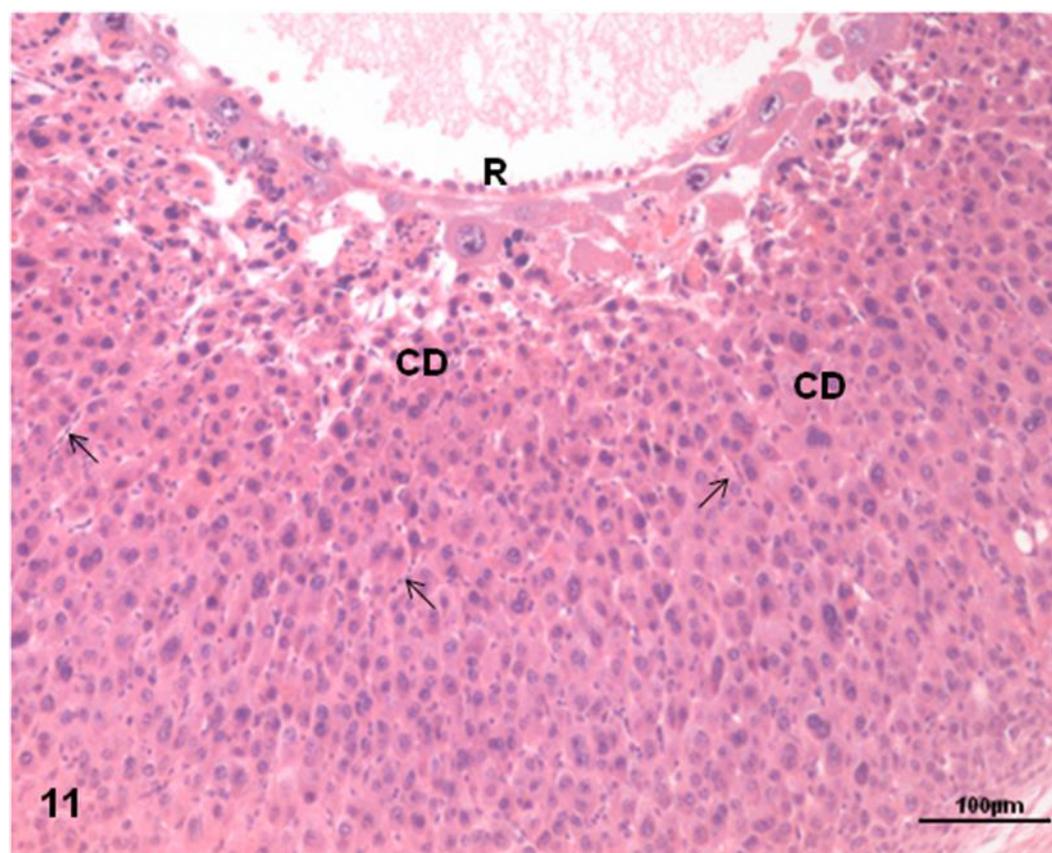
**Figs. 11-13.** Fotomicrografias de cortes transversais da região antimesometrial do útero de camundongos no 8,5<sup>o</sup>dp tratados, no 7,5<sup>o</sup>dp, com veneno bruto de *B.jararaca* e submetidos, após 3h, ao soro antibotrópico.

Coloração: H&E.

**Fig. 11.** Vista geral. Os tecidos materno e embrionário se apresentaram bem organizados, com a presença da membrana de Reichert (R) íntegra. Muitos capilares sanguíneos, contendo polimorfonucleares (setas), foram notados por toda a extensão da decídua. Células decíduais (CD).

**Fig. 12.** Detalhe da interface materno-embriônica. As células decíduais maduras (CD) mais próximas da interface materno-embriônica apresentaram-se alongadas e afastadas umas das outras, possuindo morfologia típica de células saudáveis. As células trofoblásticas gigantes (T) formavam uma camada contínua de células próximas ou adjacentes às células decíduais maduras. Nos espaços da rede de células trofoblásticas foi possível observar a presença de células sanguíneas (cabeça de seta). A membrana de Reichert (R) estava íntegra, com a presença de células da endoderme (EN) apoiadas sobre uma de suas superfícies. Próxima a essa membrana foram observados debris celulares (\*) e células em diversos graus de degeneração (setas). Capilar (c).

**Fig. 13.** Detalhe de uma célula trofoblástica gigante (T) exibindo núcleo com cromatina frouxa, e o citoplasma contendo um grande feixe de filamentos (\*). Próximos a essa célula, foram notados alguns leucócitos (L).



## Sal+SAB

**Figs. 14-18.** Fotomicrografias de cortes transversais da região antimesometrial do útero de camundongos no 8,5<sup>o</sup>dp tratados, no 7,5<sup>o</sup>dp, com salina estéril e, após 3 horas, submetidos ao soro antibotrópico.

Coloração: H&E.

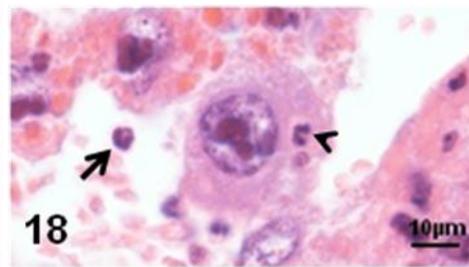
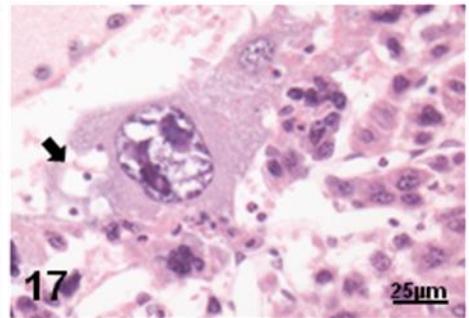
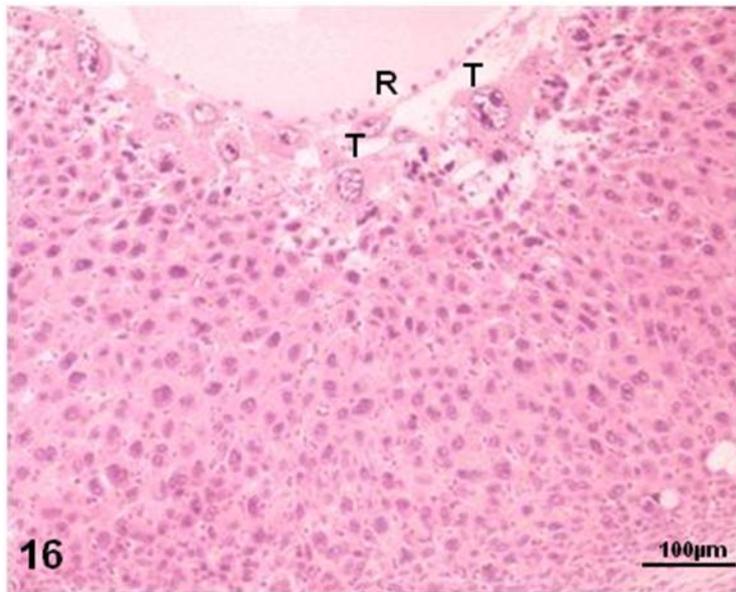
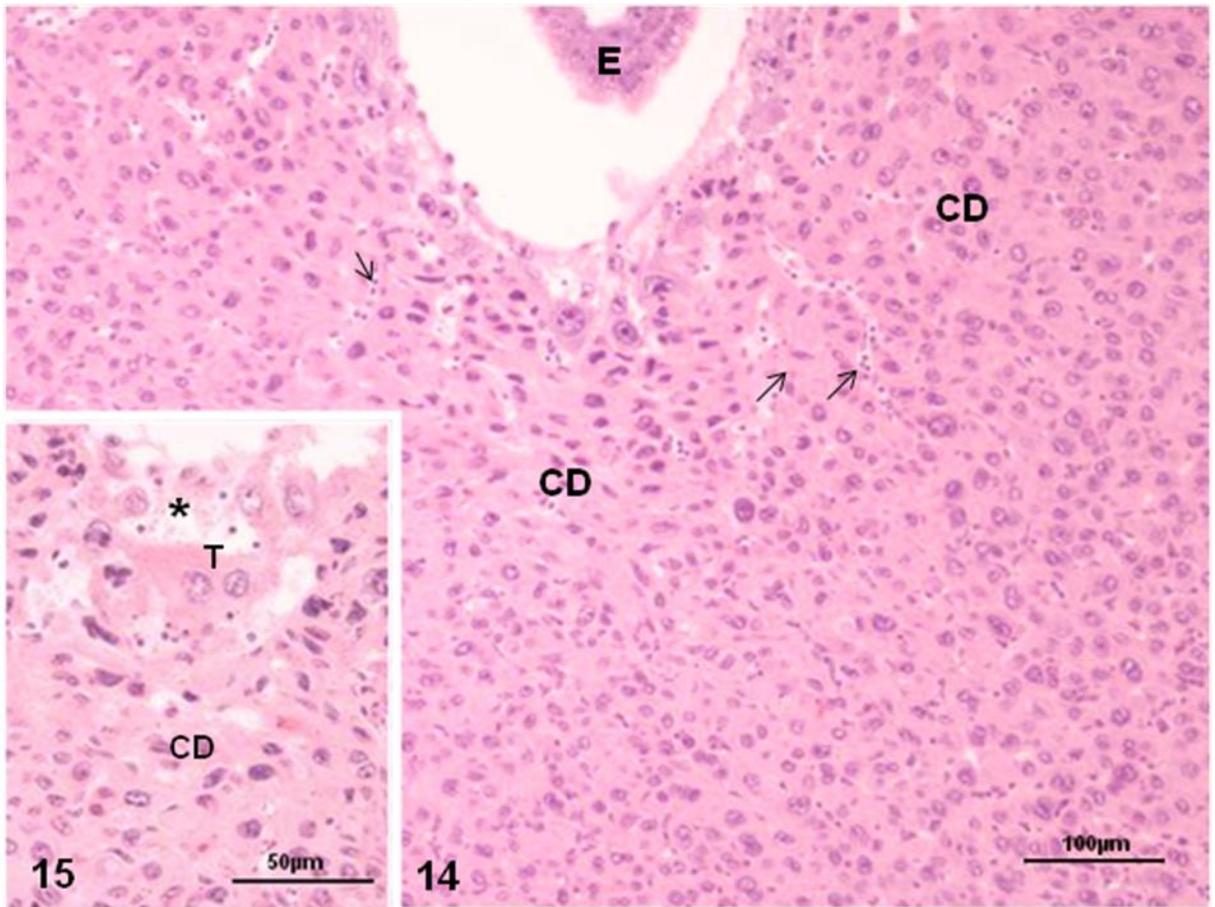
**Fig. 14.** Vista geral. Os tecidos materno e embrionário estavam organizados, apresentando células deciduais (CD) ocupando grande extensão do útero. Entre as células deciduais foi possível observar capilares sanguíneos (setas), muito comuns nessa região. Embrião (E).

**Fig. 15.** As células trofoblásticas gigantes (T), próximas e adjacentes às células deciduais maduras (CD), estavam em contato com os espaços contendo hemácias (\*).

**Fig. 16.** Na interface materno-embriônica, as células trofoblásticas gigantes (T) formavam uma camada contínua de células, em contato com uma das superfícies da membrana de Reichert (R).

**Fig. 17.** Detalhe de uma célula trofoblástica gigante exibindo núcleo com cromatina frouxa e citoplasma fracamente basófilo, adjacente a células deciduais. Polimorfonucleares (seta) foram encontrados em recessos ou concavidades das células trofoblásticas gigantes.

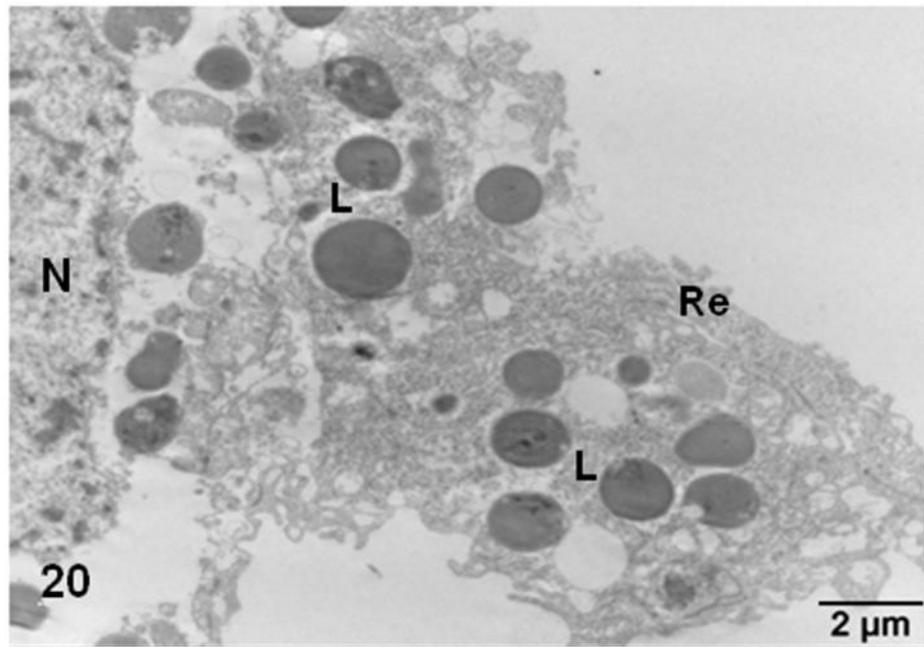
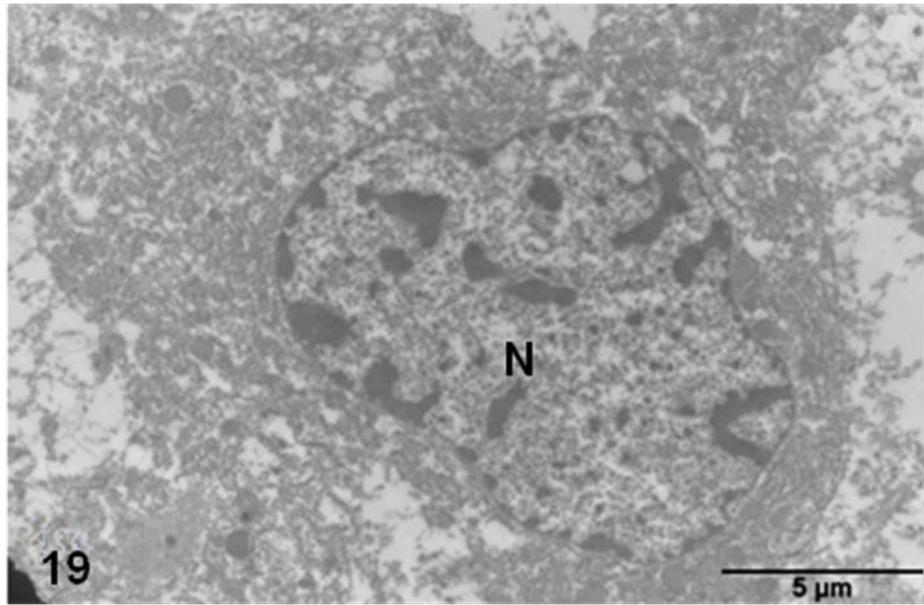
**Fig. 18.** Detalhe de uma região da interface mostrando um polimorfonuclear muito próximo à célula trofoblástica gigante (seta), ou já no interior desta célula (cabeça de seta).



Eletromicrografias da decídua antimesometrial de camundongos no 8,5<sup>o</sup>dp, pertencentes ao grupo que foi apenas tratado com veneno de *B.jararaca*.

**Fig. 19.** Célula decidual madura, da região da interface mãe-feto, em processo de morte celular. A membrana plasmática estava ausente e o citoplasma bastante desorganizado, não sendo mais possível reconhecer as organelas características dessa célula. O núcleo (N), apesar de presente, não apresentava o padrão de cromatina característico dessa célula.

**Fig. 20.** Célula trofoblástica gigante em processo de morte celular. Ainda era possível reconhecer o núcleo (N) e os lisossomos (L) presentes no citoplasma, desorganizado. Restos do retículo endoplasmático (Re).



Eletromicrografias da decídua antimesometrial de camundongos no 8,5<sup>o</sup>dp, pertencentes aos grupos VBj+SAB (Figs. 23, 24 e 25) e SaI+SAB (Figs. 21 e 22).

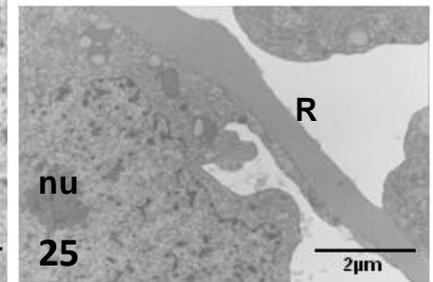
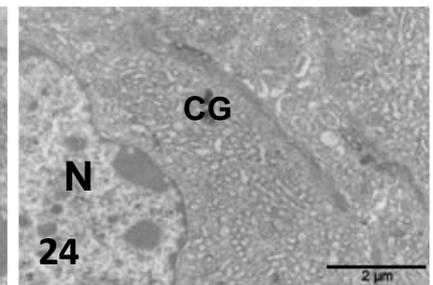
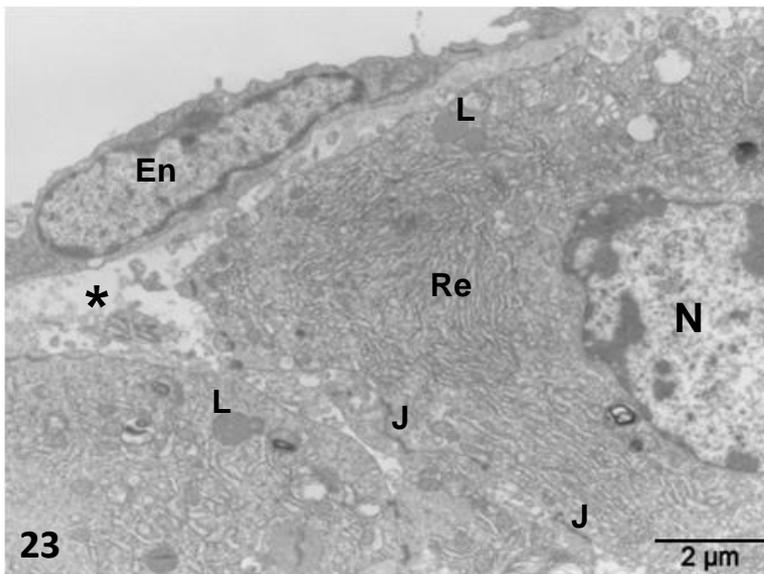
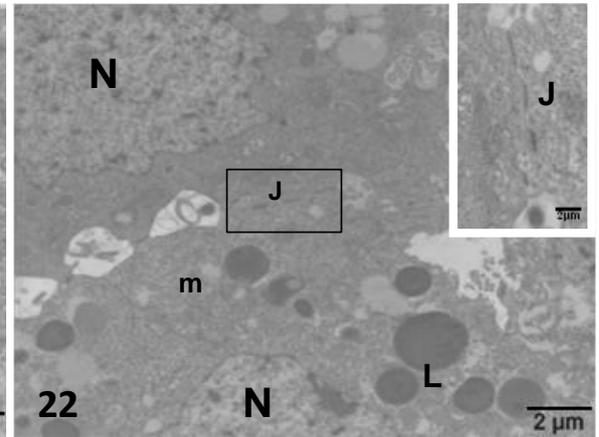
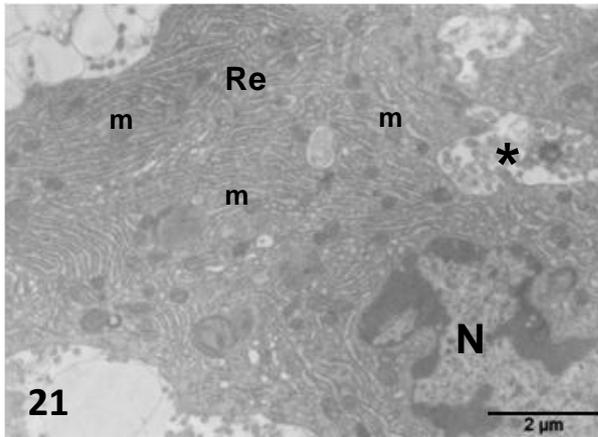
**Fig. 21.** Célula decidual pertencente à interface mãe-feto, exibindo núcleo irregular (N) e retículo endoplasmático (Re) bem desenvolvido, ocupando grande área do citoplasma. Entre as células deciduais foram observados espaços amplos (\*), preenchidos por microvilosidades e matriz extracelular. Mitocôndria (m).

**Fig. 22.** Parte de duas células trofoblásticas gigantes com núcleos (N) contendo cromatina frouxa e citoplasma com muitos lisossomos (L), de tamanhos variados. Notar a presença de junções (J) formadas por projeções citoplasmáticas, que são melhor observadas no inserto, no canto superior direito. Mitocôndria (m).

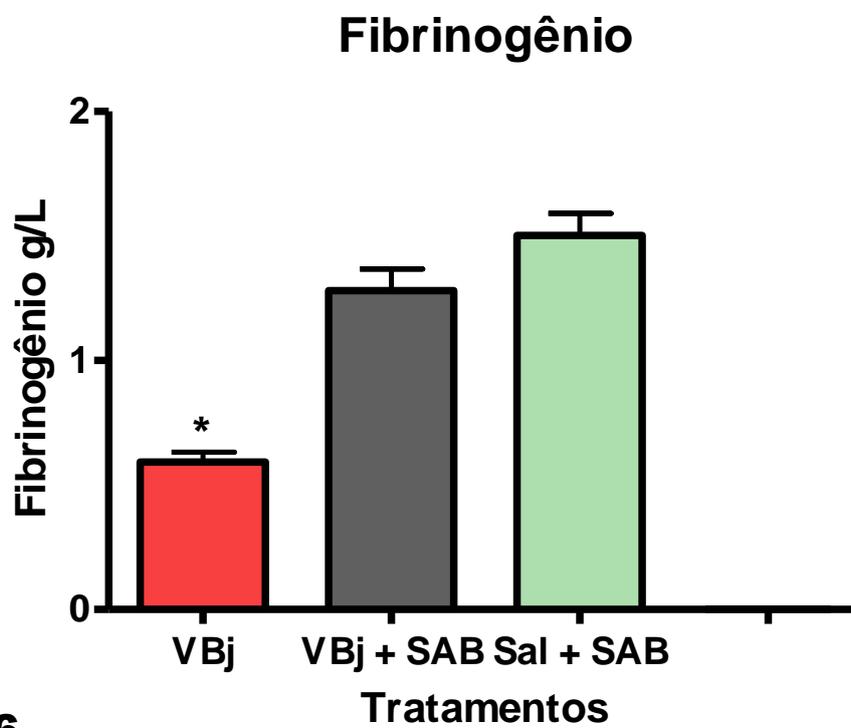
**Fig. 23.** Parte de duas células deciduais da região da interface materno-fetal, exibindo junções (J) entre elas. Uma célula endotelial (En), componente da parede de um capilar, também pode ser observada, próxima às células deciduais. Lisossomo (L). Espaço extracelular (estrela). Núcleo (N).

**Fig. 24.** Detalhe de uma célula decidual exibindo duas secções de complexo de Golgi (CG) bem desenvolvidos, no citoplasma. Núcleo (N).

**Fig. 25.** Detalhe de parte de uma célula trofoblástica gigante e um de seus prolongamentos em forma de delgada lâmina citoplasmática (seta), em contato íntimo com uma das superfícies da membrana de Reichert (R). Nucléolo (nu) proeminente também foi observado.



**Fig. 26.** Valores médios de fibrinogênio em camundongos no 8,5<sup>o</sup>dp tratados, no 7,5<sup>o</sup>dp, com salina ou veneno botrópico e submetidos ao soro antibotrópico, após 3 horas (Sal+SAB e VBj+SAB, respectivamente), e apenas tratados com veneno botrópico (VBj). Notar que houve redução no valor médio do fibrinogênio no grupo VBj, estatisticamente significativa, quando comparado com os outros dois grupos.



**26**

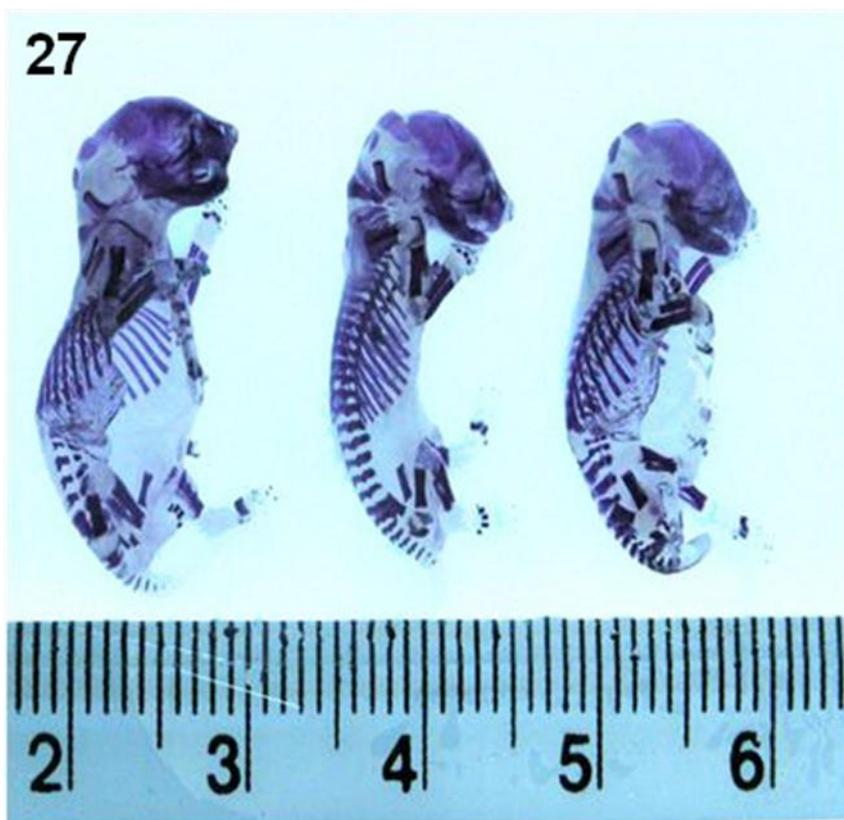
$p = < 0,001$

Os dados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

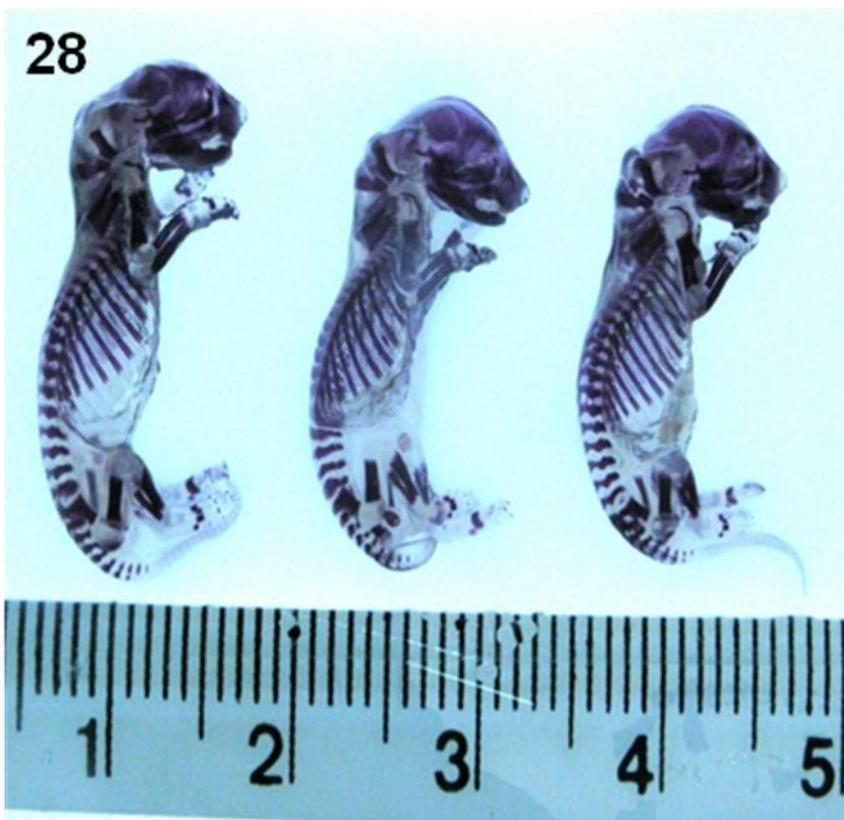
## **Análise esquelética**

**Figs. 27 e 28.** Fetos de camundongos diafanizados e corados com vermelho de alizarina S pertencentes a duas proles de mães a pré-termo (18,5<sup>o</sup>dp) que receberam, no 7,5<sup>o</sup>dp, veneno bruto de *B.jararaca* (Fig. 27) ou salina estéril (Fig. 28), e, após 3 horas, foram tratadas com soro antibotrópico. Notar que os fetos de ambos os grupos não apresentaram alterações esqueléticas e possuíam tamanhos homogêneos.

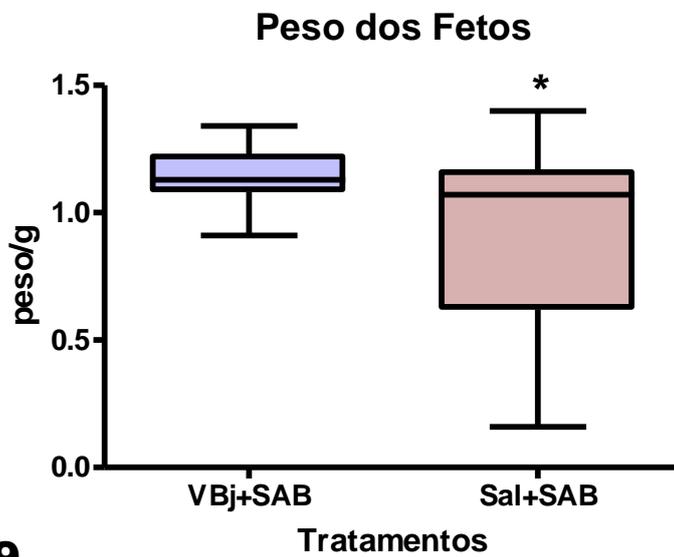
27



28



**Fig. 29.** Peso médio dos fetos no 18,5<sup>o</sup> dia de desenvolvimento. Notar que houve redução de peso entre os fetos pertencentes ao grupo Sal+SAB, estatisticamente significativo, quando comparado com o grupo VBj+SAB.

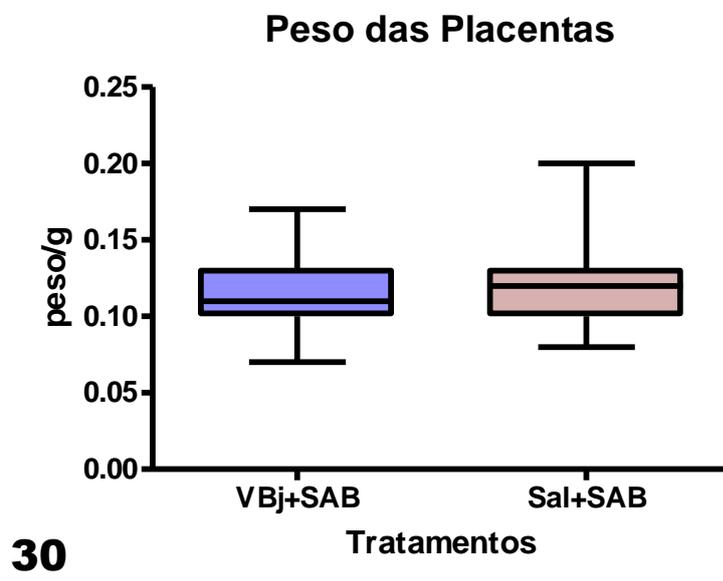


**29**

$p = 0,0005$

Os dados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

**Fig. 30.** Peso médio das placentas dos animais, no 18,5<sup>o</sup>dp, pertencentes aos dois grupos estudados. O peso das placentas era semelhante, nos dois grupos, não havendo diferença estatística.



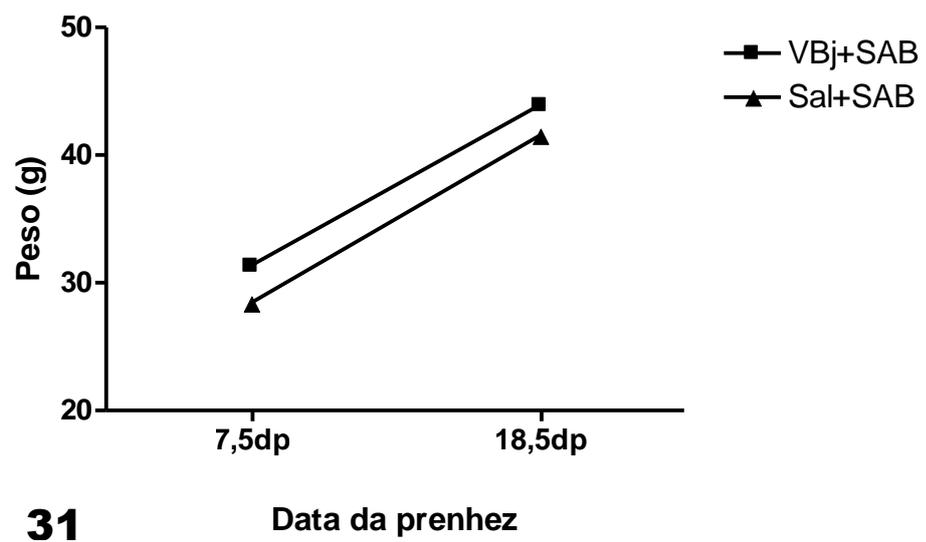
**30**

p= 0,9117

Os dados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

**Fig. 31.** Ganho de peso das mães nos grupos VBj+SAB e Sal+SAB, entre o 7,5<sup>o</sup> e o 18,5<sup>o</sup>dp. Notar que em ambos os grupos houve ganho de peso materno, no decorrer da prenhez, não havendo diferença significativa entre os mesmos.

### Ganho de peso materno



**31**

Data da prenhez

**Tabela 1** – Peso médio de camundongos no 7,5<sup>o</sup>dp e 18,5<sup>o</sup>dp pertencentes aos grupos de animais que receberam veneno de *B.jararaca* (VBj+SAB) ou salina estéril (Sal+SAB) e tratados, após 3h, com o soro antibotrópico (p=0,75).

	<b>7.5<sup>o</sup>dp (g)</b>	<b>18.5<sup>o</sup>dp (g)</b>	<b>Ganho médio de peso (g)</b>
<b>VBj+SAB (n= 11)</b>	32,35±4.69	47,02±6,75	14,67±4,41
<b>Sal+SAB (n= 11)</b>	28,42±2,28	41,53±4,56	13,11±3,2

## VI – Discussão

No presente trabalho, foi avaliada a eficácia do soro antivenenoso (SAB) em camundongos prenhes submetidos ao veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca* (Bj). Para tanto, o veneno foi administrado aos camundongos no 7,5º dia de prenhez (dp) e, após 3 horas, os animais foram tratados com o soro antivenenoso (grupo VBj+SAB). Como controle, um grupo de animais recebeu solução salina estéril e, após 3 horas, também foi submetido à soroterapia (grupo Sal+SAB). Ainda, foi incluído no planejamento experimental um grupo de animais que recebeu somente o veneno botrópico e não foi tratado com o soro (grupo VBj), com o objetivo precípua de avaliar a eficácia do lote de veneno de *B.jararaca*, comparando os resultados com os de Spadacci-Morena *et al.* (2006), que utilizaram o mesmo veneno.

Inicialmente, foi observado, nos 3 grupos estudados, que os tratamentos administrados não provocaram morte materna, estando os animais hígidos, 24 horas após os tratamentos. Com relação aos animais que receberam o veneno botrópico, a viabilidade dos mesmos era esperada, pois a dose utilizada (0,24mg de veneno de Bj/ kg de peso do animal – 10% da DL<sub>50</sub>) corresponde a um envenenamento leve a moderado. De acordo com Spadacci-Morena *et al.* (2006), que utilizaram a mesma dose, via de administração e dia de prenhez, o veneno botrópico não foi capaz de alterar os índices hematimétricos e nem alterar os valores de TP e TTPa, 24 horas após o envenenamento. Apesar disso, neste trabalho, assim como no trabalho dos autores acima citados, essa dose foi capaz de provocar alterações no nível plasmático de fibrinogênio nos animais.

Após 24 horas dos tratamentos, foi realizado o estudo histológico do útero, mais precisamente da região antimesometrial, pois, em camundongos no 8,5ºdp, a placenta definitiva (localizada na região mesometrial) ainda não está formada e funcional. Portanto, nessa fase da gestação, cabe à decídua antimesometrial a função de fazer as trocas gasosas e de nutrir os fetos (Krehbiel, 1937). Nessa fase do desenvolvimento gestacional, a decídua antimesometrial atinge um alto

grau de complexidade sendo essencial para o sucesso da prenhez (Bridgman, 1948; Velardo *et al.*, 1953; De Feo, 1967; Kleinfeld *et al.*, 1976; Finn, 1977; O'Shea *et al.*, 1983; Cinquetti & Rinaldi, 1987; Abrahamsohn & Zorn, 1993). Quanto ao embrião, no 8,5<sup>o</sup> dia de desenvolvimento, a organogênese está muito acelerada e os fetos são bastante susceptíveis a agentes teratogênicos (Rugh, 1968)

No nosso estudo, entre os animais pertencentes ao grupo VBj, os tecidos da interface materno-embriônica estavam desorganizados, com a presença de células decíduais necróticas, polimorfonucleares em grande quantidade e áreas hemorrágicas extensas. Vale ressaltar que neste período da prenhez é muito comum, na região antimesometrial, observar células decíduais próximas da interface materno-fetal em degeneração, entretanto, trata-se de uma morte programada, por apoptose, própria dessa fase da prenhez (Katz & Abrahamsohn, 1987; Correia da Silva *et al.*, 2004), e não uma morte patológica, por necrose. As células trofoblásticas gigantes também apresentaram características de células necróticas, exibindo morfologia diferente daquela encontrada na literatura (Katz & Abrahamsohn, 1987). Ultraestruturalmente, a presença, na interface materno-fetal, de células trofoblásticas gigantes e células decíduais maduras com membrana plasmática rompida ou ausente e citoplasma contendo organelas em degeneração ou, muitas vezes, não mais identificadas, confirmaram as observações da análise histológica, ao microscópio de luz. Esses achados são semelhantes àqueles descritos por Spadacci-Morena *et al.* (2006), que também submetem camundongos prenhes ao veneno de Bj. Esses autores discutem que, apesar de no 8,5<sup>o</sup>dp estar ocorrendo, naturalmente, regressão da decídua antimesometrial para promover o aumento do espaço para o feto em crescimento, as características histológicas acima citadas não são observadas, nessa fase de desenvolvimento da prenhez, em animais não submetidos a qualquer tipo de tratamento. Outros estudos também mostraram que a administração de veneno ofídico em diferentes animais, também no início da prenhez, causou frequentemente alterações no binômio mãe-feto que culminaram com aborto ou reabsorção fetal (Penn *et al.*, 1971; Clavert & Gabriel Robez, 1974; Mohamed & Nawar, 1975; Bauab *et al.*, 1997).

A grande quantidade de leucócitos polimorfonucleares no interior dos capilares, ao longo de toda a região ocupada pela decídua antimesometrial, nos leva a crer que eles estariam sendo recrutados para a região da interface materno-fetal, onde as características morfológicas, tais como, infiltrado leucocitário, edema e hemorragia, indicam a presença de um processo inflamatório. De acordo com Farsky *et al.* (1997), o recrutamento de leucócitos não é feito diretamente pelo veneno, mas indiretamente pela secreção ou ativação de componentes endógenos, como por exemplo, leucotrieno B<sub>4</sub> e tromboxano A<sub>2</sub>. As próprias células necróticas poderiam ativar o sistema complemento e gerar componentes quimiotáticos para atrair polimorfonucleares para essa região.

Em nossa pesquisa, os exames ao microscópio de luz e eletrônico de transmissão, da região antimesometrial uterina daqueles animais que receberam o veneno de Bj ou salina estéril e, após 3 horas, foram tratados pelo soro antibotrópico (grupos VBj+SAB e Sal+SAB, respectivamente) revelaram células deciduais maduras e trofoblásticas semelhantes àquelas já descritas na literatura (Bulmer & Dickson, 1961; Jollie & Bencosme, 1965; Enders & Schlafke, 1967; Finn & Lawn, 1967; Tachi *et al.*, 1970; Katz & Abrahamsohn, 1987; Abrahamsohn & Zorn, 1993; Bevilacqua & Abrahamsohn, 1988; 1989; 1994), e ausência de edema, foco hemorrágico e infiltrado leucocitário, em toda a extensão da decídua. Células deciduais maduras em degeneração, próximas ao embrião, foram notadas, mas faziam parte da involução natural da decídua antimesometrial (Welsh & Enders, 1985; Katz & Abrahamsohn, 1987).

Apesar da similaridade morfológica entre as células constituintes da interface materno-fetal, na região antimesometrial, descrita na literatura e aquela observada nos grupos VBj+SAB e Sal+SAB, uma discreta quantidade de polimorfonucleares foi observada tanto fora dos vasos, na região da interface mãe-feto, como no interior dos capilares presentes por toda a extensão da decídua antimesometrial. O recrutamento dos leucócitos pode ter ocorrido em decorrência de uma ação direta ou indireta do fenol, conservante presente no soro antibotrópico, que, de acordo com Zychar *et al.* (2008), tem a capacidade de aumentar a adesão leucocitária e sua subsequente migração para o tecido subjacente.

Por volta do 8,5<sup>o</sup>dp, a membrana de Reichert é a única barreira contínua que separa os tecidos materno e embrionário. Sua presença nesta região sugere que ela atue como uma barreira seletiva, permitindo a passagem de algumas moléculas, importantes para as trocas metabólicas entre o feto e a mãe, e impedindo a passagem de outras moléculas não necessárias ou até nocivas para o embrião (Jollie, 1968). Quando os animais receberam apenas o veneno da B<sub>j</sub> (Grupo VB<sub>j</sub>), muitas vezes a membrana de Reichert estava rompida, expondo, dessa forma, o embrião aos agentes deletérios resultantes do envenenamento materno, que provavelmente culminaram com a reabsorção fetal, ou mesmo com a diminuição dos tamanhos e pesos dos fetos a pré-termo. Já nos animais que foram tratados com o soro (Grupos VB<sub>j</sub>+SAB e Sal+SAB), a membrana de Reichert estava íntegra, mostrando dessa forma que o soro foi capaz de preservar a membrana, protegendo, dessa forma, o embrião.

Os resultados observados nesses 2 grupos de animais mostraram que, apesar do SAB ser produzido a partir de imunoglobulinas de cavalos, ele não foi capaz de provocar alterações morfológicas importantes na decídua antimesometrial, 24 horas após a soroterapia.

Acidentes com serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* provocam hipofibrinogenemia ou mesmo afibrinogenemia em humanos (Rosenfeld, 1971; Kamiguti *et al.*, 1986; Maruyama *et al.*, 1990; Cardoso *et al.*, 1993), em mulheres grávidas (Zugaib *et al.*, 1985; Otero *et al.*, 1992; Otero *et al.*, 2002) e, experimentalmente, em animais que receberam veneno botrópico (Sano-Martins *et al.*, 1995; Fernandes *et al.*, 2000; Santoro & Sano-Martins, 2004; Spadacci-Morena *et al.*, 2006). O consumo parcial ou total do fibrinogênio é devido à ativação dos fatores da coagulação – principalmente os fatores X, II e I – presentes nos venenos botrópicos (Kamiguti & Cardoso, 1989; Kamiguti & Sano-Martins, 1995).

A importância do fibrinogênio na manutenção da gestação tem sido extensivamente discutida, tanto em humanos (Nelson *et al.*, 2001; 2002; Inbal & Muszbek, 2003) como em animais (Sueh *et al.*, 1995; Iwaki *et al.*, 2002), mostrando uma íntima associação entre a diminuição ou ausência de fibrinogênio materno e perda fetal.

No nosso estudo, os níveis plasmáticos de fibrinogênio (Fg) nos grupos Sal+SAB e VBj+SAB eram semelhantes entre si e ao reportado por Iwaki *et al.* (2002) para camundongos prenhes que não receberam nenhum tratamento. Ainda de acordo com esses autores, essa quantidade de Fg materno é suficiente para manter a gestação. De fato, nos nossos animais no 8,5<sup>o</sup>dp, a decídua antimesometrial encontrava-se organizada o que, possivelmente, contribuiu para recém-nascidos saudáveis, como será discutido adiante. Já entre os animais que receberam o veneno botrópico e não foram submetidos à soroterapia, houve diminuição do Fg plasmático materno e a decídua se apresentou com morfologia bastante alterada. Spadacci-Morena (2005), utilizando o mesmo protocolo nosso, observou uma maior incidência de reabsorção fetal entre camundongos prenhes submetidos ao veneno botrópico, quando comparado com o grupo controle que foi tratado somente com salina. De acordo com Iwaki *et al.* (2002) a presença de fibrinogênio materno é importante para a estabilização da matriz extracelular, na interface materno-fetal, onde o fibrinogênio se liga a fibronectina e/ou a integrina  $\alpha_5\beta_1$  (Suehiro *et al.*, 2000). Possivelmente, a diminuição do fibrinogênio plasmático entre os animais pertencentes ao grupo VBj, poderia ter provocado a sua diminuição também na matriz extracelular, levando à destruição da sua integridade.

Neste trabalho, ficou claro que o SAB foi capaz de restabelecer o Fg plasmático nas mães, mostrando a eficácia da soroterapia. Anteriormente, Sano-Martins *et al.* (1995) também mostraram a eficácia do SAB no restabelecimento do fibrinogênio plasmático, em cães submetidos, experimentalmente, ao envenenamento por *B.jararaca*.

Com o objetivo de avaliarmos o índice de sobrevivência fetal, as características externas e esqueléticas dos fetos, o peso materno ao longo da gestação e o peso da placenta, parte dos animais pertencentes aos grupos VBj+SAB e Sal+SAB foram levados à pré-termo. Os parâmetros acima citados foram analisados com o objetivo de relacioná-los com o tratamento com o soro antitotrópico.

Com relação a esses animais que foram a pré-termo, não houve morte ou sinal de toxicidade entre os animais pertencentes a ambos os grupos. Todos os animais, independente do grupo a que pertenciam, ganharam peso ao longo da gestação, mostrando que os tratamentos não foram capazes de provocar

alterações fisiológicas importantes. As placentas, em ambos os grupos, apresentaram pesos semelhantes, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos. Esses resultados mostraram que o SAB protegeu as mães de possíveis efeitos deletérios provocados pelo veneno e que o soro *per se* não provocou nenhuma reação adversa nas mães.

Experimentalmente, animais prenhes tratados com diferentes venenos ofídicos podem apresentar interrupção da gestação (Penn *et al.*, 1971; Clavert & Gabriel-Robez, 1974; Mohamed & Nawar, 1975; Gabriel-Robez & Clavert, 1980; Bauab *et al.*, 1997). Especificamente envolvendo envenenamento por *B.jararaca*, Spadacci-Morena (2005) mostrou que em animais submetidos ao veneno de Bj e que foram a pré-termo, o número de regressões ocorridas era maior nesse grupo, quando comparado com o grupo controle, submetido à salina. No nosso estudo, no 18,5<sup>o</sup>dp, em ambos os grupos, foram observados animais onde ocorreu regressão total da prenhez ou regressões pontuais, ao longo dos cornos uterinos, entretanto a análise estatística mostrou não haver diferença significativa entre os grupos. Portanto, nestes casos, as regressões devem estar relacionadas com o estresse provocado pela manipulação dos animais e não pelo tratamento a que os animais foram submetidos. Possivelmente, a manutenção da gestação se deve ao tratamento com o soro, que foi capaz de restabelecer o fibrinogênio plasmático materno e de preservar a morfologia uterina, mais especificamente da decídua antimesometrial, fatores estes decisivos para o desenvolvimento de embriões viáveis.

Em nossa investigação, não foram observadas alterações externas e esqueléticas nos dois grupos estudados. Spadacci-Morena (2005) também não notou essas alterações em animais que receberam o veneno da Bj, entretanto examinando separadamente as ninhadas de mães que haviam recebido o veneno botrópico, esse autor notou que os fetos dessas ninhadas apresentavam tamanhos bastante heterogêneos, quando comparados com fetos de ninhadas pertencentes ao grupo controle. No nosso estudo, dentro de uma mesma ninhada, os fetos pertencentes a ambos os grupos apresentavam tamanhos homogêneos e pesos semelhantes. Estes resultados mostram que o SAB foi capaz de preservar o desenvolvimento dos fetos, sem causar reações adversas dentro de uma mesma ninhada.

Ainda com relação aos fetos, nosso estudo mostrou que havia uma diminuição do peso médio corpóreo dos fetos pertencentes ao grupo Sal+SAB, quando comparado com o grupo VBj+SAB. É possível que o soro, não estando associado ao veneno, circule livremente no organismo materno e chegue na região antimesometrial, ou mesmo na região mesometrial, onde a placenta está sendo desenvolvida, provocando alguma reação que poderia comprometer o ganho de peso fetal.

O estudo histológico da decídua mesometrial, que contribui para a formação da placenta, está em andamento, utilizando como modelo camundongos submetidos ao veneno botrópico e tratados com soro.

## VII - Considerações finais

- 1- O soro antibotrópico não provocou nenhuma reação do tipo anafilactóide, entre os camundongos prenhes, que permaneceram hígidos durante todo o período experimental;
- 2- Na região antimesometrial, no 8,5<sup>o</sup>dp, os sítios de implantação dos animais em que o veneno da *B. jararaca* foi administrado e, após 3 horas, ocorreu o tratamento com o soro (VBj+SAB), a região da interface materno-fetal manteve-se organizada à semelhança do observado no grupo Sal+SAB;
- 3- Igualmente, em relação ao embrião, nos animais do grupo VBj+SAB, o soro antibotrópico foi capaz de manter a morfologia das células trofoblásticas gigantes e da membrana de Reichert, à semelhança do observado entre os animais do grupo Sal+SAB;
- 4- Os animais do grupo VBj, apresentaram, macroscopicamente, úteros com características semelhantes aos de animais prenhes saudáveis, mas isto não ocorreu microscopicamente, com o aparecimento de dissociação, degeneração e morte celular na interface materno-embrionária;
- 5- Entre os animais que receberam o veneno de Bj e que foram tratados, posteriormente, com o soro antibotrópico (grupo VBj+SAB), o nível plasmático de fibrinogênio materno era semelhante àquele observado entre os animais do grupo Sal+SAB, 24 horas após o tratamento, isto é, no 8,5<sup>o</sup>dp. O veneno da *B. jararaca* provocou a diminuição do valor do fibrinogênio plasmático materno no grupo VBj, que foi significativa, quando estatisticamente comparado com os valores do fibrinogênio nos outros dois grupos;
- 6- Entre os animais que foram a pré-termo, os fetos não apresentaram alteração externa ou esquelética em ambos os grupos estudados (VBj+SAB e Sal+SAB);
- 7- Ainda entre os fetos no 18,5<sup>o</sup> dia de desenvolvimento, não houve prevalência de reabsorções fetais entre os grupos VBj+SAB e Sal+SAB;
- 8- O soro antibotrópico foi capaz de provocar a redução do peso dos fetos à pré-termo, pertencentes ao grupo Sal+SAB.

## VIII - Conclusão

Os resultados apresentados neste estudo permitem concluir que a administração do soro antibotrópico, 3 horas após o envenenamento, foi capaz de preservar a prenhez, não provocando reações adversas nas mães e prejuízo no desenvolvimento fetal. Ainda, o soro *per se* não provocou nenhuma alteração morfológica uterina que pudesse provocar reabsorção fetal.

Em conjunto, este trabalho reforça que o soro antibotrópico deve ser administrado, mesmo quando não há sinais aparentes de envenenamento.

## IX - Referências Bibliográficas

Abrahamsohn PA. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. *Anat. Embryol.* 1983; 166: 263-274.

Abrahamsohn PA, Zorn TMT. Implantation and decidualization in rodents. *J. Exp. Zool.* 1993; 266: 603-628.

Ahmed YY, El-Din MN, Mohamed AH, Moustafa FA. Effect of cobra venom on the chick embryo. *Toxicon* 1974; 12: 325.

Alberto-Rincon MC, Zorn TMT, Abrahamsohn PA. Diameter increase of collagen fibrils of the mouse endometrium during decidualization. *Am. J. Anat.* 1989; 186: 417-429.

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.

Amaral CFS, Rezende NA, Silva AO, *et al.* Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico: Análise de 63 casos. *Rev. Inst. Med. Trop.* 1986; 28(4): 220-27.

Amaral CFS, Dourado HV, Kouyoumdjian JA, Cardoso JL, Campos JA, Azevedo-Marques M., Lopes PFA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde 1987; 53p.

Andrade CGTJ, Zorn TMT, Abrahamsohn PA. Estudo ultra-estrutural da formação da decídua em animais pseudo-grávidos. 13th Meeting, Brazilian Society of Electron Microscopy 1991.

Anthony J. Essai sur l'évolution anatomique de l'appareil venimeux des ophidiens. *Ann. Sci. Natur. Zoo.* 1955; 17:7-53.

Araujo AS, Lobato ZIP, Chavez-Olortegui C, Velarde DT. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. *Toxicon* 2010; 55:739-744.

Armant DR, Wang J, Liu Z. Intracellular signaling in the developing blastocyst as a consequence of the maternal-embryonic dialogue. *Seminars in Reproductive Medicine* 2000; 18: 273-287.

Azevedo-Marques MM, Cupo P, Hering SE. Acidentes por animais peçonhentos. *Medicina, Ribeirão Preto* 1992; 25:539-554.

Batellino C, Piazza R, da Silva AMM, Cury Y, Farsky SHP. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 2003; 41:583-593.

Bauab FA, Brites VL, Cury MBS, Andrade ED, Matheus RCS. Efeitos de venenos ofídicos sobre a gestação. 2º Encontro Nacional de Acidentes com Animais Peçonhentos, Rio Grande do Sul, Brasil 1997; 31p.

Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the Human Placenta Springer Verlag, London 1995.

Bevilacqua EMAF, Abrahamsohn PA. Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of mouse embryo. J. Morphol. 1988; 198: 341-351.

Bevilacqua EMAF, Abrahamsohn PA. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. Arch. Biol. Med. Exp. 1989; 22: 107-118

Bevilacqua E, Abrahamsohn PA. Invasiveness of mouse trophoblastic cells in connective tissue. Acta. Anat. (Basel) 1994; 150(4): 246-52.

Bhat RN. Viperine snakebite poisoning in Jammu. J. Indian. Med. Assoc. 1974; 63: 383-392.

Billington WD. Biology of the trophoblast. Adv. Repr. Physiol. 1971; 5: 27-66.

Bjarnason J, Fox JW. Hemorrhagic toxins snake venoms. Journal Toxicology-Toxin Reviews 1988/89; 7: 121-209.

Blakenship TN, Given RL, Parkening TA. Blastocyst implantation in the Chinese hamster. Am. J. Anat. 1990; 187(2): 137-57.

Bochner R. Acidentes por animais peçonhentos: aspectos históricos, epidemiológicos, ambientais e sócio-econômicos. Tese apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca como requisito à obtenção do Título de Doutor em Saúde Pública. Rio de Janeiro. 2003.

Bochner R, Struchiner CJ. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. Cad. Saúde Pública 2003; 19(1): 7-16.

Bolaños R, Cerdas L. Produccion y control de sueros antiofídicos en Costa Rica. Biol. Of. Sanit. Panam. 1980; 88:189-196.

Bonfim VL, Toyama MH, Novello JC, Hyslop S, Oliveira CR, Rodrigues-Simioni L, *et al.* Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom. J. Protein. Chem. Apr. 2001; 20(3): 239-45.

Borland RM, Tasca RJ. Activation of a Na<sup>+</sup>-dependent amino acid transport system in preimplantation mouse embryos. Dev. Biol. 1974; 36(1): 169-82.

Boving BG. Biochemicals of implantation. In: The biology of the blastocist. Blandau, R.J., ed. The University of Chicago Press, Chicago 1971; 423-442.

Brazil V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. Revista Médica de São Paulo 1901; IV: 255-260.

Bridgman J. A morphological study of the development of the placenta of the rat; an histological and cytological study of the development of the chorioallantoic placenta of the white rat. J. Morphol. 1948; 83(2): 195-223.

Bulmer D, Dickson AD. The fibrinoid capsule of the rat placenta and the disappearance of the decidua. J. Anat. 1961; 95(3): 300-10.

Calmette A. Contribution a` l'e`tude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. Ann. Inst. Pasteur 1894; 8, 275–277.

Calvete JJ. Antivenomics and venom phenotyping: A marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. Toxicon 2010; 56: 1284-1291.

Camargo ANF. Os impasses da pesquisa microbiológica e as políticas de saúde pública em São Paulo (1892 a 1934) [Dissertação de Mestrado em Educação]. Faculdade de Educação, Unicamp. 1984.

Cardoso JL. Ofidismo. Aracneísmo. Escorpionismo. Epidemiologia. Patogenia e clínica. Diagnóstico e Terapêutica. In: Soerensen, B. (Ed.). Animais Peçonhentos. Reconhecimento. Distribuição geográfica. Produção de soros, clínica e tratamento dos envenenamentos. Atheneu, Rio de Janeiro 1990; 109-138pp.

Cardoso JL, Fan HM, França FO, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, Avila A, Sano-Martins IS, Tomy SC, Santoro ML. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. Q. J. Méd. 1993; 86: 315 – 325.

Cardoso JLC. José de Anchieta e as Cartas. In: Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes (J. L. Cardoso *et al.*) 2003; p. 456-457, São Paulo: Sarvier.

Caron EJ, Manock SR, Maudlin J, Koleski J, Theakston RDG, Warrel DA, Smalligan RD. Apparent marked reduction in early antivenom reactions compared to historical controls: Was it prophylaxis or method of administration? Toxicon 2009; 54: 779-783.

Carson DC, Dutt A, Tang JP. Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: Hyaluronate synthesis and function. Dev. Biol. 1987; 120: 228-235.

Castro I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. O mundo da saúde São Paulo 2006; 30(4): 644-653.

Chaves F, Loría GD, Salazar A, Gutiérrez JM. Intramuscular administration of antivenoms in experimental envenomation by *Bothrops asper*: comparison between Fab and IgG. *Toxicon* 2003; 41: 237-244.

Chen JC, Lin JH, Jow GM, Peng, YI, Su TH, Tsai YF, Chen TJ. Involvement of apoptosis during deciduomal regression in pseudopregnant hamsters. Effect of progesterone. *Life Sciences* 2001; 68: 815-825.

Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 1991; 29: 1279-1303.

Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 1998; 36(6): 823-846.

Cinquetti R, Rinaldi L. Regression of the basal decidua and changes in the sub-decidual region in the mouse. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* 1987; 92(2): 115-28.

Clavert J, Gabriel-Robez O. Anomalies de la face déterminées chez l'embryon de souris par l'injection de venin de vipère (*Vipera aspis*) à la femelle gestante. *Bull. Ass. Anat.* 1971; 151: 289.

Clavert J, Gabriel-Robez O. The effects on mouse gestation and embryo development of an injection of viper venom (*Vipera aspis*). *Acta. Anat. (Basel)* 1974; 88: 11 – 21.

Coborn J. The atlas of snakes of the world. Neptune City: TFH Publications 1991; p. 591.

Correia-da-Silva G, Bell SC, Pringle JH, Teixeira NA. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. *Placenta* 2004; 25: 538-547.

Costa EP, Clissa PB, Teixeira CF, Moura-da-Silva AM. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. *Inflammation* 2002; 26(1): 13-7.

Crainie ML, Guilbert MA, Wegmann TG. Expression of novel cytokine transcript in the murine placenta. *Biol. Reprod.* 1990; 43: 999-1005.

Croze F, Kennedy TG, Schroedter IC, Friesen HG, Murphy LJ. Expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in the rat uterus during decidualization. *Endocrinology* 1990; 127: 1995-2000.

Cupo P, Azevedo MM, Hering SE *et al.* Acidentes ofídicos: Análise de 102 casos. Livro de Resumos do XXI Congresso da Soc. Bras. Med. Trop. 1990; p.23-24.

Cupo P, Azevedo-Marques MM, de Menezes JB, Hering SE. Reações de hipersensibilidade imediatas após uso intravenoso de soros antivenenos: valor

prognóstico dos testes de sensibilidade intradérmicos. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 1991; 33(2): 115-22.

Daltry JC, Wuster W, Thorpe RS. Diet and snake venom evolution. Nature. 1996; 379(6565): 537-40.

Dart RC, McNally J. Efficacy, safety, and use of snake antivenoms in the United States. Ann Emerg Med 2001; 37: 181-188.

Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrum M, Andrews GK, Dey SK. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. Development 1994; 120: 1071-83.

De Feo VJ. Decidualization. In: Wynn, R.M., ed. Cellular biology of the uterus. Amsterdam: North Holland 1967; 192-291.

Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. Endocr. Rev. 2004; 25:341–373.

Domingos MO, Takehara HA, Lang G, Snowden KF, Sells PG, Mota I, Theakston RDG. Detection and neutralization of *B. jararaca* venom in mice. Braz. J. Med. Biol. Res. 1994; 27(11): 2613-2622.

Ducibella T, Albertini DF, Anderson E, Biggers JD. The preimplantation mammalian embryo: characterization of intercellular junctions and their appearance during development. Dev. Biol. 1975; 45(2): 231-50.

Dunnihoo DR, Rush BM, Wise RB, Brooks GG, Otterson WN. Snake bite poisoning in pregnancy. J. Reprod. Med. 1992; 37, 653-658.

Duru M, Helvacı M, Peker E, Dolapcioglu K, Kaya E. Reptile bite in pregnancy. Hum. Exp. Toxicol. 2008; 27: 931–932.

Eichbaum FW. Ação dermatotóxica de venenos ofídicos e sua neutralização pelos antivenenos. Mem. Inst. Butantan 1947; 20: 79.

El Hessy H, Abdel Rahman S, Iskander F, Nassar A, El Maghraby M. Experimental study on developing rat kidney alter *Naja haje* envenomation. Acta. Anat. (Basel) 1987; 128: 217 – 226.

Enders AC. Anatomical aspects of implantation. J. Reprod. Fertil. 1976; Suppl. 25: 1-15.

Enders AC. Trophoblast-uterine interactions in the first days of implantation: models for the study of implantation events in the human. Seminars in Reproductive Medicine 2000; 18: 255-263.

Enders AC, Schlafke S. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Amer. J. Anat.* 1967; 120: 185-226.

Entman SS, Moise KJ. Anaphylaxis in pregnancy. *Southern Medical Journal* 1984; 77(3): 402.

Fainstat T. Extracellular studies of uterus I. Disappearance of the discrete bundles in endometrial stroma during various reproductive stages in the rat. *Am. J. Anat.* 1963; 112: 337-370.

Fan HW. Soroterapia. In: *Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.* ed. Cardoso, J.L.C. e cols.2003; p. 380-393. Sarvier, São Paulo.

Farsky SH, Walber J, Costa-Cruz M, Cury Y, Teixeira CF. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: In vivo and in vitro studies. *Toxicon* 1997; 35: 185-193.

Fazleabas AT, Kim JJ, Strakova Z. Implantation: Embryonic signals and the modulation of the uterine environment – A review. *Placenta* 2004; 25 (Suppl), 18: S26-S31.

Fernandes I, Tavares FL, Sano-Martins IS, Takehara HA. Efficacy of bothropic antivenom and its IgG(T) fraction in restoring fibrinogen levels of *Bothrops jararaca* envenomed mice. *Toxicon* 2000; 38: 995-998.

Filho AA. Acidentes provocados por animais peçonhentos. In: *Ratton ILA. (ed). Medicina Intensiva, 2ª ed.* São Paulo, Ed. Atheneu 1997; 574-79.

Finn CA, Keen PM. The induction of deciduomata in the rat. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1963; 11: 673-82.

Finn CA, Lawn AM. Specialized junctions between decidual cells in the uterus of the pregnant mouse. *J. Ultrastruct. Res.* 1967; 20(5): 321-7.

Finn CA, McLaren A. A study of the early stages of implantation in mice. *J. Reprod. Fertil.* 1967; 13(2): 259-67.

Finn CA. The biology of decidual cells. *Adv. Reprod. Physiol.* 1971; 5: 1-26.

Finn CA. The implantation reaction. In: *Biology of the uterus.* R.M. Wynn, ed. Plenum Press, New York 1977; p.245-308.

França FOS, Fan HW. Soroterapia. In: *Schvartsman, S. (ed.) Plantas venenosas e animais peçonhentos.* Sarvier, São Paulo. 2ª edição 1992; p. 176.

França FOS, Málaque CMS. Acidente botrópico. In: *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.* Cardoso, JLC; França, FOS; Wen, FH; Málaque CMS; Haddad jr, V. 2ªed. 2009; p.81-83.

Franco FL. Origem e diversidade das serpentes. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier 2003; 3: 13-32.

Friederich C, Tu AT. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. *Biochem. Pharmac.* 1971; 20: 1549-1556.

Fritz H, Hess R. Ossification of the rat and mouse skeleton in the perinatal period. *Teratology* 1970; 3: 331-338.

Furtado MF. Contribuição ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* em função da idade das serpentes [Tese Doutorado]. Universidade de São Paulo, 1987.

Furtado MFD, Maruyama M, Kamiguti AS, Antonio LC. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon* 1991; 29: 219-226.

Gabriel-Robez O, Clavert J. Action d'une injection de venin de vipère (*Vipera aspis*) à la souris gestante sur la formation des embryons. *C.r. Sèanc. Soc. Biol.* 1969; 163: 1576.

Gabriel-Robez O, Clavert J. Teratogenic and lethal properties of the various fractions of venom of the viper, *Vipera aspis*. *Acta Anat. (Basel)* 1980; 108: 226-229.

Glasser SR, Lampelo S, Munir MI, Julian J. Expression of desmin, laminin and fibronectin during in situ differentiation of rat uterine stromal cells. *Differentiation* 1987; 35: 132-142.

Godbole G, Suman P, Gupta SK, Modi D. Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion. *Fertility and Sterility* 2010; 95(4): 1278-1283.

Gutierrez JM, Chaves F, Bolaños R, Cerdas L, Rodas E, Arroyo O, Portilla E. Neutralization de los efectos locales del veneno de *Bothrops riper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 1981; 19: 493.

Gutiérrez JM, Chaves F, Cerdas L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. *Rev. Biol. Trop.* 1986b; 34: 209 – 214.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan* 1989; 51(4): 211-223.

Gutiérrez JM, León G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 1998; 36(11): 1529-1538.

Gutiérrez JM, Higashi HG, Wen FH, Burnouf T. Strengthening antivenom production in Central and South American public laboratories: Report of a workshop. *Toxicon* 2007; 49: 30-35.

Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, Ângulo Y, Calvete JJ. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J. Proteomics* 2009; 72: 165-182.

Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW, Warrell DA. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon* 2010; 56: 1223-1235.

Guzeloglu-Kayisli O. Basic aspects of implantation. *Reproductive BioMedicine Online* 2007; 15(6): 728-739.

Habib AG, Abubakar SB, Abubakar IS, Larnyang S, Durfa N, Nassidi A, Yusuf PO, Garnvwa J, Theakston RDG, Salako L, Warrel DA. Envenoming after carpet viper bite during pregnancy: timely use of effective antivenom improves maternal and foetal outcomes. *Tropical Medicine and International Health* 2008; 13(9): 1172-1175.

Hall K. Uterine mitosis, alkaline phosphatase and adenosine triphosphatase during development and regression of deciduomata in pseudopregnant mice. *J. Endocrinol.* 1969; 44: 91-100.

Han VKM, Hunter S, Pratt RM, Zendengui JG, Lee DE. Expression of rat transforming growth factor alpha mRNA during development occurs predominantly in the maternal deciduas. *Mol. Cell. Biol.* 1987; 7: 2335-2343.

Hessel B, Blomback M. The proteolytic action of the snake venom enzymes Arvin and reptilase on N-terminal chain-fragments of human fibrinogen. *FEBS. Lett* 1971; 18: 318-320.

Hider RC, Karlsson E, Namiranian S. Separation and purification of toxins from snake venom. In: *Snake toxins*, ed. Harvey, AL, 1-34. New York: Pergamon Press, 1991.

Hillman N, Sherman MI, Graham CF. The effect of spatial arrangement on cell determination during mouse development. *Embryol. Exp. Morph.* 1972; 28: 263-278.

Hoge AR, Romano SA. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil – serpentes *Elapidae* e *Viperidae*. *Mem. Inst. Butantan* 1972; 36: 181 – 188.

Hoge AR, Romano Hoge SARWL. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. 2ª edição. *Mem. Inst. But.* 1978/79; 42/43: 373-497.

Homsi-Bradeburgo MI, Queiroz LS, Santo-Neto H, Rodrigues-Simioni L, Giglio JR. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 1988; 26(7): 615-27.

Horovitz DDG, Llerena JC Jr., de Mattos RA. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 2005; 21(4): 1055-1064.

Inamoto Y, Terao T. First report of case of congenital afibrinogenemia with successful delivery. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1985; 153: 803 – 804.

Inbal A, Muszbek L. Coagulation factor deficiencies and pregnancy loss. *Semin. Thromb. Hemost.* 2003; 29: 171 – 174.

Iwaki T, Sandoval-Cooper MJ, Paiva M, Kobayashi T, Ploplis VA, Castellino FJ. Fibrinogen stabilizes placental-maternal attachment during embryonic development in the mouse. *Am. J. Pathol.* 2002; 160: 1021-1034.

Iwanaga S, Suzuki T. Enzymes in snake venom, p.684-750. In: C.Y.Lee (Ed.). *Snake Venoms*. Berlin, Springer-Verlag 1979; p.1129.

Irwin JC, Suen LF, Faessen GH, Popovici RM, Giudice LC. Insulin-like growth factor (IGF)-II inhibition of endometrial stromal cell tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and IGF-binding protein-1 suggest paracrine interactions at the deciduas:trophoblast interface during human implantation. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 2001; 86(5): 2060-2064.

Jadhav SS, Kapre SV. Antivenom production in India. *Handbook of natural toxins*, 5, Reptil and amphibian venoms 1991; 584-608.

James RF. Snake bite in pregnancy. *The Lancet* 1985; 28: 731.

Jiang Y, Hu Y, Zhao J, Zhen X, Yan G, Sun H. The orphan nuclear receptor Nur77 regulates decidual prolactin expression in human endometrial stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011; 404: 628-633.

Jollie WP. Changes in the fine structure of the parietal yolk sac of the rat placenta with increasing gestational age. *Am. J. Anat.* 1968; 122(3): 513-531.

Jollie WP, Bencosme SA. Electron microscopic observations on primary decidua formation in the rat. *Am. J. Anat.* 1965; 116: 217-36.

Jorge MT, Ribeiro LA. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev. Ass. Med. Bras.* 1990; 36: 66-77.

Jorge MT, Cardoso JLC, Castro SCB, Ribeiro L, França FOS, Almeida ME, Kamiguti AS, Sano-Martins IS, Santoro ML, Mancau JEC, Warrel DA, Theakston RDG. A randomized blinded comparison of two doses of antivenom in the

treatment of *Bothrops* envenoming in São Paulo, Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1995; 89(1): 111-114.

Kalter H, Warkany J. Congenital malformations. N. Engl. J. Med. 1983; 308(9): 491-7.

Kamiguti AS, Sousa e Silva MC, Morena P, Nahas L. The anticoagulant effect of *Bothrops castelnaudi* snake venom. Toxicon 1985; 23(3): 383-91.

Kamiguti AS, Matsunaga S, Spir M, Sano-Martins IS, Nahas L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. Braz. J. Med. Biol. Res. 1986; 19: 199 – 204.

Kamiguti AS. Atividades coagulante, inflamatória e proteolítica dos venenos de *Bothrops jararaca* recém-nascidos e adulta [Dissertação Mestrado]. Universidade de São Paulo, 1988.

Kamiguti AS, Cardoso JL. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. Toxicon 1989; 27(9): 955-63.

Kamiguti AS, Rugman FP, Theakston RD, França FO, Ishii H, Hay CR. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming. Butantan Institute Antivenom Study Group. Thromb. Haemost. 1992; 67: 484 – 488.

Kamiguti AS, Slupsky JR, Zuzel M, Hay CR. Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. Thromb. Haemost. 1994; 72(2): 244-9.

Kamiguti AS, Sano-Martins IS. South American snake venoms affecting haemostasis. J. Toxicol. – Toxin Reviews 1995; 14: 359-374.

Kanai-Azuma M, Kanai Y, Kurohmaru M, Tachi C, Yazaki K, Hayashi Y. Giant cell transformation of trophoblast cells in mice. Endocr. J. 1994; 41(suppl): 33-41.

Kardong KV. Prey capture in the cottonmouth snake (*Agkistrodon piscivorus*). J. Herp. 1975; 25(1): 65-106.

Katz S, Abrahamsohn PA. Ultrastructural observations on the involution of the mouse antimesometrial deciduas. Acta. Anat. 1981; 111: 72-73.

Katz S, Abrahamsohn PA. Involution of the antimesometrial decidua in the mouse. Anat. Embryol. 1987; 176: 251-258.

Katz SG. Extracellular and intracellular degradation of collagen by trophoblast giant cells in acute fasted mice examined by electron microscopy. Tissue Cell 1995; 27(6): 713-21.

Kennedy TG. Estrogen and uterine sensitization for the decidual cell reaction: role of prostaglandin. *Biol. Reprod.* 1980; 23(5): 955-62.

Kirby DRS, Cowell TP. Trophoblast-host interactions. In: *Epithelial-Mesenchymal Interactions*. Fleischmajer, R. & Billingham, R.E., eds. Williams & Wilkins, Baltimore 1968; p.64-77.

Kirby EP, Niewiarowski S, Stocker K, Kettner C, Shaw E, Budzinski TM. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 1. Purification and characterization of the enzyme. *Biochemistry* 1979; 18 p. 3564-3570.

Kleinfeld RG, Morrow H, De Feo VJ. Intercellular junctions between decidual cells in the growing deciduoma of the pseudopregnant rat uterus. *Biol. Reprod.* 1976; 15(5): 593-603.

Kobayashi T, Asahina T, Maehara K, Itoh M, Kanayama N, Terao T. Congenital afibrinogenemia with successful delivery. *Gynecol. Obstet. Invest.* 1996; 42: 66 – 69.

Kocholaty FW, Billings TA, Ashley BD, Ledford EB, Goetz JC. Effect of the route of administration on the neutralizing potency of antivenins. *Toxicon* 1968; 5: 165-170.

Kraicer P, Shelesnyak MC. The induction of deciduomata in the pseudo-pregnant rat by systemic administration of histamine and histamine releasers. *J. Endocrinol.* 1958; 17(3): 324-8.

Krehbiel RH. Cytological studies of the decidual reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata. *Physiol. Zool.* 1937; 10: 212-233.

Langley RL. A review of venomous animal bites and stings in pregnant patients. *Wilderness Environ. Med.* 2010; 15(3): 207-215.

Lea RG, Clark DA: Macrophages and migratory cells in endometrium relevant to implantation. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* 1991; 5: 25.

Lin HL, Lin TY, Lee WC. Snakebite: use of antivenom in a pregnant woman. *Am. J. Emerg. Med.* 2010.

Lobel BL, Levy E, Shelesnyak MC. Studies on the mechanisms of nidation. XXXIV Dynamics of cellular interactions during progestation and implantation in the rat. *Acta. Endocrinol.* 1967; 56(Suppl 23):7-109.

Loch D. Oclusão e recanalização da luz uterine durante a gestação da camundonga. Estudo morfológico (Occlusion and recanalization of the uterine lumen during the pregnancy of the mouse. Morphological study) São Paulo. Master's Thesis. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil 1985; p. 61.

Lomonte B. Tissue damage and inflammation induced by snake venoms. Göteborg: Tryckt & Bunden 1994.

Lunam C, Rogers AW. Pericytes in the stroma of the rat uterus. J. Reprod. Fert. 1981; 63: 267-270.

Lundkvist, O. Ultrastructural studies of the endometrial stromal cells in rats during estradiol-induced implantation after experimental delay. Biol. Reprod. 1978; 18: 306-316.

Lurie Y, Bentur Y. *Vipera palaestinae* bite and serum sickness during pregnancy. J. Emerg. Med. 2009.

Ma WG, Song H, Das SK *et al.* Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003; 100: 2963-2968.

Mackessy SP. Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *Crotalus viridis oreganus*. Copeia 1988; 92-10.

Magnuson T, Jacobson JB, Stackpole CW. Relationship between intercellular permeability and junction organization in the preimplantation mouse embryo. Dev. Biol. 1978; 57(1): 214-24.

Mahan LK, Escott-Stump S. Alimentos, nutrição e dietoterapia. 2003; 10. ed. São Paulo: Roca, 2003.

Makrigiannakis A, Minas V. Mechanisms of implantation. Reprod. Biomed. Online 2007; 14(1): 75-82.

Malz S. Snakebite in pregnancy. J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw. 1967; 74, 935-937.

Martello EM, Abrahamsohn PA. Collagen distribution in the mouse endometrium during decidualization. Acta. Anat. (Basel) 1986; 127(2): 146-50.

Martin L, Finn CA. Hormonal regulation of cell division in epithelial and connective tissues of the mouse uterus. J. Endocrinol. 1968; 41, 363-371.

Maruyama M, Kamiguti AS, Cardoso JL, Sano-Martins IS, Chudzinsky AM, Santoro ML, Morena P, Tomy SC, Antonio LC, Mihara H. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). Thromb Haemost 1990; 63: 449 – 453.

McNally SL, Reitz CJ. Victims of snakebite. A 5-year study at Shongwe Hospital, Kangwane. S. Afr. Med. J. 1987;72:855– 860.

Melgarejo AR. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Fan HW, Málaque CMSM, Haddad Jr. V. ed. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier 2009; p.33-61.

Ministério da Saúde. Manual de diagnósticos e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde/ Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Brasil 2001.

Moffet A, Hiby SE. How does the maternal immune system contribute to the development of pré-eclampsia. *Placenta* 2007; 21: S51-S56.

Mohamed AH, Nawar NN, Hanna MM. Some effects of *Naja nigricollis* envenomation on developing fetal tissue. *Toxicon* 1974; 12: 477 – 480.

Mohamed AH, Nawar NN. Dismella in mice after maternal *Naja nigricollis* envenomation: a case report. *Toxicon* 1975; 13: 475 – 477.

Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia Clínica*. 2000; 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Morais V, Massaldih H. Economic evaluation of snake antivenom production in the public system. *J. Venom. Anim. Toxins. incl. Trop. Dis.* 2006; 12(3): 497-511.

Mossman HW. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Contr. Embryol.* 1937; 26: 133-246.

Mossman HW. *Vertebrate fetal membranes*. Rutgers University Press, New Brunswick 1987; p.383.

Murphy CR. The plasma membrane transformation of uterine epithelial cells during pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 2000; 55(Suppl.): 23-28.

Nahas L, Macfarlane RG, Denson KW. A study of the coagulation action of eight snake venoms. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 1964; 12: 355-367.

Nahas L, Kamiguti AS, Barros MA. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb. Haemost.* 1979; 41: 314-328.

Nardo LG, Li TC, Edwards RG. Human embryo implantation failure and recurrent miscarriage: basic science and clinical practice. *Reproductive BioMedicine Online* 2006; 13: 11-12.

Nasu K, Ueda T, Miyakawa I. Intrauterine fetal death caused by pit viper poisoning in early pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2004; 57:114-116.

Nawar NN. The effect of maternal envenomation by *Naja haje* (Egyptian Cobra) snake on the developing central nervous system. *Singapore Med. J.*, 1980; 21: 528 – 530.

Nelson DB, Ness RB, Grisso JA, Cushman M. Influence of hemostatic factors on spontaneous abortion. *Am. J. Perinatol.* 2001; 18: 195-201.

Nelson DB, Ness RB, Grisso JA, Cushman M. Sex hormones, hemostasis and early pregnancy loss. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2002; 267: 7-10.

Nikas G. Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. *Seminars in Reproductive Medicine* 2000; 18: 229-235.

Nishida S, Fujimura Y, Miura S, Osaki Y, Usami Y, Suzuki M, Titani K, Yoshida E, Sugimoto M, Yoshioka A, Fukui H. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 1994; 33: 1843 – 1849.

Ohsaka A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In Lee, C.Y. ed. *Snake venoms*. Berlin, Springer-Verlag 1979; 480-546.

O`Shea JD, Kleinfeld G, Morrow HA. Ultrastructural of decidualization in the pseudopregnant rat. *Am. J. Anat.* 1983; 166: 271-298.

Otero F, Tobon GS, Gomez LF, Osorio R, Valderrama R, Hoyos D, Urreta JE, Molina S, Arboleda JJ. Accident ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989 – febrero de 1990). *Acta Med. Colomb.* 1992; 17: 229 – 249.

Otero R, Gutierrez J, Beatriz Mesa M, Duque E, Rodriguez O, Luis Arango J, Gomez F, Toro A, Cano F, Maria Rodriguez L, Caro E, Martinez J, Cornejo W, Mariano Gomez L, Luis Uribe F, Cardenas S, Nunez V, Diaz A. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* 2002; 40: 1107 – 1114.

Otero-Patiño R, Cardoso JL, Higashi HG, Nunez V, Diaz A, Toro MF, Garcia ME, Sierra A, Garcia LF, Moreno AM, Medina MC, Castañeda N, Silva-Diaz JF, Murcia M, Cardenas SY, Dias da Silva WD. A randomized, blinded, comparative Trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in Uraba, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1998; 58(2): 183-189.

Ownby CL. Pathology of rattlesnake envenomation. In: Tu, A.T. ed. *Rattlesnake venoms, their actions and treatment*. New York, Marcel Dekker 1982; p.163-209.

Pantanowitz L, Guidozzi F. Management of snake and spider bite in pregnancy. *Obstet. Gynecol. Survey* 1996; 51(10): 615-620.

Pardal PPO, Mazzeo T, Pinheiro ACL. Snakebite in pregnancy: a preliminary study. *J. Venom Anim. Toxins* 1997; 3: 280-86.

Parkening TA. An ultrastructural study of implantation in the golden hamster. III. Initial formation and differentiation of decidual cells. *J. Anat.* 1976; 122(3): 485-498.

Parr MB, Parr EL. Uterine luminal epithelium: protrusions mediate endocytosis, not apocrine secretion, in the rat. *Biol. Reprod.* 1974; 11(2): 220-33.

Parr MB, Tung HN, Parr EL. The ultrastructure of the rat primary decidual zone. *Am. J. Anat.* 1986; 176: 423-436.

Parr MB, Parr EL. The implantation reaction. In: *Biology of the uterus*. Wynn, R.M. & Jollie, W.P., eds. Plenum Publishing Corporation, New York 1989; p.233-277.

Parrish HM, Khan MS. Snakebite during pregnancy. Report of 4 cases. *Obstet. Gynecol.* 1966; 27: 468 – 471.

Penn GB, Ross JW, Ashford A. The effects of Arvin on pregnancy in the mouse and the rabbit. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 1971; 20: 460 – 473.

Phisalix C, Bertrand G. Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère. *C.R. Acad. Sci.* 1894; 118: 356-358.

Pinho FMO, Pereira ID. Ofidismo. *Rev. Ass. Med. Brasil* 2001; 47(1):24-9.

Psychoyos A. La réaction déciduale est précédée de modifications précoces de la perméabilité capillaire de l'utérus. *Séances, C.R. Soc. Biol.* 1960; 154: 1384-1387.

Psychoyos A. Permeabilité capillaire et décidualisation utérine. *C.R. Acad. Sci. III* 1961; 252: 1515-1517.

Psychoyos A. Endocrine control of egg implantation. In: Greep, R.O. (ed.) *Handbook of Physiology* 1973; sect. 7, vol. 2, part. 2. American Physiology Society, Washington DC, 187.

Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1986; 476: 36-42.

Raw I, Guidolin R, Higashi HG, Kelen EMA. Antivenins in Brazil: preparation, p.557-581. In: Tu, A.T. *Handbook of natural toxins*. New York, Marcel Dekker 1991; 15: 832.

Raweerith R, Ratanabanangkoon K. Immunochemical and biochemical comparisons of equine monovalent and polyvalent snake antivenoms. *Toxicon* 2005; 45: 369-375.

Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.* 2004; 114(6): 744-54.

Ribeiro LA, Jorge MT. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo 1990; 32(6): 436-442.

Robbins SL, Cotran RS. Systemic diseases. In: Pathologic Basis of Disease, 2nd ed, (eds S. L. Robbins & R. S. Cotran). Philadelphia, London, Toronto: W. B. Saunders Company 1979; p.327-373.

Rojas G, Bogarin G, Gutierrez JM. Snakebite mortality in Costa Rica. Toxicon 1997; 35: 1639–1643.

Rosenfeld G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. New York: Academic Press 1971; p.345-384.

Rosenfeld MG, Joshi MS. A possible role of a specific uterine fluid peptidase in implantation in the rat. J. Reprod. Fertil. 1977; 51(1): 137-9.

Rugh R. The mouse: its reproduction and development. USA, Burgess Publishing Co. 1968; p.430.

Sananés N, Baulileu EE, Le Goascogne C. A role for prostaglandins in decidualization of the rat uterus. J. Endocrinol. 1981; 89(1): 25-33.

Sano-Martins IS, Santoro ML, Morena P, Sousa-e-Silva MC, Tomy SC, Antonio LC, Nishikawa AK, Gonçalves IL, Larsson MH, Hagiwata MK. Hematological changes induced by *Bothrops jararaca* venom in dogs. Braz. J. Med. Biol. Res. 1995; 28: 303-312.

Santoro ML, Sano-Martins IS. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. Thromb. Haemost. 2004; 92: 369-383.

Santos Filho L. História geral da Medicina brasileira. São Paulo: Hucitec/Edusp. 1991.

Schlafke S, Enders AC. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. Biol. Reprod. 1975; 12: 41-65.

Schuler-Faccini L., Leite JCL, Sanseverino MTV, Peres RM. Avaliação de teratógenos na população brasileira. Ciência & Saúde Coletiva 2002; 7(1): 65-71.

Seneviratne SL, de Silva CE, Fonseka MMD, Pathmeswaran A, Gunatilake SB, de Silva HJ. Envenoming due to snake bite during pregnancy. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2002; 96: 272-274.

Sharkey AM, Smith SK. The endometrium as a cause of implantation failure. Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 2003; 17: 289-307.

Simões R, Cury Y, Capela e Ara ALS, Bonamim LV, Bernardi MM. Efeitos embriotóxicos do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*. Embriotoxic

effects of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. Rev. Inst. Ciênc. Saúde. 2008;26(3):315-319.

Soares AM, Andriao-Escarso SH, Angulo Y, Lomonte B, Gutierrez JM, Marangoni S, Toyama MH, Arni RK, Giglio JR. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops moojeni* snake venom. Arch. Biochem. Biophys. 2000; 373(1): 7-15.

Soares AM, Guerra SR, Borja-Oliveira CR, Rodrigues VM, Rodrigues-Simioni L, Rodrigues V, Fontes MR, Lomonte B, Gutierrez JM, Giglio JR. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. Arch Biochem Biophys. 2000; 378(2): 201-9.

Spadacci-Morena DD, Katz SG. Acute food restriction increases collagen breakdown and phagocytosis by mature decidual cells of mice. Tissue Cell. 2001; 33(3): 249-57.

Spadacci-Morena DD. Estudo do efeito do veneno da serpente *Bothrops jararaca* na interação materno-fetal em camundongos no 9º e 19º dias de prenhez. [Doutorado]. UNIFESP. São Paulo, 2005.

Spadacci-Morena DD, de Tomy SC, Sano-Martins IS, Katz SG. The effect of experimental *Bothrops jararaca* envenomation on pregnant mice. Toxicon 2006; 47(2): 196-207.

Sueh TT, Holmback K, Jensen NJ, Daugherty CC, Small K, Simon DI, Potter S, Degen JL. Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen-deficient mice. Genes Dev. 1995; 9: 2020-2033.

Suehiro K, Mizuguchi J, Nishiyama K, Iwanaga S, Farrel DH, Ohtaki S. Fibrinogen binds to integrin alpha(5)beta(1) via the carboxyl-terminal RGD site of the Aalpha-chain. J. Biochem. (Tokyo) 2000; 128: 705-710.

Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. Intern. Rev. Immunol. 2002; 21: 471-495.

Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. Mol. Hum. Reprod. 1995; 10: 1579-1602.

Tachi S, Tachi C, Lindner HR. Ultrastructural features of blastocyst attachment and trophoblastic invasion in the rat. J. Reprod. Fert. 1970; 21: 37-56.

Theakston RDG, Warrell DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. Toxicon 2003; 41: 541-557.

Tranguch S, Daikoku T, Guo Y, Wang H, Dey K. Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2005; 62:1964-1973.

Tung HN, Parr MB, Parr EL. The permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: An ultrastructural tracer and freeze-fracture study. *Biol. Reprod.* 1986; 35: 1045-1058.

Vaz E. Vital Brazil. *Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia* 1950; 60:347-366.

Velardo JT, Dawson AB, Olsen AG, Hisaw FL. Sequence of histological changes in the uterus and vagina of the rat during prolongation of pseudopregnancy associated with the presence of deciduomata. *Am. J. Anat.* 1953; 93(2): 272-305.

Viravan C, Veeravat U, Warrell MJ, Theakston RD, Warrell DA. ELISA confirmation of acute and past envenoming by the monocellate Thai cobra (*Naja kaouthia*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1986; 35: 173–181.

Visser LE, Kyei-Faried S, Belcher DW. Protocol and monitoring to improve snake bite outcomes in rural Ghana. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2004; 98: 278-83.

Vital Brazil O. History of the primordia of snake-bite accident serotherapy. *Mem. Inst. Butantan.* 1987; 49(1): 7-20.

Von Klobusitzky D, König P. Estudos bioquímicos sobre os venenos das serpentes do gênero *Bothrops*. III Separação do princípio coagulante dentre a Bothropotoxina e outras substâncias contidas na secreção natural. *Mem. Inst. Butantan* 1936; 10: 223 – 236.

Warrel DA. Snake venoms in science and clinical medicine. 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989; 83(6): 732-40.

Warrell DA. Clinical features of envenoming by snake bites. In: Bon, C., Goyffon, M. (Eds.), *Envenomings and Their Treatments*. Fondation Marcel Merieux, Lyon 1996; p. 63–76.

Welsh AO, Enders AC. Occlusion and reformation of the rat uterine lumen during pregnancy. *Am. J. Anat.* 1983; 167(4): 463-77.

Welsh AO, Enders AC. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. *Am. J. Anat.* 1985; 172: 1-29.

Welsh AO, Enders AC. Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat. *Anat. Rec.* 1987; 217(2): 203-19.

Wen FH. Soroterapia. In: Cardoso JLC, França FOS, Fan HW, Málaque CMSM, Haddad Jr. V. ed. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier 2009; p.33-61.

Wewer UM, Damjanov A, Weiss J, Liotta LA, Damjanov I. Mouse endometrial stroma cells produce basement-membrane components. Differentiation 1986; 32: 40-58.

World Health Organization. Rabies and Envenomings. A Neglected Public Health Issue. Report of a Consultative Meeting. WHO, Geneva. 2007; Available at: [http://www.who.int/bloodproducts/animal\\_sera/Rabies.pdf](http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf).

Yelavarthi KK, Chen HL, Yang Y, Cowley BD. Tumor necrosis factor-alpha mRNA and protein in rat uterine and placental cells. J. Immunol. 1991; 146: 3840-3848.

Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo. Ed. Atheneu 2001; p.741.

Zorn TMT, Bevilacqua Emaf, Abrahamsohn PA. Collagen remodeling during decidualization in the mouse. Cell Tissue Res. 1986b; 244: 443-448.

Zorn TMT, Bijovsky AT, Bevilacqua Emaf, Abrahamsohn PA. Phagocytosis of collagen by mouse decidual cells. Anat. Rec. 1989; 225: 96-100.

Zorn TM, de Oliveira SF, Abrahamsohn PA. Organization of intermediate filaments and their association with collagen-containing phagosomes in mouse decidual cells. J. Struct. Biol. 1990; 103(1): 23-33.

Zugaib M, De Barros AC, Bittar RE, Burdmann EA, Neme B. Abruptio placentae following snake bite. Am J Obstet Gynecol 1985; 151: 754 – 755.

Zychar BC, Castro Jr. NC, Marcelino JR, Gonçalves LRC. Phenol used as a preservative in *Bothrops* antivenom induces impairment in leukocyte-endothelial interactions. Toxicon 2008; 51: 1151-1157.