ESTHER LOPES RICCI ADARI CAMARGO

Estudo de neuroteratologia em ratos: efeitos da restrição alimentar e da monocrotalina

SÃO PAULO
2010

ESTHER LOPES RICCI ADARI CAMARGO

Estudo de neuroteratologia em ratos: efeitos da restrição alimentar e da monocrotalina

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 obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia Experimental e Comparada

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo

2010

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.2292
FMVZ

Ricci, Esther Lopes
Estudo de neuroteratologia em ratos: efeitos da restrição alimentar e da monocrotalina / Esther Lopes Ricci. -- 2010.
93 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa.

1. Monocrotalina. 2. Restrição alimentar. 3. Intoxicação materna. 4. Efeitos Neurotóxicos. 5. Ratos Wistar. I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1	**Estudo de neuroteratologia em ratos:...**	[Neuroteratology studies in rats:...

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos da monocrotalina e da restrição alimentar nos estudos de toxicologia do desenvolvimento", protocolado sob o nº1462/2008, utilizando 200 (duzentos) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Evaluation of monocrotaline effects and food restriction on studies of the developmental toxicology", utilizing 200 (two hundred) rats, protocol number 1462/2008, under the responsibility Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 21 de agosto de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Univrsitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone/Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
+ 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CAMARGO, Esther Lopes Ricci Adari

Título: Estudo de neuroteratologia em ratos: efeitos da restrição alimentar e da monocrotalina

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 obtenção de título de Mestre em Ciências

Data: 01 / 07 / 2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. Miriam Oliveira Ribeiro Instituição: Universidade Presbiteriana Mackenzie

Assinatura: _____ Julgamento: aprovada

Prof. Dr. SILVANA LIMA GÓES Instituição: FMVZ/USP.

Assinatura: _____ Julgamento: APROVADA

Prof. Dr. HELENICE DE S. SPINOSA Instituição: FMVZ/USP

Assinatura: _____ Julgamento: APROVADA

Este trabalho:

faz parte do Projeto Temático intitulado "*Toxinas de importância em Medicina Veterinária. Estudos de imunotoxicidade e teratogenicidade: avaliação da imunotoxicidade, neurotoxicidade e teratogenicidade em roedores e caprinos*", aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo nº 2006/06397-8), o qual é coordenado pela Profa. Dra. Silvana Lima Górniak e tem como colaboradora a Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa.

recebeu auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na forma de Bolsa de Mestrado à Esther Lopes Ricci , Processo nº 08/51539-9.

Toda honra e toda glória sejam dadas a Jesus Cristo.

Dedico este trabalho a duas das pessoas que mais amo
e que infelizmente não estão mais comigo.
Vó Maria e Vô Oswaldo, obrigada por todo o amor,
vocês sempre estarão vivos em meu coração,
são exemplos que sempre vou seguir.
Tenho certeza que ainda vamos nos reencontrar.
Amo muito vocês!!!!

Agradecimentos

À Deus, que é a minha força, minha alegria e meu porto seguro. Nunca me abandonou e não me abandonará jamais. Obrigada Jesus!

Ao meu marido Diogo, obrigada por não me deixar desistir, obrigada pelos sacrifícios que você fez para eu poder estudar, só nos dois sabemos o trabalho que te dei. Esta conquista também é sua! Afinal fizemos o mestrado juntos! Te amooooo!!

Aos meus pais, posso passar o resto da minha vida agradecendo e assim mesmo não será o suficiente por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim. Tudo o que eu alcançar sempre será graças a vocês! Amo vocês!!!

Aos meus irmãos Kel e Rô, obrigada por fazerem parte da minha vida, sei que sempre posso contar com vocês. Amo vocês!!!

A minha família, em especial Sula, Ronaldo e André. Obrigada por sempre me apoiarem e me incentivarem, vocês são muito especiais para mim! Amo vocês!!!

A minha sempre orientadora Maria Martha Bernardi, desde a graduação você tem sido não apenas minha orientadora, mas também amiga, conselheira, uma mãezona!!!! Agradeço muito a Deus por te colocado você na minha vida! Você é maravilhosa!!!!

A professora Helenice de Souza Spinosa, obrigada por aceitar me orientar, pela confiança e também por todos os ensinamentos, com você aprendi muito não só cientificamente, mas também muitas coisas que vou levar para o resto da minha vida. Foi uma honra ser sua orientada!

A sempre amiga Dani, obrigada pelas muitas conversas, risadas e almoços que já fazem parte da minha vida. Amo você e sua família!

Aos amigos do Mackenzie, Bia, Cintia, Bruno, Marina, Regis, Rô (chuchu), Carol, Nita, Malu, Lelê, Danilo, Nati, vocês são muito queridos!

Aos colegas do VPT, que contribuíram com alguma etapa deste trabalho: Fernando, Fabi, Lu Lippi, Lu Cunha, Camila, Andréia, Beatriz, Aline, Vânius, Thiaguinho, Tuka, Caio e em especial Thiago B. Kirsten pelas muuuuitas ajudas!

Aos professores do VPT, Jorge, Luciano, Silvana, Isis pelas ideias e auxílio quando necessário.

Ao professor Gustavo S. Mello Filho, obrigada pelo incentivo e ajuda no começo do mestrado enquanto eu ainda trabalhava no Mackenzie. Obrigada por me iniciar na pesquisa e por todas as oportunidades e confiança!

Aos funcionários do biotério, pelos cuidados dispensados aos animais utilizados nos experimentos.

A todos os funcionários da secretaria, laboratório e biblioteca do VPT, por toda ajuda sempre que necessário.

Resumo

RICCI, E. L. **Estudo de neuroteratologia em ratos: efeitos da restrição alimentar e da monocrotalina**.[Neuroteratology studies in rats: effects of feed restriction and monocrotaline].2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os problemas causados pela exposição dos animais as plantas no Brasil data dos primórdios da colonização. Em particular, as plantas do gênero *Crotalaria* são encontradas em todo o mundo, distribuídas principalmente em áreas tropicais e subtropicais; tem como principal princípio ativo o alcalóide pirrolizidínico monocrotalina (MCT) encontrado nas suas sementes e partes aéreas. No presente trabalho foram avaliados tanto a toxicidade aguda da MCT, como os efeitos da exposição durante a gestação, a diferentes doses da MCT, sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole de ratas. Além disso, foi estudado também os efeitos da restrição alimentar (RA) em ratas prenhes e em sua prole, uma vez dados anteriores do nosso laboratório mostraram que a MCT reduziu o peso corpóreo de ratos tratados por 14 dias. Assim, ratas *Wistar* foram submetidas à restrição alimentar, durante 6º ao 20º dia de gestação, recebendo 85, 60, 45 ou 30% do consumo médio diário de ração (100% = 22,75 g de ração). Os resultados mostraram que a RA: a) promoveu canibalismo materno dependente da intensidade da RA da mãe, sendo que no grupo de maior restrição (30%) nenhum filhote sobreviveu; b) causou redução do peso corpóreo da prole, sendo que este efeito foi observado a partir do 14º dia de vida nas proles proveniente de ratas com 45% de RA e aos 35 dias de vida nos filhotes oriundos de ratas dos grupos 60, 45 e 30% de RA; c) na avaliação do desenvolvimento físico da prole não foram observadas alterações entre os grupos, exceto no peso corpóreo da prole; d) na avaliação neurocomportamental foi observado apenas redução da atividade geral da prole, sendo este efeito dependente da intensidade da RA. A MCT (10, 30 e 100 mg/kg) administrada em dose única em ratos, ratas e fêmeas prenhes promoveu alterações nos escores de avaliação clínica dose-dependente e as fêmeas prenhes mostraram ser mais sensíveis ao efeito tóxico de MCT que as fêmeas virgens e machos. A exposição à MCT (1,0; 3,5 e 7,0 mg/kg) durante a gestação promoveu: a) redução do número de filhotes nascidos das mães que receberam 3,5 e 7,0 mg/kg, em relação às mães controles e *pair-feeding* (grupo que recebeu a mesma quantidade de ração consumida pelo grupo tratado com a maior de MCT); b) redução do peso corpóreo da prole do grupo que recebeu 1,0 e 7,0 mg/kg, a partir do 35º dia de vida; c) na avaliação do desenvolvimento físico da prole não foram observadas alterações entre os grupos, exceto no peso corpóreo da prole;

d) na avaliação neurocomportamental foi observado apenas aumento do tempo de imobilidade, medido em campo aberto da prole de mães que receberam 3,5 e 7,0 mg/kg de MCT. Os presentes achados revelaram que a RA tem papel de pouca importância na toxicidade da MCT, mostrando não haver correlação íntima entre a perda de peso materno e desenvolvimento dos filhotes expostos a toxina e a RA. A inclusão do grupo *pair-feeding* parece ser importante quanto aos estudos de toxicidade do desenvolvimento, pois representam um controle dos aspectos nutricionais envolvidos no teste. Sugere-se também que nos protocolos de avaliação da toxicidade do desenvolvimento sejam incluídos estudos da interação mãe-filhote e do desenvolvimento tardio da prole exposta.

Palavras-chave: Monocrotalina. Restrição alimentar. Intoxicação materna. Efeitos Neurotóxicos.Ratos Wistar.

ABSTRACT

RICCI, E. L. **Estudo de neuroteratologia em ratos: efeitos da restrição alimentar e da monocrotalina**.[Neuroteratology studies in rats: effects of feed restriction and monocrotaline].2010. 93 f. Dissertação (mestrado em ciências)- Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The problems caused by the exposure of animals to plants in Brazil dates from the early days of colonization, in particular, plants of the genus Crotalaria. These plants can be found worldwide, mainly distributed in tropical and subtropical areas; its main active principle is the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline (MCT), which is found in their seeds and aerial parts. In the present study it was evaluated the acute toxicity of MCT, as the effects of exposure during pregnancy and the different doses of MCT on the physical and neurobehavioral development of rat offsprings. In addition, we also studied the effects of feed restriction (FR) in pregnant rats and their offspring since previous data from our laboratory showed that the MCT decreased body weight of rats treated for 14 days. Thus, Wistar rats were subjected to feed restriction during the 6th to 20th day of gestation, receiving 85, 60, 45 or 30% of average daily feed intake (100% = 22.75 g diet). The data showed that RF: a) promoted maternal cannibalism dependent on the intensity of the RA's mother, knowing that the largest group of restriction (30%) no offspring survived, b) it reduced the body weight of offspring, but this effect was observed from day 14 of life in the offspring from rats with 45% FR and 35 days of life in the offspring of rats from groups 60, 45 and 30% of FR, c) in the assessment of physical development of offspring no changes were observed between groups, except the body weight of offspring, d) neurobehavioral evaluation was observed reduction only in the general activity of the offspring and this effects being dependent on the severity of RA. The MCT (10, 30 and 100 mg / kg) administered as a single dose in rats and pregnant rats caused alterations in the scores of clinical dose-dependent and pregnant females were shown to be more sensitive to the toxic effects of MCT than virgin females and males.

Exposure to MCT (1.0, 3.5 and 7.0 mg / kg) during pregnancy promoted: a) reduction on the number of pups born of mothers who received 3.5 and 7.0 mg / kg when compared to mothers and controls pair-feeding (group received the same amount of feed consumed by the group treated with the highest MCT), b) reduction of body weight of offspring of the group that received 1.0 and 7.0 mg / kg from the 35th day of life, c) on the evaluation of the physical development of offspring no changes were observed between groups, except the body weight of offspring, d) on neurobehavioral evaluation it was observed increase of immobility only in the time. These were measured on the open field of the offspring of mothers who received 3.5 and 7.0 mg / kg MCT.

The present findings revealed that RA has a minor role in the toxicity of MCT, showing no close correlation between maternal weight loss and development of offspring exposed to toxin and RA. The inclusion of the pair-feeding group appears to be important when regards the toxicity studies of development, knowing that this can represent a control of the nutritional aspects involved in the test. It also suggest that in the protocols of toxicity development evaluation be included studies of mother-cub and the late development of offspring exposed.

Keywords: Monocrotaline. Feed restriction. Maternal intoxication. Neurotoxic effects. Wistar Rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 Sobre a Crotalaria 15
1.2 Sobre a toxicologia do desenvolvimento 18
1.3 Sobre a restrição alimentar 20

2 OBJETIVOS 26
2.1 Objetivo geral 26
2.2 Objetivos específicos 26

3 MATERIAL E MÉTODOS 27
3.1 Animais 27
3.2 Monocrotalina 27
3.3 Procedimentos 29
3.4 Análise estatística 36

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS 39
4.1 Experimento- 1: Padronização do consumo médio de ração e avaliação do peso materno nas condições do nosso biotério 39
4.2 Experimento- 2: Efeitos da restrição alimentar, em ratas, durante o período de gestação: avaliação de neuroteratogenicidade 40
4.3 Experimento- 3: Avaliação da toxicidade aguda induzida pela MCT em ratos machos, fêmeas virgens e gestantes 52
4.4 Experimento- 4: Efeitos da administração de MCT durante a gestação na prole de ratas: avaliação de neuroteratogenicidade 54

5 DICUSSÃO 67

6 CONCLUSÃO 80

REFERÊNCIAS 82

1 INTRODUÇÃO

Os problemas causados pela exposição de animais a plantas no Brasil data dos primórdios da colonização. Assim, já em 1587 o senhor de engenho Gabriel Soares de Souza, em seu “Tratado Descritivo do Brasil”, além de fazer alusão à grande riqueza da fauna e flora, mencionou a alta mortalidade de gado devido à ingestão de ervas (HOEHNE, 1939). Atualmente, considerando que muito poucos grupos de pesquisa brasileiros estão empenhados na caracterização das principais plantas potencialmente tóxicas para a criação animal em nosso país, já foram catalogadas mais de 80 destes vegetais (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000).

É bastante difícil precisar as perdas econômicas advindas da intoxicação por plantas no Brasil. Assim, ao contrário do que ocorre com alguns países como os Estados Unidos e a Austrália, nos quais são calculados estes prejuízos anualmente, em nosso país sabe-se apenas que há grande mortalidade na pecuária devido a este tipo de intoxicação. Entretanto, a morte não é a principal perda econômica, já que a grande maioria das plantas tóxicas no Brasil causa intoxicação crônica (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000). Deste modo, devem-se considerar, fundamentalmente, os prejuízos devido à queda na produtividade e ganho de peso, efeitos no sistema imune, os quais podem causar doenças decorrentes do efeito imunotóxico, e também alterações na esfera reprodutiva, particularmente efeitos teratogênicos. Outro aspecto que deve ser considerado quando se considera a relevância do estudo das plantas tóxicas se refere ao fato de que as toxinas destas plantas podem ser veiculadas por produtos de origem animal, como leite, carne, ovos, mel etc, podendo, desta maneira, produzir efeitos nocivos de maneira indireta no ser humano (PANTER; JAMES, 1990).

1.1 SOBRE A CROTALARIA

As plantas do gênero *Crotalaria* pertencem à família das Leguminosae, que compreende cerca de 600 espécies de plantas. A *Crotalaria* spp. (figura 1) possui distribuição mundial, principalmente em áreas tropicais e subtropicais do planeta (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2000). No Brasil, são conhecidas cerca de 40 espécies de

Crotalaria (TOKARNIA; DOBEREINER, 1979) e estas são amplamente cultivadas com objetivo de produzir “adubo verde”, haja vista que a C*rotalaria* spp, por ser uma Leguminosae, possui a característica de fixar o nitrogênio no solo, sendo assim empregada em áreas de solo “pobre” (JOLY, 1977). As principais formas de intoxicação de animais de produção são decorrentes da invasão das áreas cultivadas por estas, principalmente em períodos de estiagem; invasão destas plantas em pastagens; ou ainda, contaminação do feno pela planta ou por suas sementes (MEDEIROS, 1999).

Figura 1- *Crotalaria sp*

Além de ser um problema na pecuária decorrente das perdas econômicas que a toxicose causa, esta planta também pode ser considerada como um problema de saúde pública, já que o metabólito tóxico de seu princípio ativo, a monocrotalina (MCT), pode ser excretada no leite e também nos ovos e no mel (WILSON et al., 1992). Ainda, o uso

deliberado destas plantas na forma de chá e de “medicamentos” ditos populares são preocupações constantes, não só no Brasil, como em todos os países onde estas plantas são encontradas (HUXTABLE, 1980).

O principal princípio ativo da *Crotalaria* spp. é o alcalóide pirrolizidínico MCT. Porém, para que ocorra a toxicidade, é necessário que este alcalóide seja biotransformado no fígado, especificamente pelo sistema microssomal P-450-3A (KASAHARA et al., 1997), gerando destarte três metabólitos: o ácido monocrótico; a retronecina e a deidromonocratalina, também denominada de pirrol da monocrotalina (MCTP – *monocrotaline pirrol*), sendo este o metabólico tóxico deste alcalóide (MEDEIROS, 1999).

Shah, Patel e Sehgal (2005) sugerem que um dos possíveis mecanismos de toxicidade do MCTP esteja na sua interferência no transporte de proteínas e de receptores do complexo de Golgi até a membrana plasmática; ainda, Mukhopadhyay et al. (2006) consideram que o alargamento do reticulo endoplasmático rugoso e o comprometimento da atividade mitótica (megalocitose) também seja decorrente da injúria no complexo de Golgi.

As alterações mais freqüentemente observadas em animais de produção naturalmente intoxicados pela planta são aquelas relacionadas à hepatotoxicidade e à nefrotoxicidade. Histologicamente, estas alterações caracterizam-se por necrose hepática periacinar, megalocitose de hepatócitos com infiltrado neutrófílico (WILSON et al., 1992), glomerulonefrite e lesões do epitélio tubular renal (FIGUEREDO; RODRIGUEZ; ALFONSO, 1987). Ainda, em roedores e seres humanos, a intoxicação pela MCT promove hipertensão pulmonar caracterizada por edema deste órgão, com inflamação intersticial e vasculite com conseqüente desenvolvimento do *cor pulmonale* (CHESNEY; ALLEN; HSU, 1974; PAN et al., 1993; LEHRMAN et al., 2002).

Recentemente, em nossos laboratórios Hueza et al. (2009) observaram que administração de 7,0 mg/kg de MCT por 14 dias promoveu redução do peso corpóreo dos ratos, embora não tenha havido diminuição do consumo de ração. Esses autores observaram também diminuição da celularidade da medula óssea e alteração do óxido nítrico liberado pelos macrófagos.

Levando-se em consideração que são escassos os estudos sobre a toxicologia do desenvolvimento envolvendo a MCT, um dos objetivos do presente trabalho de pesquisa é avaliar os efeitos da exposição a diferentes doses da MCT durante a gestação sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole de ratas.

1.2 SOBRE A TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

A toxicologia do desenvolvimento abrange o estudo da toxicocinética, mecanismo de ação tóxico, patogênese e as conseqüências da exposição a agentes tóxicos ou condições que levem ao desenvolvimento anormal do animal (ROGERS et al., 2001). As manifestações da toxicidade no desenvolvimento incluem malformações estruturais, retardo no crescimento, dano no desenvolvimento e a morte do organismo.

O termo toxicologia do desenvolvimento é recente e refere-se a uma área do conhecimento relativamente nova, mas tem suas raízes firmemente relacionadas à teratologia que foi antigamente associada às alterações apenas de ordem estrutural (GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008). Atualmente, a toxicologia do desenvolvimento tem como sinônimo a teratologia. A toxicologia do desenvolvimento preocupa-se com efeitos prejudiciais produzidos pela exposição a diferentes agentes em organismos em desenvolvimento. Para que um agente seja classificado como um toxicante do desenvolvimento ele precisa produzir seus efeitos adversos no concepto em níveis de exposição que não induzam sinais severos de toxicidade materna (isto é, perda de peso, êmese persistente, hipo- ou hiperatividade, convulsões etc.)

O período de desenvolvimento embriológico e fetal consiste num desenrolar contínuo de mudanças e variações complexas, sendo marcadas por fases durante as quais se desenvolvem processos similares nas diferentes espécies de vertebrados (BERNARDI, 2006; GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008). Os agentes químicos aos quais o concepto está exposto durante o período de desenvolvimento representam um risco potencial para a ocorrência de toxicidade, o qual pode variar não só em função da natureza e concentração do agente, bem como através da interação do mesmo com outros fatores como espécie, raça, idade, estado nutricional, estresse e, especialmente, suscetibilidade individual (BERNARDI, 2006; GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008). Este desenvolvimento embrio-fetal de mamíferos pode ser dividido em quatro períodos: implantação, organogênese, desenvolvimento fetal e período neonatal.

A exposição a agentes tóxicos no período inicial do desenvolvimento (implantação) pode não causar embriotoxicidade, a menos que seja em uma dose elevada e, neste caso, normalmente verifica-se embrioletalidade (BERNARDI, 2006; GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008). O período de organogênese, organogenético ou embriogênico abrange

desde a proliferação e migração celular até a formação de órgãos rudimentares; neste período podem ocorrer malformações estruturais se as lesões produzidas por um agente tóxico forem compatíveis à vida (BERNARDI, 2006; GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008). Após a organogênese segue-se o período fetal e neonatal; exposições que se iniciam durante estes períodos podem apresentar anormalidades celulares e teciduais, mas os defeitos no desenvolvimento mais característicos são o retardo no crescimento e anormalidades funcionais (WILSON, 1965; BERNARDI, 2006; GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008). As anomalias do sistema nervoso central (SNC) e imune, tais como déficit no comportamento, mental e motor, bem como imunossupressão estão entre as prováveis conseqüências.

Muita controvérsia existe atualmente no que se refere à adequação e a validade dos protocolos de testes utilizados para avaliação de toxicidade. De fato, estes até hoje são baseados no conhecimento da toxicologia reprodutiva e do desenvolvimento de mais de 40 anos atrás, sendo que estes modelos foram diretamente influenciados pela tragédia ocorrida com a talidomida, que, sem dúvidas, teve um papel fundamental para o desenvolvimento da teratologia. No entanto, a simples observação de malformações e/ou anomalias não traduz, em hipótese nenhuma, o risco de teratogênese de uma dada substância química. Basicamente, um ponto deve ser reavaliado quando se consideram os atuais protocolos utilizados: estes apenas indicam os possíveis efeitos tóxicos mais óbvios que são a morte, alteração no desenvolvimento e as alterações estruturais (malformações/anomalias). Portanto, alterações mais sutis, mas não menos importantes, são descartadas da avaliação da teratogenicidade. Por outro lado, deve-se considerar que tem sido grande a preocupação das agências de regulamentação em se estabelecer e incorporar tanto protocolos de neurotoxicidade (CLAUDIO et al., 2000; LADICS et al., 2005), como de imunotoxicidade (HOLSAPPLE; WEST; LANDRETH, 2003; LADICS et al., 2005), já que se sabe que no feto ambos os sistemas são bem mais susceptíveis aos agentes tóxicos. Para tais estudos é necessário que proles sejam mantidas vivas até, pelo menos, o final da lactação, para que sejam aplicados os diferentes testes nestes animais. Esta avaliação tem, ainda, outra grande vantagem adicional, que é de se poder avaliar alterações morfológicas também nos filhotes em desenvolvimento e jovens adultos, já que este tipo de avaliação nos fetos é bastante comprometida, pois nesta fase não há o completo desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas, tornando praticamente impossível a avaliação histopatológica.

Atualmente, existem muitas informações disponíveis sobre a origem dos distúrbios no desenvolvimento resultante da exposição *in utero* a um determinado xenobiótico; no entanto, há grande preocupação por parte dos pesquisadores no que se refere à acurácia dos protocolos existentes para avaliar adequadamente os potenciais riscos da exposição a estas diversas substâncias químicas durante o desenvolvimento. Neste sentido, embora toda toxicidade deva resultar de um insulto no concepto ao nível celular, esta injúria poderá ocorrer não só de maneira direta, isto é, resultante de sua ação no feto, como também indiretamente, por meio de alterações ocorridas no organismo materno. Assim, condições maternas como alteração no fluxo sanguíneo uterino, anemia e desnutrição, as quais comprometem seriamente a homeostase da gestante, podem afetar adversamente o organismo em desenvolvimento (KHERA, 1984; ROGERS; KAVLOCK, 2001). Para alguns autores, o peso corpóreo materno durante a gestação é o principal fator que contribui para a saúde do desenvolvimento fetal. Neste sentido, estudos realizados nas últimas duas décadas vêm mostrando que o *status* nutricional materno é crítico para o desenvolvimento de teratogenicidade (KEEN, 1992).

1.3 SOBRE A RESTRIÇÃO ALIMENTAR

No mundo, mais de 20 milhões de crianças têm peso baixo ao nascer, o que representa 15,5% dos nascimentos, 95,6% deles ocorrem em países em desenvolvimento. Mais da metade das crianças nascidas nesses países não são submetidas a qualquer teste biométrico, como a pesagem; portanto estes números são subestimados. Assim, estima-se que milhões de neonatos sejam afetados pela restrição alimentar materna (WHO, 2008).

A restrição alimentar (RA) é descrita como uma forma de aumentar a expectativa de vida em diversos organismos, incluindo mamíferos (PARTRIDGE; PLETCHER; MAIR, 2005). A RA é caracterizada pela redução da quantidade total de alimento ingerida. Em 1935, McCay, Crowell, Maynard relataram que a expectativa de vida em ratos pode ser aumentada em 80% se a RA começar a partir do desmame. Efeitos similares também foram observados em camundongos, os quais apresentam aumento da longevidade e têm menos doenças associadas ao envelhecimento (WEINDRUCH; SOHAL, 1997). Overton e Williams (2004) demonstram que a RA em roedores é uma potente forma de ativar o sistema nervoso simpático, que, por sua vez, promove redução do metabolismo e, conseqüentemente, resulta em um maior tempo de vida.

Demonstrou-se, ainda, que primatas não-humanos têm menor risco de desenvolver doenças neurodegenerativas, como, por exemplo, doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington (WEINDRUCH; SOHAL, 1997; DUAN; MATTSON, 1999; LEE et al., 2000) quando submetidos a RA. Especula-se que isso possa ocorrer devido ao aumento da resistência neural provocada pela RA (MATTSON, 2000). Em seres humanos, a redução de calorias na dieta pode ocasionar aumento de dois a três anos na expectativa de vida (GREY, 2005).

A diversidade de benefícios provocados pela baixa ingestão calórica tem sido muito estudada. A RA muitas vezes está associada a alterações imunológicas, neuroendócrinas e diminuição no metabolismo, que atuam no mecanismo de conservação de energia por meio do baixo consumo de oxigênio (LUZ et al., 1995; SANTOS-PINTO; LUZ; GRICCIO, 2001), ou denominado de adaptação mitocondrial (JOHNSON et al., 2006). Em 2000, foi relatado por Lee et al. (2000) que curtos períodos de RA podem acarretar aumento da neurogênese em camundongos e ratos, e também durante o envelhecimento, preservar os níveis de serotonina e dopamina, que podem ser correlacionados com a diminuição na incidência de doenças neurodegenerativas (DUAN; MATTSON, 1999).

Dentre as diversas alterações descritas em ratos submetidos a RA, Mouret e Bobillier (1971) e Rock et al. (1999) demonstraram que a RA pode ocasionar alteração na distribuição do ciclo vigília-sono em ratos em virtude do aumento do sono de ondas lentas e do sono paradoxal durante o período escuro e diminuição na fase clara, efeito oposto ao padrão normal, uma vez que, por serem animais de hábito noturnos, a vigília predomina á noite e o sono durante o dia (TIMO-LARIA et al., 1970; ANDERSEN et al., 2001). O rato dorme cerca de 62% do período diurno e 33% durante o período noturno, se bem que na maior parte deste ele permaneça comendo, explorando o ambiente, interagindo com outros ratos, procriando e formando ninho.

Uma série de comportamentos também pode sofrer influência da RA. Ratos submetidos a essa condição demonstram maior tempo de permanência nos braços abertos em testes de labirinto em cruz elevado, sugerindo menor ansiedade (INOUE et al., 2004). Também foi observado, que a restrição calórica em dias alternados durante dois a quatro meses, promove maior resistência de neurônios hipocampais que pode ser relacionado com a preservação do aprendizado e memória em testes de labirinto aquático (BRUCE-KELLER et al., 1999). Além disso, a RA promove alterações no comportamento sexual acarretando

retardo na fase de puberdade, diminuição da motivação sexual e da atividade copulatória desses animais (HERBERG, 1963; SACHS; MARSAN, 1972; SANTOS et al., 2004).

Já é sabido há algumas décadas que a RA promove diversas alterações no comportamento sexual. Alguns estudos demonstram que a RA acarreta diminuição da motivação sexual (OLDS, 1958; HERBERG, 1963). Na década de 1960, Sachs (1965) demonstrou que ratos restritos de comida por um período de até nove dias apresentam aumento da latência para iniciar a cópula e, ainda, quando esse período foi prolongado até 29 dias, os machos não apresentam intromissões e ejaculações. No entanto, os efeitos da RA em parâmetros do comportamento sexual são ainda pouco estudados na literatura.

A RA também tem importante papel protetor contra o estresse. Mattson, Duan e Guo (2003) relataram que quando há um aporte calórico escasso, as células são submetidas a um estresse energético que pode produzir mudanças na expressão de genes resultando em mudanças adaptativas no metabolismo celular, aumentando, assim, a resistência ao estresse do organismo. A resistência celular e molecular acarretada pela RA ainda não está bem esclarecida, mas acredita-se que alguns mecanismos, como a redução da produção de oxi-radicais e expressão de proteínas de estresse mitocondrial possam estar envolvidos (MATTSON, 2000).

Alguns mecanismos hormonais estão diretamente ligados com a ingestão de alimentos, sinalizando a necessidade de ingerir alimentos, como, por exemplo, a grelina, ou relacionados com a saciedade, provocando redução na ingestão de alimentos, como, por exemplo, a leptina (KOJIMA; HOSODA; DATE, 1999).

O núcleo arqueado do hipotálamo é o maior sítio regulador da ingestão alimentar e do peso corporal, contendo neurônios orexígenos e anorexígenos. Os neurônios orexígenos liberam o neuropepitídeo Y (NPY) e as proteínas relacinadas ao gene agouti (AgRP). A grelina estimula aliberação desses peptídeos que são potentes estimuladores do apetite (KOJIMA; HOSODA; DATE, 1999).

As concentrações plasmáticas de grelina curiosamente são baixas em sujeitos obesos quando comparados com sujeitos magros, enquanto indivíduos com dieta de baixo teor calórico, ou com anorexia nervosa apresentam níveis elevados (TSCHOP; SMILEY; HEIMAN, 2000). As causas dessas diferenças ainda não são conhecidas. No entanto, especula-se que a grelina pode ser um fator orexígeno que contribui acentuadamente para o apetite voraz e, conseqüentemente, a obesidade vista nesta síndrome (CUMMINGS et al., 2002).

A ação da leptina ocorre a partir da ativação de receptores específicos presentes nos órgãos alvos. Existem dois tipos de receptores para leptina, o ObRb, de cadeia longa (maior quantidade de aminiácidos), com maior expressão no hipotálamo, e os receptores de cadeia curta (menor quantidade de aminoácidos) ObRa são encontrados em outros órgãos como o pâncreas e, mais especificamente, nas células a e d das ilhotas de Langerhans (JANECKOVA, 2001).

A expressão da leptina é controlada por diversas substâncias, como a insulina, os glicocorticóides e as citocinas pró-inflamatórias. Estados infecciosos e as endotoxinas também podem elevar a concentração plasmática de leptina (NOVA et al., 2002). Inversamente, a testosterona, a exposição ao frio e as catecolaminas reduzem a síntese de leptina (GOUMENOU et al., 2003). Situações de estresse impostas ao corpo, como jejum prolongado e exercícios físicos intensos, provocam a diminuição das concentrações circulantes de leptina (KOLACZYNSKI et al., 1996), indicando, desta maneira, a atuação do SNC na inibição da liberação de leptina pelos adipócitos.

O NPY e a AgRP são de grande importância no sistema orexígeno, promovendo aumento da ingestão alimentar, diminuição do gasto energético e aumento da lipogênese em animais. A redução das concentrações de leptina e insulina ativam os neurônios produtores de NPY e AgRP no núcleo arqueado do hipotálamo (RIJKE et al., 2005). Assim, a expressão do RNAm desses neuropeptídeos se encontram aumentados durante um a sete dia após RA em camundongos (HAHN et al., 1998) e em ratos (BRADY et al., 1990).

Além da leptina, a insulina também informa a adequação das reservas energéticas ao hipotálamo. Esses dois hormônios são importantes para o controle do peso corporal de longo prazo (SCHWARTZ et al., 2000). Em relação ao controle alimentar de curto prazo, além da colecistocinina (CCK), outras substâncias pertencentes a este sistema foram estudadas, como, por exemplo, o peptídeo YY (PYY), um inibidor do apetite (MARX, 2003).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é um dos sistemas que também pode ser afetado pela RA. Garcia-Belenguer, Oliver e Mormede (1993) demonstraram que as concentrações de corticosterona estavam aumentadas em ratos após quatro semanas de RA a 50% e, ainda, que esses níveis permanecem elevados ao longo do dia. Outro eixo que também pode sofrer influência da RA é o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HPT), diminuindo a secreção hipofisária do hormônio tireoestimulante (TSH) e as concentrações séricas do hormônio da tireóide (ARMARIO; BALASCH; MARTINEZ, 1980; HERLIHY; STACY; BERTRAND, 1990). Alguns hormônios secretados pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

(HPG) também se encontram alterados, como, por exemplo, a redução do hormônio luteinizante (LH) e hormônio de crescimento (GH) (ARMARIO; BALASCH; MARTINEZ, 1980; LEONHARDT et al., 1999). Ainda relacionado com o eixo HPG, Sirotkin e colaboradores (2008) demonstraram que a administração crônica de leptina em ratos restritos de comida em 50% foi capaz de aumentar as concentrações de testosterona plasmática quando comparadas com animais que tiveram comida *ad libitum*.

Em particular, quanto aos efeitos da RA durante a gestação, sabe-se que alterações crônicas e agudas do consumo materno de nutrientes durante a gestação causam alterações na função do pâncreas e do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal nos descendentes antes e após o nascimento (OUSEY et al., 2008). Por outro lado, o ganho de peso materno apropriado durante a gestação é considerado o principal fator para o desenvolvimento pré-natal saudável em seres humanos (GABBE; NIEBY; SIMPSON, 2002).

Num estudo recente, conduzido por Fleeman et al. (2005) em ratos, no qual os efeitos da restrição alimentar materna em até 50% da dieta normal foram avaliados empregando-se os protocolos convencionais (isto é, avaliação fetal óssea e visceral), concluiu-se que esta restrição produziu apenas redução do peso fetal. Portanto, esta pesquisa sugeriu que o *status* nutricional materno não promoveria efeitos teratogênicos.

No mesmo sentido, Dipe (2009) constatou diminuição do peso dos filhotes no 21º dia da gestação e da placenta das ratas que foram submetidas a RA de 30, 45 e 60% durante a gestação, sendo este efeito dependente da intensidade da privação, mas não observou malformações ósseas e/ou viscerais nessas proles. Observou-se também que privação de ração promoveu aumento da ocorrência de ureteres sinuosos nos fetos das ratas submetidas a 30, 45 e 60% de RA durante a gestação.

Em estudos de avaliação de toxicidade de substâncias químicas administradas na ração de animais de laboratório durante a gestação pode ser observado redução do peso materno; este efeito pode ser atribuído tanto ao efeito tóxico direto da substância química sobre o organismo materno, como à interferência no consumo de ração causada por sua baixa palatabilidade. Para melhor avaliar esses efeitos, na literatura tem sido sugerida a introdução de um grupo *pair-feeding* (SILVA et al., 1987; FLEEMAN et al., 2005; DIPE, 2009). Esse grupo recebe a mesma quantidade de ração consumida pelo grupo experimental (isto é, exposto a substância em estudo) que apresenta a maior perda de peso corpóreo, para avaliar se a perda de peso, por si só, seria responsável pelos eventuais efeitos observados e não conseqüência da exposição à substância química que está sendo testada.

Considerando que MCT reduziu o peso corpóreo de ratos tratados por 14 dias (HUEZA et al., 2009), no presente trabalho foi avaliado não só os efeitos da exposição a diferentes doses da MCT durante a gestação sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole de ratas, com também os efeitos da restrição alimentar em ratas prenhes e em sua prole. Tanto a administração da MCT, com a restrição alimentar foram feitas apenas durante o período de organogênese e de desenvolvimento fetal do rato (respectivamente, 6º – 15º dias e 16º – 21º dias após a fecundação) (BERNARDI, 2006), para evitar que possíveis efeitos embriotóxicos ou que comprometessem a implantação (5º – 6º dias após a fecundação) (BERNARDI, 2006) conduzissem a embrioletalidade e, conseqüentemente, impedissem a gestação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar, em ratos, os efeitos da RA e da exposição a diferentes doses de MCT durante a gestação no desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar os efeitos da restrição alimentar durante a gestação de ratas, no desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole;

b) Avaliar a toxicidade da MCT administrada em dose única em ratos, ratas e fêmeas prenhes;

c) Avaliar os efeitos da exposição à MCT durante a gestação no desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 140 ratas Wistar fêmeas, virgens, sexualmente maduras, pesando aproximadamente 200 g e machos da mesma espécie, pesando em torno de 250 g, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia, da 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) mantidas em uma sala com temperatura controlada por meio de equipamento de ar condicionado (20 ± 3ºC) 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, exceto naqueles em que foi estudado o efeito da privação alimentar e no grupo *pair-feeding*. Este último grupo recebeu a mesma quantidade de ração consumida pelo grupo tratado com a maior de MCT. Para tanto, os grupos eram pareados e iniciava-se o tratamento com a MCT; averiguava-se, então, a quantidade de ração consumida por esses animais naquele dia e no dia seguinte essa mesma quantidade de ração era fornecida aos animais do grupo *pair-feeding*.

3.2 MONOCROTALINA (MCT)

A MCT foi obtida a partir das sementes de *C. spectabilis*, que foram gentilmente cedidas pela empresa especializada em grãos cultivares “Piraí Sementes” de Piracicaba, São Paulo, no ano de 2007; estas foram mantidas a -20ºC até o momento do uso.

Todo o processo de extração e purificação foi realizado pela Dra. Mitsue Haraguchi do Instituto Biológico de São Paulo. A seguir, todo o procedimento é sucintamente descrito.

Extração e purificação da MCT

As sementes de *C. spectabilis* (1 kg), secas e moídas, foram exaustivamente extraídas por processo de maceração com etanol 96%. Os extratos reunidos foram filtrados e

concentrados para eliminar o solvente em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura de aproximadamente 50° C até a secura. O resíduo etanólico foi dissolvido em solução constituída de etanol e água na proporção 1:1 e eluído em coluna de resina de troca-iônica catiônica (Amberlite IR-120B). Em seguida, a coluna foi lavada com água e eluído com solução de hidróxido de amônio 0,5M. A solução eluída foi evaporada no rotaevaporador nas mesmas condições acima para obter um resíduo de coloração esbranquiçada. Este resíduo foi recristalizado em metanol por três vezes até obter o produto cristalino incolor pesando 2,29 g. A sua pureza foi comparada com o padrão de MCT por cromatografia em camada delgada em placa de silicagel 60G e desenvolvida nos dois sistemas de solventes: A) clorofórmio, metanol, 17% de hidróxido de amônio (82,5:15,5:2) e B) clorofórmio, acetona, etanol e 17% de hidróxido de amônio (5:3:1:1). Ambas as placas foram reveladas com solução de o-cloranil em benzeno ou reagente de Ehrlich modificado contendo trifluoreto de borodietileterato para visualizar a mancha e medir o R_f comparando com padrão de MCT (MOLINEUX et al., 1980).

Estudo químico

O cristal obtido foi então submetido à análise elementar para averiguar o grau de pureza da MCT extraída, à Central Analítica do Instituto de Química – USP. A ressonância magnética nuclear de prótons (H^+) da MCT ($C_{16}H_{23}NO_3$) em clorofórmio deuterado a 500 MHtz, de carbono (C) em 125MHtz e de nitrogênio (N) em 125MHtz e, finalmente, oxigênio (O) em 500 MHtz, obtendo-se as seguintes percentagens: 59,05 para H^+ (esperado 59,06%); 6,80 para C (esperado 7,13); 4,39 para N (esperado 4,31) e 29,76 para O (esperado 29,51). Assim, foi determinado que a pureza da MCT cristalizada equivale a 99,26%.

A partir do cristal obtido, foram preparadas as doses de MCT empregadas no presente estudo.

3.3 PROCEDIMENTOS

Diagnóstico de prenhez

Para o acasalamento as fêmeas foram distribuídas duas a duas em gaiolas de polietileno, onde no final da tarde foi colocado um macho sabidamente fértil. Na manhã subseqüente, os machos foram retirados, e os esfregaços vaginais coletados.

Os fatores indicativos de prenhez foram: presença de espermatozóides (figura 2) e de células indicativas de estro (caracterizada como a fase estrôgenica máxima, onde se encontram apenas células queratinizadas). Este foi considerado como o dia 0 de gestação (GD 0). Durante a gestação foi mantida uma fêmea por gaiola, sendo que estas foram pesadas para controle de ganho de peso.

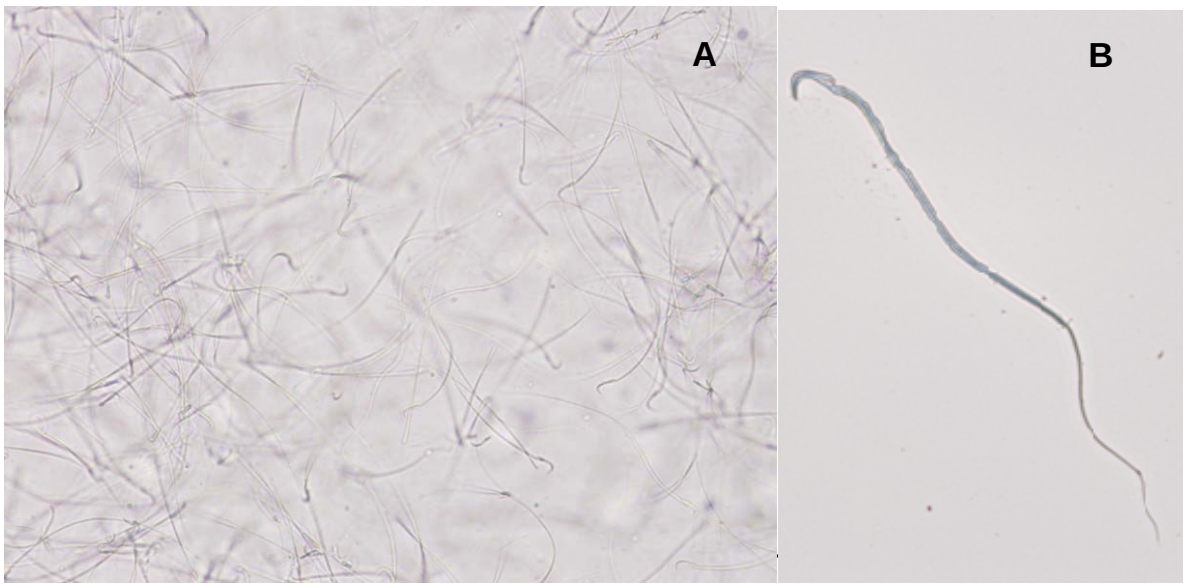

Figura 2- Lavado vaginal positivo de ratas contendo espermatozóides, observado ao microscópio óptico em aumento de (A) 20x e (B) 40x.

As fêmeas prenhes foram pesadas no GD O, GD 7, GD 14 e GD 21. Durante o período de gestação foram avaliados diariamente os consumos de água e de ração, sendo calculado, posteriormente a média dos consumos.

Avaliação do desenvolvimento ponderal dos filhotes

Todos os filhotes de cada fêmea foram pesados, individualmente, nos dias 2, 7, 14, 21, 28 e 35 após o nascimento (PND). Além disso, foram avaliados fisicamente para observação da ocorrência ou não de malformações visíveis e foram sexados pelo método da medição da distância anogenital (com auxílio de paquímetro). Posteriormente, a ninhada foi padronizada para um número de oito filhotes em proporções iguais de sexo. Ao final foram calculados os respectivos ganhos de peso dos animais dos grupos controle e experimentais. Os dados foram analisados tomando-se a ninhada como unidade.

A figura 3 ilustra uma fêmea com sua ninhada e a figura 4 uma ninhada de ratos padronizada com quatro machos e quatro fêmeas.

Figura 3 - Rata Wistar com filhotes

Figura 4 - Padronização das ninhadas em 4 machos e 4 fêmeas

Avaliação do desenvolvimento de reflexos e da atividade geral observada em campo aberto

A avaliação do desenvolvimento reflexológico permite a identificação de possíveis alterações neurocomportamentais desde o início de vida do animal. São feitos testes diários até que 100% dos filhotes escolhidos de cada ninhada apresentem os seguintes reflexos e comportamentos:

a) Reflexo de preensão palmar: o animal é contido em uma das mãos do pesquisador e uma das patas do membro torácico 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 é realizado no 2°, 4°, 6° e 10° dia da lactação, sendo que este é o único teste em que o reflexo desaparece ao longo do tempo.

b) Reflexo de endireitamento: o animal é colocado em decúbito dorsal, sendo medida a ocorrência ou não da resposta de virar o corpo para a posição de 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 é de 30 segundos. Este reflexo é observado do 5° ao 10° dia da lactação.

c) Reflexo de geotaxia negativa: os filhotes são colocados 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 30 segundos), para os animais voltarem à posição oposta, ou seja, voltados com a cabeça para cima (Figura 5). Quando os animais não apresentam o reflexo na 1° tentativa, eles podem ser testados mais duas vezes com a mesma latência. A ocorrência na 1°, 2° ou 3° tentativa também será registrada. Este reflexo é observado no 5°, 7°, 9°, 11° e 13° dia da lactação. A latência máxima é de 1 minuto.

Figura 5 - Plataforma com inclinação de 45º para a observação da geotaxia negativa do filhote

d) Dia de andar adulto: os filhotes são colocados sobre uma superfície plana (balcão) e observa-se se estes se apóiam 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 é observado do 10º ao 18º dia da lactação ou até o dia que os animais o apresentarem.

e) 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, segundo Alder e Zbinden (1977). Observa-se quando o animal apresenta um tremor generalizado logo após o ruído, que representa que o conduto auditivo está aberto. É registrado o dia em que o animal apresenta pela primeira vez este reflexo. Este teste é realizado do 11° ao 14° dia de lactação, ou até o dia que os animais o apresentarem.

f) Atividade motora: neste teste os animais são colocados em um campo aberto do 15° ao 20° dia da lactação e também aos 75 dias de vida, sempre durante um mesmo período (manhã ou tarde). Cada animal escolhido (1 fêmea e 1 macho/ninhada) é colocado individualmente no centro do aparelho de campo aberto, sendo observado por 3 minutos. Este campo aberto é construído segundo o modelo descrito por Broadhurst (1960), que consiste de uma arena de madeira, adaptada para filhotes de ratos (diâmetro de 40 cm com paredes laterais de 27 cm de altura) e para ratos adultos (diâmetro de 97 cm x 27 cm de altura) – Figura 6. O fundo deste aparelho é dividido em vinte e cinco partes aproximadamente iguais. Entre um animal e outro, o aparelho é limpo com solução de álcool a 5% para evitar-se a interferência do odor do animal anterior. Observa-se a freqüência de locomoção, de levantar e o número de bolos fecais (defecação). Define-se unidade de locomoção o ato de o animal penetrar com as quatro patas em uma das divisões do chão da arena; unidade de levantar corresponde à postura de o animal permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima, podendo ou não tocar com as patas dianteiras as paredes do campo aberto; e cada bolo de fezes produzido pelo animal durante o período de teste é registrado como unidade de defecação. O registro da freqüência dos parâmetros é feito por intermédio de um contador manual. O tempo de imobilidade (*freezing*) também pode ser medido (em segundos), sendo que a imobilidade é definida quando o animal não apresenta locomoção e sem movimentos de farejar. Este parâmetro é medido com o auxílio de um cronômetro.

Figura 6 – Campo aberto para a observação da atividade geral dos filhotes

Avaliação do desenvolvimento físico da prole de ratas

Para a avaliação do desenvolvimento físico dos animais foram observados os dias do desdobramento das orelhas, do nascimento de pêlos (figura 7), de abertura dos olhos e do canal auditivo, dia de andar adulto, da descida dos testículos e da abertura vaginal. É feita por meio de observações diretas, de cada filhote do(s) dia(s) em que, após o nascimento, ocorrerem os seguintes parâmetros:

a) Desdobramento de orelha: os filhotes escolhidos de cada ninhada foram observados entre o 1° e o 5° dia da lactação, quanto à ocorrência ou não deste parâmetro;

b) Erupção dos dentes incisivos: observada pela abertura da boca dos filhotes escolhidos, entre o 6° e o 12° dia da lactação, sendo registrado o dia exato do aparecimento do esmalte dos dentes superiores e também dos inferiores.

c) Abertura dos olhos: registrado o dia da ocorrência da primeira fresta da abertura dos dois olhos. Esta observação é realizada entre o 10° e o 15° dia da lactação.

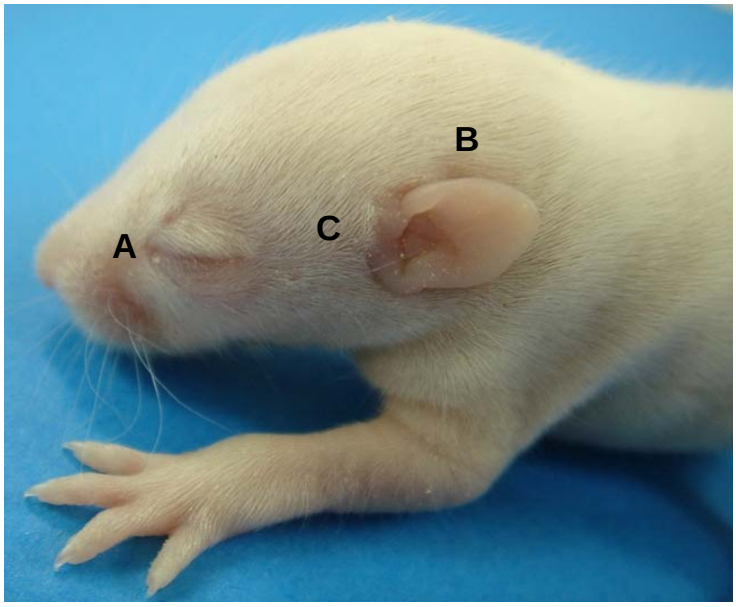

Figura 7- Rato no PND 10, quando é possível observar (A) olho ainda fechado, (B) pêlos já nascidos e (C) orelha já desdobrada

d) Descida de testículo: é observado o dia em que os dois testículos descem para o escroto. Esta observação inicia-se entre o 18° e o 30° dia de vida dos filhotes machos.

e) Abertura vaginal: é registrado o dia da ocorrência da fresta vaginal. Esta observação é realizada a partir do 30° dia de vida dos filhotes fêmeas.

Os dados são analisados tomando-se a ninhada como unidade.

Avaliação da toxicidade aguda da MCT administrada em dose única em ratos, ratas e fêmeas prenhes

Para avaliação da toxicidade aguda, os animais receberam a MCT e foram colocados individualmente em gaiolas metálicas (22 x 13 x 16 cm), sendo observados a cada 15 minutos durante as quatro primeiras horas. A seguir, os animais foram recolocados nas gaiolas de moradias (5 ratos por gaiola, exceto as fêmeas prenhes que foram mantidas individualmente nas suas gaiolas) e a observação foi feita a cada 24 horas após a administração da MCT, durante 15 dias, ou até o dia do parto. Os filhotes nascidos das fêmeas tratadas foram avaliados no 1º dia do nascimento, quanto ao número de animais vivos e mortos, e para a

detecção de possíveis malformações externas. O quadro 1 mostra as avaliações clínicas efetuadas em ratos, adaptadas daquelas propostas por Brito (1994); foram atribuídos os seguintes escores: 0= ausência do sinal; 1= raros sinais; 2= sinais evidentes; e 3= sinais evidentes e contínuos.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Empregou-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) para a realização das análises estatísticas. Para verificar a homocedasticidade dos dados utilizou-se o teste de Bartlett. Uma vez que os dados foram paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via ou quando existiram dois fatores (tempo e tratamento) para serem avaliados, empregou-se a ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Em todas as análises efetuadas, as diferenças foram consideradas significantes quando $p<0,05$. Os dados estão expressos como média ± erro padrão.

Para a avaliação da toxicidade aguda foi empregado escores, sendo calculadas as medianas obtidas nas primeiras quatro horas de observação.

(Continua)

Observações Gerais	***Descrição dos sinais de toxicidade***	***Pontuação Basal****
Atividade geral	Verificar atividade geral do animal na gaiola moradia após estímulo; entende-se, como atividade geral, dentre outros comportamentos, a presença de locomoção, levantar, farejar e/ ou parado.	3
Frêmito vocal	Observar se há emissão de som sem nenhuma estimulação ou toque.	0
Irritabilidade	Assoprar e tocar levemente para examinar reação.	0
Resposta ao toque	Pegar, tocar num intervalo de tempo mais prolongado (mais de 15 segundos) e examinar respostas.	3
Aperto de cauda	Apertar região próxima a ponta da cauda com bastante intensidade.	3
Contorção	Verificar se está presente ou não.	0
Trem posterior	Verificar de está com a postura normal ou caído (intesidade, modo de andar).	0
Força de agarrar	Colocar animal em cima da grade e avaliar intesidade em que se segura na mesma.	3
Ataxia	Movimentos incoordendos devido à dismetria (distúrbio de coordenação dos movimentos por estados de inconsciência e consciência compensatória).	0
Reflexo auricular	Estalar dos dedos uma vez e analisar reflexo. Logo após estalar várias vezes seguidas e observar reflexos.	3
Tremores	Observar se estão presentes ou não.	0
Convulsões	Observar se estão presentes ou não.	0
Straub	Verificar se a cauda está caída ou ereta; se ereta, verificar intensidade.	0

(Conclusão)

Observações Gerais	*Descrição dos sinais de toxicidade*	*Pontuação Basal**
Hipnose	Ficar aparentemente dormindo (olhos fechados), mas quando se toca no animal, ele acorda. Testar decúbito lateral; e ver se volta a posição normal.	0
Anestesia	Ausência de reflexos dolorosos.	0
Lacrimação	Observar se há lágrimas presentes ou não.	0
Ptose palpebral	Avaliar se está com os olhos abertos (normal) ou semi-cerrados.	0
Micção e defecação	Para estes dois parâmetros, anotar se houver alguma alteração ou variação nitidamente diferente do normal.	3
Piloereção	Observar se os pêlos estão eretos e sua intesidade.	0
Hipotermia	Verificar temperatura retal (termômetro).	-
Respiração	Para o score, a respiração normal é considerada. (Para respirações muito ofegantes avaliar até o número 8).	3
Cianose	Verificar a coloração das orelhas, das patas, das narinas e da cauda.	0
Morte	Anotar o tempo e se possível descrever os episódios anteriores à morte.	0

* Escores: 0= ausência do sinal; 1= raros sinais; 2= sinais evidentes; 3= sinais evidentes e contínuos.

Quadro 1– Avaliações clínicas de ratos para observação da toxicidade aguda. Adaptada de Brito, (1994)

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1- Padronização do consumo médio de ração e avaliação do peso materno nas condições do nosso biotério

Foram utilizadas 20 fêmeas prenhes**.** Durante o período gestacional foram verificados o estado geral dos animais e a ocorrência de abortos. O peso das mães foi aferido diariamente e, assim também, o consumo de ração. Após o nascimento dos filhotes, foi realizada a média dos consumos de ração para estabelecer as condições de privação alimentar a ser empregada no Experimento 2.

Resultados

A tabela 1 mostra os resultados obtidos da média da avaliação diária do consumo de ração materno durante a gestação das fêmeas. Nota-se que a média total diária do consumo de ração foi de 22,75 ± 0,43 g. Assim, no Experimento 2 as ratas prenhes devem receber 85, 60, 45 ou 30% (grupos de consumo 85%, 60%, 45% ou 30% de ração, respectivamente) desta média total diária do consumo de ração, isto é, de 22,75 g de ração por dia.

Tabela 1- Consumo médio diário de ração (em gramas) de cada rata prenhe, durante a gestação e a média geral de consumo

Fêmeas	***Consumo médio de ração(g)***	***Fêmeas***	***Consumo médio de ração(g)***
1	21,50	**11**	23,93
2	24,11	**12**	23,78
3	24,67	**13**	21,24
4	24,81	**14**	21,18
5	23,11	**15**	20,89
6	22,61	**16**	26,54
7	20,36	**17**	22,45
8	21,06	**18**	22,82
9	19,55	**19**	24,04
10	20,51	**20**	26,00
Média geral = 22,75 ± 0,43			

4.2 EXPERIMENTO 2- Efeitos da restrição alimentar, em ratas, durante o período de gestação: avaliação de neuroteratogenicidade

Cinqüenta fêmeas prenhes foram separadas em cinco grupos: um grupo controle e quatro grupos submetidos às restrições alimentares, permitindo que as ratas recebessem 85%, 60%, 45% ou 30% do consumo médio de ração por dia (100% = 22,75 g de ração por dia). A restrição ocorreu do 6º ao 20º de gestação (DG) e, durante este período, foram medidos o peso e os consumos de ração e de água das ratas. No 1º dia após o nascimento (DPN) os filhotes foram observados quanto ao número de animais vivos e mortos, e para a detecção de possíveis malformações externas.

Estes filhotes foram também avaliados, do DPN1 ao DPN35, frente a diferentes protocolos comportamentais para evidenciar alterações neurológicas decorrentes do tratamento materno durante a gestação, conforme descrito no item 3.3.

Resultados

Avaliação do consumo de água durante a gestação

A tabela 2 mostra os resultados obtidos da avaliação do consumo total de água, durante 6º ao 20º de gestação, de ratas submetidas à restrição alimentar, as quais receberam 85%, 60%, 45% ou 30% do consumo médio de ração por dia, e de ratas do grupo controle (sem restrição alimentar). Assim, nota-se que não houve diferenças significantes no consumo de água entre os animais do grupo controle e aqueles dos grupos de restrição alimentar.

Tabela 2- Consumo total de água (em ml), durante 6º ao 20º dia de gestação, de ratas do grupo controle (sem restrição alimentar) e de ratas submetidas à restrição alimentar, as quais receberam 85%, 60%, 45% ou 30% do consumo médio de ração por dia (100% = 22,75 g de ração). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão; N=número de animais por grupo

Controle	Grupos de restrição alimentar			
	85%	60%	45%	30%
(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)
545,0±13,6	538,0±20,5	530,0±42,8	529,0±31,5	546,0±30,6

P>0,05, ANOVA

Avaliação do peso materno

A figura 8 ilustra e tabela 3 mostra os resultados obtidos da avaliação do peso materno durante a gestação das fêmeas privadas ou não de ração. A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados do peso materno mostrou que houve diferença estatisticamente significante entre os grupos, em relação ao tratamento ($F(4/945) = 23,90$, $P<0,0001$) e dias de observação ($F(20/945) = 39,08$, $P<0,0001$), havendo interação entre os fatores ($F(80/945)= 11,93$, $P<0,0001$). Assim, observou-se que há redução significante do peso materno à medida que se aumenta a intensidade da restrição alimentar, sendo esse efeito mais evidente entre os dias 8º e 19º da gestação.

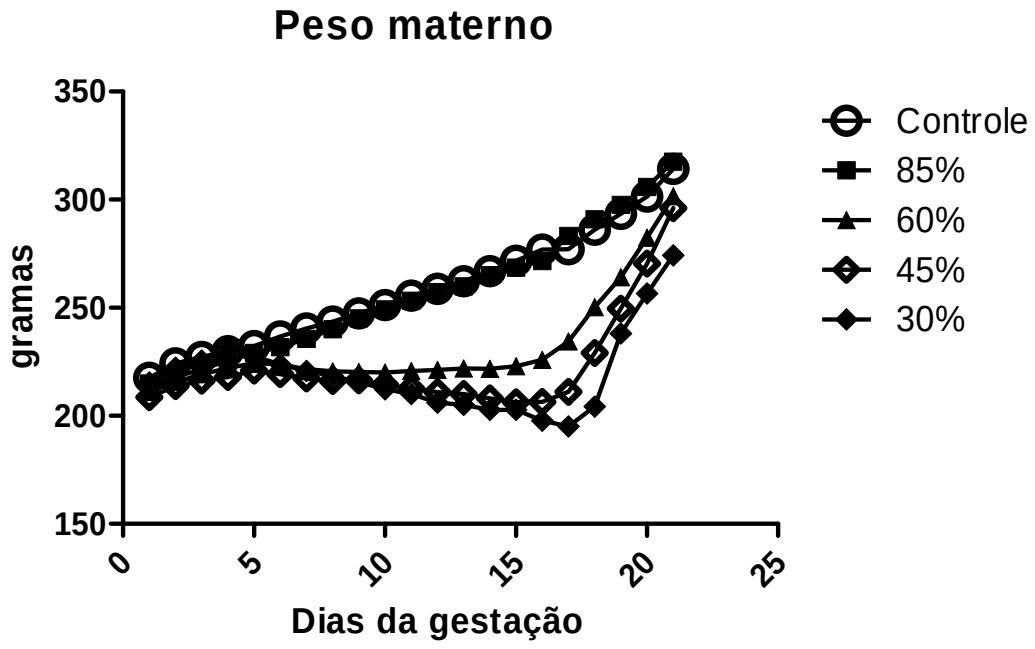

Figura 8- Peso materno (em g) de ratas prenhes do grupo controle (sem restrição alimentar) e de ratas prenhes submetidas à restrição alimentar, durante 6º ao 20º dia de gestação, as quais receberam 85%, 60%, 45% ou 30% do consumo médio de ração por dia (100% = 22,75 g de ração). São apresentadas as médias; N = 10 animais por grupo; ver na Tabela 3 as diferenças significantes entre os grupos

Tabela 3- Peso materno (em g) de ratas prenhes do grupo controle (sem restrição alimentar) e de ratas submetidas à restrição alimentar, durante 6º ao 20º dia de gestação, as quais receberam 85%, 60%, 45% ou 30% do consumo médio de ração por dia (100% = 22,75 g de ração). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão

ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni (*P<0,001, em relação ao grupo controle).

Dia da Gestação	Controle	Grupos de restrição alimentar			
		85%	60%	45%	30%
	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)
1	217,64±5,8	214,94±3,4	211,02±5,4	208,62±3,5	215,04±4,6
2	224,24±6,3	218,11±3,2	215,51±5,3	213,71±3,3	222,33±4,6
3	227,28±6,8	221,43±3,4	219,25±6,4	216,29±3,4	225,63±4,6
4	229,98±7,3	225,55±3,9	222,03±6,4	217,98±3,3	231,16±9,9
5	232,32±7,7	229,03±3,7	224,45±6,7	220,89±3,4	227,56±5,1
6	236,70±7,5	231,76±3,8	223,67±6,8	219,32±2,8	223,76±4,5
7	240,45±7,3	235,60±4,1	221,57±6,3	217,23±3,0	220,76±4,0
8	243,65±7,2	240,06±3,6	220,55±5,6	216,13±3,3*	218,43±3,7*
9	247,35±7,2	245,06±4,1	220,18±5,8*	216,37±3,3*	215,53±3,2*
10	251,17±7,1	249,27±4,4	220,07±5,6*	214,44±3,3*	212,23±2,6*
11	255,66±7,1	253,19±4,4	220,72±5,6*	212,62±3,1*	210,13±2,6*
12	258,77±6,9	257,21±4,6	221,21±5,4*	210,95±3,5*	206,06±2,0*
13	262,30±6,8	259,87±4,5	221,95±5,3*	210,15±3,7*	205,00±2,0*
14	266,95±7,5	265,06±4,8	221,75±4,9*	208,04±3,3*	202,80±1,9*
15	271,78±7,9	268,55±5,1	222,94±4,8*	206,26±3,0*	202,73±3,4*
16	276,96±7,7	271,66±5,6	225,96±6,6*	206,48±3,3*	197,73±1,1*
17	283,29±8,2	277,03±5,1	234,44±7,3*	211,01±4,0*	195,06±1,6*
18	290,86±8,7	286,08±5,3	250,25±9,2*	229,01±4,6*	204,33±2,9*
19	297,58±9,0	293,48±5,7	264,07±9,5*	249,64±4,3*	238,06±5,7*
20	305,84±9,1	301,49±5,9	282,44±9,7	270,42±5,3*	256,63±9,1*
21	317,54±8,1	314,28±5,1	301,53±8,9	296,02±3,8	274,33±5,6*

Avaliação do número de filhotes nascidos

A tabela 4 mostra os resultados do número de filhotes nascidos por fêmea e do canibalismo materno pós-parto de ratas submetidas à restrição alimentar. Verifica-se que não houve diferenças significantes entre os grupos em relação ao número de filhotes nascidos por fêmea parida, porém à medida que se aumenta a restrição alimentar, aumenta o canibalismo materno, até atingir 100% de canibalismo nas ratas do grupo que recebeu apenas 30% do consumo diário de ração.

Tabela 4- Número de filhotes nascidos por fêmea (médias ± erros padrão) e porcentagem de filhotes mortos por canibalismo materno pós-parto de ratas do grupo controle (sem restrição alimentar) e de ratas submetidas à restrição alimentar, durante 6º ao 20º dia de gestação, as quais receberam 85%, 60%, 45% ou 30% do consumo médio de ração por dia (100% = 22,75 g de ração). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; N = 10 animais por grupo

Grupos	No. de filhotes nascidos/fêmea	Porcentagem de filhotes mortos por canibalismo materno
Controle	10,5±0,63	0
Restrição 85%	10,8±0,77	5,87
Restrição 60%	11,2±0,97	30,55
Restrição 45%	12,0±0,48	56,93
Restrição 30%	14,0±1,15	100,00

P>0,05, ANOVA

Desenvolvimento físico dos filhotes

A figura 9 ilustra os resultados obtidos da avaliação do peso dos filhotes durante os 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dia de vida de ratas submetidas à restrição alimentar. A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados dos pesos dos filhotes mostrou que houve diferença estatisticamente significante entre os grupos, em relação ao tratamento (F(3/180)= 0,48, P<0,0001) e dias de observação (F(4/180) = 98,61 P<0,0001), havendo interação entre os fatores (F(12/180) = 0,33, P<0,0001). Assim, nota-se que a restrição alimentar materna reduziu o peso dos filhotes do grupo restrição 45% aos 14, 28 e 35 dias de vida, enquanto no grupo 60% de restrição esse efeito foi observado apenas no 35º de vida.

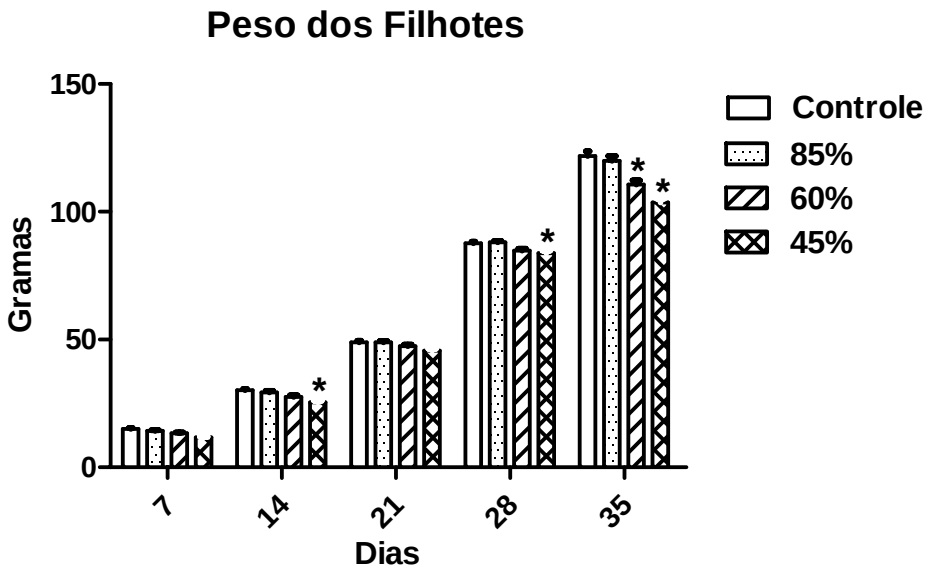

Figura 9- Peso de filhotes (em g) de ratas do grupo controle (sem restrição alimentar) e de ratas submetidas à restrição alimentar, durante 6º ao 20º dia de gestação, as quais receberam 85%, 60%, 45% ou 30% do consumo médio de ração por dia (100% = 22,75 g de ração). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; N = 10 ninhadas/grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni (*P<0,001, em relação ao grupo controle)

A figura 10 ilustra os resultados obtidos da avaliação do dia de abertura de olhos, aparecimento de pêlos, desdobramento de orelha, erupção dos dentes incisivos, descida dos testículos e abertura vaginal da prole de ratas submetidas à restrição alimentar. A ANOVA de uma via aplicada a cada um desses parâmetros não mostrou diferenças significantes entre os grupos [F(3/39)= 0,53 para a abertura de olhos; F(3/39)= 0,12 para o aparecimento de pêlo; F(3/39) = 0,70 para o desdobramento de orelha; F(3/39)= 1,97 para a erupção dos dentes incisivos; F(3/39)= 2,54 para a descida dos testículos e F(3/39)= 0,36 para a abertura vaginal, P>0,05].

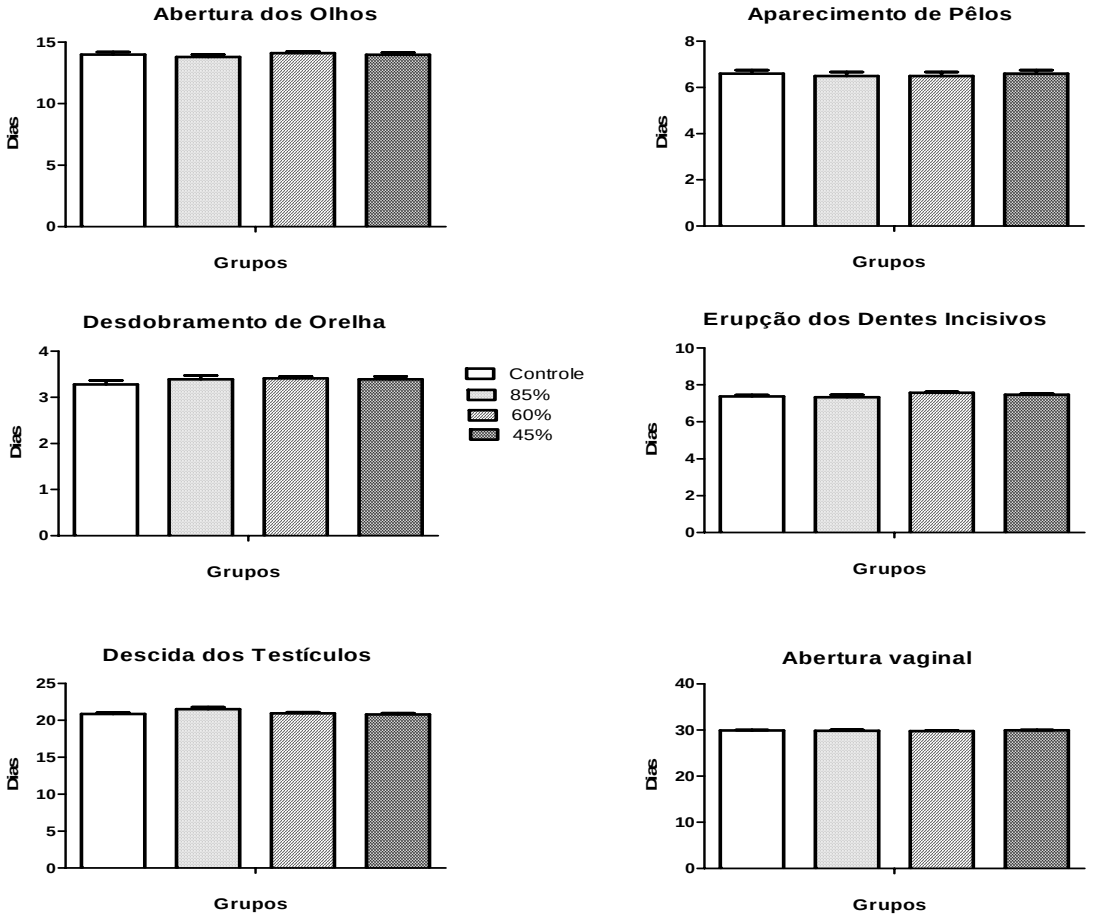

Figura 10- Dia da abertura de olhos, aparecimento de pêlos, desdobramento de orelha, erupção dos dentes incisivos, descida dos testículos e abertura vaginal da prole de ratas do grupo controle (sem restrição alimentar) e de ratas submetidas à restrição alimentar, durante 6º ao 20º dia de gestação, as quais receberam 85%, 60%, 45% ou 30% do consumo médio de ração por dia (100% = 22,75 g de ração). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; N = 10 ninhadas por grupo. (ANOVA de uma via, P>0,05)

Desenvolvimento reflexológico dos filhotes

A figura 11 ilustra os resultados obtidos do desenvolvimento reflexológico dos filhotes da prole de ratas submetidas a RA. A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados da avaliação do reflexo de endireitamento, realizada do 5º ao 10º dia de vida, mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação dias de observação ($F(5/216) = 32,98$, $P< 0,0001$), não havendo diferenças com relação ao tratamento ($F(3/216) = 1,74$, $P< 0,0968$) e na interação entre os fatores ($F(15/216)= 6,46$, $P<0,0809$). O teste *pos hoc* de Bonferroni indicou diferença puntual no dia 9 nos animais do grupo privado em 60% com relação aos demais grupos.

A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados do reflexo de preensão palmar, realizada no 2º, 4º, 6º e 10º dia de vida, mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação ao tratamento ($F(3/144) = 43,27$, $P <0,0001$), dias de observação ($F(3/144) = 31,66$, $P< 0,0001$), havendo interação entre os fatores ($F(9/144)= 18,68$, $P< 0,0001$). Assim, notou-se que a redução desse reflexo nos dias 2 e 4 nos animais dos grupos restrição 45% e 60% e no 6º dia de vida nos três grupos experimentais, quando comparado ao grupo controle.

A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados da geotaxia negativa, realizada no 5º, 7º, 9º, 11º e 13º dia de vida, mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação ao tratamento ($F(3/180) = 5,66$, $P<0,0001$), dias de observação ($F(4/180) = 79,97$, $P< 0,0001$), havendo interação entre os fatores ($F(12/180)= 3,70$, $P< 0,0001$). Assim, notou-se aumento do tempo para realização do reflexo no 5º dia nos grupos restrição 45% e 60%, no 7º dia apenas o grupo 45% e no 9º dia houve aumento do tempo deste reflexo apenas no grupo restrição 60%, em relação ao grupo controle.

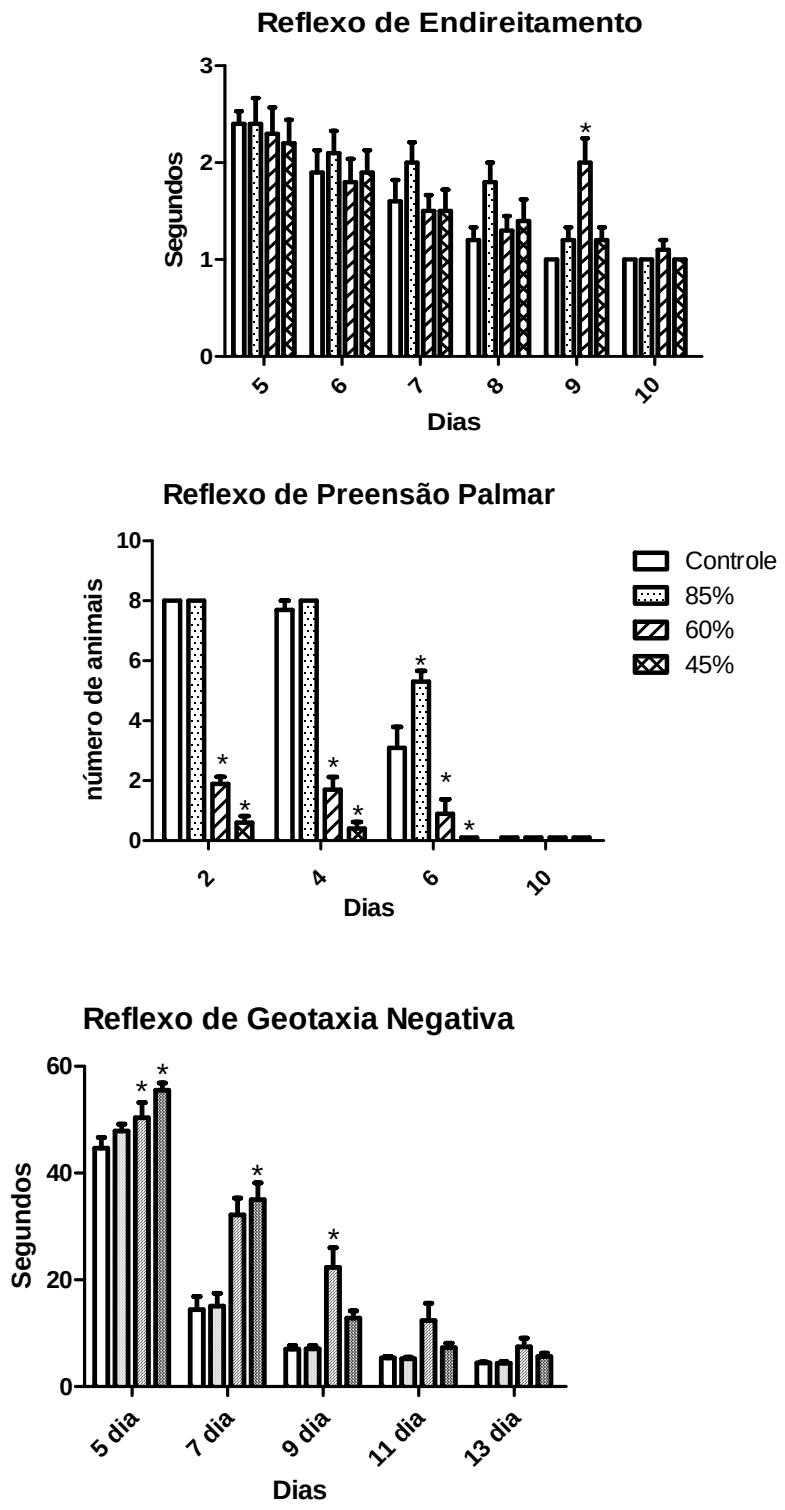

Figura 11-Reflexos de endireitamento, de preensão palmar e de geotaxia negativa da prole de ratas do grupo controle (sem restrição alimentar) e de ratas submetidas à restrição alimentar, durante 6º ao 20º dia de gestação, as quais receberam 85%, 60% ou 45% do consumo médio de ração por dia (100% = 22,75 g de ração). São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. N= 10 ninhadas/grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni, * p< 0,001 em relação ao grupo controle

A figura 12 ilustra os resultados obtidos no reflexo de sobressalto e dia de andar adulto da prole de ratas submetidas a RA. A ANOVA de uma via aplicada ao dia do reflexo de sobressalto não indicou diferenças significantes entre os grupos tanto para o reflexo de sobressalto [(F(3/39) = 1,28, P>0,05], como para o dia de andar adulto [F(3/39)= 2,11 P >0,05)].

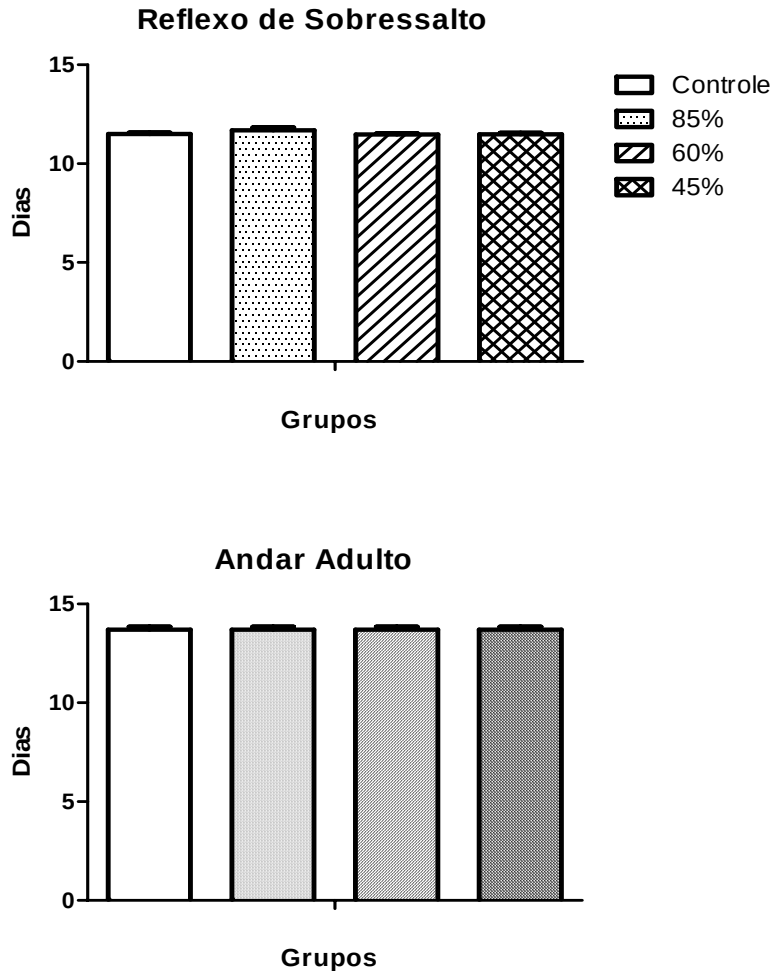

Figura 12-Reflexo de sobressalto e dia de andar adulto da prole de ratas do grupo controle (sem restrição alimentar) e de ratas submetidas à restrição alimentar, durante 6º ao 20º dia de gestação, as quais receberam 85%, 60% ou 45% do consumo médio de ração por dia (100% = 22,75 g de ração). São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. N= 10 ninhadas/grupo. ANOVA de uma via (P> 0,05)

Atividade geral observada em campo aberto dos filhotes

A figura 13 ilustra os resultados obtidos na locomoção, levantar, tempo de imobilidade e defecações medidos em campo aberto. A ANOVA de duas vias aplicada a locomoção da prole de ratos em campo aberto mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação ao tratamento ($F(3/180) = 24,34$, $P < 0,0001$), dias de observação ($F(5/180) = 35,46$, $P< 0,0001$), havendo interação entre os fatores ($F(15/180)= 5,59$, $P< 0,0001$). Assim, notou-se que houve redução na locomoção do 16º ao 20º dia nos grupos restrição 45% e 60% em relação ao grupo controle.

A ANOVA de duas vias aplicada ao levantar da prole de ratos em campo aberto mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação ao tratamento ($F(3/180) = 7,08$, $P <0,0001$), dias de observação ($F(7/180) = 6.87$, $P< 0,0001$), havendo interação entre os fatores ($F(15/180)= 4,09$, $P< 0,0001$). Assim, notou-se que houve redução deste parâmetro em todos os dias de observação no grupo restrição 45% e, no 18º e 20º dia também houve redução no grupo restrição 60%.

A ANOVA de duas vias aplicada ao tempo de imobilidade da prole de ratos em campo aberto mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação ao tratamento ($F(5/180) = 9,02$, $P < 0,0001$), dias de observação ($F(8/180) = 67,47$, $P< 0,0001$), havendo interação entre os fatores ($F(12/180)= 4,19$, $P< 0,0001$). Assim, notou-se que nos dias 16, 17, 18, 19 e 20, houve aumento no tempo de imobilidade dos grupos restrição 45% e 60% em relação ao grupo controle.

A ANOVA de uma via aplicada a defecação não indicou diferenças significantes entre os grupos ($F(3/270) = 0,94$ $P >0,05$).

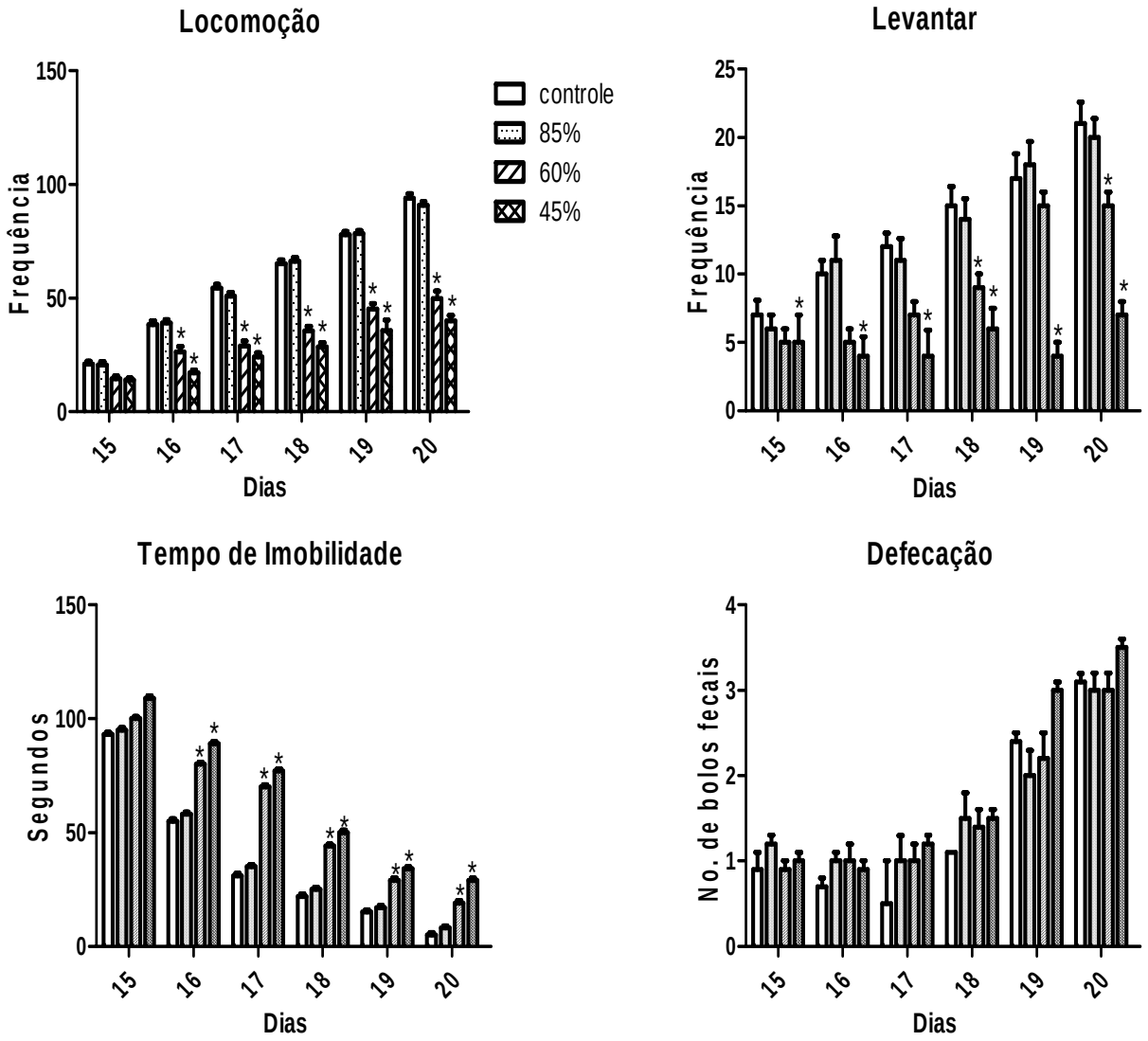

Figura 13- Atividade geral, avaliada no campo aberto, da prole de ratas do grupo controle (sem restrição alimentar) e de ratas submetidas à restrição alimentar, durante 6º ao 20º dia de gestação, as quais receberam 85%, 60% ou 45% do consumo médio de ração por dia (100% = 22,75 g de ração)

4.3 EXPERIMENTO 3- Avaliação da toxicidade aguda induzida pela MCT em ratos machos, fêmeas virgens e gestantes

Foram utilizados 90 ratos, sendo 30 machos, 30 fêmeas virgens e 30 fêmeas no 6º dia de gestação (DG). Cada um desses grupos foi subdividido em três, os quais receberam, por gavagem, 10,0; 30,0 ou 100,0 mg/kg de uma única dose MCT, sendo observados durante 15 dias ou até o final da gestação, conforme descrito anteriormente. No 1º dia após o nascimento os filhotes foram também avaliados quanto ao número de animais vivos e mortos, e para a detecção de possíveis malformações externas.

Resultados

A tabela 5 mostra os efeitos da administração de dose única de MCT em ratos machos, fêmeas virgens e fêmeas gestantes. Os dados apresentados referem-se à mediana dos escores obtidos nas quatro primeiras horas de observação, uma vez que após esse período poucas alterações foram constatadas. Verifica-se, de modo geral, que os machos e as fêmeas virgens se comportaram de maneira semelhante frente às diferentes doses administradas e, ainda, à medida que se aumenta a dose de MCT, aumenta a intensidade das manifestações clínicas. Por outro lado, as fêmeas prenhes mostraram maior número de parâmetros alterados (frêmito vocal, anestesia e mortalidade) e também maior alteração nos valores de escores atribuídos aos parâmetros (atividade geral, frêmito vocal, resposta ao toque, aperto de cauda, reflexo auricular, tremor, straub, anestesia, ptoses, micção e defecação, piloereção e mortalidade)

Em relação ao número de filhotes nascidos das fêmeas prenhes, constatou-se que todas as fêmeas tiveram sua gestação a termo e que todos os filhotes nasceram vivos. As fêmeas tratadas com 10 mg/kg de MCT tiveram 10,3 filhotes nascidos, as fêmeas 30 mg/kg tiveram 3,57 filhotes e as fêmeas 100 mg/kg tiveram 3,26 filhotes.

Tabela 5- Avaliação clínica de ratos (machos, fêmeas virgens e fêmeas prenhes) que receberam, por gavagem, uma única dose de 10, 30 ou 100 mg/kg de monocrotalina (MCT). Os machos e fêmeas virgens foram observados por 15 dias e as fêmeas prenhes, até o parto. São apresentadas medianas dos escores obtidos nas quatro primeiras horas de observação. N = 10 animais por grupo

Parâmetro	Machos			Fêmeas virgens			Fêmeas prenhes		
	MCT (mg/kg)			MCT (mg/kg)			MCT (mg/kg)		
	10	30	100	10	30	100	10	30	100
Atividade geral	3	3	1	3	3	1	3	1	0
Frêmito vocal	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resposta ao toque	3	3	3	3	3	3	3	3	2
Aperto de cauda	3	3	2	3	3	2	3	2	1
Contorções	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trem posterior	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Força de agarrar	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	0	0	1	0	0	1	1	2	2
Tremor	0	0	1	0	1	2	0	2	3
Convulsões	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Straub	0	0	1	0	1	1	0	1	2
Hipnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Lacrimação	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptoses	0	0	1	0	1	1	0	1	2
Micção e defecação	3	3	2	3	3	2	3	2	2
Piloereção	0	0	1	0	1	2	1	1	3
Hipotermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiração	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Cianose	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mortalidade	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Escores: 0= ausência do sinal; 1= raros sinais; 2= sinais evidentes; 3= sinais evidentes e contínuos

4.4 EXPERIMENTO 4- Efeitos da administração de MCT durante a gestação na prole de ratas: avaliação de neuroteratogenicidade

Quarenta fêmeas prenhes foram separadas em cinco grupos: três grupos, cujas ratas receberam, do 6º ao 20º dia de gestação, 1,0; 3,5 ou 7,0 mg/kg de MCT, por gavagem; um grupo controle que recebeu comida *ad libitum*; e um grupo *pair-feeding*, isto é, que recebeu a mesma quantidade de comida ingerida pelo grupo tratado com a maior dose de MCT (7,0 mg/kg). Foram medidos o peso corpóreo e os consumos de ração e de água de todas as ratas. No 1º dia após o nascimento os filhotes foram observados quanto ao número de animais vivos e mortos, e para a detecção de possíveis malformações externas.

Estes filhotes foram avaliados, do DPN1 ao DPN35, frente a diferentes protocolos comportamentais para evidenciar alterações neurológicas decorrentes do tratamento materno durante a gestação, conforme descrito no item 3.3.

Resultados

Avaliação do consumo de água durante a gestação

A tabela 6 mostra os resultados obtidos da avaliação do consumo de água do 6º ao 20º dia de gestação das fêmeas dos grupos controle, *pair-feeding* e tratadas com diferentes doses de MCT. Nota-se que não houve diferenças significantes no consumo de água total entre os animais dos diferentes grupos [F(4/57)=0,212 P>0.05].

Tabela 6- Consumo total de água (em ml) durante o 6º ao 20º dia de gestação de ratas prenhes. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; N= número de animais por grupo

Controle	*Pair-feeding*	MCT (mg/kg)		
		1,0	3,5	7,0
(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)
552,0±10,8	544,8±14,6	543,0±31,0	547,0±21,8	551,0±30,9

P>0,05, ANOVA

A tabela 7 mostra os resultados obtidos da avaliação do consumo de ração do 6º ao 20º dia de gestação das fêmeas dos grupos controle, *pair-feeding* e tratadas com diferentes doses de MCT. Nota-se que não houve diferenças significantes entre os grupos [F(4/57)=1,734 P>0.05]

Tabela 7- Consumo diário de ração (em g), durante a gestação, de ratas do grupo controle, do grupo *pair-feeding* e de ratas que receberam do 6º ao 20º dia de gestação diferentes doses de monocrotalina (MCT). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; N=número de animais por grupo

Dia da gestação	controle	*Pair-feeding*	MCT (mg/kg)		
			1,0	3,5	7,0
	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)
1	22,31±4,3	24,94±3,4	21,00±3,4	22,61±3,4	23,65±3,7
2	24,33±5,9	22,11±3,2	20,51±5,4	24,91±2,3	20,57±2,8
3	20,26±3,9	24,43±3,4	21,25±6,1	22,9±3,4	20,99±3,4
4	21,50±5,7	24,55±3,9	21,03±6,4	21,48±3,3	22,16±5,9
5	21,55±6,0	21,03±3,7	22,45±6,5	20,89±5,4	24,61±6,1
6	24,97±5,5	25,76±3,8	20,19±6,8	23,32±2,8	23,58±2,6
7	20,45±7,3	23,60±4,1	21,36±6,9	24,23±3,8	23,76±4,0
8	25,65±7,2	23,06±3,6	25,35±5,6	25,13±5,3	22,06±3,0
9	22,35±7,2	22,06±5,1	23,18±5,0	26,37±3,4	24,58±3,2
10	23,17±7,1	22,27±4,4	26,07±5,6	28,44±3,1	25,43±2,0
11	24,66±7,1	24,99±4,2	24,12±5,7	27,62±2,2	26,34±3,6
12	25,77±6,9	25,21±5,6	29,28±5,1	28,95±3,4	27,51±4,5
13	25,30±6,8	26,87±4,5	26,95±5,3	26,65±2,0	28,30±2,1
14	26,67±7,5	25,06±4,8	27,00±4,6	28,04±3,3	27,94±5,3
15	25,78±7,9	27,55±5,1	27,94±4,8	28,26±3,7	28,41±6,8
16	27,96±7,7	26,66±5,6	26,90±5,6	29,48±3,1	29,56±1,0
17	26,29±8,2	25,03±4,1	25,49±7,9	28,01±4,1	28,06±1,6
18	30,86±8,7	30,08±5,3	28,15±9,2	29,01±4,6	30,31±2,8
19	30,58±9,0	36,48±5,7	30,09±4,0	30,64±4,1	35,22±7,4
20	32,84±9,1	35,49±5,9	30,84±6,4	32,42±5,2	34,57±7,8
21	33,54±8,1	35,28±4,6	37,53±8,9	36,02±3,9	36,33±5,6

ANOVA (p>0,05)

Avaliação do peso materno

A figura 14 ilustra e a tabela 8 mostra os resultados obtidos da avaliação do peso materno durante a gestação das fêmeas dos grupos controle, *pair-feeding* e tratadas com diferentes doses de MCT. A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados do peso materno mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação ao tratamento ($F(4/945) = 2,72$, $P < 0,0001$) e dias de observação ($F(20/945) = 65,74$, $P < 0,0001$), não havendo interação entre os fatores ($F(80/945) = 2,11$, $P < 0,8282$). O teste de Bonferroni mostrou que a administração de 7,0 mg/kg de MCT reduziu o peso materno das ratas do 17º ao 21º dia de gestação, em relação aos animais do grupo controle.

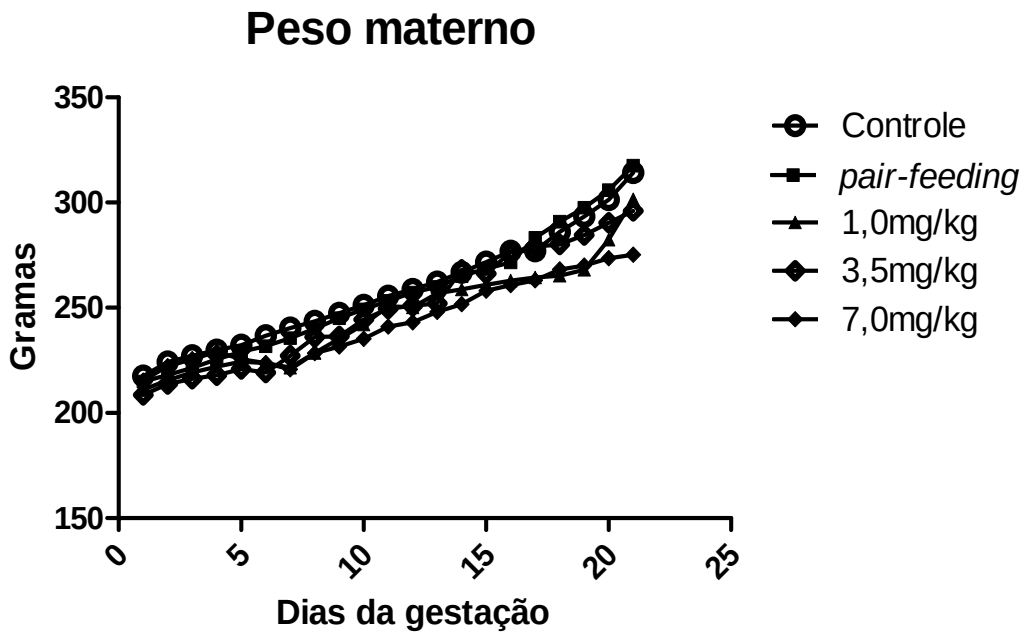

Figura 14- Peso materno (em g) de ratas prenhes dos grupos controle, *pair-feeding* e de ratas que receberam do 6º ao 20º dia de gestação diferentes doses de monocrotalina (MCT). São apresentadas as médias; N = 10 animais por grupo (ver na Tabela 8 as diferenças significantes entre os grupos)

Tabela 8- Peso materno (em g) de ratas prenhes dos grupos controle, *pair-feeding* e de ratas que receberam do 6º ao 20º dia de gestação diferentes doses de monocrotalina (MCT). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; N = número de animais por grupo

Dia da gestação	controle	*Pair-feeding*	MCT(mg/kg)		
			1,0	3,5	7,0
	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)	(N=10)
1	215,39±5,8	211,35±3,1	212,59±5,0	217,61±2,5	219,40±2,1
2	224,24±6,3	218,11±3,2	215,51±5,3	213,71±3,3	222,33±4,6
3	227,28±6,8	221,43±3,4	219,25±6,4	216,29±3,4	225,63±4,6
4	229,98±7,3	225,55±3,9	222,03±6,4	227,83±3,3	231,16±9,9
5	232,32±7,0	229,03±3,7	224,45±6,7	230,89±3,4	232,56±5,1
6	236,70±7,5	231,76±3,8	230,45±6,8	236,32±2,8	235,91±4,5
7	240,45±7,3	235,60±4,1	238,57±6,3	241,23±3,7	240,00±4,1
8	243,65±7,1	240,06±3,6	241,55±5,6	247,13±3,2	242,44±3,6
9	247,35±7,4	244,06±4,0	248,18±5,8	249,37±3,3	245,53±3,2
10	251,17±7,9	249,31±4,4	250,07±5,6	254,44±3,3	252,23±2,6
11	255,66±7,0	254,19±4,3	254,72±5,6	256,62±3,9	252,13±2,6
12	258,77±5,6	257,21±4,6	255,21±5,4	260,95±3,5	256,06±1,9
13	262,30±6,6	259,87±4,5	259,95±4,8	263,15±3,7	260,00±2,0
14	266,95±7,5	265,06±4,8	263,75±4,9	271,14±3,3	262,80±1,9
15	271,78±7,9	268,55±5,1	269,94±4,8	275,26±3,0	265,73±3,4
16	276,96±7,7	271,66±5,6	272,96±6,6	279,48±3,3	268,73±1,1
17	284,29±8,2	277,03±5,1	274,44±7,3	281,21±4,0	261,06±1,9*
18	292,86±8,7	286,08±5,3	280,25±9,2	287,01±4,6	269,33±2,1*
19	297,58±9,0	293,48±5,7	284,07±9,5	289,64±4,3	270,16±5,7*
20	305,84±9,1	301,49±5,9	292,44±9,7	299,42±5,3	271,63±9,1*
21	319,66±8,1	314,28±5,1	311,58±5,3	309,02±3,8	284,33±5,6*

ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni (*P<0,001, em relação ao grupo controle)

Avaliação do número de filhotes nascidos

A figura 15 ilustra e a tabela 9 mostra os resultados do número de filhotes nascidos por fêmea e do canibalismo materno pós-parto de ratas dos grupos controle, *pair-feeding* e tratadas com diferentes doses de MCT. A ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos [F(4/49)=32.77 P<0.0001] em relação ao número de filhotes e o teste de Bonferroni mostrou redução neste parâmetro nos grupos que receberam 3,5 e 7,0 mg/kg de MCT durante a gestação, em relação aos animais do grupo controle. Portanto, à medida que se aumenta a dose da MCT, diminui o número de filhotes nascidos. Por outro lado, não foi observado canibalismo em nenhum dos grupos estudados.

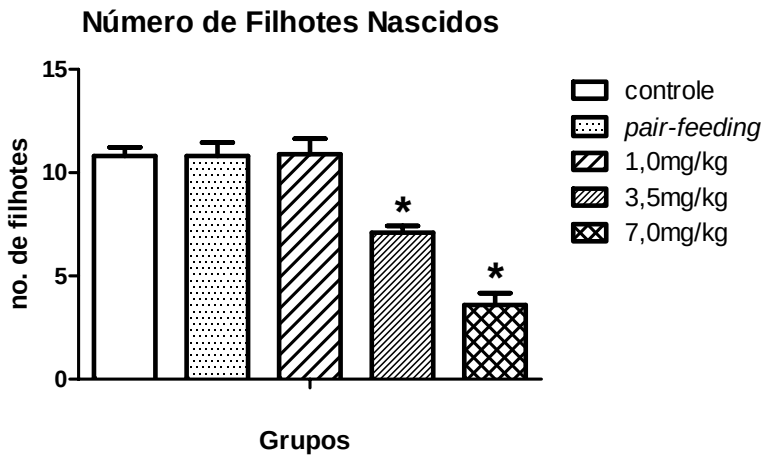

Figura 15- Número de filhotes nascidos dos grupos controle, pair-feeding e de ratas que receberam do 6º ao 20º dia de gestação diferentes doses de monocrotalina (MCT). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; N= 10 ninhadas/grupo. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni (* P< 0,001 em relação ao grupo controle)

Tabela 9- Número de filhotes nascidos por fêmea (médias ± erros padrão) e porcentagem de filhotes mortos por canibalismo materno pós-parto de ratas dos grupos controle, *pair-feeding* e de ratas que receberam do 6º ao 20º dia de gestação diferentes doses de monocrotalina (MCT)

Grupos	No. de filhotes nascidos/fêmea	Porcentagem de filhotes mortos devido ao canibalismo (%)
Controle	11,8±0,43	0
Pair-feeding	10,9±0,66	0
1,0 mg/kg de MCT	10,8±0,75	0
3,5 mg/kg de MCT	7,1±0,32*	0
7,0 mg/kg de MCT	3,6±0,57*	0

ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni (P< 0,0001)

Análise do desenvolvimento físico dos filhotes

A figura 16 ilustra os resultados obtidos da avaliação do peso dos filhotes durante os 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dia de vida provenientes de ratas dos grupos controle, *pair-feeding* e tratadas com diferentes doses de MCT. A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados dos pesos dos filhotes mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação ao tratamento ($F(4/225) = 0,08$, $P < 0,0001$) e dias de observação ($F(4/225) = 99,34$ $P< 0,0001$), não havendo interação entre os fatores ($F(16/225)= 0,04$, $P<0,3147$). Assim, nota-se que a exposição de 1,0 e 7,0 mg/kg de MCT durante a gestação reduziu o peso dos filhotes aos 35 dias de vida.

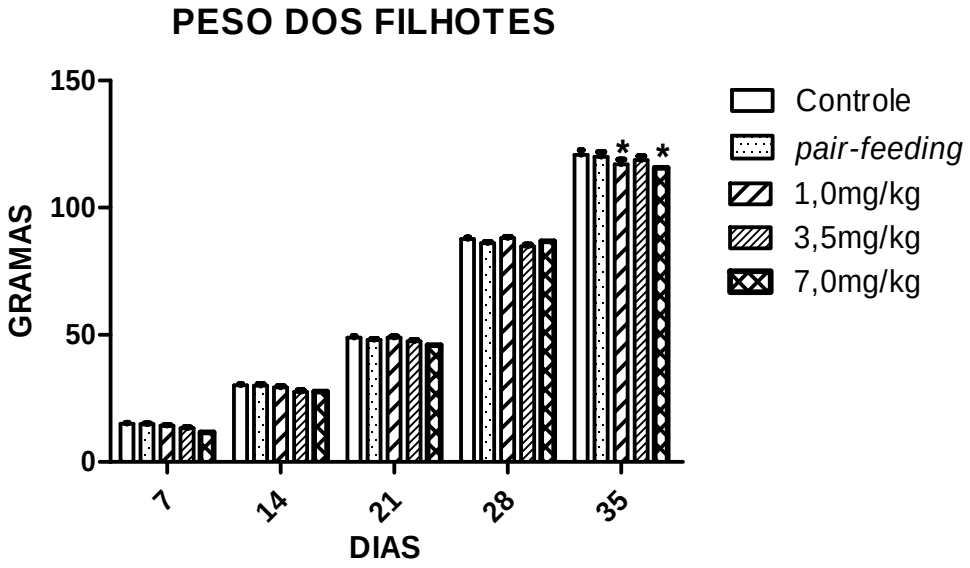

Figura 16- Peso dos filhotes (em g) provenientes de ratas dos grupos controle, *pair-feeding* e de ratas que receberam do 6º ao 20º dia de gestação diferentes doses de monocrotalina (MCT). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; N= 10 ninhadas/grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni (* P< 0,001 em relação ao grupo controle)

A figura 17 ilustra os resultados obtidos no dia de desdobramento de orelha, aparecimento de pêlos, erupção dos dentes incisivos, abertura dos olhos, descida dos testículos e abertura vaginal dos filhotes provenientes de ratas dos grupos controle, *pair-feeding* e tratadas com diferentes doses de MCT. A ANOVA de uma via aplicada ao dia de desdobramento de orelha não indicou diferenças significantes entre os grupos [F(4/49) = 0,5837; F(4/49) = 0,1121 para o dia de aparecimento de pêlos; F(4/49) = 4,461 para o dia de erupção do dentes incisivos, F(4/49) = 0,5548 para o dia de abertura de olhos; F(4/47) = 1,741 para a descida dos testículos e F(4/49) = 0,3998 para abertura vaginal; P >0,05].

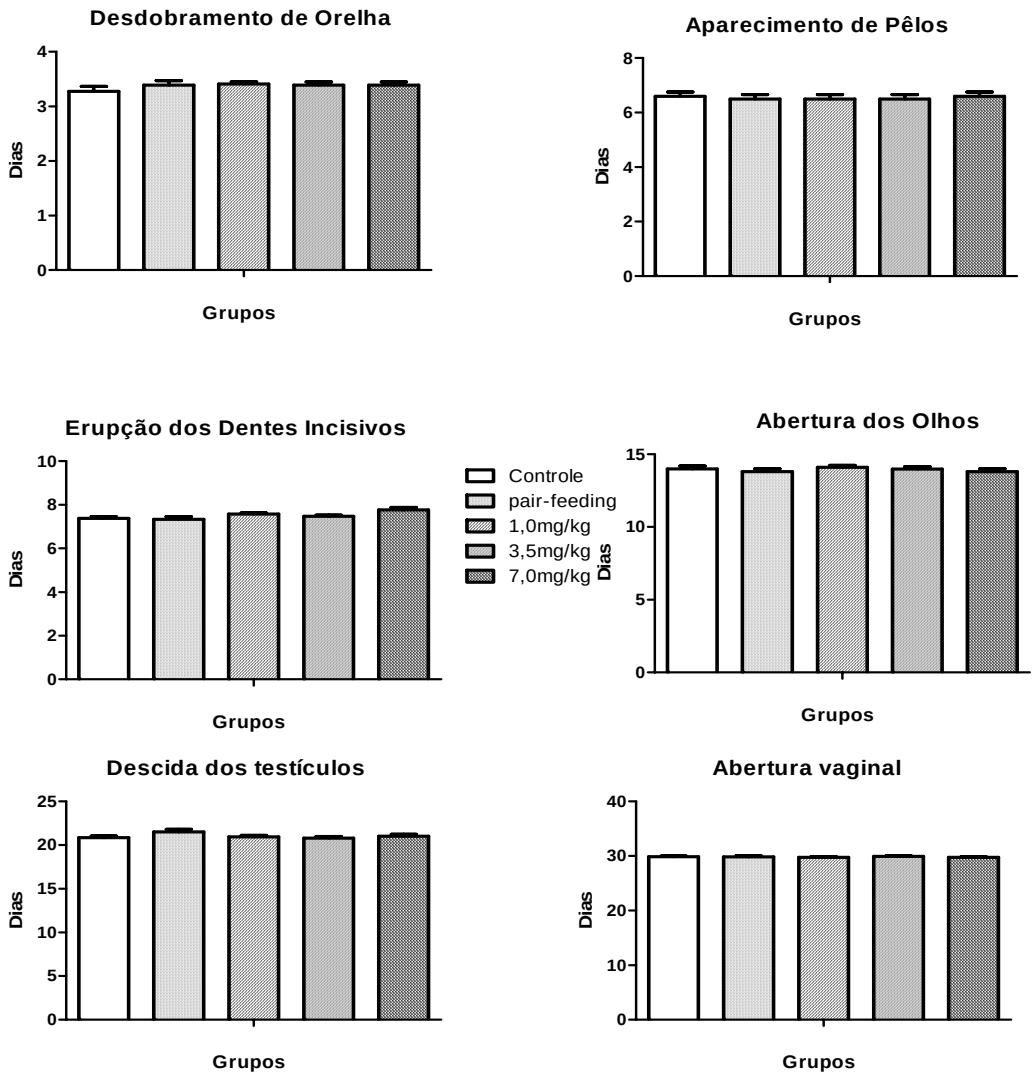

Figura 17- Dia da abertura de olhos, aparecimento de pêlos, desdobramento de orelha, erupção dos dentes incisivos, descida dos testículos e abertura vaginal da prole de ratas dos grupos controle, *pair-feeding* e de ratas que receberam do 6º ao 20º dia de gestação diferentes doses de monocrotalina (MCT). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; N = 10 ninhadas por grupo. (ANOVA de uma via, P>0,05)

Desenvolvimento reflexológico dos filhotes

A figura 18 ilustra os resultados obtidos na avaliação do reflexo de endireitamento, preensão palmar e geotaxia negativa dos filhotes provenientes de ratas dos grupos controle, *pair-feeding* e tratadas com diferentes doses de MCT. A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados do reflexo de endireitamento, realizada do 5º ao 10º dia de vida, mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação dias de observação ($F(5/70) = 56,90$, $P < 0,0001$), não havendo diferenças com relação ao tratamento ($F(4/270) = 0,22$, $P < 0,8375$) e na interação entre os fatores ($F(20/270)=0,74$, $P<0,9997$).

A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados do reflexo de preensão palmar, realizado no 2º, 4º, 6º e 10º dia de vida, mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação aos dias de observação ($F(3/180) = 93,31$, $P < 0,0001$), e não houve diferenças estatisticamente significantes com relação ao tratamento ($F(4/180) = 0,17$, $P= 0,3080$), e interação entre os fatores ($F(12/180)= 0,27$, $P=0,7983$).

A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados da geotaxia negativa, realizado nos 5º, 7º, 9º, 11º e 13º dia de vida, mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação ao dias de observação ($F(4/225) = 88,77$, $P< 0,0001$) e tratamento ($F(3/225) = 0,91$, $P=0,3089$), não havendo interação entre os fatores ($F(16/225)= 0,78$, $P= 0,0001$). Assim, notou-se aumento desse efeito no 7º dia, nos grupo 1,0 mg/kg, em relação ao grupo controle.

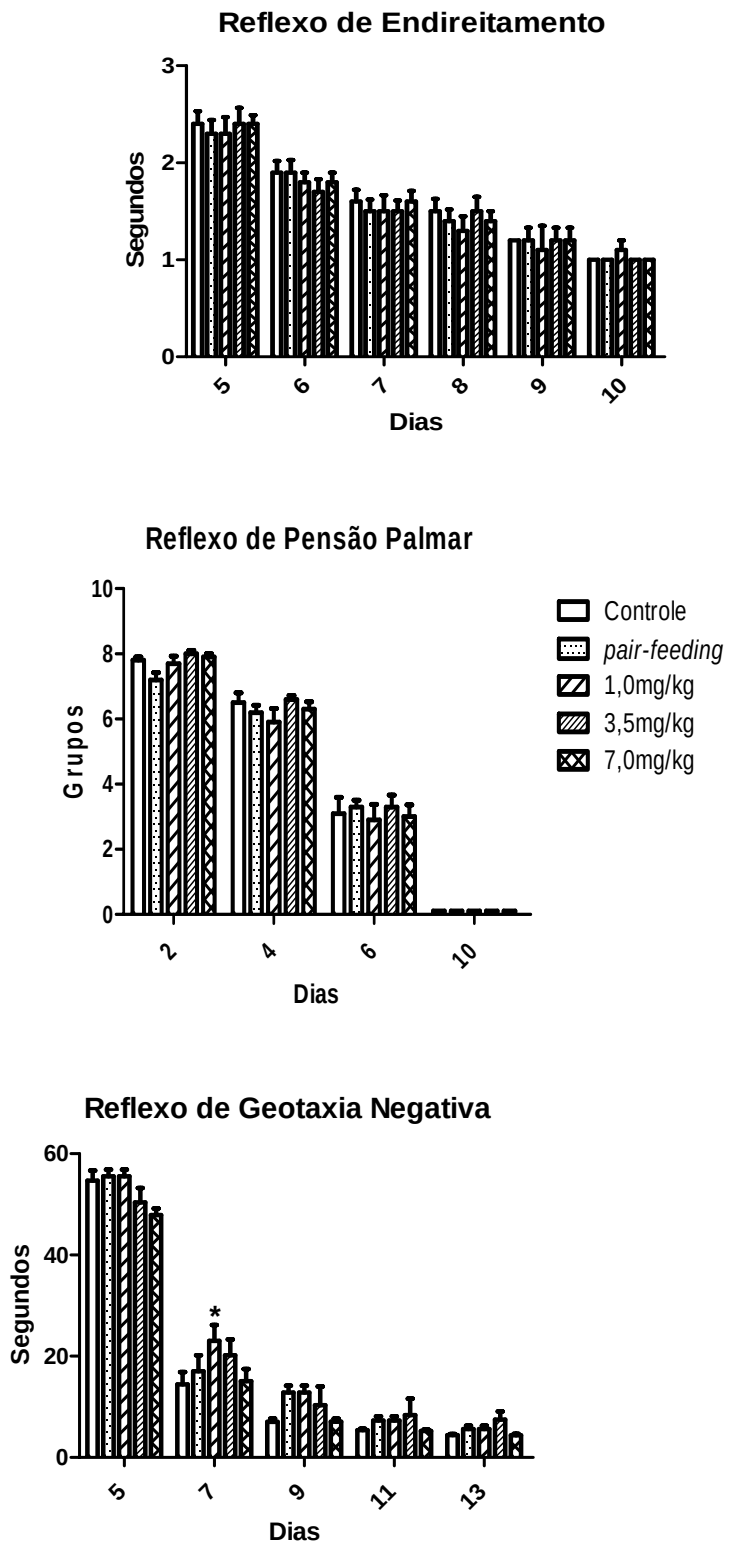

Figura 18- Reflexos de endireitamento, de preensão palmar e de geotaxia negativa da prole de ratas do grupo controle e de ratas submetidas à MCT do 6º ao 20º dia de gestação, 1,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 7,0 mg/kg. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. N= 10 ninhadas/grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. *p<0,0001

A figura 19 ilustra os resultados obtidos no reflexo de sobressalto. A ANOVA de uma via aplicada ao dia do reflexo de sobressalto e o dia de andar adulto não indicaram diferenças significantes entre os grupos (F(4/49) = 1,231, para o reflexo de sobressalto e F(4/49) = 0,0, para o dia de andar adulto P= 0,3112).

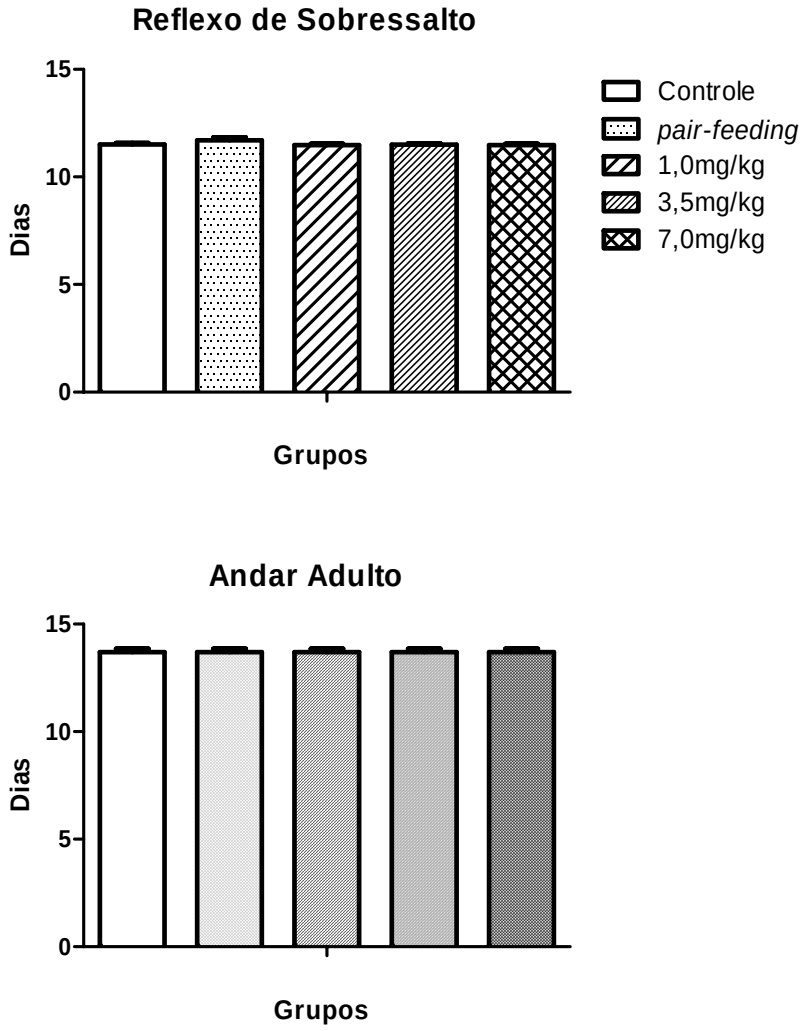

Figura 19- Efeitos da MCT do 6º ao 20º dia de gestação, 1,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 7,0 mg/kg e grupo controle no reflexo de sobressalto e dia de andar adulto na prole de ratos. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. N= 10 ninhadas/grupo. ANOVA de uma via

Atividade geral observada em campo aberto dos filhotes

A figura 20 ilustra os resultados obtidos na locomoção medida em campo aberto. A ANOVA de duas vias aplicada a locomoção da prole de ratos em campo aberto mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação ao tratamento ($F(4/1872) = 0,58$, $P < 0,0001$), dias de observação ($F(5/1872) = 66,29$ $P< 0,0001$), mas não havendo interação entre os fatores ($F(20/1872)= 0,32$, $P=0,5766$). Assim, notou-se que houve redução na locomoção do 17º dia nos grupos 3,5 mg/kg em relação ao grupo controle.

A ANOVA de duas vias aplicada ao levantar da prole de ratos em campo aberto mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação dias de observação ($F(5/2370) = 17,76$, $P< 0,0001$), não havendo diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos ($F(4/2370) = 0,34$, $P= 0,0430$) e a interação entre os fatores ($F(20/2370)= 0,31$, $P= 0,9824$) .

A ANOVA de duas vias aplicada ao tempo de imobilidade da prole de ratos em campo aberto mostrou que houve diferença estatisticamente significante com relação ao tratamento ($F(4/270) = 0,42$, $P < 0,0001$), dias de observação ($F(5/270) = 97,87$, $P< 0,0001$), havendo interação entre os fatores ($F(20/270)= 0,81$, $P< 0,0001$). Assim, notou-se que no dia 15 houve aumento no tempo de imobilidade dos grupos 1,0 mg/kg e 3,5 mg/kg e nos dias 16,17 e 18 esse aumento foi apenas do grupo 3,5mg/kg em relação ao grupo controle.

A ANOVA de uma via aplicada a defecação não indicou diferenças significantes entre os grupos ($F(4/270) = 0,94$ $P =0,9864$).

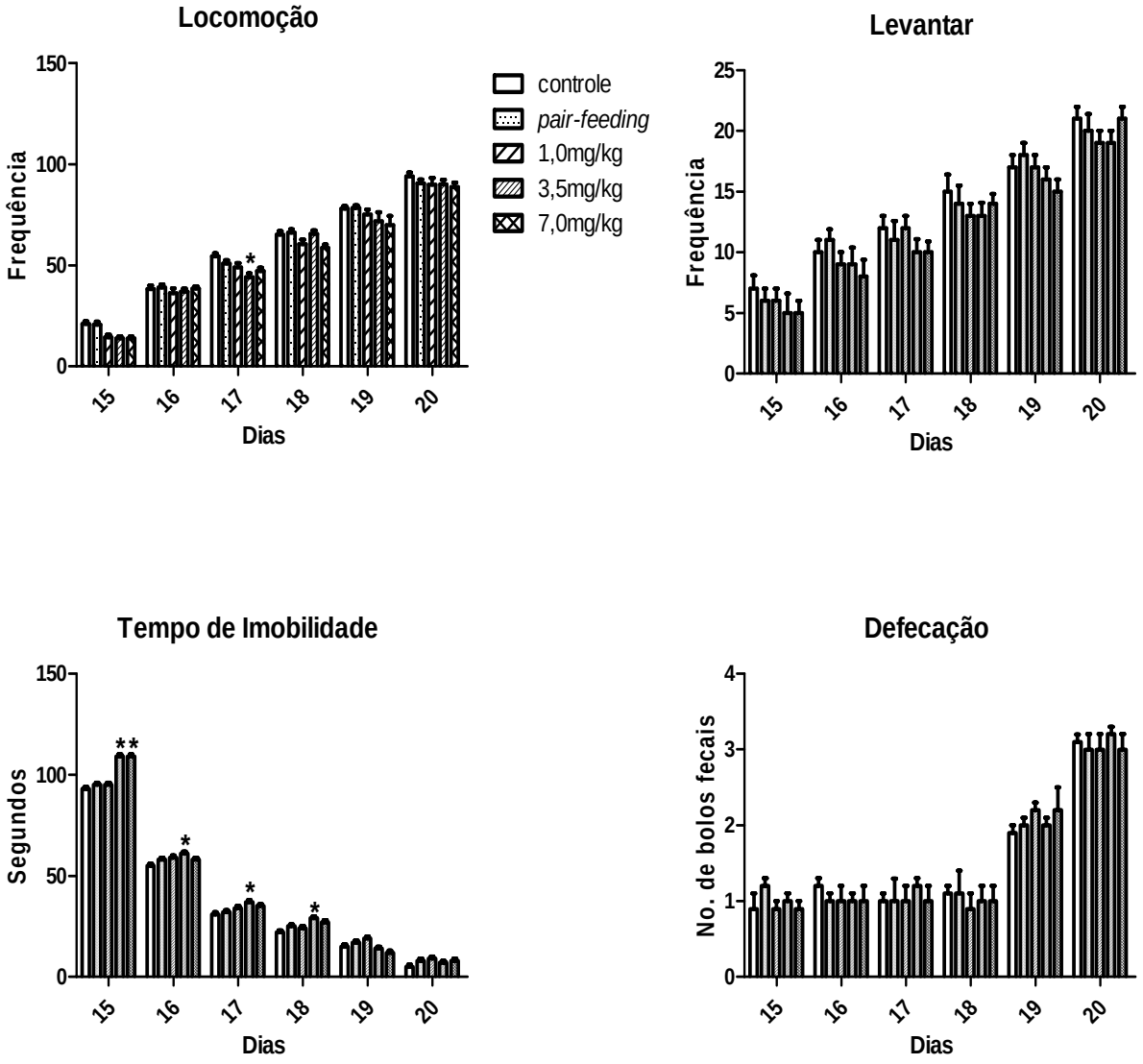

Figura 20- Atividade geral, avaliada no campo aberto, da prole de ratas do grupo controle e das ratas submetidas à MCT do 6º ao 20º dia de gestação, 1,0mg/kg, 3,5 mg/kg, 7,0 mg/kg. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. N= 10 ninhadas/grupo. ANOVA de duas vias

5 DISCUSSÃO

Na investigação dos efeitos tóxicos de substâncias químicas no período perinatal, o peso corporal materno e de sua prole são tidos como um índice importante de toxicidade. Alterações no peso materno podem estar ligadas à desnutrição produzida diretamente pelo agente tóxico ou indiretamente por outros fatores como interferências com a palatabilidade, odor e outras características do alimento. Além disto, o agente tóxico pode, de forma indireta, modificar os processos fisiológicos da placenta interferindo com o transporte de nutrientes para o feto em desenvolvimento, ou ainda causar distúrbios fisiopatológicos no organismo materno, mal-nutrição materna resultante da diminuição da comida ingerida ou mal-absorção gastrintestinal de nutrientes. Portanto, nos estudos de toxicologia do desenvolvimento sempre permanece a dúvida se as alterações no peso materno e no peso de sua prole são conseqüência do efeito direto ou indireto da ação nociva do agente tóxico.

Na literatura têm-se muitas informações sobre a RA e suas conseqüências. Assim, para determinar as condições da privação alimentar em nosso biotério, realizou-se o Experimento 1. Neste caso foram utilizadas 20 fêmeas prenhes, sendo diariamente aferido o consumo de ração, a fim de se conhecer o consumo médio de ração durante a prenhez, podendo assim, estabelecer os diferentes níveis de RA, conforme proposto nos experimentos de Fleeman et al. (2005). Desta forma, estabeleceu-se que as ratas receberiam 30, 45, 60 e 85% da quantidade de ração ingerida pelas ratas do grupo controle.

No Experimento 2, a partir do 8º dia de gestação (Figura 8 e Tabela 3) e, portanto, há três dias do início dos diferentes níveis de RA, nota-se que o peso materno foi menor nas ratas submetidas a privação alimentar de 60, 45 e 30% daquela das ratas do grupo controle, enquanto o grupo 85% em nenhum momento diferiu do grupo controle. A partir do 20º dia de gestação quando a restrição alimentar terminou houve um retorno no ganho de peso proporcional a restrição. Nota-se ainda, que a intensidade do grau de RA acompanhou a intensidade da perda de peso, sendo mais evidente próximo ao término da RA.

Ao nascimento dos filhotes oriundos das ratas submetidas à RA observou-se o canibalismo materno e este também foi proporcional à intensidade da privação alimentar, ou seja, a rata submetida à maior restrição foi aquela que mostrou maior canibalismo. Um dado interessante foi que a mãe que recebeu apenas 30% da ração em relação ao grupo controle, matou e comeu todos os filhotes logo após o nascimento.

O comportamento agressivo em direção à cria, sem causar sérias injúrias físicas, é considerado normal em muitas espécies animais como cães e primatas, tido como um comportamento de apaziguamento, visando “ensinar etiqueta social” ao infante, uma vez que a mãe deve mostrar e estabelecer dominância (HOUPT, 2000). Quando a injúria ao filhote é mais séria, este comportamento pode se enquadrar em comportamento materno anormal, rejeição ou, algumas vezes, canibalismo (HOUPT, 2004). No entanto, em condições “normais”, este fenômeno de canibalismo materno, comum em laboratórios, ainda não é compreendido (WEBER; OLSSON, 2008).

O ato de um animal devorar o outro da mesma espécie é um comportamento intrigante que atrai estudos de várias áreas, desde a Biologia até a Sociologia, passando por questionamentos éticos e religiosos quando o fenômeno é observado em comunidades humanas (PIÚMA, 2007).

O canibalismo é um ato que sugere auto-eliminação de uma espécie por ela mesma, porém pode representar uma vantagem evolucionaria individual e populacional (BROWN,1976). Assim, o ato de canibalismo contra jovens crias pode ser uma estratégia de sobrevivência de adultos durante períodos de limitação de comida. Desta forma, quando os recursos são limitados, as fêmeas podem reduzir o tamanho da ninhada através do canibalismo. Este fato poderia explicaria o canibalismo observado no presente trabalho. Mais ainda, a correlação verificada entre o grau de RA e o do canibalismo materno reforça o aspecto evolucionário do fenômeno materno.

Outro fato interessante e que pode ser correlacionado ao aspecto evolucionário ligado à preservação da espécie seria o aumento do número de filhotes na medida em que se aumentou a restrição alimentar. De fato, fêmeas do grupo de maior restrição apresentaram cerca 40% a mais de filhotes do que as fêmeas do grupo controle.

É fato conhecido que entre animais, ocorrência de canibalismo materno, é mais freqüente quando há defeitos físicos na prole. Dipe (2009) estudou as malformações ósseas e viscerais promovidas pela restrição alimentar sobre a prole de ratas Wistar no mesmo esquema do presente trabalho. Esse autor não verificou teratogênese nas diferentes RA. Portanto, a hipótese de defeitos físicos na prole levando ao canibalismo materno pode ser descartada no presente trabalho.

Outro aspecto a considerar, seria que o estresse causado pela RA durante a gestação, causaria alterações neuronais que levariam a mãe a matar e comer seus filhotes, logo após o nascimento. Neste sentido, sabe-se que a liberação do fator liberador de corticotropina é

responsável pelo aumento de ansiedade e reação de medo em machos roedores (LONSTEIN; GAMMIE, 2002). Por outro lado, em fêmeas durante a lactação há decréscimo dos níveis deste hormônio no hipotálamo, uma vez que o comportamento agressivo protetor pós-parto está relacionado à diminuição da ansiedade e medo, e a administração de fator liberador corticotropina e o hormônio adrenocorticotrópico inibem sua manifestação (LONSTEIN; GAMMIE, 2002).

Broom e Johnson (1993) comentam que o estresse é um efeito ambiental sobre um indivíduo que coloca uma sobrecarga sobre o seu sistema de controle e reduz o seu–vigor físico o que acarretaria aumento de mortalidade e insucesso no crescimento ou na reprodução. O termo estresse também pode ser definido como um sintoma resultante da exposição do animal a um ambiente hostil, com conseqüentes prejuízos para a homeostase. Os agentes estressores podem ser de natureza mecânica (traumatismos cirúrgicos ou não), física (calor, frio, som), química (drogas) ou biológica (agentes infecciosos, fatores psíquicos, estado de nutrição, etc). Em outras palavras, as condições ambientais adversas ao bem-estar animal podem ser climáticas, como calor ou frio extremo; nutricionais, como privação de alimentos ou de água; sociais, como ocupação de posições hierarquicamente inferiores dentro de um grupo; ou fisiológicas, causadas por patógenos ou toxinas. Assim no presente trabalho, embora as fêmeas possam ter sofrido adaptações que as levassem a apresentar menores níveis de estresse, a privação alimentar causaria ativação suplementar do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, levando ao comportamento agressivo materno exacerbado e ao canibalismo. Portanto, não se pode descartar que o canibalismo observado não tenha tido a contribuição do estresse na sua eliciação.

Ainda, levantando hipóteses acerca das causas do canibalismo observado, alterações na interação mãe-filhote podem estar envolvidas no fenômeno. O comportamento materno é mantido por hormônios e neurotransmissores, porém o fator crítico é a estimulação tátil durante a amamentação (LONSTEIN; DE VRIES, 2000; FEBO; NUMAN; FERRIS, 2005), o estímulo olfatório importantíssimo na interação entre crias e fêmeas (LONSTEIN; GAMMIE, 2002), e, ainda, os estímulos ultrassônicos oriundos dos filhotes (HOUPT, 2000). Assim, filhotes desnutridos, como é o caso deste trabalho, podem não apresentar as mesmas habilidades que os filhotes alimentados adequadamente. Redução nestes estímulos prejudicaria o reconhecimento materno dos filhotes levando ao canibalismo.

Os filhotes que sobreviveram ao canibalismo materno foram pesados no 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dia de vida (Figura 9). Assim, observou-se que durante a amamentação somente o

grupo de maior restrição apresentou redução no peso no 14º dia da lactação. Deve ser salientado que o consumo de ração dos filhotes inicia-se no 10º dia pós-parto, ainda durante a fase de lactação, evidenciando prejuízo precoce no grupo de maior privação. Este fato também é observado aos 35 dias de idade, quando todos os filhotes provenientes de mães privadas apresentaram redução no peso, porém a redução de peso mais evidente ocorreu no grupo de restrição 45%. Portanto, durante o período de lactação os efeitos da RA não são tão evidentes quanto aqueles observados a longo prazo.

Os efeitos da desnutrição intra-uterina dependem da fase de desenvolvimento em que está o feto ou o órgão, sendo tanto mais intensos e permanentes quanto mais precocemente ocorrer e mais tarde se iniciar a recuperação nutricional (GURMINI, 2005).

Gurmini (2005) verificou que filhotes de mães submetidas à restrição dietética de 50% durante a gestação apresentam peso, comprimento do corpo e comprimento do intestino menores, recuperando apenas o comprimento do corpo após a lactação, mas não atingindo o desenvolvimento alcançado pelos filhotes de mães nutridas. Além disso, a altura total da mucosa, a altura da vilosidade, a espessura da vilosidade e a altura do enterócito também foram comprometidas, apenas recuperando a espessura da vilosidade após o período de lactação. Esses achados mostram que o filhote submetido à desnutrição durante a gestação, mesmo após a lactação, apresenta comprometimento de seu desenvolvimento. No mesmo sentido, no presente trabalho, observou-se que no grupo de restrição de 45%, aos 14 e 28 dias de idade, há redução mais persistente do peso corpóreo da prole. No entanto, um fato adicional foi observado: aos 35 dias de idade todas as proles de mães com restrição apresentaram redução do peso corporal em graus proporcionais à restrição, fato indicativo de lesões persistentes, somente expressas durante o desenvolvimento dos animais, especificamente na fase de puberdade.

Estudos mostram que a baixa ingestão calórica durante a gestação e/ou lactação podem resultar em atrasos e/ou adiantamento na a maturação e outras características físicas e reflexológicas da prole (CHIAVEGATTO; OLIVEIRA; BERNARDI, 1997).

No presente estudo os parâmetros de desenvolvimento físico não foram modificados pela RA. No entanto, cabem aqui alguns comentários à cerca da natureza de cada um destes parâmetros, uma vez que nesse trabalho são comparados os dados da desnutrição e aqueles da MCT no sentido de discriminar os efeitos da desnutrição e aqueles da toxicidade do alcalóide pirrolizidínico.

Abertura dos olhos e erupção dos dentes incisivos dependem basicamente da presença do fator de crescimento epidérmico (EGF). Em 1962, Cohen descobriu o EGF que é um polipetídeo potente promotor da divisão e diferenciação celular dos tecidos epidérmicos. A facilitação para abertura dos olhos e erupção dos dentes incisivos tem origem epidérmica. Foi demonstrado que o EGF pode acelerar a abertura dos olhos e a erupção dos incisivos quando administrado em ratos, camundongos e hamsters (HOATH, 1986; SMART et al., 1989). Nesse sentido, o crescimento de pêlo e penugem, desdobramento das orelhas também estão envolvidos com esses fatores.

A maturação sexual em machos é resultado do complexo de interações do hipotálamo, pituitária anterior, testículos e órgãos sexuais secundários (NEGRO-VILLAR; OJEDA; MCCANN, 1973). Uma teoria sugere que a iniciação da puberdade tem como primeiro evento alteração sensitiva no eixo hipotálamo-pituitária com *feedback* negativo para os andrógenos (SMITH; DAMASSA; DAVISON, 1989). Uma vez que o "*gonadostast*" (em analogia a termostato, para o mecanismo em que a secreção hormonal das gônadas regulam a secreção das células do hipotálamo e hipófise) se estabeleceu, há aumento no nível e/ou liberação do padrão de gonadotrofina, resultando no aumento da secreção de testosterona pelas células de Leydig, até que um novo estado de equilíbrio seja alcançado. Nas ratas o único sinal externo da puberdade é a canalização da vagina, a qual é inicialmente imperfurada e mais tarde torna-se patente em conseqüência da estimulação estrogênica. A abertura vaginal ocorre um dia depois do primeiro surto pré-ovulatório de gonadotrofinas (SODERSTEIN; ENEROTH, 1984). Um fenômeno importante evolucionário pelo qual a mãe regula o desenvolvimento gonadal da sua ninhada é o controle da canalização da vagina pelo GnRH do leite materno (SODERSTEIN; ENEROTH, 1984). Este deprime a função ovariana impedindo sua maturação e, na medida em que os filhotes começam a comer regularmente, os episódios de amamentação tornam-se menos freqüentes, o aporte de GnRH do leite materno reduz-se naturalmente, permitindo o desenvolvimento ovariano que culmina na puberdade da fêmea (SODERSTEIN; ENEROTH, 1984).

No entanto estes mesmos animais que não mostraram alterações no desenvolvimento físico (exceto peso corpóreo), quando avaliados nos reflexos neurológicos, mostraram déficits evidentes (Figura 11). Os reflexos e as respostas de um recém-nascido permitem que ele reaja ao ambiente em que vive. Esses reflexos são instintivos, servem para protegê-lo e todos os filhotes nascem com os mesmos reflexos. Por outro lado, as respostas são totalmente individuais. Os reflexos são respostas específicas, previsíveis e involuntárias a um tipo

específico de estímulo. Segundo Fox (1965), os seguintes reflexos podem ser testados no início da vida, em ratos: preensão palmar, endireitamento ou recuperação do decúbito, geotaxia negativa e endireitamento.

Durante a ontogenia o desenvolvimento do controle da postura depende de muitos processos neurobiológicos e da percepção do mundo externo. Tem sido proposto por vários autores que o desenvolvimento postural é pré-requisito para o desenvolvimento motor (ALTMAN; SUDARSHAN, 1975) e, mais ainda, o desenvolvimento postural interfere intimamente com o desenvolvimento cognitivo e da comunicação verbal e não verbal em crianças (SILVA et al., 1987). De acordo com Altman e Sudarsham (1975) três sistemas periféricos podem estar envolvidos com a regulação da postura, incluindo o sistema vestibular, extereoceptivo e proprioceptivo; além disso, estímulos do sistema visual têm importância na aquisição da postura. As funções do sistema vestibular começam logo após o nascimento, embora sejam dificultadas pela imaturidade do sistema motor. O estudo do sistema vestibular atrai pouca atenção nas investigações do desenvolvimento da postura, possivelmente, porque as deficiências precoces destes sistemas são em geral compensadas durante a adolescência (CHIAVEGATTO; OLIVEIRA; BERNARDI, 1997). O reflexo de endireitamento, geotaxia negativa e andar adulto em filhotes de ratos ocorrem pela ação do desenvolvimento motor e também é guiado pelo sistema vestibular (CHIAVEGATTO; OLIVEIRA; BERNARDI, 1997).

Observou-se no reflexo de endireitamento (Figura 11) que apenas o grupo de restrição 60% apresentou retardo significante em relação ao grupo controle; essa diferença apareceu no 9º dia de vida e o mesmo foi observado no reflexo de geotaxia negativa. Neste último verificou-se também aumento no 5º e 7º dia do grupo RA 45% em relação ao grupo controle e aumento no 5º e 9º dia do grupo RA 60% em relação ao grupo controle (Figura 11). O grupo RA 85% não apresentou diferenças significantes em relação ao grupo controle. Ambos os reflexos, representam a orientação espacial do animal; o reflexo de endireitamento está ligado a propriocepção (FOX, 1965) e os presentes dados indicam que este aspecto do desenvolvimento não foi alterado de forma significativa pela restrição alimentar. Por outro lado, o reflexo de geotaxia que expressa a exterreocepção do animal (CHIAVEGATTO; OLIVEIRA; BERNARDI, 1997) foi extremamente afetado ela restrição alimentar, o que leva a supor que a restrição alimentar pode interferir com a relação do animal com o mundo a sua volta. Aparentemente, um animal que não tem boa percepção espacial pode ser mais facilmente predado ou apresentar dificuldades na procura de alimento e fêmeas para

reprodução. Quanto ao dia de andar adulto, este não foi modificado (Figura 12).

Em relação ao reflexo de preensão palmar, vale comentar alguns aspectos históricos. No ano de 1896, Joseph Felix Babinski apresentou na *Biological Society* de Paris um artigo sobre a resposta cutânea plantar em alguns pacientes humanos com desordens orgânicas do SNC, tendo feito a descrição definitiva em 1898 (BARRAQUER-BORDAS, 1968). Este sinal (de Babinski) corresponde à flexão dorsal ou à extensão do polegar desencadeada pela estimulação do tegumento de uma zona qualquer da planta dos pés, exceto na região plantar do próprio polegar (BARRAQUER-BORDAS, 1968). O reflexo de preensão palmar, também chamado de reflexo de Babinsk é um dos reflexos do bebê; é normal em crianças abaixo de 2 anos de idade, mas desaparece à medida que a criança cresce e o sistema nervoso se desenvolve (ALDER; ZBINDEN, 1977). Em pessoas com mais de 2 anos de idade, a presença do reflexo de Babinski indica danos nos nervos que conectam a medula espinal ao cérebro (o trato corticoespinal) (BARRAQUER-BORDAS, 1968). Uma vez que este trato se apresenta do lado esquerdo e direito, o reflexo de Babinski pode ocorrer em um dos lados ou nos dois. O reflexo de Babinski anormal pode ser temporário ou permanente (ALDER; ZBINDEN, 1977).

No presente trabalho observou-se que nos filhotes das mães privadas de ração 45% e 60% apresentaram redução no reflexo de preensão palmar no 2º, 4º e 6º dia de vida em relação ao grupo controle (Figura 11); já o grupo que as mães foram submetidas à restrição de ração 85% houve um aumento neste reflexo no 6º dia, quando se esperaria que este reflexo fosse diminuído como constatado no grupo controle. No último dia de observação deste reflexo não houve diferença significativa entre os grupos. Portanto, com base nestes resultados observou-se retardo precoce nos filhotes de mães restritas 45% e 60%, mas com o passar do tempo observa-se uma recuperação.

Quanto ao reflexo de sobressalto, este ocorre paralelo com abertura do ducto auditivo, iniciando-se o processo de percepção de sons do ambiente (ALTMAN; SUDARSHAN, 1975); no caso (Figura 12) não foram observados diferenças estatísticas entre os grupos RA e grupo controle.

Diante destes resultados, torna-se importante e necessário comentar sobre os estudos de interação materno-filhote. Alguns dados do desenvolvimento físico da prole cujas mães foram privadas de alimento sugerem que o cuidado materno não foi prejudicado pela restrição alimentar. Ao nascimento as proles dos roedores não apresentam ainda controle da

temperatura corporal e dependem da mãe para manter a temperatura corporal (CHIAVEGATTO; BERNARDI, 1991). Caso isto não ocorra pode-se ter a morte prematura dos filhotes por hipotermia. No presente estudo, não se observou morte perinatal em fêmeas restritas. Por outro lado, é fato conhecido que, em ratos, as fêmeas durante a lactação lambem mais filhotes machos, pois este procedimento libera testosterona do filhote a determina a adequada descida do testículo, ou seja, sua maturação sexual (ALMEIDA et al., 1996). Desta forma, a ausência de alterações neste parâmetro nos grupos restritos de alimento aponta para um cuidado maternal similar àqueles das fêmeas do grupo controle. Acrescente-se, ainda, que embora se tenha queda de peso corporal materno na restrição, ao nascimento e durante a lactação, o desenvolvimento físico da prole foi similar aquele do grupo controle. Em particular, a abertura vaginal da prole feminina não foi alterada e desde que o principal hormônio, como já comentado, que inibe a canalização da vagina é de origem do leite materno, conclui-se que a quantidade e/ou qualidade deste leite foi suficiente para manter o pleno desenvolvimento dos filhotes, apesar da restrição de alimento. Raciocínio similar pode ser feito com relação à ausência de diferenças significantes nos pesos das proles restrita ou não ao nascimento. De fato, o aporte de nutrientes durante o período final da gestação e mesmo durante a restrição permitiu o desenvolvimento ponderal da prole em níveis de normalidade.

Diante disto, propõe-se que nos protocolos de estudo do desenvolvimento a inclusão de testes de avaliação do comportamento materno para dirimir algumas dúvidas que possam ser de natureza relativa à interação materno-filhote ou de ações diretas ou indiretas do agente tóxico.

No presente trabalho foi avaliada também a atividade geral da prole. A atividade geral, também chamada de atividade motora ou espontânea, mensura a capacidade do animal de se movimentar em uma área desconhecida independente de estímulos ambientais. No presente experimento, fatores ambientais (aparelho, intensidade de luz, barulho) foram padronizados para uma adequada determinação da atividade geral, conforme sugerido por Reiter e McPhail (1982).

Assim, foram constatadas alterações significantes na freqüência locomoção e levantar, bem como no tempo de parado dos filhotes oriundos de ratas submetidas a RA. Notou-se que a partir do 16º dia houve diminuição na locomoção dos filhotes em que a mãe sofreu restrição

de 45% e 60% da ração (Figura 13). Observou-se também no campo aberto redução no levantar dos filhotes do grupo com restrição de 45% em todos os dias observados (Figura 16); nos filhotes de restrição 60% a diminuição do levantar ocorreu apenas no 18º e 20 º dia. Não houve diferenças significantes entre o grupo controle e restrição de 85%, tanto na locomoção quanto no levantar.

Bernardi e Palermo-Neto (1983) mostraram o envolvimento dos parâmetros freqüência de locomoção e levantar com sistemas dopaminérgicos centrais distintos, porém intimamente ligados à expressão da função motora. A locomoção apresenta características ora de emocionalidade, ora de comportamento exploratório e a habituação não ocorre em função de exposições repetidas, mas em geral em função do tempo (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1983). O levantar pode ser tido como a manifestação de um processo exploratório de aproximação por parte do animal das regiões modificadas do ambiente, ou de modo alternativo expressão de um estado de ativação generalizada da qual faltaria o componente exploratório (ADES, 1975).

Nestes mesmos filhotes observou-se que o tempo de imobilidade foi maior nos grupos restrição 45% e 60% em relação ao grupo controle e restrição de 85% (Figura 13), mostrando correlação entre os parâmetros locomoção e levantar com a imobilidade. Estes dados sugerem redução na atividade motora dos animais. As habilidades motoras se constituem como uma das mais importantes manifestações na relação de um ser vivo com o seu ambiente. Os comportamentos locomotores estão estreitamente relacionados à sobrevivência dos mamíferos e requerem uma coordenação fina e precisa na atividade simultânea das diversas vias motoras (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1983).

Observou-se também no teste de campo aberto que os filhotes não apresentaram diferenças significantes entres os grupos RA e o grupo controle em relação à defecação (Figura 18). Segundo, Bernardi e Palermo-Neto (1983), a defecação é reativa ou emocional, e é uma resposta autonômica que ocorre em situações de novidade ou aversivas, sendo considerada, com alguma reserva, como medida de emocionalidade no teste de campo aberto. Nesse sentido, no presente trabalho esse parâmetro indicou ausência de alterações na emocionalidade da prole.

Vale ainda destacar que, embora não se tenha observado alterações no desenvolvimento da habilidade motora dos animais (dia de andar adulto), o teste de campo aberto demonstrou prejuízo na função motora dos animais.

Estes resultados em conjunto demonstraram que, na dependência do grau de restrição alimentar materna, sua prole apresenta alterações principalmente de cunho neurológico, associada à redução no desenvolvimento ponderal. A análise do desenvolvimento motor dos animais no campo aberto revela dados interessantes. Assim, o dia de andar adulto dos animais não se mostrou diferente daquele dos animais controle e seria esperado que a locomoção ou o levantar no campo aberto também não tivesse sido modificado. No entanto, notou-se que nos vários dias de observação a locomoção e o levantar nos animais foram reduzidas em paralelo com o aumento significante da duração de imobilidade, o que expressa modificações importantes no desenvolvimento do sistema motor. Estas alterações só foram evidentes quando o sistema foi desafiado pela exposição ao campo aberto, fato bastante comum nos experimentos perinatais, uma vez que o organismo tende a suprir as duas deficiências dentro de uma contingência normal, sendo que estas só são explicitadas quando o sistema é desafiado.

Os diferentes agentes exógenos quer sejam físicos ou químicos, podem causar efeitos deletérios diretamente sobre o produto da concepção, ou secundariamente, através da ação sobre o organismo materno (SPINOSA et al., 1999). Para os estudos experimentais relacionados aos efeitos de xenobióticos sobre a indução de anomalias e ou malformações fetais, é importante salientar que as doses preconizadas/utilizadas não devem causar toxicidade materna exacerbada, uma vez que o próprio estresse da intoxicação poderia causar efeitos deletérios ao concepto, inferindo, destarte com a interpretação correta dos reais efeitos de xenobióticos (GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008).

Os ensaios de toxicidade aguda fornecem um perfil da toxicidade de substâncias químicas contribuindo para estabelecimento do potencial tóxico de uma substância e permitindo o estabelecimento de doses, períodos e órgãos afetados na investigação toxicológica.

Nesse sentido, foi realizado o Experimento 4 deste trabalho, no qual se avaliou a toxicidade aguda da MCT. Considerando que o enfoque foram os estudos perinatais, incluiu-se um grupo de fêmeas gestantes ao lado de ratos machos e fêmeas preconizados nestes testes.

Partiu-se da dose de 10 mg/kg de MCT, uma vez que em trabalho anterior dose similar (7 mg/kg) promoveu poucos efeitos tóxicos em animais adultos (HUEZA, 2009). As demais doses empregadas formam 3 e 10 vezes maiores que a inicial. Pode-se, então, perceber que há diferenças entre os sexos na toxicidade a MCT, visto que as fêmeas virgens são mais sensíveis aos efeitos tóxicos da MCT que os machos. No entanto, as fêmeas prenhes foram as mais afetadas, ou seja, mais sensíveis que as virgens, uma vez que apresentam maiores escores dos sintomas de intoxicação por MCT.

Deve ser destacado que durante a prenhez tanto os mecanismos de absorção, distribuição e biotransformação, como aqueles da excreção estão modificados (BERNARDI, 2006). Estes fatos explicariam a maior toxicidade observada. Qualitativamente, verificou-se incremento em parâmetros ligados a ativação do sistema sensorial, tais como sensibilidade corneal, auditiva, frêmito vocal e resposta ao aperto da cauda. Pode haver ainda contribuições periféricas da ativação do sistema nervoso expressos pela presença de tremor e piloereção. Além disto, houve redução significante da locomoção dos animais que é uma resposta adaptativa ao estresse em roedores.

Baseados nestes resultados tomou-se como maior dose da MCT a ser empregada nos ensaios perinatais a dose de 7,0 mg/kg, próxima a dose de 10 mg/kg que foi empregada nos estudos de Hueza (2009).

Em relação à administração de MCT em fêmeas gestantes, determinou-se que estas receberam o tratamento do 6º ao 20º DG. Este período foi escolhido, pois se sabe que, em ratas, no 6º dia de prenhez já houve a implantação do embrião no útero materno (BERNARDI, 2006), permitindo desta maneira, que os efeitos da planta ocorressem somente durante o período de organogênese e desenvolvimento fetal, descartando-se, assim, a possibilidade de toxicidade pré-implantação. O tratamento com MCT durante o período de organogênese e desenvolvimento fetal das ratas não produziu alterações no desenvolvimento físico da prole, mas no teste de geotaxia negativa, houve diferença pontual, estatisticamente significante do grupo 1,0 mg/kg de MCT, no dia 7 em relação ao grupo controle. Os demais parâmetros do desenvolvimento reflexológico também não foram alterados. A atividade motora da prole foi avaliada em campo aberto e mostrou aumento significante apenas na duração da imobilização, os animais dos grupos 3,5 e 7,0 mg/kg de MCT, nos dias 15, 16 e 17 em relação ao grupo controle.

Neste estudo, quando se avaliou o ganho de peso total das fêmeas gestantes, tratadas ou não com a MCT, foi possível observar diminuição significante no peso daquelas ratas que receberam a maior dose de MCT (7,0 mg/kg) ao final da gestação. Uma vez que o número de filhotes nascidos destas gestantes diferiu daquele das fêmeas do grupo controle, pode-se relacionar esta diminuição verificada, pode ser por uma embriotoxicidade, desde que a fase de crescimento dos fetos ocorre no terço final da gestação (BERNARDI, 2006).

Observou-se também redução no peso dos filhotes; esta redução ocorreu apenas no 35º dia pós-natal, nos filhotes cujas mães receberam as doses 1,0 e 7,0 mg/kg de MCT, evidenciando que durante a lactação não houve retardo no desenvolvimento dos filhotes, mas depois, quando os animais começaram a se alimentar sozinhos, houve redução no peso destes animais. Pode-se aventar que alterações comportamentais ou na fisiologia tenham causado estes efeitos. É interessante lembrar que a MCT é um alcalóide pirrozolidínico havendo relato que toxinas deste grupo levam a anorexia e lesões hepáticas (PAN et al., 1993), o que comprometeria o metabolismo adequado do alimento; acrescente-se ainda que estes animais podem ter dificuldades em buscar o alimento.

No presente trabalho verificou-se perda de peso significante de ratas expostas a maior dose de MCT. Como já comentado anteriormente, buscou-se saber se esta perda de peso ocorreu por ação direta ou indireta da MCT. Os resultados indicam que ambos tratamentos, tanto a restrição alimentar quanto a MCT promoveram redução tardia do peso das proles, evidentemente em razão dos tratamentos, mas não comprometeram o desenvolvimento intra-uterino dos filhotes quando se toma o parâmetro peso corporal da prole ao nascimento.

Releve-se então a importância de avaliações tardias nos estudos de desenvolvimento perinatal, pois alguns dados de importância toxicológica não são evidentes ao nascimento, mas sim em períodos mais tardios da vida do animal.

À medida que o peso corpóreo tardio dos filhotes se encontrou reduzido em ambos os tratamentos, não se pode atribuí-lo apenas a um efeito tóxico da MCT sobre a prole. Esse efeito foi mais evidente em mães restritas de comida, porém em ambos os casos o efeito da diminuição do peso foi tardio. Novamente pode-se supor que durante o período de lactação (PND1 a PND21) não houve prejuízo no aporte de nutrientes para os filhotes das mães restritas e das tratadas com a MCT sendo possível que a qualidade do leite materno tenha sido preservada.

Os resultados não indicam alterações no desenvolvimento físico da prole, evidenciando que não há efeitos tóxicos para esses parâmetros nas doses de MCT empregadas. Porem, quando se analisou os resultados dos reflexos dos filhotes cujas mães receberam MCT na gestação, encontrou-se retardo nos reflexos de geotaxia negativa, mas esse dano também é encontrado nos filhotes de mães restritas de ração, e nas mesmas os danos dos filhotes são muito mais evidentes. Com base nos resultados das mães *pair-feeding* (que receberam a mesma quantidade de comida das mães 7,0 mg/kg), e essas não apresentaram diminuição de peso ao final da gestação em relação às mães controles, podemos aferir a toxicidade a MCT, ou seja, o retardo mesmo que pontual no reflexo de geotaxia negativa pode estar envolvido com danos ao sistema proprioceptor causado pela MCT. Os demais parâmetros reflexológicos que apresentaram alterações foram apenas nos filhotes de mães RA por isso não podemos aferir toxicidade a MCT nestes parâmetros.

Finalizando, a importância dos presentes achados não se prende à RA e tampouco à toxicidade da MCT, mas sim da interação dos dois aspectos. Nota-se que a RA representou papel de pouca importância na toxicidade da MCT, mostrando não haver correlação íntima entre a perda de peso materno e desenvolvimento dos filhotes expostos a toxina e a RA. A inclusão do grupo *pair-feeding* parece ser importante quando dos estudos de toxicidade do desenvolvimento, pois representam um controle dos aspectos nutricionais envolvidos no teste. Mais ainda, sugere-se que nos protocolos de avaliação da toxicidade do desenvolvimento sejam incluídos estudos da interação mãe-filhote (por exemplo, avaliação do comportamento materno) e do desenvolvimento tardio da prole exposta.

6 CONCLUSÕES

a) A RA (85, 60, 45 e 30% do consumo médio de ração) durante a gestação de ratas:

- o grupo RA 85% comportou-se de maneira semelhante ao grupo controle em todos os ensaios realizados;
- promoveu canibalismo materno que foi dependente da intensidade da RA da mãe, sendo que no grupo de maior restrição (30%) nenhum filhote sobreviveu;
- causou redução do peso corpóreo da prole dos grupos com RA, sendo que este efeito foi observado a partir do 14º dia de vida nas proles proveniente de ratas com 45% do consumo médio de ração e aos 35 dias de vida em todos os filhotes oriundos de ratas com RA;
- na avaliação do desenvolvimento físico da prole não foram observadas alterações entre os grupos, exceto no peso corpóreo da prole;
- na avaliação neurocomportamental foi observado apenas redução da atividade geral da prole com 15 a 20 dias de idade, sendo este efeito dependente da intensidade da RA

b) A MCT (10, 30 e 100 mg/kg) administrada em dose única em ratos, ratas e fêmeas prenhes:

- promoveu alterações nos escores de avaliação clínica dose-dependente;
- fêmeas prenhes são mais sensíveis ao efeito tóxico de MCT que as fêmeas virgens e machos.

c) A exposição à MCT (1, 0; 3,5 e 7,0 mg/kg) durante a gestação:

- promoveu redução do número de filhotes nascidos das mães que receberam 3,5 e 7,0 mg/kg, em relação às mães controles e *pair-feeding*;
- causou redução do peso corpóreo da prole do grupo que recebeu 1,0 e 7,0 mg/kg, a partir do 35º dia de vida;
- na avaliação do desenvolvimento físico da prole não foram observadas alterações entre os grupos, exceto no peso corpóreo da prole;
- na avaliação neurocomportamental foi observado apenas aumento do tempo de imobilidade, medido em campo aberto da prole de mães que receberam 3,5 e 7,0 mg/kg de MCT.

Sugere-se também que nos protocolos de avaliação da toxicidade do desenvolvimento sejam incluídos estudos da interação mãe-filhote (por exemplo, comportamento materno) e do desenvolvimento tardio da prole exposta.

REFERÊNCIAS

ADES, C. O. Efeito de aumentos e diminuições de intensidade luminosa sobre a resposta de levantar-se do rato. **Psicologia**, v. 2, p. 47-54, 1975.

ALDER, S.; ZBINDEN, G. Methods for the evaluation of physical, neuromuscular and behavior development of rats in early posnatal life. In: NEUBERT, D.; MERKER, H.J.; KWAIGROCH, T.E. **Evaluation of embriotoxic effects in animals.** Stuttgard; Georg Thieme, 1977. P. 175-185.

ALMEIDA, R. G.; MASSOCO, C.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Perinatal astemizol expure in the rat throughout gestation: long-term behavioral and ana tomical effects associated with reproduction. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 114, p. 123-127, 1996.

ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. Posnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Animal Behavior**, v. 23, p. 896-920, 1975.

ANDERSEN, M. L.; PALMA, B. D.; RUEDA, A. D.; TUFIK, S. Registro e identificação das fases do ciclo vigília-sono-análise dos eletroscilogramas**.** In: UNIFESP(Ed.) **Implantação de eletrodos para o estudo eletrofisiológico do ciclo vigília-sono do rato**. São Paulo, UNIFESP Ltda, Brasil; 2001. p.43-59.

ARMARIO, A.; BALASCH, J.; MARTINEZ, E. The effect of paradoxical sleep deprivation on estrous cycles of the female rats. **Hormones and Behavior.,** v. 49, p. 433-440, 1980.

BARRAQUER-BORDAS, L. **Neurologia fundamental**. 2. ed. Barcelona; Ed. Tory, 1968.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, 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. Effescts of apomorphine administration on rearing activity of control and experimental rats with drawn from long-term haloperidol treatment. **General Pharmacology,** v. 14, p. 545-547, 1983.

BRADY, L. S.; SMITH, M. A.; GOLD, P. W.; HERKENHAM, M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restriction and food-deprived rats. **Neuroendocrinology,** v. 52, p. 441-447, 1990.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas, Unicamp, 1994, p. 15–21.

BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics. In: EISENK, H.J. **Experiments in Personality**. London; Routledge & Kegan Paul, 1960. 31-71.

BRONW, M. C.; JANSEN, J. K. S.; VAN ESSEN, D. Polineural innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. **Journal of Physiology,** v. 261, p. 387-422, 1976.

BROOM, D. M.; JOHNSON, K. G. **Stress and animal welfare**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 211.

BRUCE-KELLER, A. J.; UMBERGER, G.; MCFALL, R.; MATTSIN, M. P. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. **Annals and Neurology**, v. 45, p. 8-15, 1999.

CHESNEY, C. F.; ALLEN, J. R.; HSU, I. C. Right ventricular hypertrophy in monocrotaline pyrrole treated rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 20, p. 257-268, 1974.

CHIAVEGATTO, S.; BERNARDI, M. M. Prenatal vs posnatal effects on offsping weight gain of rat exposed to diphenhydramine: A critical evaluation of fostering produces in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology,** v. 99, p. 219-221, 1991.

CHIAVEGATTO, S.; OLIVEIRA, C. A.; BERNARDI, M. M. Prenatal exposure of rats to diphenhydramine: effects on physical development, open field, and gonadal hormone levels in adults. **Neurotoxicology and teratology**, v. 19, p. 511-516, 1997.

CLAUDIO, L.; KWA, W. C.; RUSSELL, A. L.; WALLINGA, D. Testing methods for developmental neurotoxicity of environmental chemicals. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 164, p. 1-14, 2000.

CUMMINGS, D. E.; CLEMENT, K.; PURNELL, J. Q.; VAISSE, C.; FOSTER, K. E.; FRAYO, R. S.; SCHWARTZ, M. W.; BASDEVANT, A.; WEIGLE, D. S. Elevated plasma ghrelin levels in Prader-Willi Syndrome. **Nature Medicine**, v. 8, p. 643-4, 2002.

DIPE, V. V. **Efeitos da Privação alimentar materna sobre a prole de ratas Wistar. Avaliações teratogênicas clássicas e de imunoteratologia**. 2009. 180f. Tese (Mestrado em ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

DUAN, W.; MATTSON, M. P. Dietary restrictions and 2-deoxy-glucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in the models of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Research**, v. 57, p. 195-206, 1999.

FEBO, M.; NUMAN, M.; FERRIS, C. F. Functional magnetic resonance imaging shows oxytocin activates brain regions associated with mother-pup bonding during suckling. **Journal of Neuroscience Research,** v. 50, p.11637-11644, 2005.

FIGUEREDO, M. L. A.; RODRIGUEZ, J.; ALFONSO, H. A. Patologia de la intoxication experimental aguda por *Crotalaria retusa y Crotalaria spectabilis* em pollos. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v. 18, p. 63-71, 1987.

FLEEMAN, T. L.; CAPPON, G. D.; CHAPIN, R. E.; HURTT, M. E. Effects of feed restriction during organogenesis on embryo-fetal development in the rat**.** Birth Defects Research Part B - **Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 74, n. 5, p. 442-449, 2005.

FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse**. Animal Behavior,** v. 13, p. 234-241, 1965.

GABBE, S. G.; NIEBY, J. R.; SIMPSON, J. L. **Obstetrics:** normal and problem pregnancies. 4 ed. New York: Churchill Livingstone, 2002.

GARCIA-BELENGER, S.; OLIVER, C.; MORMEDE, P. Facilitation and feedback in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during food restriction in rats. Journal of **Neuroendocrinology**, v. 5, p. 663-668, 1993.

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

GOUMENOU, A. G.; MATALLIOTAKIS, I. M.; KOUMANTAKIS, G. E.; PANDIS, D. K. The role of leptin in fertility. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**; v.106, 2003. p.118-124.

GREY, A. D. The unfortunate influence of the weather on the rate of ageing: Why human caloric restriction or its emulation may only extend life expectancy by 2-3 years. **Gerontology**, v. 51, p. 73-82, 2005.

GURMINI, J. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial,** v. 41, n. 4, p. 271-278, 2005.

HAHN, T. M.; BREININGER, J. F.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. **Nature Neuroscienci,** v. 1, p. 271-272, 1998.

HERBERG, L. J. Seminal ejaculation following positively reinforcing electrical stimulation of rat hypothalamus**. Journal of Comparative Psychology**, v. 56, p. 679-685, 1963.

HERLIHY, J. T.; STACY, C.; BERTRAND, H. A. Long-term food restriction depresses serum thyroid hormone concentrations in the rat. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 53, p. 9-16, 1990.

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

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Departamento de Botânica do Estado de São Paulo, 1939. p. 20.

HOLSAPPLE, M. P.; WEST, L. J.; LANDRETH, K. S. Species comparison of anatomical and functional immune system development. **Birth Defects Research Part B – Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 68, n. 4, p. 321-334, 2003.

HOUPT, K. A. Equine maternal behavior and its aberrations. In: **International Veterinary Information Science.** Recent advances in companion animal behavior problems., 2000. New York: Disponível em: <http://www.ivis.org/>. Acesso em: janeiro de 2009.

HOUPT, K. A. Small animal behaviour and its aberrations. In: **International Veterinary Information Science**. Recent advances in companion animal behavior problems. 2004. Disponível em: <http://www.ivis.org/>. Acesso em: janeiro de 2009.

HUEZA, I. M.; BENASSI, J. C.; RASPANTINI, P. C. F.; RASPANTINI. L. E. R.; SÁ, L. R. M; GÓRNIAK, S. L.; Mitsue, H. Low doses of monocrotaline in rats cause diminished bone marrow cellularity and compromised nitric oxide production by peritoneal macrophages. **Journal of Immunotoxicology,** v. 6, n. 1, p. 11-18, 2009.

HUXTABLE, R. J. Herbal teas and toxins: novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States**. Perspectives in Biology and Medicine,** v. 24, p. 1-14, 1980.

INOUE, K.; ZORRILLA, E. P.; TABARIN, A.; VALDEZ,G. R.; IWASAKI, S.; KIRIIKE, N.; KOOB, G. F. Reduction of anxiety after restricted feeding in the rat: implication for eating disorders. **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 11, p. 1075-1081, 2004.

JANECKOVA, R. The role of leptin in human physiology and pathophysiology**.** **Physiological Research,** v. 50, n. 5, p. 443-459, 2001.

JOHNSON, G.; ROUSSEL, D.; DUMAS, J. F.; DOUAY, O.; MALTHIÈRY, Y.; SIMARD, G.; RITZ, P. Influence of intensity of food restriction on skeletal muscle mitochondrial energy metabolism in rats**. American Journal Physiol Endocrinol Metabolism**, v. 291, n. 3, p. 460-467, 2006.

JOLY, A. B. **Botânica: chaves de identificação das famílias de plantas vasculares que ocorrem no Brasil**. 4ª. ed. São Paulo: Nacional, 1977.

KASAHARA, Y.; KIYATAKE, K.; TATSUMI, K.; KAKUSAKA, I.; YAMAGATA, S.; KITADA, M.; KUKIYAMA, T. Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 124-129, 1997.

KEEN, C. L. Maternal factores affecting teratogenic response: a need for assessment. **Teratology,** v. 46, p. 15-21, 1992.

KHERA, K. S**.** Maternal toxicity- a possible factor in fetal malformations in mice. **Teratology**, v.29, n.3, p.411-416, 1984.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y.; Ghrelin is a growth-hormonereleasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, n.6762, p. 656-660, 1999.

KOLACZYNSKI, J. W.; CONSIDINE, R. V.; OHANNESIAN, J.; MARCO, C.; OPENTANOVA, I.; NYCE, M. R. Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans**. Diabetes,** v. 45, n.11, p. 1511-1515, 1996

LADICS, G. S.; CHAPIN, R. E.; HASTINGS, K. L.; HOLSAPPLE, M. P.; MAKRIS, S. L.; SHEETS, L. P.; WOOLHISER, M. R.; BURNS-NAAS, L. A. Developmental toxicology evaluations - Issues with including neurotoxicology and immunotoxicology assessments in reproductive toxicology studies. **Toxicological Sciences**, v. 88, n. 1, p. 24-29, 2005.

LEE, J.; DUAN, W.; LONG, J. M.; INGRAM, D. K.; MATTSON, M. P. Dietary restriction increase the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. **J Mol Neurosci**., v. 15, n. 2, p. 99-108, 2000.

LEHRMAN, S.; ROMANO, P.; FRISHMAN, W; RASHID, A.; DOBKIN, J.; REICHEL, J. Primary pulmonary hypertension and cor pulmonale. **Cardiology in Review,** v.10, n. 5, p. 265-278, 2002.

LEONHARD, S.; SHAHAB, M.; LUFT, H.; WUTTKE, W.; JARRY, H. Redction of the luteinzing hormone secretion induced by long-term feed restriction in male rats is associated with increased expression of GABA-synthesizing enzymes without alterations of GnRH gene expression. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, n. 8, p. 613-619, 1999.

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

LONSTEIN, J. S.; DE VRIES, G. J. Influence of gonadal hormones on the development of parental behavior in adult virgin prairie voles (Microtus ochrogaster). **Behavioural Brain Research,** v. 114, n. 1-2, p. 79-87, 2000.

LUZ, J.; GRIGGIO, M. A.; NATRELI, R. M.; AUMOND, M. D. Energy balance of rats subjected to continuos and intermittent food restriction**. Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 28, n. 9, p. 1019-1023, 1995.

MARX, J. Cellular warious at the battle of the bulge. **Science**, v. 299, n. 5608, p. 846-849, 2003.

MATTSON, M. P. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run**. Brain Research,** v. 886, n. 1-2, p. 47-53, 2000.

MATTSON, M. P.; DUAN, W.; GUO, Z. Meal size and frequency affect neural plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms**. Journal of Neurocienci,** v. 84, n. 31, p. 417-431, 2003.

MCCAY, C. M.; CROWELL, F.; MAYNARD, L. A. The effect of retarded growth uponthe length of life span and upon the ultimate body size. **Journal of Nutrition,** v. 10, p. 63-79, 1935.

MEDEIROS, R. M. T. **Toxicidade da monocrotalina: estudo em ratos, durante o período perinatal**. 1999. 102 f. Tese (Doutorado em ciências)- Faculadade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MOURET, J. R.; BOBILLIER, P. Diurnal rhythm of sleep in the rat: Augment of paradoxical sleep following alterations in the feeding schedule**. International Journal of Neuroscienci,** v. 2, p. 265-270, 1971.

MUKHOPADHYAY, S.; SHAH, M.; PATEL, L. K.; SEHGAL, P. B. Monocrotaline pyrrole-induced megalocytosis of lung and breast epithelial cells: Disruption of plasma membrane and Golgi dynamics and an enhanced unfolded protein response**. Toxicology Applied Pharmacology**, v. 211, p. 209-220, 2006.

NEGRO-VILLAR, A.; OJEDA, S. R.; MCCANN, S. M. Evidence for changes in sensitivity to testosterone negative feedback on gonadotropin release during sexual developmente in the male rat. **Endocrinology,** v. 93, p. 729-735, 1973.

NOVA, E.; SAMARTIN, S.; GOMEZ, S.; MORANDE, G.; MARCOS, A. The adaptive response of the immune system to the particular malnutrition of eating disorders. **European Journal of Clinical Nutrition,** v. 56, p. 34-7, 2002.

OLDS, J. Effects of hunger and male sex hormone on self-stimulation of the brain**. Journal of Comparative Physiology and Psychology,** v. 51, p. 320-324, 1958.

OUSEY, J. C.; FOWDEN, A. L.; WILSHER, S.; ALLEN, W. R. The effects of maternal health and body condition on the endocrine responses of neonatal foalts. **Equine Veterinary Journal,** v. 40, n.7, p. 673-679, 2008**.**

OVERTON, J. M.; WILLIAMS, T. D. Behavioral and physiologic responses to caloric restriction in mice. **Physiology & Behavior,** v. 81, p. 749-754, 2004.

PAN, L. C.; WILSON, D. W.; LAME, M. W.; JONES, A. D.; SEGALL, H. J. Cor Pulmonale is caused by monocrotaline and dihydromonocrotaline, but not by glutathione or cysteine conjugates of dihydropyrrolizine. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 118, p. 87-97, 1993.

PANTER, K. E.; JAMES, L. F. Natural plant toxicants in milk: a review**. Journal of Animal Science**, v. 68, n. 3, p. 892-904, 1990.

PARTRIDGE, L.; PLETCHER, S. D.; MAIR, W. Dietary restriction, mortality trajectories, risk and damage. **Mechanism Ageing**, v. 126, p. 35-41, 2005.

PIÚMA, L. A. **Canibalismo em fêmeas de camundongos *Swiss* expostas à irradiação ionizante durante a prenhez: alterações morfológicas associadas**. 2007. 97. Tese (Doutorado em Saúde Brasileira).-Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora. 2007.

REITER, L. D.; McPHAIL, R. C. Factors influencing motor activity measurements in neurotoxicology. In: MITCHEL, C. L. **Nervous system toxicology**. New York: Raven Press, 1982. p.45-65.

RIJKE, C. E.; HILLEBRAND, J. J. G.; VERHAGEN, L. A. W.; ROELING, T. A. P.; ADAN, R. A. H. Hypothalamic neuropeptide expression following chronic food restriction in sedentary and wheelrunning rats. **Journal of Molecular Endocrinology,** v. 35, p. 381-390, 2005.

ROCK, R.; KAPÁS, L.; THAISHI P.; FANG, J. KRUEGER, J. M. Food restriction after the diurnal distribution of sleep in rats**. Physiology and Behavior**, v. 67, p. 697-703, 1999.

ROGERS, J. M.; GRAY, L.E.; CARVER, B.D.; KAVLOCK, R.J. Developmental toxicity of dinocap in the mouse is not due to two isomers of the major active ingredients. **Journal of Molecular Endocrinology,** v. 30, n. 5, p.23-25, 2001.

ROGERS, J. M.; KAVLOCK, R. J. Developmental toxicology. In: Klaassen, C.D., editor. **Casarett and Doulls's toxicology: the basic science of poisons**. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill. 2001, p. 351-386.

SACHS, B. D. Sexual behavior of male rats after one to nine days without food. **J Comparative Psychological**, v. 60, p. 144-146, 1965.

SACHS, B. D.; MARSAN, E. Male rats prefer sex to food after 6 days of food deprivation. **Psychological Science,** v. 28, p. 47-49, 1972.

SANTOS, A. M. S.; FERRAZ, M. R.; TEIXEIRA, C. V.; SAMPAIO, M. J. B.; DA FONTE RAMOS, C. Effects of undernutrition on serum and testicular testosterone levels and sexual function in adult rats**. Hormone Metabolism,** v. 36, p. 27-33, 2004.

SANTOS-PINTO, F. N.; LUZ, J.; GRIGGIO, M. M. Energy expenditude of rats subjected to long-term food restriction. **International Journal of Food Scienci and Nutritional,** v. 52, p. 193-200, 2001.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D.G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661-671, 2000.

SHAH, M.; PATEL, K.; SEHGAL, P. B. Kidney damage induced by poisonous plants in cattle in Brazil. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 92, p.411-5, 2005.

SILVA, V.; RIUL, T. R.; GOLOVATTEI, M. A. R.; PAUMGARTTER, F. J. R. Ethanol embryofetotoxicity in malnourished rats. **Nutrition Reports Internacional**, v. 36, n. 04, p. 887-895, 1987.

SIROTKIN, A.V.; CHRENKOVÁ, M.; NITRAYOVÁ, S.; PATRAS, P.; DARLAK, K.

VALENZUELA, F.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Effects of chronic food restriction and treatments with leptin or ghrelin on different reproductive parameters of male rats. **Peptides**, v. 29, p. 895-903, 2008.

SMART, J. L.; SILVA, V. A.; MALHEIROS, L. R.; PAUMGARTEN, F. J. R.; MASSEY, R. F. Epidermal growth factor advances some aspects of development but retards others in both rats and hamsters. **Journal of Development Physiology**, v. 11, p. 153-158, 1989.

SMITH, E. R.; DAMASSA, D. A.; DAVIDSON, J. M. Feedback regulation and male puberty: Testosterone-luteinizing hormone relationships in the developing male rat. **Endocrinology, v.** 101, p. 173-180, 1989.

SODERSTEIN, P.; ENEROTH, P. Effects of exposure to pups on maternal behavior, sexual behavior and serum prolactin concentrations in male rat. **Journal of Endocrinology**, v. 102, p. 115-119, 1984.

SPINOSA, H. S.; SILVA, Y. M.; NICOLAU, A. A.; BERNARDI, M. M.; LUCISANO A. Possible anxiogenic effects of fenvalerate, a type II pyrethroid pesticide, in rats. **Physiology and Behavior,** v. 67, n. 4, p. 611-615, 1999.

TIMO-LARIA, C.; NEGRÃO, N.; SCHMIDEK, W. R.; ROCHA, T. L.; HOSHIRO, K. Phases and states of sleep in the rat**. Physiology and Behavior,** v. 5, p. 402-407, 1970.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. **Plantas tóxicas da Amazônia:** a bovinos e outros herbívoros**.** Manaus, 1979.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil.** Rio de Janeiro, Helianthus, 2000.

TSCHOP, M.; SMILEY, D. L.; HEIMAN, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v. 407, p. 908-913, 2000.

WEBER, E. M.; OLSSON, I. A. S. Maternal behavior in *Mus musculus* sp: An ethological review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, p. 1-22, 2008.

WEINDRUCH, R.; SOHAL, R. S. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging**. New England Journal of Medicine,** v. 337, p. 986-994, 1997.

WILSON, D. W.; SEGALL, H. J.; PAN, L. C.; LAME, M. W.; ESTEP, J. E.; MORIN, D. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, p. 307-325, 1992.

WILSON, J. C. Methods for administering agents and detecting malformation in experimental animal. In: WILSON, J.C.; WARKANY, J., ed. **Teratology:** principles and techniques. Chicago: University of Chicago Press, 1965. p. 262-327.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Maternal mortality**. Geneva, Switezerland: World Heath Organization, fact Sheet, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/making_pregnancy_safer/events/2008/mdg5/factsheet_maternal_mortality.pdf>. Acesso em: 2 set. 2009