VANESSA ANASTACIO DA COSTA CARVALHO

Estudos comportamentais da exposição à *Senna occidentalis*
durante o período perinatal em ratos

SÃO PAULO
2013

VANESSA ANASTACIO DA COSTA CARVALHO

Estudos comportamentais da exposição à *Senna occidentalis*
durante o período perinatal em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2857
FMVZ

Carvalho, Vanessa Anastacio da Costa
Estudos comportamentais da exposição à *Senna occidentalis* durante o período perinatal em ratos. / Vanessa Anastacio da Costa Carvalho. -- 2013.
71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa.

1. *Senna occidentalis*. 2. Toxicidade perinatal. 3. Antraquinonas. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudos comportamentais e bioquímicos da exposição à *Senna occidentalis* durante o período perinatal em ratos", protocolado sob o nº 2421/2011, utilizando 50 (cinquenta) ratos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/10/2011.

We certify that the Research "Behavioral and biochemical studies of *Senna occidentalis* exposure during the perinatal period in rats", protocol number 2421/2011, utilizing 50 (fifty) rats, under the responsibility Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/26/2011.

São Paulo, 27 de outubro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CARVALHO, Vanessa Anastacio da Costa

Título: Estudos comportamentais da exposição à *Senna occidentalis* durante o período perinatal em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Agradecimentos

Agradeço à minha família pelo esforço e apoio para manter meus estudos e evoluir profissionalmente, também pelo carinho e força nos momentos difíceis e alegrias nos momentos de lazer.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Helinice de Souza Spinosa, por me conceder a oportunidade de realizar uma importante etapa da minha vida profissional, por sua compreensão, confiança, amizade e orientação.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Martha Bernardi por sua amizade, confiança, incentivo e contribuição essencial em minha dissertação.

Agradeço a todos os meus amigos pela presença e força nos momentos difíceis e por me proporcionarem muitos momentos de alegria e diversão. Agradeço em especial à minhas amigas Mariana Sayuri Berto Udo e Thaísa Meira Sandini pelo companheirismo, incentivo e contribuição essencial em minha dissertação.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, que colaboraram de diferentes maneiras para a realização do meu mestrado.

Aos demais professores do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, obrigada pela convivência e por compartilhar do seu conhecimento.

Agradeço à Universidade de São Paulo por possibilitar a realização dessa importante etapa da minha vida profissional e por permitir que eu fizesse parte de um dos seus grupos de pós-graduação e ao CNPq, pelo apoio financeiro com a bolsa de mestrado.

RESUMO

CARVALHO, V. A. C. **Estudos comportamentais da exposição à *Senna occidentalis* durante o período perinatal em ratos.** 2013. 71 f. [Behavioral studies of *Senna occidentalis* exposure during the perinatal period in rats]. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A *Senna occidentalis* (sinônimo *Cassia occidentalis*) é uma planta amplamente utilizada pela população para fins medicinais, embora esteja associada a casos de intoxicação humana e animal. Por isso, além de ser considerada um problema de saúde pública, é tida também como uma planta tóxica de interesse pecuário. Sua toxicidade é atribuída à diantrona, uma quinolona, cujo mecanismo de ação tóxico se deve ao desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial, promovendo dano mitocondrial especialmente nos órgãos com maior demanda de oxigênio. O objetivo deste trabalho foi estudar, em ratos, os possíveis efeitos tóxicos causados pela exposição à *Senna occidentalis* durante o período de gestação. Para tanto, 36 fêmeas prenhes foram divididas em 5 grupos, que foram tratados do 6º ao 20º dia de gestação (período de organogênese e de desenvolvimento fetal) com 1%, 2%, 3% e 4% de sementes da planta na ração; o grupo controle recebeu a ração normal do laboratório. A escolha dessas concentrações foi embasada em estudos prévios de toxicidade subaguda em ratos, que mostraram efeito dose-dependente. Durante o período de gestação foram avaliados o peso corpóreo e o consumo de ração e água das fêmeas. Após o nascimento, os filhotes foram analisados quanto ao número de vivos e mortos e para a detecção de possíveis malformações externas. Foi avaliado também o desempenho reprodutivo e o comportamento materno das fêmeas. Com relação à prole, observou-se o seu desenvolvimento físico e de reflexos, bem como atividade geral no campo aberto, comportamento de brincar, labirinto em cruz elevado e labirinto em T. Os resultados do presente estudo mostraram diminuição no ganho de peso das ratas tratadas com 2%, 3% e 4% da planta na ração, além de diminuição no consumo de ração, prejuízo no desempenho reprodutivo e sinais de intoxicação em ratas do grupo de 4%. Ratas tratadas com 2% de *S. occidentalis* na ração apresentaram prejuízo no comportamento materno. Ainda, houve adiantamento para o aparecimento de pelos e erupção dos dentes incisivos em filhotes do grupo de 1%, bem como adiantamento para o desenvolvimento do reflexo de geotaxia negativa e para a perda do reflexo de preensão palmar em filhotes dos grupos de 3% e 1% respectivamente. Estes resultados indicam que a exposição à *S. occidentalis* durante a gestação causou toxicidade materna acompanhada de prejuízo no comportamento materno e alteração no desenvolvimento físico e reflexológico da prole destas ratas.

Palavras-chave: *Senna occidentalis*. Toxicidade perinatal. Antraquinonas.

ABSTRACT

CARVALHO, V. A. C. **Behavioral studies of *Senna occidentalis* exposure during the perinatal period in rats.** [Estudos comportamentais da exposição à *Senna occidentalis* durante o período perinatal em ratos]. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The *Senna occidentalis* (synonym *Cassia occidentalis*) is a plant widely used by people for medicinal purposes, although it is associated with cases of human and animal poisoning. So, besides being considered a public health problem, it is also regarded as a toxic plant of livestock interest. Its toxicity is attributed to diantrone, a quinolone, whose mechanism of action is due to the toxic uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation, promoting mitochondrial damage especially in organs with higher oxygen demand. The objective of this work was to study, in rats, the possible toxic effects caused by exposure to *Senna occidentalis* during the gestation period. For this purpose, 36 female rats were divided into 5 groups, which were treated from the 6th to the 20th day of gestation (period of organogenesis and fetal development) with 1%, 2%, 3% and 4% of plant seeds in the diet; the control group received normal chow lab. The choice of these concentrations was based on previous studies of subacute toxicity in rats, which showed dose-dependent effect. During the period of gestation were evaluated: body weight, feed intake and water consumption of females. After birth, pups were analyzed for the number of living and dead, and for the detection of possible external malformations. We also evaluated the reproductive performance and maternal behavior of females. With regard to offspring, it was observed their physical and reflexes development, their general activity in the open field, their play behavior and their behavior in elevated plus maze and T maze. The results of this study showed a decrease in body weight of dams treated with 2%, 3% and 4% of the plant in the diet, in addition to reduced feed intake, impaired reproductive performance and signs of poisoning in dams of group 4%. Dams treated with 2% of *S. occidentalis* in diet showed impaired maternal behavior. Still, there was an advance for the appearance of hair and for the eruption of incisors in pups from 1%, as well as an advance to the development of negative geotaxis reflex and to the loss of palmar grasp reflex in puppies of 3% and 1% groups respectively. These results indicate that exposure to *S. occidentalis* during pregnancy caused maternal toxicity accompanied by impairment in maternal behavior and change in reflexology and physical development of the offspring of these rats.

Keywords: *Senna occidentalis*. Perinatal toxicity. Anthraquinones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A planta <i>Senna occidentalis</i> -----	15
Figura 2 - Ganho de peso gestacional (g), semanal (1ª – 3ª semana), de ratas prenhes do grupo controle e que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	35
Figura 3 - Parâmetros do comportamento materno de ratas do grupo controle e que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	39
Figura 4 - Dia pós-natal (DPN) do aparecimento de pêlos e da erupção dos dentes incisivos da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	44
Figura 5 - Dia pós-natal (DPN) do aparecimento do reflexo de geotaxia negativa e desaparecimento do reflexo de preensão palmar da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escores para avaliação da qualidade do novo ninho -----	25
Tabela 2 - Consumo de ração (g) e de água (ml) e ganho de peso gestacional (g), semanais (1ª – 3ª semana), de ratas prenhes do grupo controle e que receberam na ração 1%, 2%, 3% ou 4% de sementes de <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	35
Tabela 3 - Desempenho reprodutivo das ratas do grupo controle e que receberam na ração 1%, 2%, 3% ou 4% de sementes de <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	36
Tabela 4 - Parâmetros do comportamento materno das ratas do grupo controle e que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	38
Tabela 5 - Peso (g) dos filhotes machos e fêmeas, em diferentes dias de vida pós-natal (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	41
Tabela 6 - Comprimento (cm) dos filhotes machos e fêmeas, em diferentes dias de vida pós-natal (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	42
Tabela 7 - Desenvolvimento físico da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	43
Tabela 8 - Dia pós-natal (DPN) para o aparecimento dos reflexos posturais e de sobressalto e para o desaparecimento do reflexo de preensão palmar da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	45
Tabela 9 - Unidade de locomoção da prole lactente no campo aberto, nos diferentes dias pós-natais (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	47
Tabela 10 - Frequência de levantar da prole lactente no campo aberto, nos diferentes dias pós-natais (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	48
Tabela 11 - Frequência de grooming da prole lactente no campo aberto, nos diferentes dias pós-natais (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	49

Tabela 12 - Tempo de imobilidade (em segundos) da prole lactente no campo aberto, nos diferentes dias pós-natais (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	50
Tabela 13 - Quantidade de bolos fecais da prole lactente no campo aberto, nos diferentes dias pós-natais (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	51
Tabela 14 - Parâmetros avaliados no comportamento de brincar dos filhotes machos provenientes de ratas expostas ou não (controle) à <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	52
Tabela 15 - Parâmetros da atividade geral em campo aberto da prole adulta (DPN 75) proveniente de ratas expostas ou não (controle) à <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	53
Tabela 16 - Parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado da prole proveniente de ratas expostas ou não (controle) à <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação -----	54
Tabela 17 - Escores obtidos no labirinto em T da prole proveniente de ratas expostas ou não (controle) à <i>Senna occidentalis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação --	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Senna occidentalis</i> : descrição, distribuição e importância	14
1.2 Propriedades farmacológicas e empregabilidade terapêutica	15
1.3 Propriedades tóxicas: princípios ativos, mecanismo de ação e efeitos tóxicos	16
1.4 Toxicologia do desenvolvimento	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Animais	23
3.2 <i>Senna occidentalis</i>	23
3.3 Preparação da ração	23
3.4 Procedimentos experimentais	24
3.4.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez	24
3.4.2 Avaliação do ganho de peso, consumo de água e de ração, bem como do desempenho reprodutivo das fêmeas prenhes	24
3.4.3 Comportamento materno	25
3.4.4 Avaliação do desenvolvimento ponderal da prole	26
3.4.5 Avaliação do desenvolvimento físico da prole	26
3.4.6 Avaliação do desenvolvimento de reflexos da prole	27
3.4.7 Campo aberto	28
3.4.8 Comportamento de Brincar	29
3.4.9 Labirinto em Cruz Elevado	29
3.4.10 Labirinto em T	30
3.5 Delineamento experimental	31

3.6 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Avaliação do ganho de peso, consumo de água e de ração, bem como do desempenho reprodutivo das fêmeas prenhes	34
4.2 Comportamento materno	38
4.3 Avaliação do desenvolvimento ponderal da prole	40
4.4 Avaliação do desenvolvimento físico da prole	42
4.5 Avaliação do desenvolvimento de reflexos da prole	44
4.6 Campo Aberto durante a lactação (DPN 15 a 21)	46
4.7 Comportamento de Brincar	52
4.8 Campo Aberto na idade adulta (DPN 75)	53
4.9 Labirinto em Cruz Elevado	54
4.10 Labirinto em T	54
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	66

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Senna occidentalis*: descrição, distribuição e importância

A *Senna occidentalis*, sinônimo *Cássia occidentalis*, é uma planta herbácea, anual, pertencente à família Leguminosae Caesalpinoideae (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000). É conhecida popularmente como: fedegoso, mamangá, sene, cigarreira, mata-pasto, lava-pratos (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008), manjerioba (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000) e café senna (YADAV et al., 2010). É amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000) e cresce em pastagens e culturas de cereais, como o milho, o sorgo, a soja e o trigo (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). Mede de 1 a 2 metros de altura e possui inflorescências terminais com flores de coloração amarelo ouro. Os frutos são formados dentro de vagens achatadas de coloração marrom, com 10 a 14 cm de comprimento. Floresce no período de setembro a outubro e frutifica no período de fevereiro a abril. As vagens, quando imaturas, são verdes, com faixas transversais marrons, tornando-se secas no outono, quando as sementes estão maduras. Pode ser diferenciada das outras espécies de *Senna* através das características no direcionamento de crescimento das vagens; no caso da *Senna occidentalis*, este ocorre de forma curva, com as pontas para cima (LORENZI, 1991), (Figura 1).

A *Senna occidentalis* possui propriedades terapêuticas, porém também possui ação tóxica, assim, além de ser considerada um problema de saúde pública, por sua ampla utilização pela população para fins medicinais (SOYUNCU; CETE; NOKAY, 2008), é considerada também uma planta tóxica de interesse pecuário, sendo economicamente importante, pois pode causar grandes perdas por morte de animais ou por diminuição da produção e gastos com medidas de controle e profilaxia. Os relatos da intoxicação animal por esta planta advêm da França, Austrália, Estados Unidos e Brasil, causando problemas principalmente na região sul desses dois últimos países (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000).

Figura 1 - A planta *Senna occidentalis*

Fonte: <http://www.indianpediatrics.net/july2007/july-522-525.htm>

1.2 Propriedades farmacológicas e empregabilidade terapêutica

A planta é utilizada popularmente, por via tópica ou oral, para tratar diversas afecções e doenças. Pesquisas científicas revelaram que a mesma possui grande potencial biológico e apresenta uma série de propriedades que fundamentam seu uso. Tais estudos mostraram que ela apresenta atividade antimicrobiana, combatendo fungos e bactérias; antimalárica; analgésica e antiinflamatória; antioxidante e hepatoprotetora; antimutagênica e anticarcinogênica; imunoestimulante; antidiabética; laxativa; diurética e alivia a cólica em recém-nascidos e bebês (HUSSAIN; DEENI, 1991; JAFRI et al., 1999; SHARMA et al., 1999; TONA et al., 2001; LOMBARDO; KIYOTA; KANEKO, 2009; YADAV et al., 2010). Contudo, suas propriedades fitoquímicas e eficácia medicinal são dependentes da localização

geográfica e estação do ano, pois a concentração dos princípios ativos pode variar (YADAV et al., 2010).

Segundo Yadav et al. (2010), as sementes torradas da planta são comumente utilizadas pela população local de Haryana (Índia) no tratamento de diversas doenças e como substituto do café e ainda, segundo Lombardo, Kiyota e Kaneko (2009) as classes pobres da Índia e do Sri Lanka usam cotidianamente as sementes, quando macias, como substituto do feijão.

1.3 Propriedades tóxicas: princípios ativos, mecanismo de ação e efeitos tóxicos

O princípio ativo tóxico da *Senna occidentalis* é a diantrona, uma antraquinona (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). Porém, foram extraídas de várias espécies de *Senna*, incluindo a *S. occidentalis*, outras substâncias potencialmente tóxicas como: flavonóides, oxalato de cálcio, albumina tóxica, senosídeos A, B, C e D, glicosídeos esteróides, glicosídeos saponínicos, glicosídeos antraquinônicos, emodina, aloe-emodina, reína e crisofanol e N-metilmorfolina (SOYUNCU; CETE; NOKAY, 2008). O mecanismo de ação tóxica, determinado pela diantrona (YADAV et al., 2010), presente em maior concentração nas sementes da planta, é o desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial. Esta antraquinona agiria diretamente sobre o metabolismo desta organela, desestabilizando-a (CAVALIERE et al., 1997) e possivelmente causando alterações na estrutura interna da mesma (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). Os danos mitocondriais ocorreriam especialmente nos órgãos com maior demanda de oxigênio (HARAGUCHI et al., 1998b).

A semente da *Senna occidentalis* é a principal causadora de intoxicações mais severas, sendo que a dose tóxica devido à ingestão das vagens pelos animais é de 0,05% a 0,5% do peso corporal, embora as outras partes dessa planta, como as folhas, os caules e as vagens também sejam consideradas tóxicas (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008; YADAV et al., 2010).

A intoxicação dos animais pela *Senna occidentalis* pode ocorrer pela ingestão da planta no pasto ou incluída no feno, geralmente em bovinos, ou mais comumente através da ingestão de ração contaminada com as sementes da planta, quando estas não são separadas dos grãos dos cereais (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). No caso da não separação adequada dos tipos de

sementes no momento da coleta dos cereais, as sementes da *S. occidentalis* passam a compor parte do produto final destinado à alimentação humana ou animal, levando a um desbalanço nutricional e incluindo na dieta componentes tóxicos (BARROS, 1991). A partir disso pode-se inferir que essa afecção ocorre também em criações de animais confinados, como, por exemplo, na avicultura (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

A intoxicação natural por *Senna occidentalis* foi descrita em bovinos, eqüinos e suínos (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000). Experimentalmente, pôde ser observada em aves (HARAGUCHI et al., 1998a), ovinos (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000), caprinos (BARBOSA-FERREIRA et al., 2005), coelhos (TASAKA, 2000) e ratos (BARBOSA-FERREIRA et al., 2005; BARBOSA-FERREIRA et al., 2011), além dos animais já citados acima.

Nas intoxicações naturais ou experimentais, as diferentes espécies animais apresentam sinais clínicos semelhantes, variando na intensidade. As principais manifestações clínicas, de animais intoxicados com concentrações moderadas ou elevadas (3% a 20%) de sementes de *S. occidentalis*, são: diarreia (principalmente em ruminantes), dispnéia, abatimento, incoordenação motora, tremores musculares, fraqueza muscular, andar cambaleante, relutância em mover-se, mioglobinúria, decúbito esternal, decúbito lateral e morte (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). Na intoxicação crônica, com baixas concentrações de semente da planta (0,1% a 1%), os únicos sinais clínicos observados são: anorexia e diminuição no ganho de peso e, conseqüentemente, queda na produção (HARAGUCHI et al., 1998b; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

Os principais achados de necrópsia e histopatologia, nas diferentes espécies animais, são as degenerações dos músculos esquelético e cardíaco; também é possível verificar alterações hepáticas, renais e no sistema nervoso central (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). Deve-se considerar ainda que, dependendo da espécie animal, a localização e gravidade das lesões podem variar (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000).

A *S. occidentalis* também se mostra capaz de promover efeitos imunotóxicos e anemia microcítica e hipocrômica em aves (NAKAGE et al., 2000; SILVA et al., 2003) e ratos (MARIANO-SOUZA, 2005, 2009) e ainda causa alterações na resposta inflamatória de ratos, mostrando ter um efeito antiflogístico (MARIANO-SOUZA, 2005). Em intoxicações experimentais por *S. occidentalis*, a planta foi capaz de provocar queda no consumo de ração e água e diminuição do peso corporal em aves (SILVA et al., 2003) e mamíferos (TASAKA, 2000; BARBOSA-FERREIRA et al., 2005; MARIANO-SOUZA, 2005, 2009). Aragão

et al. (2009), ao estudar a toxicidade reprodutiva do extrato da planta *Senna occidentalis* em ratas gestantes, observaram efeito abortivo nas doses de 250 e 500 mg/Kg.

Com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos tóxicos perinatais da *S. occidentalis*, Tasaka (2000) administrou sementes desta planta a coelhas gestantes e observou que as proles de mães tratadas apresentavam nos hepatócitos, dilatação mitocondrial com destruição das cristas internas. Mariano-Souza (2009), por sua vez, administrou as sementes da planta a ratas gestantes e observou efeito imunotóxico e alterações hematopoiéticas na prole de mães tratadas. Já Barbosa-Ferreira et al. (2011), ao administrar sementes de *S. occidentalis* a cabras gestantes, verificaram que os filhotes destas mães não apresentaram alterações morfológicas, porém manifestaram déficit de aprendizado ao serem avaliados em testes neurocomportamentais.

Com relação à intoxicação humana pela *Senna occidentalis*, são poucas as informações, porém as sementes in natura foram indicadas como causa de surtos de disfunção cerebral severa em crianças indianas, por vezes resultando em coma fatal, e parecem afetar principalmente os sistemas hepático, cerebral e músculos esqueléticos dos humanos (YADAV et al., 2010). Além disso, Vashishta et al. (2007) associaram a síndrome da encefalopatia infantil à intoxicação acidental por *Senna occidentalis*. Medoua e Mbofung (2006), por sua vez, revelaram que não existe qualquer risco toxicológico aos consumidores da bebida preparada com as sementes da planta, visto que o fator tóxico é eliminado pelo procedimento usual de torrefação da mesma.

Contudo, sabendo que a diantrona possui passagem transplacentária e que pode causar efeitos diretos no feto, este trabalho tem como objetivo avaliar, em ratos, os possíveis efeitos tóxicos causados pela exposição à *Senna occidentalis* durante o período de organogênese e de desenvolvimento fetal (do 6º ao 14º dia e do 15º ao 21º dia de gestação, respectivamente). Para isso foram utilizadas as concentrações de 1%, 2%, 3% e 4% de sementes da planta adicionadas na ração; a escolha dessas concentrações é embasada em estudo prévio de toxicidade subaguda em ratos, que mostraram efeito dose-dependente (BARBOSA-FERREIRA et al., 2005).

1.4 Toxicologia do desenvolvimento

A toxicologia do desenvolvimento está relacionada à toxicologia reprodutiva e tem base na teratologia (GÓRNIK; SPINOSA; BERNARDI, 2008).

A toxicologia reprodutiva estuda qualquer tipo de interferência, provocada por um agente tóxico, na capacidade reprodutiva de machos ou fêmeas e também no desenvolvimento da sua progênie (BERNARDI, 2006; DALLEGRAVE et al., 2007). Já a teratologia estuda as anomalias e malformações ligadas a perturbações no desenvolvimento embrionário e fetal. Por muito tempo a teratologia restringiu-se apenas ao estudo das alterações morfológicas, principalmente do sistema esquelético. Hoje sabe-se que malformações não significam apenas anormalidades anatômicas ou teciduais, mas também anormalidades bioquímicas (BERNARDI, 2006). Por isso, atualmente a teratologia também avalia as alterações no crescimento, funcionais e comportamentais da prole, bem como a morte da mesma (GÓRNIK; SPINOSA; BERNARDI, 2008).

A toxicologia do desenvolvimento estuda os efeitos tóxicos causados por diferentes agentes químicos em um organismo em desenvolvimento. Podendo ser resultado de uma exposição anterior à concepção, ou seja, materna ou paterna; durante o desenvolvimento pré-natal ou pós-natal, até a maturação sexual da prole (GÓRNIK; SPINOSA; BERNARDI, 2008; MAKRIS et al., 2011). Portanto, podem ocorrer alterações morfológicas ou fisiológicas na prole por ação direta de um agente tóxico sobre o feto ou através da ação deste no organismo materno (CHAHOUDE et al., 1999a,b; BERNARDI, 2006). Sendo importante lembrar que muitos tóxicos podem atravessar a membrana placentária, assim podendo interferir diretamente sobre o desenvolvimento embrionário e fetal.

O desenvolvimento pré e pós-natal de mamíferos pode ser dividido em quatro estágios, na respectiva ordem: implantação, organogênese, desenvolvimento fetal e período neonatal. O efeito tóxico de uma substância pode ocorrer em qualquer um desses estágios, porém, dependendo da fase do desenvolvimento em que o indivíduo é exposto, as consequências podem variar. A exposição durante a fase de implantação pode levar ao aborto. Já a exposição durante o período de organogênese, que compreende a proliferação e migração celular até a formação de órgãos rudimentares, e que representa a fase de maior suscetibilidade à ação dos agentes tóxicos, pode acarretar em malformações estruturais. Exposições que se iniciam durante o desenvolvimento fetal e período neonatal podem causar anormalidades celulares e teciduais, que podem interferir em funções normais de importantes sistemas, como o sistema nervoso central, sistema imune ou sistema endócrino, além de retardo geral do desenvolvimento (LEMONICA, 1996).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar, em ratas e respectivas proles, os possíveis efeitos tóxicos causados pela exposição à *Senna occidentalis* durante o período gestacional.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar na mãe:

- a toxicidade materna por meio da avaliação de seu peso gestacional, consumo hídrico e de ração, desempenho reprodutivo e comportamento materno;

Avaliar na prole:

- o desenvolvimento físico e de reflexos, a atividade geral e o comportamento de brincar na infância;
- a atividade geral, labirinto em cruz elevado e labirinto em T na idade adulta.

Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados, no início dos experimentos, ratas Wistar fêmeas, virgens, sexualmente maduras, pesando aproximadamente 150 g e machos da mesma espécie, pesando em torno de 200g, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (43 x 23 x 16 cm), com tampa de metal, e mantidos em uma sala com temperatura controlada por meio de equipamento de ar condicionado ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$), e com ciclo de doze horas de claro e escuro, sendo a luz acesa às 6:00 horas. Água e comida foram fornecidas *ad libitum* aos animais durante todo procedimento experimental.

Os animais foram utilizados de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais em laboratório da FMVZ/USP (protocolo CEUA nº 2421/2011, aceito em 26/10/2011).

3.2 *Senna occidentalis*

As sementes maduras de *Senna occidentalis*, utilizadas neste experimento, foram coletadas de uma plantação existente no Mato Grosso do Sul em março de 2006.

3.3 Preparação da ração

As sementes de *Senna occidentalis* foram separadas dos cotilédones, congeladas em nitrogênio líquido e trituradas em liquidificador comercial (Wallita®). Este procedimento foi realizado a frio devido à possibilidade de inativação dos princípios ativos, e consequente perda da toxicidade das sementes, pelo aquecimento na trituração em moinhos de facas. As sementes trituradas foram incorporadas à ração comercial (Nuvital®), que foi

esfarelada. Esta mistura foi homogeneizada em misturador (Marconi® modelo 206) e imediatamente peletizada. Foram preparadas quatro concentrações diferentes de sementes (1%, 2%, 3% e 4%) na ração. Para o grupo controle, a ração comercial foi esfarelada e repeletizada, sem adição de sementes.

3.4 Procedimentos experimentais

No presente estudo foram realizados os procedimentos experimentais descritos a seguir:

3.4.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

Para o acasalamento as fêmeas foram distribuídas nas gaiolas dos machos, na proporção de três fêmeas para cada macho, ao final do período claro do ciclo (17h – 18h). Na manhã subsequente (8h – 9h) foram realizados esfregaços vaginais de todas as fêmeas para o diagnóstico de prenhez. Para isso, um *swab* umedecido com solução salina foi introduzido na vagina da rata a fim de coletar o conteúdo presente na mesma. Em seguida foi realizado um esfregaço em lâmina de vidro, sendo este observado ao microscópio óptico (técnica adaptada de Marcondes, Bianchi e Tanno, 2002).

Os fatores indicativos de prenhez foram: presença de espermatozoides e de células indicativas de estro (células queratinizadas) no esfregaço vaginal. Este foi considerado como o dia 0 de gestação (GD 0).

3.4.2 Avaliação do ganho de peso, consumo de água e de ração, bem como do desempenho reprodutivo das fêmeas prenhes

Durante a gestação foi mantida uma fêmea por gaiola, sendo a água e a ração fornecidas *ad libitum* aos animais. O peso materno e o consumo de água e ração das ratas foram mensurados nos dias de gestação 0, 7, 14 e 21. Após o nascimento dos filhotes foi

avaliado o desempenho reprodutivo das fêmeas, sendo coletado dados sobre o tempo de gestação, o número de filhotes nascidos, de filhotes vivos e mortos, proporção entre filhotes machos e fêmeas, peso da ninhada (todos os filhotes nascidos), peso da ninhada padronizada para 8 filhotes e também peso e tamanho de um macho e uma fêmea de cada ninhada.

3.4.3 Comportamento materno

O comportamento materno em ratos é constituído por vários componentes, incluindo a recuperação e limpeza de filhotes que estão fora do ninho, a construção do ninho e o aleitamento materno, onde a fêmea adota uma postura denominada *crouching*, na qual expõe seu ventre aos filhotes facilitando assim a ejeção do leite.

O comportamento materno foi avaliado no dia 7 da lactação. Neste dia os filhotes foram separados da mãe, sendo colocados numa caixa contendo maravalha, onde permaneceram por 1 hora. Após este período de separação os filhotes foram novamente colocados com a mãe, distribuídos em lados diferentes da caixa. O comportamento materno foi então observado continuamente por 1 hora, sendo avaliados os seguintes parâmetros: latência para buscar o primeiro, o segundo, o terceiro, o quarto e o quinto filhote; latência para agrupar todos os filhotes no ninho; latência para o comportamento materno total ou *Full Maternal Behavior*, que significa a rata ficar em postura de aleitamento sobre os filhotes por mais de 3 minutos consecutivos; frequência de auto-limpeza ou *self-grooming* da mãe e construção e qualidade do ninho. Para a avaliação da qualidade do novo ninho construído, foi utilizada uma escala de escores conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Escores para avaliação da qualidade do novo ninho

Características do ninho	Escore
Não houve confecção do novo ninho	0
Ninho superficial, sem paredes de maravalha	1
Ninho pouco profundo, com baixas paredes de maravalha	2
Ninho profundo, com paredes altas ou até mesmo encobrindo os filhotes	3

3.4.4 Avaliação do desenvolvimento ponderal da prole

No DPN (dia pós-nascimento) 2 os filhotes foram avaliados fisicamente para a possível ocorrência de malformações visíveis e foram sexados pelo método da medição da distância anogenital. Posteriormente, a ninhada foi padronizada para um número de oito filhotes em proporções iguais de sexo. Um macho e uma fêmea de cada ninhada foram pesados e tiveram seu comprimento medido (distância entre a ponta do focinho até a inserção da cauda) no DPN 2, 7, 14, 21, 28, 35 e 75. Os dados foram analisados tomando-se a ninhada como unidade.

3.4.5 Avaliação do desenvolvimento físico da prole

A avaliação do desenvolvimento físico dos animais foi feita por meio de observação direta do filhote após o nascimento, sendo registrados os dias de: desdobramento das orelhas, nascimento de pelos, erupção dos dentes incisivos, abertura dos olhos, dia de andar adulto, descida dos testículos e abertura vaginal. Segue abaixo a descrição destes parâmetros:

- a) Desdobramento de orelha: os filhotes escolhidos de cada ninhada foram observados a partir do 2º dia da lactação, quanto à ocorrência ou não deste parâmetro.
- b) Nascimento de pelos: dia em que observa-se o aparecimento de uma fina camada branca de pelos sobre o corpo do animal. Este parâmetro foi observado a partir do 5º dia de lactação.
- c) Erupção dos dentes incisivos: é observada pela abertura da boca do filhote, a partir do 6º dia da lactação, sendo registrado o dia exato do aparecimento do esmalte dos dentes superiores e também dos inferiores.
- d) Abertura dos olhos: é registrado o dia da ocorrência da primeira fresta da abertura de ambos os olhos. Esta observação foi realizada a partir do 10º dia da lactação.

- e) Dia de andar adulto: o filhote é colocado sobre uma superfície plana (balcão) e observa-se se este se apoia sobre as quatro patas sem encostar o ventre na superfície plana. Quando isto é observado, anota-se, então, o dia de andar adulto. Este parâmetro foi observado a partir do 10º dia da lactação.
- f) Descida de testículo: é observado o dia em que os dois testículos descem para o escroto. Esta observação foi realizada a partir do 18º dia de lactação dos filhotes machos.
- g) Abertura vaginal: é registrado o dia da ocorrência da fresta vaginal. Esta observação foi feita a partir do 30º dia de vida dos filhotes fêmeas.

3.4.6 Avaliação do desenvolvimento de reflexos da prole

A avaliação do desenvolvimento reflexológico permite a identificação de possíveis alterações neurocomportamentais desde o início da vida do animal. Foram feitos testes diários até que 100% dos filhotes escolhidos de cada ninhada apresentassem os seguintes reflexos e comportamentos: reflexo de endireitamento; reflexo de geotaxia negativa; reflexo de sobressalto e reflexo de preensão palmar (este é o único teste em que o reflexo desaparece ao longo do tempo). Segue abaixo a descrição dos mesmos:

- a) Reflexo de preensão palmar: o animal é contido em uma das mãos do(a) pesquisador(a) e uma das patas do filhote é tocada com a ponta de um clipe para a avaliação da ocorrência do reflexo. O critério para a ocorrência é que o animal feche a pata ao contato físico com o clipe. Este teste foi realizado a partir do 2º dia da lactação, sendo que ao longo do tempo ele deve desaparecer.
- b) Reflexo de endireitamento: o animal é colocado em decúbito dorsal, sendo avaliada a ocorrência ou não da resposta de virar o corpo para a posição em decúbito ventral. O critério para o registro desse reflexo é que, ao virar-se, o animal fique com as quatro patas espalmadas na superfície. O período de latência máximo para este teste foi padronizado para 10 segundos. Este reflexo foi observado a partir do 2º dia de lactação.

- c) Reflexo de geotaxia negativa: o filhote é colocado em uma rampa de aproximadamente 45° de inclinação, a 5 cm do final inferior dessa superfície, com a cabeça direcionada para baixo. Anota-se a latência (não superior a 60 segundos), para que o animal se direcione à posição oposta, ou seja, voltado com a cabeça para cima. Quando o animal não apresenta o reflexo na 1ª tentativa, ele pode ser testado mais 2 vezes com a mesma latência. A ocorrência na 1ª, 2ª ou 3ª tentativa também é registrada. Este reflexo foi observado a partir do 5º dia da lactação.
- d) Reflexo de sobressalto: os filhotes escolhidos de cada ninhada são separados de seus irmãos e são expostos a um estalido curto e seco (movimento de um molho de chaves ou o estalar dos dedos). É observado se o animal apresenta um tremor generalizado logo após o ruído, o qual representa que o conduto auditivo está aberto. É registrado o dia em que o animal apresenta pela primeira vez este reflexo. Este teste foi realizado a partir do 11º dia de lactação.

3.4.7 Campo aberto

A atividade geral observada no campo aberto pode ser empregada como índice para medir emocionalidade ou alterações motoras, provocadas por diferentes agentes. Os animais foram observados do 15º ao 21º dia da lactação e também aos 75 dias de vida.

O aparelho de campo aberto é constituído por uma arena circular de madeira com 40 cm de diâmetro (para filhotes de rato) ou 97 cm de diâmetro (para ratos adultos) e parede metálica com 27 cm de altura, pintados de branco. O assoalho da arena é dividido em 25 regiões com áreas aproximadamente iguais, delimitadas por duas circunferências concêntricas de raios diferentes e segmentos de retas radiais demarcados em preto em sua superfície. A arena é iluminada por lâmpada incandescente.

Durante a realização do experimento o rato é colocado no círculo central da arena e observado por 3 (DPN 15 ao 21) ou 5 (DPN 75) minutos, para os seguintes parâmetros: frequência de locomoção; frequência de levantar; frequência de limpeza (*grooming*); duração de imobilidade (*freezing*) e número de defecações. As observações dos ratos são feitas sempre no mesmo período do dia, para evitar variações circadianas do comportamento.

3.4.8 Comportamento de Brincar

Após o desmame, no DPN 21, um macho de cada ninhada é isolado, ou seja, fica sozinho numa gaiola, mas na mesma sala das gaiolas dos outros animais. Este animal isolado permanece nesta condição até o DPN 31.

No DPN 31 um animal agrupado *naïve* (que não passou por nenhum tratamento ou teste) é inserido na gaiola do isolado, onde o experimento é realizado. As observações são feitas em uma sessão de 10 minutos e são medidos os seguintes parâmetros: frequência de *pinning* (comportamento de brincar propriamente dito); frequência de passar sobre ou sob o animal agrupado; frequência de montar no animal agrupado; tempo que o animal isolado passa farejando o animal agrupado; tempo de perseguição ao animal agrupado e tempo que o animal isolado passa sem interagir com o agrupado.

Os animais isolados e agrupados apresentaram diferença de peso de no máximo 10 gramas.

3.4.9 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é considerado um modelo experimental de ansiedade, sendo bastante utilizado para avaliação de efeitos ansiolíticos de drogas. Ele leva em conta o comportamento típico do rato, que procura locomover-se em ambientes fechados (túneis) para evitar predadores. Assim, quando o rato pode escolher entre um ambiente aberto e um fechado, ele prefere este último.

O LCE é constituído de 2 braços abertos, opostos, medindo 50 x 10 cm e 2 braços fechados, sem teto, também opostos, medindo 50 x 10 x 40 cm, que são posicionados formando ângulos de 90 graus. O LCE fica suspenso a uma altura de 50 cm do piso da sala através de um suporte de madeira e a sala é iluminada artificialmente por meio de lâmpadas fosforescentes.

A prole é avaliada no LCE aos 75 dias de idade. No início do experimento o rato é colocado no centro do aparelho e é observado por 3 minutos, para os seguintes parâmetros: número de entradas nos braços abertos, nos braços fechados e frequência que o animal passa pelo centro; tempo de permanência nos braços abertos, nos braços fechados e no centro; número de avaliações de risco, que é quando o animal estica o corpo

para observar o que há em volta do braço aberto; e quantas vezes o animal olha para baixo quando está nos braços abertos.

O teste foi realizado durante a fase clara do ciclo de luz e entre um animal e outro o LCE foi limpo com solução de álcool a 5%, para diminuir a interferência do odor deixado por outros animais neste aparelho.

3.4.10 Labirinto em T

Neste teste que avalia a memória o aparelho é de madeira, pintado de preto, e constituído de três braços fechados, com ângulos de 90° entre eles, formando um T. Os braços possuem 10 cm de largura e paredes com 30 cm de altura. Um dos braços apresenta uma área de partida de 20 cm comprimento, separada por uma parede removível da continuação do braço, com mais 45 cm de comprimento; os outros dois braços (para a direita e para a esquerda) possuem 40 cm de comprimento cada. O aparato se encontra a 65 cm do chão.

O teste é realizado no DPN 90, no período da manhã e no período da tarde, em uma sala com baixa iluminação. No dia do teste cada animal passa pelo aparato por quatro sessões de 90 segundos cada. O animal é introduzido no aparato em uma área de partida e lá mantido por 10 segundos, quando uma barreira é erguida, permitindo que o animal explore o labirinto por mais 90 segundos. Na primeira sessão o braço direito está obstruído por uma parede removível. Após 20-30 minutos, o animal passa novamente pelo aparato, agora com os dois braços livres (segunda sessão). Após 4-5 horas, o animal passa mais uma vez pelo aparato, desta vez com o braço esquerdo obstruído (terceira sessão). Após 20-30 minutos, o animal passa pela quarta vez pelo aparato, desta vez com os dois braços livres. Ao término de cada sessão, o labirinto é limpo com solução de álcool 5 %, eliminando possíveis odores deixados por outros animais.

As sessões com um dos braços obstruídos são as sessões de escolha forçada, ou seja, objetivam levar o animal para um determinado braço do aparato. As sessões seguintes, com os dois braços livres, que são o teste propriamente dito, são as sessões de livre escolha, ou seja, o animal tem acesso aos dois braços do labirinto podendo escolher entrar em um ou outro. Sempre é verificado o primeiro braço visitado nas sessões de livre escolha e se este for o braço contrário ao anteriormente visitado, isto é, se ele alternar o braço visitado, é considerado um acerto, de acordo com o modelo de comportamento de

alternação espontânea (DUDCHENKO, 2004). Se o animal entrar primeiramente no mesmo braço que ele havia visitado na sessão anterior, ou seja, repetindo o braço anteriormente visitado, é considerado um erro.

Dessa forma, cada animal passa por duas sessões de escolha forçada e duas sessões de livre escolha, que são o teste propriamente dito. Para a análise estatística, são empregados escores de 0 a 2: foi definido que o animal que obteve erros nas duas sessões de teste tem o escore 0; o animal que obteve 1 acerto e 1 erro atinge o escore 1 e o animal que obteve dois acertos atinge o escore 2.

3.5 Delineamento experimental

Foram empregadas 36 fêmeas prenhes, as quais foram separadas em 5 grupos: controle (n=9), tratado com ração comercial isenta de sementes de *Senna occidentalis*; e 4 grupos tratados com: 1% (n=9), 2% (n=7), 3% (n=7) e 4% (n=4) de sementes da planta na ração. O tratamento ocorreu do 6º ao 20º dia de gestação e, durante este período, foram avaliados semanalmente o peso materno e o consumo de ração e água dessas fêmeas. Além disso, as mães também foram observadas quanto ao seu desempenho reprodutivo (2º dia pós-natal - DPN 2) e comportamento materno (DPN 7).

No DPN 2 anotou-se o número de filhotes vivos e mortos e a ocorrência de possíveis malformações externas, a seguir estes filhotes foram sexados pelo método da medição da distância anogenital. Cada ninhada foi padronizada para 8 filhotes (4 fêmeas e 4 machos, sempre que possível), sendo um macho e uma fêmea de cada ninhada marcados com nanquim para representarem seus irmãos na realização dos testes. Estes filhotes foram avaliados do DPN 2 ao DPN 90. Foram observados: o desenvolvimento ponderal (peso corporal e distância da ponta do focinho à base da cauda, nos DPNs 2, 7, 14, 21, 28, 35 e 75), o desenvolvimento físico e de reflexos, a atividade geral em campo aberto (DPN 15 ao 21 e DPN 75), o comportamento de brincar (DPN 31) e o desempenho no labirinto em cruz elevado (DPN 75) e no labirinto em T (DPN90).

3.6 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados apresentados a seguir foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

A homocedasticidade dos dados foi avaliada pelo teste de Bartlett. Para os dados paramétricos de mais de um grupo foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Dunnet. No caso de dados não paramétricos de mais de dois grupos foi empregado o teste de Kruskal-Wallis. Na existência de 2 fatores (tempo ou gênero e tratamento) foi empregada a ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Foram consideradas significativas as análises que apresentaram nível de significância $p < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

São apresentados a seguir os resultados referentes à exposição materna e de sua prole a *Senna occidentalis*.

4.1 Avaliação do ganho de peso, consumo de água e de ração, bem como do desempenho reprodutivo das fêmeas prenhes

A tabela 2 mostra o consumo de ração e de água, bem como o ganho de peso gestacional das ratas do grupo controle e das ratas que consumiram diferentes concentrações de sementes da *Senna occidentalis*, incorporadas à ração, durante a gestação. As ratas expostas à concentração de 4% manifestaram sinais de toxicidade, sendo restringido para 4 o número de animais desse grupo; em função disso, esses dados não foram incluídos na análise estatística.

Com relação aos resultados do consumo de ração e de água, a ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes entre os grupos. No entanto, quando se avaliou o ganho de peso gestacional, a ANOVA de duas vias apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tempo de gestação ($F(2/84)=162,97$, $p<0,0001$), não havendo diferenças relacionadas ao tratamento e nem interação entre estes. O teste de Bonferroni mostrou que houve redução significativa no ganho de peso materno em ratas do grupo de 2% ($p<0,01$) e 3% ($p<0,05$) na terceira semana gestacional em relação às ratas do grupo controle (tabela 2 e figura 2).

Tabela 2 - Consumo de ração (g) e de água (ml) e ganho de peso gestacional (g), semanais (1ª – 3ª semana), de ratas prenhes do grupo controle e que receberam na ração 1%, 2%, 3% ou 4% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Gestação	Controle	<i>Senna occidentalis</i>			
	(n=9)	1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)	4% (n=4)
Consumo de ração					
1ª semana	151,44±20,24	157,62±20,57	146,1±9,13	151,7±13,78	152,97±23,41
2ª semana	167,0±17,33	175,57±16,63	169,48±17,08	161±8,43	146,8±52,18
3ª semana	188,82±19,27	191,81±19,69	192,8±26,97	194,6±24,63	116,13±39,08
Consumo de água					
1ª semana	247,48±27,17	253,57±31,22	232,5±32,59	266,07±25,73	250,35±43,36
2ª semana	289,2±17,55	292,85±39,43	300±60,59	270,71±23,57	269±109,41
3ª semana	384,45±64,23	375±80,68	340,5±71,46	370±50,82	317,1±129,39
Ganho de peso					
1ª semana	21,11±5,89	23,7±9,55	22,98±7,7	24,1±4,03	14,22±3,4
2ª semana	19,71±5,21	22,91±3,57	19,25±5,48	20,38±9,74	-10,87±14,19
3ª semana	67,93±11,38	66,83±16,33	50,1±15,82**	55,67±11,42*	33,1±10,3

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni (realizada apenas entre o grupo controle e os grupos 1%, 2% e 3%): *p<0,05; **p<0,01

Legenda: n=número de animais por grupo

Figura 2 - Ganho de peso gestacional (g), semanal (1ª – 3ª semana), de ratas prenhes do grupo controle e que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Notas: Dados expressos em média e desvio padrão; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni: *p<0,05; **p<0,01

A tabela 3 mostra o desempenho reprodutivo das ratas que receberam ou não (grupo controle) diferentes concentrações de sementes da planta durante a gestação. Novamente, os dados das fêmeas expostas à concentração de 4% não foram submetidos à análise estatística. A ANOVA de duas vias não apontou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, quando avaliados os diferentes parâmetros do desempenho reprodutivo das fêmeas.

Tabela 3 - Desempenho reprodutivo das ratas do grupo controle e que receberam na ração 1%, 2%, 3% ou 4% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Dados Reprodutivos	Controle	<i>Senna occidentalis</i>			
	(n=9)	1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)	4% (n=4)
Nº de filhotes nascidos	10,22±1,48	9,22±2,48	10,42±0,78	11,42±1,51	6,25±2,62
Morte perinatal	0,11±0,33	0	0	0	2,75±4,27
Peso da ninhada (g)¹	60,6±9,20	66,1±9,76	59,94±8,29	58,71±5,45	26,46±15,66
Nº filhotes machos	4,66±1,80	5,11±2,36	6,14±1,34	6,14±1,46	2,33±1,52
Nº filhotes fêmeas	5,44±1,42	4,11±1,26	4,28±1,25	5,28±1,49	2,33±1,52
Tempo de gestação	21,4±0,54	22,14±0,69	21,6±0,54	21,57±0,53	--

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett (realizada apenas entre o grupo controle e os grupos 1%, 2% e 3%): $p>0,05$

Legenda: ¹Ninhada padronizada para 8 filhotes (exceto ninhada do grupo de 4%); n=número de animais por grupo

Os sinais de toxicidade observados nas ratas que receberam a concentração de 4% da planta na ração foram:

Rata 1: mostrou caquexia (peso: 155 g), apatia e eriçamento dos pêlos. Seus filhotes apresentavam peso e tamanho reduzidos e movimentos de contorção. Todos os filhotes morreram nos primeiros dias de vida e a fêmea veio a óbito em seguida (DPN5).

Rata 2: mostrou caquexia (peso: 195,9 g), vestígio de epistaxe e eriçamento dos pêlos. Veio a óbito no DPN8, com 2 filhotes ainda vivos, os quais foram submetidos à eutanásia em seguida (inalação de CO₂).

Rata 3: mostrou caquexia (peso: 174 g), eriçamento dos pêlos, olhos hipocorados, aparente hipotermia, apatia, andar vagaroso e com dificuldade. Seus filhotes apresentavam peso e tamanho reduzidos, movimentos de contorção, aparente hipotermia e estavam

espalhados pela caixa (ausência de ninho). Foi realizada a eutanásia (xilasina e cetamina 1:2, na dose de 0,1ml/100 g) e a necropsia da rata no DPN6. Neste dia havia 6 filhotes com sinais de inanição, sendo que 5 já estavam mortos e a fêmea estava comendo um deles, portanto houve canibalismo materno. O filhote que estava vivo foi submetido à eutanásia (inalação de CO₂).

Dados observados na necropsia da rata 3: seus ossos da coluna e quadril estavam proeminentes evidenciando sua caquexia. No fígado (peso: 8,6 g) observou-se lesão em porção caudal, com aparência hemorrágica (petéquias). O Baço (peso: 0,1987 g) se apresentava com tamanho reduzido e friável. Pulmões (peso: 1,4 g) de aspecto hemorrágico e tamanho reduzido, com lesões nas bordas caudais e regiões dorsais. Coração (peso: 0,6 g) e rins (peso: 0,7 g cada um) com aparência normal. Adrenais (peso: direita 0,0422 g e esquerda 0,0436 g) de tamanho aumentado e aparência normal. Ovários (peso: direito 0,0392 g e esquerdo 0,0368 g) de tamanho reduzido e aparência normal. Útero (peso: 0,47 g) com 11 botões de implantação embrionária nos cornos uterinos (5 do lado esquerdo e 6 do lado direito). Trato digestivo com presença de fezes de consistência dura no intestino grosso (constipação) e intestino delgado com coloração escura (hemorragia/necrose?); estômago (peso: com alimento 10,5 g e vazio 1,4 g) com vilosidades internas normais, presença de alimento de consistência dura e externamente apresentando uma “vesícula” de sangue em região pilórica. Cavidade oral, traquéia e tireoide com aparência normal. Presença de sangue fluído na cavidade abdominal.

Rata 4: fêmea ativa, tendo feito ninho grande e de bom aspecto, com quatro filhotes. No DPN13 foi realizada a eutanásia (xilasina e cetamina 1:2, na dose de 0,1ml/100 g) e necropsia da rata, que estava aparentemente saudável.

Dados observados na necropsia da rata 4: peso corpóreo de 245,7 g. Intestino com hiperemia (vasos intestinais dilatados) e ceco bastante dilatado. Baço (peso: 0,6 g), fígado (peso: 11,1 g), pulmões (peso: 1,1 g), rins (peso: direito 0,8 g e esquerdo 0,7 g), adrenais (peso: direita 0,0308 g e esquerda 0,0315 g) e coração (peso: 1g) com aparência normal.

4.2 Comportamento materno

A tabela 4 mostra os parâmetros do comportamento materno das ratas do grupo controle e das ratas que consumiram diferentes concentrações de sementes da *Senna occidentalis*, incorporadas à ração, durante a gestação.

A ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett mostrou retardo na busca do 1º ($F(3/25)=3,704$, $p<0,05$), 2º ($F(3/25)=3,536$, $p<0,05$), 3º ($F(3/25)=3,493$, $p<0,05$), 4º ($F(3/25)=3,509$, $p<0,05$) e 5º ($F(3/25)=4,037$, $p<0,05$) filhote das ratas do grupo de 2%, em comparação às ratas do grupo controle (tabela 4 e figura 3).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos demais parâmetros avaliados do comportamento materno (tabela 4). Porém, vale salientar que uma rata do grupo de 2% não agrupou todos os filhotes da ninhada e que uma rata de cada grupo experimental não apresentou no *full maternal behavior*.

Tabela 4 - Parâmetros do comportamento materno das ratas do grupo controle e que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Parâmetros	Controle (n=8)	<i>Senna occidentalis</i>		
		1% (n=7)	2% (n=7)	3% (n=7)
Lat 1º F	17,38±12,58	28,86±15,74	162±175,6*	62,71±60,41
Lat 2º F	36,75±18,04	49,29±24,42	206,1±212,2*	101±66,76
Lat 3º F	51,63±25,39	63±24,06	249,6±256,6*	123,3±59,08
Lat 4º F	85,75±49,51	84,43±39,89	290,3±261,8*	150,1±80,57
Lat 5º F	102,3±56,23	128±73,93	381,9±318,2*	180±93,47
Lat ninhada	424,5±264,4	432,1±213,8	563,2±348,2 ^A	340,4±141,6
Lat FMB	1685±840,4	1076±395,7 ^A	1040±281,5 ^A	1115±519,2 ^A
SG	7,37±2,2	6,14±1,67	5,14±1,95	6,42±2,5
QN	2 (1 – 3)	2 (0 – 3)	1 (1 – 2)	2 (1 – 3)

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão, exceto os dados referentes à qualidade do novo ninho, que foram expressos em mediana e seus respectivos limites mínimo e máximo; ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett: * $p<0,05$

Legenda: **Lat...F**=Latência (segundos) para buscar o...filhote; **Lat ninhada**=Latência (segundos) para agrupar a ninhada; **Lat FMB**=Latência (segundos) para o *full maternal behavior*; **SG**=Frequência de *self grooming*; **QN**=Qualidade do novo ninho (escore); n=número de animais por grupo; ^A(n=6)

Figura 3 - Parâmetros do comportamento materno de ratas do grupo controle e que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Notas: Dados expressos em média e desvio padrão; ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett: *p<0,05

4.3 Avaliação do desenvolvimento ponderal da prole

As tabelas 5 e 6 mostram a avaliação do desenvolvimento ponderal (peso e comprimento corpóreo) da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação.

Com relação ao peso da prole feminina, a ANOVA de duas vias apontou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com relação ao tratamento ($F(3/178)=6,17$, $p<0,0005$) e ao tempo ($F(6/178)=2976,75$, $p<0,0001$), não mostrando interação entre os fatores. O teste de Bonferroni evidenciou maior peso corpóreo, no DPN 75, das fêmeas pertencentes aos grupos de 1% ($p<0,001$) e 3% ($p<0,01$) em relação à prole feminina do grupo controle (tabela 5).

Ao avaliar o comprimento corpóreo da prole feminina, a ANOVA de duas vias apontou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com relação ao tratamento ($F(3/133)=3,10$, $p<0,0291$) e ao tempo ($F(6/133)=2103,86$, $p<0,0001$), não havendo interação entre os fatores. O teste de Bonferroni evidenciou menor comprimento, no DPN 75, das fêmeas pertencentes ao grupo de 3% ($p<0,05$) em relação à prole feminina do grupo controle (tabela 6).

Com relação ao peso e comprimento corpóreo da prole masculina, a ANOVA de duas vias não apontou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Peso (g) dos filhotes machos e fêmeas, em diferentes dias de vida pós-natal (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

DPN	Gênero	Controle (n=9)	<i>Senna occidentalis</i>		
			1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
2	♂	7,83±1,26	8,82±1	7,91±0,98	7,65±0,99
	♀	7,58±1,4	8,78±1,10	7,6±0,94	7,21±0,65
7	♂	15,26±2,5	17,04±1,19	15,4±2,02	16,1±2,13
	♀	14,56±2,9	16,93±1,21	15,22±1,8	15,27±1,71
14	♂	30,07±2,54	31,38±2,1	29,45±2,02	30,14±3,04
	♀	28,4±2,84	30,83±1,96	28,92±2,1	29,18±2,49
21	♂	46,32±3,05	49,84±2,74	43,67±3,94	46,41±6,61
	♀	43,61±3,21	48,16±2,49	42,57±3,22	44,81±5,77
28	♂	74,22±6,52	80,27±5	74,72±10,67	77,9±9,57
	♀	71,07±6,78	77,75±3,66	70,16±5,72	74,21±7,80
35	♂	116,45±11,65	122,85±12,11	116,54±15,62	116,54±9,45
	♀	106,97±6,83	111,75±7,23	103,72±9,83	108,45±6,80
75	♂	328,2±28	323,52±18,01	316,5±40,84	322,78±18,37
	♀	195±17,92	210,64±17***	203,94±13,24	207,34±7,5**

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni:

p<0,01; *p<0,001

Legenda: n=número de animais de cada gênero por grupo

Tabela 6 - Comprimento (cm) dos filhotes machos e fêmeas, em diferentes dias de vida pós-natal (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

DPN	Gênero	Controle	<i>Senna occidentalis</i>		
		(n=9)	1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
2	♂	5,42±0,43	5,42±0,34	5,4±0,41	5,21±0,26
	♀	5,25±0,28	5,28±0,26	5,26±0,33	5,08±0,15
7	♂	6,62±0,25	6,64±0,24	6,46±0,32	6,42±0,34
	♀	6,4±0,33	6,57±0,34	6,36±0,21	6,31±0,37
14	♂	8,25±0,28	8,35±0,37	8±0	8±0,5
	♀	8,12±0,25	8,28±0,26	8±0	8±0,28
21	♂	10,37±0,25	10,57±0,44	10,2±0,44	10,07±0,34
	♀	10,25±0,5	10,35±0,37	10,2±0,27	10,14±0,37
28	♂	12±0,57	12,21±0,39	12,1±0,54	12,14±0,37
	♀	11,75±0,64	12,14±0,37	11,5±0,61	12±0,5
35	♂	13,75±0,64	13,42±0,34	13,2±0,44	13,21±0,26
	♀	13,37±0,47	13,14±0,24	12,9±0,74	13,14±0,24
75	♂	19,02±0,55	19,02±0,84	18,84±0,93	19,27±0,96
	♀	17,5±1,01	17,18±0,63	17,22±0,56	16,77±0,39*

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni: *p<0,05

Legenda: n=número de animais de cada gênero por grupo

4.4 Avaliação do desenvolvimento físico da prole

A tabela 7 mostra o desenvolvimento físico da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação.

Com relação ao aparecimento de pêlos, a ANOVA de duas vias apontou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3/56)=6,05$, $p<0,0012$), no entanto, não mostrou diferenças entre o gênero dos animais e nem interação entre os fatores. O teste de Bonferroni evidenciou um adiantamento no aparecimento deste parâmetro em filhotes machos ($p<0,05$) e fêmeas ($p<0,05$)

provenientes do grupo de 1% em relação aos filhotes do grupo controle (tabela 7 e figura 4).

No que diz respeito à erupção dos dentes incisivos a análise estatística mostrou diferenças significantes entre os grupos com relação ao tratamento ($F(3/56)=3,73$, $p<0,0163$) e ao gênero dos animais ($F(1/56)=4,77$, $p<0,0331$), não havendo interação entre os fatores. O teste de Bonferroni evidenciou o adiantamento do aparecimento deste parâmetro somente em filhotes machos ($p<0,05$) provenientes do grupo de 1% em relação aos filhotes do grupo controle (tabela 7 e figura 4).

Quanto à avaliação dos demais parâmetros a ANOVA de duas vias não apontou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Tabela 7 - Desenvolvimento físico da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Parâmetros	Gênero	Controle	<i>Senna occidentalis</i>		
		(n=9)	1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
DO	♂	2,55±0,52	2,22±0,44	2,42±0,78	2,42±0,53
	♀	2,44±0,52	2,22±0,44	2,28±0,48	2,42±0,53
NP	♂	6,77±0,66	5,88±0,78*	6,57±0,53	6,42±0,53
	♀	6,77±0,66	5,88±0,78*	6,57±0,53	6,42±0,53
ED	♂	11,22±0,97	10,22±0,66*	11±0,81	10,42±0,78
	♀	10,55±1,33	9,55±1,23	10,28±0,48	10,42±0,53
AO	♂	13,33±0,70	13±0,70	13,42±0,78	13,57±0,53
	♀	13,11±1,05	12,77±0,44	13,28±0,75	13,42±0,53
AA	♂	11,55±1,23	11±1	12±1,29	12±1
	♀	11,55±1,23	10,88±0,78	11,85±1,06	11,85±1,06
DT	♂	19,77±1,2	19,44±0,72	19,28±0,75	19,28±1,11
AV	♀	37±1,80	35,55±1,33	36±1,63	35,28±1,11

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão do DPN (dia pós-nascimento) em que foi observada a ocorrência dos diferentes parâmetros; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni: * $p<0,05$

Legenda: **DO**=desdobramento das orelhas; **NP**=nascimento de pêlos; **ED**=erupção dos dentes incisivos; **AO**=abertura dos olhos; **AA**=andar adulto; **DT**=descida dos testículos; **AV**=abertura vaginal; n=número de animais de cada gênero por grupo

Figura 4 - Dia pós-natal (DPN) do aparecimento de pelos e da erupção dos dentes incisivos da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Notas: Dados expressos em média e desvio padrão; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni: * $p < 0,05$

4.5 Avaliação do desenvolvimento de reflexos da prole

A tabela 8 mostra o desenvolvimento reflexológico da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação.

A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados da geotaxia negativa mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com relação ao tratamento ($F(3/56)=3,04$, $p < 0,0362$), não apontando diferenças entre os gêneros dos animais, nem interação entre os fatores. O teste de Bonferroni evidenciou o adiantamento no aparecimento deste parâmetro em filhotes machos ($p < 0,05$) provenientes do grupo de 3% em relação aos filhotes do grupo controle (tabela 8 e figura 5).

Quando avaliada a preensão palmar a ANOVA de duas vias também apontou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com relação ao tratamento ($F(3/52)=5,56$, $p < 0,0022$), não apontando diferenças entre os gêneros dos animais, nem interação entre os fatores. O teste de Bonferroni evidenciou o adiantamento na perda do reflexo de preensão palmar em filhotes machos ($p < 0,01$) provenientes do grupo de 1% em relação aos filhotes do grupo controle (tabela 8 e figura 5).

Com relação ao endireitamento postural e reflexo de sobressalto a ANOVA de duas vias não apontou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Tabela 8 - Dia pós-natal (DPN) para o aparecimento dos reflexos posturais e de sobressalto e para o desaparecimento do reflexo de preensão palmar da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Parâmetros	Gênero	Controle (n=9)	<i>Senna occidentalis</i>		
			1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
PP	♂	4,77±1,30	4±0,70**	5,14±1,06	4,71±0,48
	♀	4,77±1,30	4,33±0,70	5±1,15	5,28±0,75
EP	♂	4,11±1,53	3,33±1	3,42±1,51	3±1
	♀	4±1,65	2,88±0,78	3,57±1,61	3,28±1,38
GN	♂	6,11±1,05	5,33±0,5	5,71±0,75	5,14±0,37*
	♀	5,88±0,78	5,33±0,5	5,71±0,75	5,71±0,75
RS	♂	12,22±0,44	11,88±0,60	12,28±0,48	12,57±0,78
	♀	12,11±0,60	11,66±0,70	12,28±0,48	12,14±0,89

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni: *p<0,05; **p<0,01

Legenda: **PP**=preensão palmar; **EP**=endireitamento postural; **GN**=geotaxia negativa; **RS**=reflexo de sobressalto; n=número de animais de cada gênero por grupo

Figura 5 - Dia pós-natal (DPN) do aparecimento do reflexo de geotaxia negativa e desaparecimento do reflexo de preensão palmar da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Notas: Dados expressos em média e desvio padrão; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni: *p<0,05; **p<0,01

4.6 Campo Aberto durante a lactação (DPN 15 a 21)

As tabelas 9 a 13 mostram os parâmetros da atividade geral em campo aberto da prole lactente masculina (DPN 15 a 21) de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação.

A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na locomoção (tabela 9), no levantar (tabela 10), no tempo de imobilidade (tabela 12) e no número de bolos fecais (tabela 13); quanto ao grooming foram observadas diferenças entre os grupos com relação ao tratamento ($F(3/196)=4,35$, $p<0,0054$), no entanto, não houve diferenças com relação ao tempo e nem interação entre os fatores. O teste de Bonferroni evidenciou redução do grooming nos machos ($p<0,05$) provenientes do grupo de 3%, no DPN 15, em relação aos filhotes do grupo controle (tabela 11).

As tabelas 9 a 13 mostram também os parâmetros da atividade geral em campo aberto da prole lactente feminina (DPN 15 a 21) de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação.

A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na locomoção (tabela 9), no levantar (tabela 10), no grooming (tabela 11) e no tempo de imobilidade (tabela 12); quanto ao número de bolos fecais foram observadas diferenças entre os grupos com relação ao tempo ($F(6/196)=14,78$, $p<0,0001$), no entanto, não houve diferenças com relação ao tratamento e nem interação entre os fatores. O teste de Bonferroni evidenciou aumento no número de bolos fecais das fêmeas ($p<0,05$) provenientes dos grupos de 2% e 3%, no DPN 21, em relação aos filhotes do grupo controle (tabela 13).

Tabela 9 - Unidade de locomoção da prole lactente no campo aberto, nos diferentes dias pós-natais (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

DPN	Gênero	Controle (n=9)	<i>Senna occidentalis</i>		
			1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
15	♂	3,22±3,76	8±6,96	8,85±10,91	7,71±6,36
	♀	4,88±6,52	10,44±14,18	7,28±6,57	4,42±6,29
16	♂	4,88±8,73	14,11±12,77	11±10,03	5,85±8,21
	♀	5,33±8,3	10,88±8,97	9,85±6,20	9±8,42
17	♂	6,33±5,67	19,44±15,70	8,71±8,88	12,14±8
	♀	16,44±17,44	17,33±12,22	13,71±7,52	24,28±11,32
18	♂	11,33±8,2	22,22±17,94	7±4,43	10±11,54
	♀	25,66±22,22	27,22±13,15	37,28±39,70	30,28±16,39
19	♂	14,66±13,08	29,44±19,26	9,28±8,28	18,85±17,69
	♀	23,22±24,35	26,22±17,60	37,28±28,70	44,71±25,11
20	♂	20,55±13,88	35,55±35,73	18,42±12,35	19,57±18,98
	♀	31±15,74	38,88±23,15	40,42±20,23	24,71±11,51
21	♂	25,77±18,51	40,66±21,08	23,42±21,46	35,14±17,66
	♀	33±27,18	37,55±12,47	47,57±26,12	46,14±24,66

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni: $p > 0,05$

Legenda: n=número de animais de cada gênero por grupo

Tabela 10 - Frequência de levantar da prole lactente no campo aberto, nos diferentes dias pós-natais (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

DPN	Gênero	Controle (n=9)	<i>Senna occidentalis</i>		
			1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
15	♂	2,22±3,23	1,55±1,81	1,85±4,48	1,71±2,05
	♀	0,77±1,30	3,77±3,80	1,14±1,21	2,42±4,27
16	♂	1,44±2,12	2,33±3,60	2,85±4,59	2,57±2,37
	♀	2,44±3,43	1,77±1,39	2,85±3,23	4±5,03
17	♂	2,11±2,57	3,22±2,22	3,71±4,49	3,28±1,97
	♀	3,77±5,21	4,44±2,92	3,28±2,92	4,42±3,95
18	♂	3,11±3,1	3,44±3,90	2,28±1,60	1,14±1,77
	♀	6,11±5,37	6,66±5,19	6,42±6,87	6±3,26
19	♂	2,55±1,81	5,11±4,88	1,57±1,27	4±4,76
	♀	4,11±3,88	5,44±4,77	7,57±7,41	8,14±5,04
20	♂	3,11±3	5,55±7,16	3,42±2,76	2±3,60
	♀	4,77±3,7	7,66±6,20	5,28±3,09	5±4,08
21	♂	3,44±3,87	7,22±5,33	4,14±5,20	6,85±6,03
	♀	5,11±4,64	8,11±4,56	9,28±11,41	10,85±6,71

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni: $p > 0,05$

Legenda: n=número de animais de cada gênero por grupo

Tabela 11 - Frequência de grooming da prole lactente no campo aberto, nos diferentes dias pós-natais (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Frequência de Grooming					
DPN	Gênero	Controle (n=9)	<i>Senna occidentalis</i>		
			1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
15	♂	2,22±1,20	1,33±0,86	1,42±0,78	0,71±0,75*
	♀	1,77±1,64	1±0,70	0,85±0,69	0,85±0,89
16	♂	1,88±0,92	1,88±0,78	2,28±0,75	1,85±0,69
	♀	1,11±1,05	1,77±1,20	0,71±0,75	1,42±0,97
17	♂	2±1,22	2,33±1	1,71±1,25	1,85±1,06
	♀	1,11±0,78	1,44±0,88	0,85±0,69	1±1,15
18	♂	2,55±1,50	2,22±1,20	1,57±0,53	1,57±1,13
	♀	1,33±1,58	1,44±1,13	1±0,57	1,28±1,11
19	♂	2,44±0,72	1,66±0,5	1,57±0,97	2±0,81
	♀	1,88±1,16	1,33±0,5	1,14±0,69	0,85±0,69
20	♂	2,22±0,97	1,55±1,01	1,85±0,89	1,28±0,75
	♀	2,22±1,64	1,55±0,88	1,28±0,48	1,42±0,53
21	♂	1,77±0,66	1,77±0,44	1,85±1,06	1,42±0,53
	♀	1,77±1,30	1,22±0,97	1±0,57	1,28±0,95

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni:
*p<0,05

Legenda: n=número de animais de cada gênero por grupo

Tabela 12 - Tempo de imobilidade (em segundos) da prole lactente no campo aberto, nos diferentes dias pós-natais (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

DPN	Gênero	Controle	<i>Senna occidentalis</i>		
		(n=9)	1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
15	♂	63,11±42,21	49,33±35,47	81±57,13	73,85±32,01
	♀	73,44±27,66	50,22±40,44	71,57±37,53	95±0
16	♂	56,11±35,86	48,44±28,50	65,28±38,89	43±20,61
	♀	63,22±48,56	50,22±24,30	81,28±46,88	32,57±24,58
17	♂	74,33±41,98	26,66±15,44	46,14±19,91	34±22
	♀	65,44±68,72	38,88±28,86	37,14±27,16	28,71±26,65
18	♂	54,33±48,74	52,22±42,02	62,42±31,83	98,14±31,26
	♀	43,22±46,70	30,88±22,49	39±42,58	38,42±32,84
19	♂	44,44±24,58	39,88±24,08	65,57±38,83	43±46,32
	♀	48,22±30,65	35,44±39,06	24,14±32,84	27,71±34,80
20	♂	49,22±53,23	58,11±57,79	57,57±22,11	56,28±48,63
	♀	40,44±39,43	24,55±35,07	18,14±24,31	50,57±34,48
21	♂	48±36,07	28±37,16	64,57±61,42	28,42±31,61
	♀	57,11±49,27	26,77±24,40	30,71±33,75	18,28±24,66

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni: $p > 0,05$

Legenda: n=número de animais de cada gênero por grupo

Tabela 13 - Quantidade de bolos fecais da prole lactente no campo aberto, nos diferentes dias pós-natais (DPN), provenientes de ratas expostas ou não (controle) à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

DPN	Gênero	Controle (n=9)	<i>Senna occidentalis</i>		
			1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
15	♂	0,22±0,44	0±0	0±0	0±0
	♀	0,11±0,33	0±0	0,14±0,37	0,14±0,37
16	♂	0±0	0±0	0,28±0,48	0,28±0,48
	♀	0,33±0,7	0,33±0,5	0,14±0,37	0,57±0,78
17	♂	0±0	0,44±1,33	0,28±0,48	0,28±0,48
	♀	0,33±0,7	0,33±0,7	0,42±0,53	0,28±0,48
18	♂	0,33±0,7	0,33±0,70	0,28±0,48	0,28±0,48
	♀	0,33±0,7	0,88±1,16	0,57±0,53	1,14±1,06
19	♂	0,44±0,72	1±1,32	0,42±1,13	1±1,41
	♀	0,77±0,97	0,22±0,44	1,28±1,49	0,71±1,49
20	♂	1,11±0,92	1,66±1,5	1,28±1,70	1±1,29
	♀	1,44±1,81	1,88±1,83	1,71±1,70	1,71±1,97
21	♂	1,77±2,33	2,22±1,85	1±1	2,28±1,88
	♀	1,33±1,65	2,22±2,33	3,14±2,34*	3,28±2,42*

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni:

*p<0,05

Legenda: n=número de animais de cada gênero por grupo

4.7 Comportamento de Brincar

A tabela 14 mostra os parâmetros avaliados no comportamento de brincar dos filhotes machos de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação.

A ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos diferentes parâmetros avaliados no comportamento de brincar.

Tabela 14 - Parâmetros avaliados no comportamento de brincar dos filhotes machos provenientes de ratas expostas ou não (controle) à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Parâmetros	Controle (n=9)	<i>Senna occidentalis</i>		
		1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
PT	7,88±6,77	4,22±2,72	6,57±6,42	9,57±8,75
PI	7±6,24	3,33±2,44	5,85±6,36	7,57±6,13
PA	0,88±0,92	0,88±1,53	0,71±0,95	2±4
PS	22,55±19	38,55±16,01	29,42±17,93	40,28±11,39
M	3,77±6,15	4,44±5,43	7,14±6,09	6,85±5,11
F	86,88±29,28	86,11±27,71	86,71±30,56	76,71±26,79
P	41,77±27,04	33,55±9,54	45,57±29,13	37,14±11,73
EA	97,33±45,74	80,88±21,63	117±81,68	92,14±31,34

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett: $p>0,05$

Legenda: **PT**=Pinning Total; **PI**=Pinning animal isolado por baixo; **PA**=Pinning animal agrupado por baixo; **PS**=Passar sobre ou sob o animal agrupado; **M**=Montar no animal agrupado; **F**=Farejar animal agrupado (seg); **P**=Perseguir animal agrupado (seg); **EA**=Exploração do ambiente (seg; sem contato com animal agrupado); n=número de animais por grupo

4.8 Campo Aberto na idade adulta (DPN 75)

A tabela 15 mostra os parâmetros da atividade geral em campo aberto da prole adulta (DPN 75) de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação.

A ANOVA de uma via ($F(3/28)=2,75$, $p=0,7815$) seguida do teste de Dunnett mostrou diminuição na frequência de levantar dos machos ($p<0,05$) pertencentes ao grupo de 2% em comparação aos machos do grupo controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos demais parâmetros avaliados no campo aberto.

Tabela 15 - Parâmetros da atividade geral em campo aberto da prole adulta (DPN 75) proveniente de ratas expostas ou não (controle) à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Parâmetros	Gênero	Controle	<i>Senna occidentalis</i>		
		(n=9)	1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
LO	♂	107,11±43,61	132,22±27,16	105,42±35,64	132,57±40,47
	♀	166,33±34,73	162,55±30,17	165,14±22,36	161,42±30,34
LE	♂	23,33±7,01	17,44±4,79	15,28±5,96*	17,28±6,26
	♀	33,11±19,04	26,55±18,54	29,71±9,58	24,57±6,82
G	♂	1,77±1,56	1,66±0,70	1,28±1,38	0,71±0,75
	♀	0,66±1	1,11±1,16	0,71±0,48	0,14±0,37
I	♂	19,22±33,01	4,66±6,26	12±16,53	0±0
	♀	0,44±1,33	3,66±7,31	0±0	0±0
BF	♂	4,11±3,01	1,77±1,92	4,14±2,73	1,14±1,95
	♀	1,44±1,87	2,22±2,72	0,85±1,57	0,28±0,48

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett: * $p<0,05$
 Legenda: **LO**=unidade de locomoção; **LE**=frequência de levantar; **G**=frequência de grooming; **I**=tempo de imobilidade (seg); **BF**=quantidade de bolos fecais; n=número de animais de cada gênero por grupo

4.9 Labirinto em Cruz Elevado

A tabela 16 mostra os parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação.

A ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos diferentes parâmetros avaliados.

Tabela 16 - Parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado da prole proveniente de ratas expostas ou não (controle) à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Parâmetros	Gênero	Controle (n=9)	<i>Senna occidentalis</i>		
			1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
%EBA	♂	17,0±21,85	23,0±20,94	23,0±19,83	19,0±17,78
	♀	23,0±16,67	28,0±13,79	31,0±20,47	22,0±14,92
%PBA	♂	12,0±18,78	20,0±22,65	20,0±18,04	17,0±17,58
	♀	26,0±19,20	22,0±17,54	30,0±20,79	17,0±12,16
AR	♂	7,67±3,35	9,22±2,54	5,86±2,27	9,29±2,69
	♀	8,33±6,10	10,89±4,73	6,71±2,36	11,14±2,34
OB	♂	5,0±4,18	8,11±5,80	8,14±4,18	7,0±3,51
	♀	10,78±6,94	10,0±5,63	11,71±5,71	8,86±4,63

Notas: Dados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett: $p>0,05$
 Legenda: **%EBA**: % de entrada em braços abertos; **%PBA**: % de permanência em braços abertos; **AR**: frequência de avaliação de risco; **OB**: frequência de olhar para baixo; n=número de animais de cada gênero por grupo

4.10 Labirinto em T

A tabela 17 mostra os escores obtidos no labirinto em T da prole de ratas do grupo controle e de ratas que receberam na ração 1%, 2% ou 3% de sementes de *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação.

O teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Tabela 17 - Escores obtidos no labirinto em T da prole proveniente de ratas expostas ou não (controle) à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação

	Gênero	Controle	<i>Senna occidentalis</i>		
		(n=9)	1% (n=9)	2% (n=7)	3% (n=7)
Escores	♂	1 (0 – 2)	2 (0 – 2)	2 (0 – 2)	2 (1 – 2)
	♀	1 (0 – 2)	2 (1 – 2)	1 (0 – 2)	2 (1 – 2)

Notas: Dados expressos em mediana e respectivos limites mínimo e máximo; Kruskal-Wallis: $p > 0,05$

Legenda: n=número de animais de cada gênero por grupo

Discussão

5 DISCUSSÃO

A toxicidade da *Senna occidentalis* é atribuída à diantrona, uma quinolona, cujo mecanismo de ação tóxico se deve ao desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial, promovendo dano mitocondrial especialmente nos órgãos com maior demanda de oxigênio. A diantrona se encontra em maior quantidade nas sementes da planta, portanto, foram adicionadas diferentes concentrações da semente da planta à ração comercial e administradas a ratas prenhes.

No presente estudo foram empregadas, inicialmente, as concentrações de 1%, 2% e 4%, baseadas em estudos prévios de nosso laboratório (BARBOSA-FERREIRA et al., 2005), porém a concentração de 4% mostrou-se altamente tóxica para as ratas prenhes, sendo portanto, excluída do estudo e substituída pela concentração de 3%. No entanto, os dados de sua toxicidade foram apresentados.

Em estudos perinatais com agentes tóxicos é importante o emprego de três doses, sendo recomendável que a maior delas promova ligeira toxicidade materna, a menor não produza qualquer efeito nocivo e a outra seja uma dose intermediária entre elas. Tal fato é justificado, pois alterações na homeostase materna, promovidas por uma intoxicação, poderão se refletir na prole de maneira indireta; assim, não ficaria claro se os efeitos tóxicos dever-se-iam a uma intoxicação materna ou a um efeito direto do agente tóxico nos filhotes (BERNARDI, 2006).

A administração da *S. occidentalis* às ratas prenhes ocorreu do 6º ao 20º dia de gestação, que compreende o período de organogênese e de desenvolvimento fetal. Neste período já ocorreu a implantação embrionária no útero e, assim, não são observadas toxicidade pré-implantação e reabsorções (BERNARDI, 2006).

As concentrações de 2% e 3% reduziram o ganho de peso das fêmeas no final da gestação. Desta forma, estas concentrações produziram toxicidade materna, sugerindo um efeito cumulativo ou de toxicidade retardada. Apesar disto, o número de filhotes, peso da prole, razão macho/fêmea, bem como o tempo de gestação não foram modificados pela exposição à *S. occidentalis*. Já as ratas que receberam a concentração de 4% mostraram, além da diminuição no ganho de peso, diminuição no consumo de ração, prejuízo no desempenho reprodutivo e sinais de intoxicação.

Estudos prévios de nosso grupo mostraram que a exposição de cabras à concentração de 4% de sementes de *S. occidentalis* durante a gestação, provocou toxicidade expressa por lesões hepáticas e renais, na musculatura esquelética e músculo

cardíaco e em nervo ciático; com relação ao desempenho reprodutivo observaram-se reabsorções e o óbito de uma fêmea. Menores concentrações que a de 4% não produziram toxicidade materna e fetal (BARBOSA-FERREIRA et al., 2011). Diferenças ligadas à espécie podem explicar as diferenças de toxicidade entre cabras e ratas.

Os cuidados parentais em mamíferos, incluindo o materno, são essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento global dos filhotes, principalmente filhotes de ratos, pois estes nascem altriciais, isto é, parcialmente imóveis, desprovidos de pelos, surdos, cegos e incapazes de regular a própria temperatura (GROTA; ADER, 1969; SALE et al., 2007). Em ratos, particularmente, o comportamento materno manifesta-se antes do nascimento e perdura até a lactação. Esse comportamento consiste na recuperação ou busca da cria, sua limpeza, construção do ninho, posição de amamentação, tempo gasto amamentando, entre outros fatores (STERN; YU; CROCKETT, 2002; MOURA et al., 2010).

A recuperação e o agrupamento dos filhotes são importantes manifestações do comportamento materno, pois a mãe busca os filhotes para mantê-los unidos e aquecidos, facilitando a amamentação e a limpeza dos mesmos (MOURA et al., 2010). A amamentação é mais intensa no início do período da lactação, justamente para garantir o desenvolvimento dos filhotes, sendo este o período mais crítico da vida desses animais. Nossos resultados mostraram que não houve diferenças para o início da amamentação nos diferentes grupos estudados, porém algumas ratas não apresentaram o comportamento materno total (*full maternal behavior*).

Considerando que houve retardo para a busca do 1º ao 5º filhote das ratas do grupo de 2%, em comparação às ratas do grupo controle, pode-se concluir que houve prejuízo na motivação do comportamento materno destas ratas e, este achado pode estar relacionado com fatores hormonais, uma vez que, sabe-se que os hormônios são fundamentais para a presença do comportamento materno (RUSSEL et al., 2001; NUMAM; INSEL, 2003; GIOVENARDI et al., 2005) ou ainda, que houve redução da resposta materna aos estímulos provenientes dos filhotes, através de sons, sinais táteis e olfatórios (LONSTEIN; GAMMIE, 2002). No entanto, não foram observadas alterações no comportamento materno após a exposição à maior concentração da *S. occidentalis*, evidenciando um efeito bifásico.

Com relação ao desenvolvimento ponderal a prole feminina e masculina das ratas expostas às várias concentrações da *S. occidentalis* não mostrou alterações na infância e puberdade, porém na idade adulta verificou-se que fêmeas expostas às concentrações de 1% e 3% tiveram pesos maiores que das ratas do grupo controle, evidenciando uma toxicidade retardada. Apenas as fêmeas de mães expostas à concentração de 3%

mostraram também menor comprimento corporal em relação ao grupo controle, revelando além de toxicidade retardada, redução no seu desenvolvimento geral. Desta forma, a exposição à *S. occidentalis* promoveu maior toxicidade em fêmeas que em machos. Provavelmente este fato se deve às diferenças ligadas ao sexo, já bastante conhecidas na literatura.

Na avaliação do desenvolvimento físico foi visto que a exposição à *Senna occidentalis* adiantou o aparecimento de pelos em filhotes machos e fêmeas provenientes do grupo de 1% e a erupção dos dentes incisivos em filhotes machos do mesmo grupo. Assim, pode-se especular que a planta interferiu direta ou indiretamente sobre o fator de crescimento epidérmico (EGF – *Epidermal Growth Factor*), um polipeptídeo que está envolvido no desenvolvimento físico, podendo tanto acelerar quanto atrasar a manifestação dos diferentes parâmetros avaliados (HOATH, 1986; CALAMANDREI; ALLEVA, 1989; SMART et al., 1989).

Os fatores de crescimento são proteínas que se ligam a receptores da membrana celular, ativando assim a proliferação e a diferenciação celular. Muitos fatores de crescimento estimulam a divisão celular em diferentes tipos de células, enquanto outros são específicos para um tipo celular particular, como o EGF (COHEN, 1962). O EGF regula e estimula a proliferação e a diferenciação nos epitélios, estando presente em vários fluidos corporais como: urina, leite, saliva, plasma e líquido amniótico (CONSOLARO; CONSOLARO, 2010). A primeira descrição do EGF foi feita por Cohen (1962), o qual identificou este polipeptídeo nas glândulas submandibulares de ratos, sendo excretado diretamente na saliva. Este fator foi envolvido na aceleração da erupção dos dentes incisivos e na abertura dos olhos dos recém-nascidos.

O estudo do desenvolvimento comportamental dos filhotes permite a avaliação da maturidade dos sistemas que controlam os diversos reflexos. A avaliação comportamental da prole tanto na infância como na idade adulta é importante para o estudo dos efeitos nocivos provocados por agentes tóxicos com ação no sistema nervoso central (SNC). Dessa forma, sabendo que a diantrona produz efeitos tóxicos no SNC e atravessa a barreira transplacentária, a prole das ratas expostas à *S. occidentalis* foi avaliada não só quanto ao desenvolvimento físico, como também quanto ao desenvolvimento de reflexos e comportamentos, que podem expressar possíveis alterações no SNC.

Com relação ao desenvolvimento de reflexos da prole, a exposição às sementes da planta adiantou a perda da preensão palmar em filhotes machos provenientes do grupo de 1% e o aparecimento da geotaxia negativa em filhotes machos provenientes do grupo de 3%.

A preensão palmar é um reflexo medular que tende a desaparecer no decorrer da vida pós-natal dos filhotes (DIAMENT, 1978). Sabendo que este reflexo é originado no tronco cerebral e suprimido pelo processo de mielinização dos centros superiores do SNC (CAPUTE; ACCARDO, 1996), pode-se sugerir que houve adiantamento para a maturação desta região do sistema nervoso.

Os ajustes posturais, como o reflexo de endireitamento e de geotaxia negativa, são regulados por três sistemas: vestibular, exteroceptivo e proprioceptivo. Portanto, os reflexos de endireitamento postural e geotaxia negativa de ratos jovens refletem o desenvolvimento motor e as atividades controladas pelo sistema vestibular (ALTMAN, 1975; DIAMENT, 1978). Além disso, o cerebelo e o sistema visual também estão envolvidos na regulação da postura. Estes dados em conjunto sugerem que a exposição à *Senna occidentalis* adiantou a maturação destes sistemas.

Considerando que a integridade do sistema vestibular também pode ser avaliada por meio da atividade motora geral do animal (ALTMAN, 1975; ALTMAN; SUDARSHAN, 1975; DIAMENT, 1978), com a finalidade também de estudar o desenvolvimento do sistema vestibular, a atividade motora geral da prole foi acompanhada por sete dias consecutivos, em campo aberto, do DPN15 ao DPN21.

Originalmente o teste de campo aberto foi criado por Calvin Hall em 1932, este relacionava a defecação do animal com um índice de timidez, ou emocionalidade (WALSH; CUMMINS, 1976); atualmente, este teste é bastante utilizado para avaliar a atividade locomotora e exploratória, relacionando-as ou não a emocionalidade dos roedores.

Segundo Walsh e Cummins (1976), o comportamento no campo aberto depende de como o animal responde a uma variedade de fatores como: a retirada do seu ambiente moradia, a transferência para o aparato de campo aberto, o fato de estar num ambiente novo (aparato) e em uma sala diferente, além da ocorrência de experiências anteriores, pois um animal re-exposto ao aparato responde de maneira diferente de um animal submetido ao teste pela primeira vez.

Um dos fatores relevantes na observação do comportamento do animal no campo aberto é a sua tendência a movimentar-se, conhecida como atividade geral. A quantificação dessa locomoção pode refletir o comportamento, uma vez que o animal permanecerá imóvel (*freezing*) quando apresentar alto grau de ansiedade. Além da locomoção, o comportamento de levantar (onde o animal fica apoiado nas patas traseiras e eleva o tronco para farejar o ambiente verticalmente) é a manifestação de um processo exploratório de aproximação das regiões modificadas do ambiente. Este parâmetro tende a aumentar de frequência frente à estimulação nova (WALSH; CUMMINS, 1976).

Segundo Archer (1973), a exploração do roedor é inversamente proporcional ao medo, ou emocionalidade: “a alta emocionalidade inibe a exploração e a baixa emocionalidade a facilita”.

Como ambientes abertos são naturalmente aversivos para os ratos, estes tendem a permanecer mais tempo na periferia do aparato do que no centro, mantendo suas vibrissas e corpo em contato com a parede do campo aberto; este comportamento é chamado de tigmotaxia, uma estratégia evoluída para evitar predadores, sobretudo os predadores aéreos (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1980; MA et al., 2007). O comportamento de auto-limpeza (ou *self-grooming*) observado no campo aberto, tem sido tomado como a expressão de um decréscimo na emocionalidade e mostra independência das situações de medo (MA et al., 2007).

Ao analisar a atividade geral das proles masculina e feminina dos diferentes grupos experimentais em campo aberto, nos dias 15 a 21 da lactação, observaram-se alterações pontuais e em parâmetros ligados à limpeza (*grooming*) e defecação. Portanto, embora se tenha observado adiantamento em reflexo postural, este fato não promoveu interferência significativa no desenvolvimento motor dos animais expostos às sementes da planta durante o período perinatal.

Com relação ao comportamento de brincar, segundo Vieira e Sartorio (2002):

“A brincadeira é um comportamento bastante frequente na vida de animais jovens, principalmente mamíferos. O seu estudo pode ser considerado um meio pelo qual é possível compreender como ocorre o desenvolvimento comportamental e social. Apesar de termos diversos resultados de pesquisa, principalmente em relação aos fatores causais, ainda não é possível afirmar categoricamente para que serve a brincadeira e como ocorreu a sua evolução filogenética.”

No presente estudo, a exposição às diferentes concentrações das sementes de *S. occidentalis* não modificou o brincar de ratos machos pré-púberes e, portanto, não modificou a interação social destes animais na infância.

Da mesma forma que na infância, a exposição prenatal às sementes da *Senna occidentalis* promoveu poucas alterações relevantes no comportamento dos machos e fêmeas na idade adulta. Somente foi observado, no campo aberto aos 75 dias de vida, que a concentração de 2% reduziu a frequência de levantar dos machos, não havendo alteração nos demais parâmetros.

O labirinto em cruz elevado é um modelo animal validado do ponto de vista farmacológico, bioquímico e comportamental como teste de ansiedade no rato (VALLE, 1970; BLIZARD; LIPPMAN; CHEN, 1975). Sua funcionalidade como um modelo animal de ansiedade baseia-se na atividade exploratória espontânea e na aversão natural do animal pelos braços abertos. O número de entradas e tempo gasto nos braços abertos são empregados como indicadores inversamente relacionados à ansiedade (PELLOW et al., 1985; HOGG, 1996); assim, quanto mais intensa a exploração dos braços abertos, menor a ansiedade.

Várias manipulações são capazes de alterar o comportamento do rato nesse teste, observando-se aumentos seletivos na exploração dos braços abertos após a administração de ansiolíticos, como clordiazepóxido e diazepam. Em contraposição, agentes farmacológicos que provocam ansiedade diminuem a atividade exploratória nos braços abertos (PELLOW et al., 1985). Também neste teste, não foram notadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais e controle, indicando que a exposição pré-natal às sementes da planta não promoveu efeitos em longo prazo na ansiedade dos animais.

No labirinto em T, um modelo de aprendizado espacial, da mesma forma que nos demais testes realizados na idade adulta, não foram observadas diferenças entre animais expostos às sementes da planta e o grupo controle. Portanto, embora se tenha observado alteração no desenvolvimento do reflexo de geotaxia negativa na infância, a percepção espacial dos animais não foi modificada na idade adulta. Além disto, pode-se também sugerir que o aprendizado dos ratos machos e fêmeas também não foi modificado pela exposição pré-natal às sementes da *Senna occidentalis*.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Os estudos realizados mostraram que:

- A exposição a diferentes concentrações (1 – 4%) das sementes da *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação, provocou toxicidade materna dose-dependente, avaliada pelas alterações do ganho de peso, consumo de ração e desempenho reprodutivo, bem como os achados de necropsia;
- A exposição materna à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação, causou prejuízo no comportamento materno;
- A exposição à *Senna occidentalis*, do 6º ao 20º dia de gestação, alterou o desenvolvimento físico da prole, demonstrado pelo adiantamento para o aparecimento de pelos e para a erupção dos dentes incisivos; além disso, modificou o desenvolvimento de reflexos, promovendo adiantamento para a perda da preensão palmar e para o início da geoataxia negativa;
- Durante a infância, não foram observadas interferências na atividade geral e comportamento de brincar da prole exposta à *Senna occidentalis* no período perinatal, revelando que a atividade exploratória e a socialização destes ratos não foram modificadas;
- Na idade adulta, não foram observados efeitos relevantes em longo prazo no comportamento da prole, uma vez que o comportamento em campo aberto, no labirinto em cruz elevado e no labirinto em T não foram modificados de forma importante pela exposição à *Senna occidentalis* no período perinatal.

Referências

ALTMAN, J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. IV. Spatial organization of bipolar cells, parallel fibers and glial palisades. **Journal of Comparative Neurology**, v. 163, n. 4, p. 427-447, 1975.

ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Animal Behaviour**, v. 23, n. 4, p. 896-920, 1975.

ARAGAO, T. P.; LYRA, M. M.; SILVA, M. G.; ANDRADE, B. A.; FERREIRA, P. A.; ORTEGA, L. F.; et al. Toxicological reproductive study of *Cassia occidentalis* L. in female Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 1, p. 163-166, 2009.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behavior**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

BARBOSA-FERREIRA, M.; DAGLI, M. L.; MAIORKA, P. C.; GORNIK, S. L. Sub-acute intoxication by *Senna occidentalis* seeds in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 497-503, 2005.

BARBOSA-FERREIRA, M.; PFISTER, J. A.; GOTARDO, A. T.; MAIORKA, P. C.; GORNIK, S. L. Intoxication by *Senna occidentalis* seeds in pregnant goats: prenatal and postnatal evaluation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, n. 3, p. 263-268, 2011.

BARROS, C. S. L. Intoxicação por plantas que afetam o sistema muscular - intoxicação por *Senna occidentalis*. In: RIET-CORREA, F. M.; SCHILD, M. C.; IL, A. **Pelotas: Hemisfério Sul do Brasil**, p. 201-223, 1991.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 807-816.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Atividade geral: conceito e medidas. **Psicologia USP**, v. 6, p. 43-38, 1980.

BLIZARD, D. A.; LIPPMAN, H. R.; CHEN, J. J. Sex differences in open-field behavior in the rat: the inductive and activational role of gonadal hormones. **Physiology & Behavior**, v. 14, n. 5, p. 601-608, 1975.

CALAMANDREI, G.; ALLEVA, E. Epidermal growth factor has both growth-promoting and growth-inhibiting effects on physical and neurobehavioral development of neonatal mice. **Brain Research**, v. 477, n. 1-2, p. 1-6, 1989.

CAPUTE, A. J.; ACCARDO, P. J. The infant neurodevelopmental assesement: a clinical interpretive manual for CAT-CLAMS in the first Two years of life, part 2. **Current Problems in Pediatrics**, v. 26, n. 8, p. 265-306, 1996.

CAVALIERE, M. J.; CALORE, E. E.; HARAGUCHI, M.; GORNIK, S. L.; DAGLI, M. L.; RASPANTINI, P. C.; et al. Mitochondrial myopathy in *Senna occidentalis*-seed-fed chicken. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 37, n. 2, p. 181-185, 1997.

CHAHOU, I.; BUSCHMANN, J.; CLARK, R.; DRUGA, A.; FALKE, H.; FAQI, A.; et al. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation. Report of the Second Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology Berlin, 27-28 August 1998. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 1, p. 77-82, 1999a.

CHAHOU, I.; LIGENSA, A.; DIETZEL, L.; FAQI, A. S. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 375-381, 1999b.

COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, p. 1555-1562, 1962.

CONSOLARO, A.; CONSOLARO, M. F. M. O. As funções dos Restos Epiteliais de Malassez, o EGF e o movimento ortodôntico. **Dental Press J. Orthod.**, v. 15, n. 2, p. 24-32, 2010.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; OLIVEIRA, R. T.; ANDRADE, A. J.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 9, p. 665-673, 2007.

DIAMENT, A. J. [The basis of neurologic development]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 36, n. 4, p. 285-302, 1978.

DUDCHENKO, P. A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 7, p. 699-709, 2004.

GIOVENARDI, M.; DE AZEVEDO, M. S.; DA SILVA, S. P.; HERMEL, E. D. E. S.; GOMES, C. M.; LUCION, A. B. Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. **Physiology & Behavior**, v. 86, n. 1-2, p. 209-217, 2005.

GÓRNIK, S. L.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Toxicologia do desenvolvimento. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. p. 701-731.

GROTA, L. J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behaviour in *Rattus norvegicus*. **Animal Behaviour**, v. 17, n. 4, p. 722-729, 1969.

HARAGUCHI, M.; CALORE, E. E.; DAGLI, M. L.; CAVALIERE, M. J.; CALORE, N. M.; WEG, R.; et al. Muscle atrophy induced in broiler chicks by parts of *Senna occidentalis* seeds. **Veterinary Research Communications**, v. 22, n. 4, p. 265-271, 1998a.

HARAGUCHI, M.; GORNIK, S. L.; CALORE, E. E.; CAVALIERE, M. J.; RASPANTINI, P. C.; CALORE, N. M.; et al. Muscle degeneration in chicks caused by *Senna occidentalis* seeds. **Avian Pathology**, v. 27, n. 4, p. 346-351, 1998b.

HOATH, S. B. Treatment of the neonatal rat with epidermal growth factor: differences in time and organ response. **Pediatric Research**, v. 20, n. 5, p. 468-472, 1986.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 21-30, 1996.

HUSSAIN, H. S. N.; DEENI, Y. Y. Plants in Kano ethnomedicine: screening for antimicrobial activity and alkaloids. **Int J Pharm.**, v. 29, n. 1, p. 51-56, 1991.

JAFRI, M. A.; JALIS SUBHANI, M.; JAVED, K.; SINGH, S. Hepatoprotective activity of leaves of *Cassia occidentalis* against paracetamol and ethyl alcohol intoxication in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 3, p. 355-361, 1999.

LEMONICA, I. P. Embriofetotoxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 12-94.

LOMBARDO, M.; KIYOTA, S.; KANEKO, T. M. Aspectos étnicos, biológicos e químicos de *Senna occidentalis* (Fabaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 30, p. 9-17, 2009.

LONSTEIN, J. S.; GAMMIE, S. C. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 8, p. 869-888, 2002.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil** (Vol. I). Nova Odessa: Plantarum, 1991.

MA, W. P.; CAO, J.; TIAN, M.; CUI, M. H.; HAN, H. L.; YANG, Y. X.; et al. Exposure to chronic constant light impairs spatial memory and influences long-term depression in rats. **Neuroscience Research**, v. 59, n. 2, p. 224-230, 2007.

MAKRIS, S. L.; KIM, J. H.; ELLIS, A.; FABER, W.; HARROUK, W. **Current and Future Needs for Developmental Toxicity Testing**, 2011.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MARIANO-SOUZA, D. P. **Avaliação dos efeitos tóxicos da *Senna occidentalis* em ratos. Parâmetros: bioquímicos, hematológicos, anatomopatológicos e inflamatórios**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MARIANO-SOUZA, D. P. **Efeitos tóxicos da *Senna occidentalis* sobre o sistema linfopoiético: Avaliação da exposição de ratos durante a fase de crescimento e pré-natal**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MEDOUA, G. N.; MBOFUNG, C. M. F. Kinetics studies of some physicochemical substances during roasting and preparation of beverage made by *Cassia occidentalis* seeds. **LWT-Food Sci Technol**, v. 40, n. 4, p. 730-736, 2006.

MOURA, L. M.; CANTERAS, N. S.; SUKIKARA, M. H.; FELICIO, L. F. Morphine infusions into the rostralateral periaqueductal gray affect maternal behaviors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 899-905, 2010.

NAKAGE, A. P. M.; MACARI, M.; NAKAGHI, L. S.; MALHIEROS, E. B.; VASQUES, L. H.; SECATO, E. R. Haematological and hormonal studies from broiler chickens fed with corn contaminants: *Crotalaria spectabilis* and *Senna occidentalis*. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 37, n. 5, p. 377-381, 2000.

NUMAM, M.; INSEL, T. R. **The neurobiology of parental behavior**. New York: Springer, 2003.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

RUSSEL, J. A.; DOUGLAS, A. J.; WINDLE, R. J.; INGRAM, C. D. **The maternal behavior: neurobiological and neuroendocrine adaptation and disorders in pregnancy and post partum**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001.

SALE, A.; CENNI, M. C.; CIUCCI, F.; PUTIGNANO, E.; CHIERZI, S.; MAFFEI, L. Maternal Enrichment during Pregnancy Accelerates Retinal Development of the Fetus. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11, p. 1160, 2007.

SHARMA, N.; TRIKHA, P.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Protective effect of *Cassia occidentalis* extract on chemical-induced chromosomal aberrations in mice. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 643-653, 1999.

SILVA, T. C.; GORNIK, S. L.; OLORIS, S. C.; RASPANTINI, P. C.; HARAGUCHI, M.; DAGLI, M. L. Effects of *Senna occidentalis* on chick bursa of Fabricius. **Avian Pathology**, v. 32, n. 6, p. 633-637, 2003.

SMART, J. L.; DA SILVA, V. A.; MALHEIROS, L. R.; PAUMGARTTEN, F. J.; MASSEY, R. F. Epidermal growth factor advances some aspects of development but retards others in both rats and hamsters. **J Dev Physiol**, v. 11, n. 3, p. 153-158, 1989.

SOYUNCU, S.; CETE, Y.; NOKAY, A. E. Portal vein thrombosis related to *Cassia angustifolia*. **Clin Toxicol (Phila)**, v. 46, n. 8, p. 774-777, 2008.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária** (Vol. I). São Paulo: Manole, 2008.

STERN, J. M.; YU, Y. L.; CROCKETT, D. P. Dorsolateral columns of the spinal cord are necessary for both suckling-induced neuroendocrine reflexes and the kyphotic nursing posture in lactating rats. **Brain Research**, v. 947, n. 1, p. 110-121, 2002.

TASAKA, A. C. **Estudo da toxicidade da *Senna occidentalis* em coelhos. I - Avaliação em animais durante a fase de crescimento. II - Efeitos perinatais.** Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil** (Vol. I). Rio de Janeiro, 2000.

TONA, L.; MESIA, K.; NGIMBI, N. P.; CHRIMWAMI, B.; OKOND'AHOKA; CIMANGA, K.; et al. In-vivo antimalarial activity of *Cassia occidentalis*, *Morinda morindoides* and *Phyllanthus niruri*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 47-57, 2001.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **Am J Psychol**, v. 83, n. 1, p. 103-111, 1970.

VASHISHTHA, V. M.; KUMAR, A.; JOHN, T. J.; NAYAK, N. C. *Cassia occidentalis* poisoning causes fatal coma in children in western Uttar Pradesh. **Indian Pediatr**, v. 44, n. 7, p. 522-525, 2007.

VIEIRA, M. L.; SARTORIO, L. Análise motivacional, causal e funcional da brincadeira em duas espécies de roedores. **Estud. psicol. (Natal) [online]**, v. 7, n. 1, p. 189-196, 2002.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

YADAV, J. P.; ARYA, V.; YADAV, S.; PANGHAL, M.; KUMAR, S.; DHANKHAR, S. *Senna occidentalis*. A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. **Fitoterapia**, v. 81, p. 223-230, 2010.