UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

GABRIELA DE CASTRO KELLER

Possível efeito galactagogo e toxicidade da *Trigonella foenum-graecum* durante o período lactacional. Estudos em ratas

São Paulo
2015

GABRIELA DE CASTRO KELLER

**Possível efeito galactagogo e toxicidade da *Trigonella foenum-graecum*
durante o período lactacional. Estudo em ratas**

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

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Prof^a. Dr^a Silvana Lima Górnjak

São Paulo

2015

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.3117
FMVZ

Keller, Gabriela de Castro

Possível efeito galactagogo e toxicidade da *Trigonella foenum-graecum* durante o período lactacional. Estudos em ratas / Gabriela de Castro Keller. -- 2015.
95 f. :il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof ^a. Dr ^a. Silvana Lima Górnjak.

1. Fenogrego. 2. Galactagogo. 3. Comportamento. 4. Ratos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da toxicidade da *Trigonella foenum-graecum* em ratos lactentes", protocolado sob o nº 2696/2012, utilizando 100 (cem) ratos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Silvana Lima Górnjak, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research "Toxicity study of *Trigonella foenum-graecum* in infants rats", protocol number 2696/2012, utilizing 100 (one hundred) rats, under the responsibility Profa. Dra. Silvana Lima Górnjak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 16 de agosto de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: KELLER, Gabriela de Castro

Título: Possível efeito galactagogo e toxicidade da *Trigonella foenum-graecum* durante o período lactacional. Estudo em ratas

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a): _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a): _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a): _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais Lúcia Maria e Walter (Dadinho),
a meu marido Rafael (Rafa) e meu filho
Francisco (Tico) por todo o apoio e força. O amor
de vocês foi essencial para a concretização desta
etapa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me fazer acreditar que tudo dará certo.

Aos meus pais, por todo o amor, ensinamento e exemplo. Esta dissertação é de vocês também!

Ao meu marido Rafa pelo companheirismo, incentivo e paciência. Admiro seu positivismo e determinação. Ao meu filho Tico, seu sorriso acalma meu coração. Amo vocês!

Aos demais familiares por todo apoio. Em especial ao meu irmão Alexandre. Xan, obrigada por todas as dicas e ajudas. Te admiro!

Aos animais que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

A faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Patologia (VPT) por me fornecer os meios para a execução deste trabalho.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

A minha orientadora Prof. Dra. Silvana Lima Górnaiak pela oportunidade e apoio, principalmente na reta final.

Aos funcionários do laboratório: Herculano, Nicolle, e Vagner por toda a ajuda técnica e risadas.

Aos funcionários do CEPTOX de Pirassununga: Ester e PC.

Ao Edson do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP pelas análises hematológicas.

As meninas da secretaria: Adriana, Cristina e Milena por toda atenção e carinho.

Aos funcionários do biotério: Aline, Cláudia, Dona Idalina, Luciana, Mauro e Nelsinho pelo apoio nos experimentos e cuidado com os animais.

A turma do VPT: Adriana, Aline, André, Atílio, Carla, Daniel, Dyanne, Eduardo, Fernando Pipole, Fernando Ponce, Izabel, Júlia, Leonardo, Lilian, Luciana Cunha, Marianne Klein, Mariane Silva, Maysa, Patrícia, Rafael, Sayuri, Thiago Marinho, Wanderley pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Em especial Natalia, Paulinha e Thaisa por estarem sempre disponíveis para ajudar e ficarem ao meu lado até o último momento. Paulinha, obrigada por me orientar nas horas de maior cansaço, me puxar quando eu precisava e me dar força. Valeu meninas!

Muito obrigada a todos do VPT pela amizade e principalmente carinho e cuidado durante minha gravidez. Vocês fizeram tudo ficar mais leve e engraçado. Eu, Rafa e Tico seremos sempre gratos!

*“...Concedei-me uma fé íntegra,
Uma esperança firme,
Uma caridade perfeita,
Uma humildade profunda,
Um reto sentir e conhecer...”*

(Francisco de Assis)

*“Toda prece elevada
É manancial de magnetismo criador
E vivificante.
E toda criatura que cultiva a oração,
Com o devido equilíbrio do sentimento,
Transforma-se, gradativamente,
Em foco irradiante
De energias da Divindade”.*

(Francisco Candido Xavier)

RESUMO

KELLER, G. C. **Possível efeito galactagogo e toxicidade da *Trigonella foenum-graecum* durante o período lactacional. Estudos em ratas.** [Galactagogue possible effect and toxicity of *Trigonella foenum-graecum* during lactation. Study in rats]. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Diversas medidas são adotadas com o objetivo de restabelecer a produção de leite materno, entre elas estão os galactagogos, substâncias com propriedades estimulantes para a lactação materna. Muitas dessas substâncias são de origem vegetal, cujo uso é amplamente disseminado pela cultura popular. Uma das plantas comumente utilizada é a *Trigonella foenum-graecum*, popularmente conhecida como Fenogrego. Apesar de existirem relatos de casos onde o Fenogrego exerceu ação positiva sobre a lactação materna, não existem estudos sistemáticos que corroborem seu efeito galactagogo, e mais importantes, que determinem sua segurança no que diz respeito à toxicidade. Assim, a proposta deste estudo foi verificar, durante a lactação, o efeito galactagogo do fenogrego bem como os possíveis efeitos maternos e no desenvolvimento da prole de ratas. Para tanto, ratas Wistar foram tratadas, por gavagem. Nossos resultados mostram que nas doses utilizadas, não existe toxicidade aparente do fenogrego. No entanto, também não foi observado nenhum efeito positivo sobre a produção de leite ou sobre o desenvolvimento da prole.

Palavras-chave: Fenogrego. Galactagogo. Comportamento. Ratos

ABSTRACT

KELLER, G. C. **Galactagogue possible effect and toxicity of *Trigonella foenum-graecum* during lactation. Study in rats.** [Possível efeito galactagogo e toxicidade da *Trigonella foenum-graecum* durante o período lactacional. Estudo em ratas]. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

There are different methods used to restore the breast milk production, and one of them is the galactagogues, substances with maternal lactation stimulant properties. Many of these substances are of vegetable origin, whose use is widely disseminated through popular culture. One of the plants most commonly used is the *Trigonella foenum-graecum*, popularly known as fenugreek. There are different reports describing the positive effect of fenugreek on maternal lactation; however, there are no systematic studies that support its galactagogue effect. Thus, the purpose of this study was to verify, during lactation, the effect of galactagogue fenugreek and maternal effects and development of offspring rats.

To this end, female rats received by gavage different doses of fenugreek's dry seed extract. Our results demonstrate, in the used doses, there is no toxic effect. However, at the tested doses, the treatment also did not stimulate the maternal lactation.

Keywords: Fenugreek. Galactagogue. Behaviour. Rats

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ALP	Fosfatase alcalina
Anova	Análise de variância
cm	Centímetro
DPN	Dia pós nascimento
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Grama
GGT	Gama glutamil transferase
h	Hora
Kg	Kilograma
KHz	Hertz
min	Minuto
m	Metro
mg	Miligramas
mm	Milímetro
mL	Mililitro
WBC	Células brancas
RBC	Células vermelhas
HGB	Hemoglobina
HCT	Hemacrócito
PLT	Plaquetas

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Aparato para coleta de leite	31
Figura 2 - Teste do reflexo de geotaxia negativa	34
Figura 3 - Equipamento para o teste de vocalização ultrassônica	36
Figura 4 - Gravação do teste de campo aberto para filhotes.....	38
Figura 5 - Gráficos representativos dos parâmetros número de vocalizações (A), tempo total de vocalização (B), tempo médio de vocalização (C) e tempo médio de silêncio (D) dos filhotes machos e fêmeas.....	65
Figura 6 - Gráficos representativos dos parâmetros distância percorrida (A), velocidade média (B), permanência no centro (C) e transições entre zonas (D) dos filhotes machos e fêmeas.....	66
Figura 7 - Gráficos representativos dos parâmetros distância percorrida (A), velocidade média (B), permanência no centro (C) e transições entre zonas (D) dos filhotes machos e fêmeas.....	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Consumo de ração (em g) de ratas	45
Tabela 2 - Consumo médio de água (em mL) de ratas	46
Tabela 3 - Ganho de peso (em g) de ratas.....	47
Tabela 4 - Ganho de peso (em g) de ninhadas de ratas	47
Tabela 5 - Ganho de peso (em g) de filhotes machos e fêmeas	48
Tabela 6 - Volume de leite (em mL) coletado de ratas	49
Tabela 7 - Consumo médio de ração (em g) de ratas	50
Tabela 8 - Consumo médio de água (em mL) de ratas	50
Tabela 9 - Ganho de peso (em g) de ratas.....	51
Tabela 10 - Parâmetros hematológicos de ratas	52
Tabela 11 – Bioquímica sérica de ratas	53
Tabela 12 - Ganho de peso (em g) de ninhada de ratas	54
Tabela 13 - Ganho de peso (em g) de filhotes machos e fêmeas de ratas	56
Tabela 14 - Parâmetros hematológicos de filhotes machos de ratas	58
Tabela 15 - Parâmetros hematológicos de filhotes fêmeas.....	59
Tabela 16 – Bioquímica sérica de filhotes machos de ratas.....	60
Tabela 17 – Bioquímica sérica de filhotes fêmeas de ratas	61
Tabela 18 - Parâmetros de desenvolvimento físico de filhotes machos e fêmeas de ratas.....	63
Tabela 19 - Desenvolvimento reflexológico de filhotes machos e fêmeas de ratas ..	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	ALEITAMENTO MATERNO	16
1.2	GALACTAGOGOS	18
1.3	FENOGRGO.....	20
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL.....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	ANIMAIS	26
3.2	MATÉRIA VEGETAL.....	26
3.3	MEDICAMENTOS	27
3.4	PROCEDIMENTOS	27
3.4.1	Acasalamento e confirmação de prenhez	27
3.4.2	Avaliação e padronização da ninhada	28
3.4.3	Preparo e administração de <i>Trigonella. foenum-graecum</i> às mães.....	28
3.4.4	Avaliação do consumo de água e ração e ganho de peso das lactantes.....	29
3.4.5	Avaliação do ganho de peso individual e da ninhada	29
3.4.6	Coleta e quantificação do volume de leite.....	29
3.4.7	Avaliação do desenvolvimento físico	31
3.4.8	Avaliação do desenvolvimento reflexológico	32
3.4.9	Avaliação comportamental da prole	34
3.4.10	Vocalização ultrassônica	35
3.4.11	Atividade geral em campo aberto	36
3.4.12	Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos	38
3.4.13	Análise estatística	39
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	41

4.1	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE <i>TRIGONELLA FOENUM- GRAECUM</i> NAS RATAS LACTANTES. ESTUDO DE QUANTIFICAÇÃO DO VOLUME DA PRODUÇÃO DE LEITE	41
4.2	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE <i>TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM</i> A RATAS LACTANTES.....	42
4.3	EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE <i>TRIGONELLA FOENUM- GRAECUM</i> EM FÊMEAS LACTANTES. ESTUDO NOS FILHOTES.....	42
5	RESULTADOS	44
5.1	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE <i>TRIGONELLA FOENUM- GRAECUM</i> NAS RATAS DO 1º AO 19º DIA DE LACTAÇÃO. ESTUDO DE QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LEITE	45
5.2	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE <i>TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM</i> A RATAS LACTANTES ESTUDO 1 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE <i>TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM</i>	49
5.3	EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE <i>TRIGONELLA FOENUM- GRAECUM</i> EM FÊMEAS LACTANTES. ESTUDO NOS FILHOTES.....	54
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	82
	REFERENCIAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ALEITAMENTO MATERNO

A subnutrição durante a primeira infância aumenta o risco de contrair doenças e já foi responsável pela morte de milhões de crianças com menos de cinco anos de idade (BLACK et al., 2008; WHO, 2008). Dessa forma, fica claro que o aleitamento materno exclusivo torna-se de fundamental importância para garantir a nutrição, bem como o crescimento e a saúde da criança.

O aleitamento materno exclusivo é definido como a forma nutricional que consiste em somente leite da própria mãe ou de outra lactante, sem adição de nenhum outro líquido (nem mesmo água) ou qualquer sólido, com exceção de solução de hidratação, vitaminas, suplementos minerais e medicamentos, quando absolutamente necessário (WHO/UNICEF/USAID, 2008).

Segundo o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), o aleitamento materno exclusivo até o sexto mês de vida pode evitar 1,3 milhões de mortes de crianças menores de 5 anos por ano. No Brasil, 66% das mortes de crianças com idade inferior a um ano ocorrem no período neonatal (até o 28º dia de vida) e 49% na primeira semana de vida (UNICEF, 2007), corroborando a importância do aleitamento materno.

Além da diminuição da mortalidade infantil, o leite materno reduz o risco de doenças no trato gastrointestinal e respiratório (BACHRACH; SCHWARZ; BACHRACH, 2003; TOMA; REA, 2008; BINNS; LEE, 2014). Estudos já demonstraram que o aleitamento materno pode diminuir infecções agudas como por *Campylobacter enterite* (RUIZ-PALACIOS et al., 1990), bem como atuar na redução de doenças autoimunes (MAYER et al., 1988). Ressalta-se ainda que crianças amamentadas têm menor risco de desenvolver enterecolite necrótica, otites, infecções respiratórias, *diabetes mellitus* e alergias (PULLAN et al., 1980; BORCH-JOHNSEN et al., 1984; MAYER et al., 1988; OKAMOTO; OGRA, 1989; HOWIE et al., 1990; RUIZ-PALACIOS et al., 1990; AVENDANO et al., 1993; DEWEY; HEINIG; NOMMSEN-RIVERS, 1995; RIORDAN, 1997).

Em relação à composição nutricional, o leite contém proteínas, gordura e lactose como os principais macronutrientes e as vitaminas A, B1, B2, B6, B12, D e

iodina constituindo os principais micronutrientes. Além disso, apresenta uma série de componentes bioativos como células, imunoglobulinas, citocinas, quimiocinas, inibidores de citocinas e diversos hormônios (BALLARD; MORROW, 2013), compostos essenciais para o crescimento, desenvolvimento e proteção do recém-nascido (LEUNG; SAUVE, 2005). As mães também se beneficiam ao amamentar seus filhos. Estudos demonstram que a amamentação exclusiva está relacionada com a redução do risco de câncer de ovário (TUNG et al., 2003), proteção contra câncer de mama (BERNIER et al., 2000), facilidade em retornar ao peso pré-gestacional (DEWEY; HEINIG; NOMMSEN, 1993) bem como aumento dos intervalos intergestacionais (KENNEDY; VISNESS, 1992).

Além dos benefícios fisiológicos, a amamentação contribui para o estabelecimento do vínculo mãe-bebê, essencial tanto para a redução dos índices de rejeição e abandono quanto, para a formação dos laços afetivos e pela saúde mental (TERUYA; COUTINHO, 2006). Um estudo realizado com mães e seus respectivos filhos avaliou a relação entre a duração do aleitamento e fatores psicossociais, tal como a qualidade da relação entre pais e filhos, delinquência juvenil, abuso de drogas e a saúde mental. Para isso, foram coletadas informações referentes à prática do aleitamento materno em dois momentos distintos, o primeiro entre o nascimento e o primeiro ano de vida e o segundo quando esses indivíduos já se encontravam com idade entre 15 e 18 anos, período considerado crítico para o surgimento de diferentes questões da esfera psicológica. Assim, os resultados mostraram que as crianças que foram amamentadas por mais tempo apresentaram na adolescência, maior vínculo familiar e as mães, uma maior tendência de serem mais carinhosas e menos superprotetoras (FERGUSON; WOODWARD, 1999).

Apesar das evidências dos diversos benefícios do aleitamento materno e de seu incentivo pelas instituições médicas e de saúde em todo o mundo, muitos fatores contribuem para a diminuição da produção de leite pela mãe e consequentemente o desmame precoce dos filhos. Entre estes fatores estão a falta de conhecimento materno sobre a prática da amamentação que muitas vezes leva a crença de que o leite materno é fraco ou é insuficiente para a nutrição adequada do bebê (MCLEOD; PULLON; COOKSON, 2002)

Por outro lado, mães conscientes dos inúmeros benefícios da amamentação mas que apresentam dificuldades para produzir leite suficiente, recorrem a alternativas medicinais, como por exemplo, o uso de galactagogos, que definimos

como meio ou substâncias com capacidade de estimular a lactação. Desta forma, estes compostos tornaram-se um importante aliado na produção de leite materno, largamente utilizados em todo o mundo, seja através de recomendação médica ou pela cultura popular.

1.2 GALACTAGOGOS

Os galactagogos ou galactogogos podem ser compostos sintéticos, isolados na forma de medicamentos, alimentos ou suplementos a base de plantas. Entre os medicamentos mais comumente prescritos para esta finalidade estão a metoclopramida e a domperidona (BETZOLD, 2004). Estas substâncias agem como antagonistas dopaminérgicos, inibindo a dopamina sobre a secreção de prolactina, ocasionando aumento dos níveis séricos deste hormônio e consequentemente aumentando a produção láctea (CHAVES; LAMOUNIER; CÉSAR, 2007; CHAVES, et al., 2008).

Com relação ao efeito galactagogo da metoclopramida, a maioria dos estudos apresentam resultados positivos (ZUPPA et al., 2010); no entanto, deve-se ponderar que dentre os encontrados na literatura, apenas quatro possuem metodologia adequada (CHAVES et al., 2008); porém, ainda assim, não podem ser totalmente confiáveis, já que na metodologia, detecta-se problemas com o número de amostras e a seleção dos indivíduos para fazer parte na pesquisa (ABM, 2011). Já em relação à domperidona, as revisões bibliográficas descrevem que existe apenas um estudo com metodologia adequada que evidencia aumento na produção de leite (BETZOLD, 2004; ZUPPA et al., 2010), porém alguns autores divergem sobre a efetividade dos resultados obtidos (CHAVES et al., 2008).

Embora haja o efeito galactogênico produzido pela metoclopramida, é importante apontar que alguns estudos nos quais foi empregada esta substância em mulheres lactantes, mostram efeitos adversos maternos, tais como depressão (CHAVES et al., 2008), ansiedade, distúrbio intestinal, nervosismo, fadiga, sonolência e efeitos extrapiramidais (GABAY, 2002; BETZOLD, 2004; ZUPPA et al., 2010). A domperidona apresenta menor lipossolubilidade e peso molecular o que faz

com que menor quantidade do fármaco ultrapasse a barreira hematoencefálica diminuindo assim, seus efeitos extrapiramidais e a tornando-a mais segura que a metoclopramida (GABAY, 2002; BETZOLD, 2004; ZUPPA et al., 2010). Além disso, a quantidade que passa para o leite materno é menor para a domperidona do que na metoclopramida, devido sua maior afinidade com as proteínas plasmáticas (ZUPPA et al., 2010).

Atualmente, tem-se observado aumento significativo do uso de medicamentos ditos “alternativos”, ou seja substâncias usadas para o tratamento de diversas doenças que não são medicamentos convencionais, como, por exemplo, compostos a base de ervas. O baixo custo em relação aos medicamento sintéticos, a facilidade de aquisição e, principalmente, a cultura popular em considerá-los como “medicamentos naturais” que pela crença não promovem efeitos indesejados, são as principais razões para seu uso pela população. Para se ter uma ideia da importância do uso dessas terapias alternativas, a Associação Brasileira de Indústrias de Fitoterápicos (ABIFITO) estima que o crescimento no uso desses produtos é de cerca de 15% ao ano.

Dentro desse contexto, a utilização de plantas e fitoterápicos como medida alternativa para estimular a produção de leite também vem ganhando destaque. O acesso globalizado a informação sobre o uso tradicional de plantas e extratos em diferentes culturas ao redor do mundo e o apoio e pesquisas feitas pelos profissionais da área da saúde, vêm promovendo o crescente aumento de seu emprego. Por exemplo, mesmo em países desenvolvidos, como nos Estados Unidos, já foi verificado que cerca de 15% das mulheres utilizam plantas para promover o aumento da lactação, prática estimulada principalmente pelas parteiras (ABASCAL; YARNELL, 2008; DENNHY et al., 2010).

Um estudo realizado na Austrália, com mulheres lactantes, aponta dados preocupantes em relação à utilização de substâncias vegetais. Apesar da maioria dessas mulheres (70, 1%) relatar que há ausência de informações sobre o uso de plantas medicinais durante o período lactacional, cerca de 43,4% consideram as plantas mais seguras que os medicamentos convencionais e apenas 28,6% delas comunicam os médicos quanto ao uso de plantas durante a lactação (SIM et al., 2013).

Dentre as diversas plantas que vêm sendo amplamente utilizadas como estimulantes da lactação, destaca-se o fenogrego (ZAPANTIS; STEINBERG;

SCHILIT, 2012). Para se ter ideia de sua importância, no que se refere ao uso popular, acredita-se que seja, atualmente, o extrato vegetal mais amplamente empregado como galactagogo (TURKYILMAZ et al., 2011). Um estudo realizado em centros médicos norte-americanos, para avaliar as práticas populares mais disseminadas nas comunidades de aleitamento materno, apontou que o fenogrego é a planta com maior índice de recomendações para a promoção da lactação (SCHAFFIR; CZAPLA, 2012), evidenciando a importância do estudo desta planta.

1.3 FENOGRIGO

A *Trigonella foenum-graecum*, popularmente conhecida por fenogrego, pertence à família da *Fabacea* e é distribuída geograficamente na região do Mediterrâneo, principalmente em países como China, Índia e Indonésia. O fenogrego é uma planta anual, ereta que pode atingir a altura de 0,3 a 0,8 m, as flores são amarelas e na maturidade dão origem às vagens que contêm sementes marrons, utilizadas com finalidade terapêutica, enquanto as folhas verdes são usadas como aditivo em preparações alimentícias (YADAV; BAQUER, 2014).

A semente é rica em mucilagem polissacarídeo (que consiste principalmente em galactomananos). Em menor quantidade contém óleo essencial e uma variedade de metabólitos secundários que incluem protoalcaloides, trigonelina, colina, saponinas, flavonóides e diosgenina (SUMAYYA; AMATULLAH, 2012). O fenogrego apresenta várias propriedades farmacológicas, sendo as mais importantes os efeitos hipoglicemiantes (KHOSLA; GUPTA; NAGPAL, 1995), antioxidante (DIXIT et al., 2005), gastroprotetor (SUJA PANDIAN; ANURADHA; VISWANATHAN, 2002), hepatoprotetor e hipocolesterolêmico (SRINIVASAN, 2006) e galactagoga (ZAPANTIS; STEINBERG; SCHILIT, 2012).

O mecanismo galactogênico do fenogrego ainda não está claro. Alguns trabalhos sugerem que como o fenogrego estimula a sudorese, e a mama é uma glândula sudorípara modificada, seu efeito sobre a produção de leite materno seja decorrente do aumento na produção de suor (GABAY, 2002; TURKYILMAZ et al., 2011). Além disso, o fenogrego contém em sua composição a diosgenina, um

composto fitoestrogênico capaz de induzir o crescimento do tecido mamário em camundongas ovariectomizadas (BASCH et al., 2003), sugerindo um possível mecanismo endócrino.

O uso do fenogrego durante a lactação é bastante diversificado, dependendo do país, provavelmente pela cultura local, e da forma como é empregado. Da mesma forma, devido às diferentes abordagens, muitos dos trabalhos sobre o efeito galactogogo do fenogrego ou são inconclusivos ou contraditórios. Por exemplo, foi mostrado, na Indonésia, que mulheres lactantes que receberam cápsulas contendo 600 mg de fenogrego, três vezes ao dia, aumentaram o volume do leite em até 20%; porém, sem diferença significativa quando comparadas ao grupo de referência (DAMANIK; WAHLQVIST; WATTANAPENPAIBOON, 2006). Outro estudo, realizado na Turquia, com 66 mulheres, divididas em três grupos iguais, um controle, no qual não recebiam tratamento algum; outro grupo placebo, no qual as mulheres recebiam chá de maçã e um terceiro grupo de mulheres que recebiam pó de fenogrego, associado a outras substâncias, não indicadas. Os resultados mostraram que aquelas mulheres que receberam o chá contendo fenogrego apresentaram um aumento na produção láctea de quase o dobro que aquelas mulheres tratadas com placebo ou que não receberam nenhum tratamento. No entanto, como o chá contendo fenogrego continha outras substâncias, não identificadas, não foi possível atribuir o efeito galactogênico somente ao fenogrego. Além disso, o próprio autor considera que o número de participantes do estudo foi pequeno e que mais estudos são necessários para avaliar os mecanismos de ação da planta, bem como de seu efeito galactagogo (TURKYILMAZ et al., 2011).

Um hospital no Canadá, que vem empregando o fenogrego há pelo menos seis anos, foi observado que das 1200 mulheres que fizeram uso da planta, todas relataram aumento na produção de leite entre 24 e 72 horas após o início do tratamento (HUGGINS, [2003?]). Outro relato, dos Estados Unidos do uso do fenogrego em um caso de indução de lactação de mãe adotiva de gêmeos. O processo de indução teve início vinte semanas antes do nascimento das crianças e o fenogrego foi administrado em associação a outros galactagogos (SZUCS; AXLINE; ROSENMAN, 2010), sendo que os autores relataram haver melhora na produção láctea desta mãe.

Com relação a estudos experimentais, a administração do fenogrego, como suplemento alimentar na ração, em diferentes espécies animais de criação, mostrou

que a planta é capaz de aumentar a produção de leite em cabras e búfalos (MOHAMED; EI-SAIDY, 2004; ABO EL-NOR et al., 2007).

O uso do fenogrego como suplemento alimentar em pequenas quantidades é considerado seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos (GABAY, 2002). No entanto, a indicação de segurança de uso por gestantes e lactantes não é consenso, uma vez que existem relatos de propriedades tóxicas que resultam em diarreia e reações alérgicas. Salienta-se que o uso por lactentes diabéticas não é recomendado (FORINASH et al., 2012), e também é importante comentar que o uso durante a gestação é contra indicado, pois exibe atividade uterotônica (BASCH et al., 2003). O fenogrego ainda pode potencializar o efeito de medicamentos anti-hipertensivos e para controle do diabetes e aumentar, assim, o risco de hemorragia em mulheres que fazem uso de aspirina e warfarina (TIRAN, 2003).

Pelo exposto, fica evidente que embora o fenogrego seja a planta mais amplamente utilizada para promover a produção de leite, sendo perpetuado principalmente pela indicação e uso tradicional, com esta finalidade galactogoga, por diversas populações, não existem estudos adequadamente controlados, que permitam concluir sobre esse atribuído efeito. Além disto, até o momento, não há, na literatura, um estudo, de campo ou experimental, dedicado à avaliação da toxicidade da *Trigonella foenum-graecum* nos lactentes ou em mulheres, ou fêmeas de outras espécies animais, durante o período da lactação. Assim, o presente projeto foi realizado, procurando contribuir na elucidação de ambas questões.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se a *Trigonella foenum-graecum* apresenta efeito galactagogo, bem como, possíveis efeitos maternos e no desenvolvimento da prole durante o período de lactação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar:

- Se a administração de fenogrego causa aumento no volume de leite em ratas, durante a lactação (DPN1 a DPN19);
- A toxicidade sistêmica, o ganho de peso, bem como no consumo de água e ração das ratas expostas ao fenogrego durante a lactação (DPN1 a DPN21);
- A vocalização da prole de ratas expostas ao fenogrego durante a lactação (DPN1 a DPN21);
- O desenvolvimento ponderal, físico e reflexológico da prole de ratas expostas ao fenogrego durante a lactação (DPN1 a DPN21);
- A atividade motora no campo aberto da prole durante a infância, bem como na idade adulta, de ratas expostas ao fenogrego durante a lactação (DPN1 a DPN21).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos e fêmeas, sexualmente maduros, com idade aproximada de 80 dias, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária. No início dos experimentos as fêmeas pesavam aproximadamente 200g e os machos 250g. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno medindo 34x41x17cm e mantidos durante todo o experimento em salas com temperatura de $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa entre 45 - 65% e com ciclo de doze horas de claro e escuro, sendo a luz acesa às 6:00 horas. Durante todo período experimental foram fornecidos ad libitum ração específica para roedores e água filtrada.

Os ratos foram utilizados de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório, aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo nº 2696/2012).

3.2 MATÉRIA VEGETAL

A semente em pó da *Trigonella foenum-graecum* (fenogrego) foi adquirida do distribuidor de insumos farmacêuticos Florian - Grupo Flores e Ervas, corresponde ao lote de origem: 010 e lote interno: 040099.

O produto foi analisado pelo fornecedor de acordo com a Farmacopéia Brasileira 4ª edição e apresenta as seguintes características:

- Aspecto macro e microscópico: pó de aspecto homogêneo;
- Características organolépticas: coloração amarela; odor e sabor característico;

- Características físico-químicas: pó fino com ausência de elementos estranhos; umidade 7,9%; cinzas insolúveis 3,1574%; metais pesados 0,3142% e densidade 0,495g/ml sem compactação;
- Teste de identificação positivo para saponinas e alcaloides.

3.3 MEDICAMENTOS

Para a realização deste estudo foram utilizados os seguintes medicamentos: (1) domperidona (Motilium® Janssen Farmacêutica), empregado como “controle positivo” na quantificação da produção de leite; (2) ocitocina (Ocitocina® Vetnil) para estimular a ejeção do leite durante a coleta; (3) xilazina (Xilazina® Syntec) para promover a analgesia das lactantes no momento da coleta de leite; e a associação de (4) xilazina (Xilazina® Syntec) e cetamina (Dopalen® Ceva) para promover a analgesia e sedação para realizar a coleta de sangue e, também, posteriormente, para realizar eutanásia.

3.4 PROCEDIMENTOS

3.4.1 Acasalamento e confirmação de prenhez

As fêmeas foram colocadas com os machos para o acasalamento no período noturno (a partir das 18:00 horas). Na manhã seguinte (8:00 horas) os machos foram retirados, coletando-se, a seguir, os lavados vaginais. A confirmação de prenhez foi determinada por meio da observação microscópica do esfregaço vaginal (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002) e constatação da presença de espermatozóide, que foi o indicador do dia 0 de gestação (DG0). As ratas prenhes

foram, então, acondicionadas individualmente em gaiolas moradias, onde permaneceram durante todo o período experimental.

3.4.2 Avaliação e padronização da ninhada

Com o objetivo de diminuir o estresse materno no dia pós-natal (DPN) zero, os animais não foram manuseados, anotando-se apenas o dia de nascimento de cada ninhada. Da mesma maneira, objetivando-se abrandar qualquer estresse materno, os filhotes foram manuseados com delicadeza, sempre com luvas e passando-as na maravalha da gaiola antes de tocá-los, evitando-se, assim, que houvesse rejeição materna aos filhotes devido a odores diferentes.

No dia seguinte ao nascimento (DPN1) procedeu-se a inspeção nos filhotes para detectar a presença de natimortos e malformações externas. A seguir, procedeu-se à padronização da ninhada. Para tal, realizou-se a sexagem da prole empregando-se o método de distância anogenital que, identifica o macho como tendo a maior distância e a fêmea a menor distância. As ninhadas foram padronizadas mantendo-se, sempre que possível, seis (Experimento 1) ou oito (Experimento 2) filhotes por ninhada, em proporções iguais de sexos. Os demais animais foram submetidos à eutanásia em câmara de gás carbônico (CO₂).

3.4.3 Preparo e administração de *T. foenum-graecum* às mães

A semente em pó da planta foi diluída em água filtrada e administrada às mães, nas diferentes doses, por via oral através de gavagem.

3.4.4 Avaliação do consumo de água e ração e ganho de peso das lactantes

A partir do DPN1, e a cada três dias até o final do experimento, a ração das lactantes foi pesada (peso inicial) em balança semi-analítica e após três dias nova pesagem foi realizada (peso final); a diferença entre o peso inicial e o final correspondeu a quantidade de ração consumida no período.

O consumo de água foi realizado por meio de pesagem do bebedouro. Assim, considerando-se que a densidade da água é 1g/ml, foi aplicada a fórmula $d=m/v$ para a conversão do peso obtido em gramas para volume em mililitros.

O peso das lactantes foi mensurado a cada três dias e a partir destes valores foi calculado o ganho de peso materno. Apenas no Experimento 1, a última pesagem foi realizada com um intervalo de quatro dias ao invés de três dias.

3.4.5 Avaliação do ganho de peso individual e da ninhada

No dia de padronização da ninhada DPN1, um filhote macho e uma fêmea de cada ninhada foram escolhidos ao acaso e identificados na pata traseira esquerda com tinta nanquim. Estes animais foram pesados, separadamente, a cada três dias, durante o período de tratamento, exceto naqueles animais do Experimento 1, nos quais realizou-se a última pesagem com um intervalo de quatro dias. Além do peso individual procedeu-se a pesagem da ninhada, na mesma frequência estabelecida na pesagem individual dos filhotes, sendo os dados analisados tomando-se a ninhada como unidade.

3.4.6 Coleta e quantificação do volume de leite

A quantificação da produção de leite de ratas baseou-se nas técnicas propostas por Souza (2004), com modificações, como descritas a seguir: nos dias de

coleta de leite as lactantes foram pesadas e separadas de suas ninhadas. Decorridas 3h40min do início da separação as lactantes receberam, por via intraperitoneal, 3 UI de ocitocina e após 10 min 15,0 mg/Kg de xilazina pela mesma via e decorridos 10 min desta última administração iniciou-se a coleta do leite.

Para ordenhar o leite, empregou-se um aparato (Figura 1) desenvolvido no Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), conforme ilustrado na figura 1. Brevemente, as fêmeas possuem seis pares de glândulas mamárias, três localizados na região torácica, um na região abdominal e dois na região inguinal. A coleta foi realizada por um período de quinze minutos, sempre iniciando pelos tetos da região torácica, abdominal e por último da região inguinal. O tempo de permanência em cada teto foi determinado pela saída ou não de leite, ou seja, o teto foi trocado apenas quando se verificava não haver mais leite. Para a coleta, posiciona-se o teto da rata na extremidade superior que possui formato cônico (A), na lateral do aparato (B) conectou-se a mangueira que estava acoplada à bomba de vácuo, permitindo, assim, a simulação do movimento de sucção nos tetos do animal. Na extremidade inferior (C) do dispositivo foi conectado o frasco para a coleta do leite.

A intensidade da sucção foi determinada manualmente com auxílio de uma mangueira de borracha para garantir o bem estar dos animais durante o processo de coleta.

As amostras de leite foram coletadas em tubos plásticos previamente identificados e pesados. A diferença de peso dos tubos plásticos antes e após a coleta correspondeu a quantidade de leite produzida.

Figura 1 - Aparato para coleta de leite

Fonte: (KELLER, 2014)

Legenda: Aparelho empregado para a ordenha das ratas. A: extremidade superior onde acopla-se o teto do animal; B: lateral para conectar a mangueira ligada a bomba de vácuo; C: extremidade inferior.

3.4.7 Avaliação do desenvolvimento físico

No DPN1, um filhote macho e uma fêmea foram tatuados na pata dianteira esquerda com tinta nanquim. Estes animais foram utilizados para o estudo do desenvolvimento físico, que é realizado através da observação direta de cada filhote a partir do dia 1 após o nascimento (DPN1) (ZBINDEN, 1981; HEYSER, 2003). Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- **Tamanho dos filhotes:** os filhotes foram medidos, com o auxílio de um paquímetro no DPN1, DPN10 e DPN21.
- **Erupção dos dentes incisivos:** observado pela abertura da boca dos filhotes e registrado o dia do aparecimento do esmalte dos dentes superiores e inferiores. Este parâmetro foi observado entre os DPN6 a DPN12.
- **Abertura dos olhos:** observada a abertura da primeira fresta do olho esquerdo e direito entre os DPN7 e DPN17.
- **Andar adulto:** os filhotes foram colocados sobre uma superfície plana e observou-se o dia em que estes se apoiaram sobre as quatro patas sem encostar o ventre na superfície plana. Este parâmetro foi observado entre os DPN12 e DPN21.
- **Descida dos testículos:** observado o dia em que os dois testículos desceram para o escroto. Este parâmetro foi avaliado entre os DPN18 e DPN30.
- **Abertura vaginal:** observada a ocorrência da abertura da fresta vaginal a partir do DPN30.

3.4.8 Avaliação do desenvolvimento reflexológico

O estudo de desenvolvimento reflexológico foi realizado com os mesmos filhotes, machos e fêmeas, submetidos à avaliação do desenvolvimento físico, sendo anotado o dia exato do surgimento de cada parâmetro avaliado (ZBINDEN, 1981; HEYSER, 2003). Os filhotes foram observados diariamente, até que 100% dos filhotes marcados de cada ninhada apresentassem os seguintes reflexos e comportamentos:

- **Reflexo de preensão palmar:** o filhote foi contido em uma das mãos do pesquisador e toca-se o coxim plantar de um dos membros torácico superior do filhote com a ponta de um clipe. O critério para a ocorrência do reflexo é caracterizado pela contração dos dedos da pata ao contato físico

com o clipe, este é o único reflexo que desaparece ao longo do tempo. Este parâmetro foi realizado a partir do DPN1.

- **Reflexo de endireitamento postural:** os filhotes foram colocados em decúbito dorsal, sendo medida a ocorrência ou não da resposta de virar o corpo para a posição de decúbito ventral apoiando-se sobre os quatro membros. O período de latência máximo para este teste é de 60 segundos. Este parâmetro foi observado entre os DPN1 e DPN10.
- **Reflexo de geotaxia negativa:** o filhote foi colocado sobre uma plataforma com aproximadamente 45° de inclinação, com a cabeça direcionada para baixo. Observou-se, então a latência (não superior a 60 segundos), para o animal girar à posição com a cabeça para cima (Figura 2). Este parâmetro foi observado entre os DPN3 e DPN15.
- **Reflexo de sobressalto:** o filhote foi exposto a um estalido curto e seco (estalar dos dedos) a uma distância de 25 a 30 cm acima do filhote. Quando o animal apresentou um tremor generalizado logo após o ruído, indica que o conduto auditivo está aberto. Este parâmetro foi observado entre os DPN11 e DPN21.
- **Reflexo de segurar na barra:** o filhote foi erguido pelo tronco e agarrou com as patas dianteiras em uma barra de metal de diâmetro entre 4 mm e 7 mm. Após agarrar na barra o filhote foi solto e observou-se por um período máximo de 10 segundos o tempo que este se segurou na barra. Este parâmetro foi avaliado entre os dias DPN10 e DPN21.
- **Reflexo de endireitamento no ar:** os filhotes foram segurados de cabeça para baixo a uma altura de 60 cm e soltos sobre uma superfície acolchoada para avaliação do aparecimento do reflexo de endireitar-se durante a queda. Este parâmetro foi observado entre os dias DPN16 e DPN21.

Figura 2 - Teste do reflexo de geotaxia negativa

Fonte: (KELLER, 2014)

Legenda: Aparelho empregado para realizar o teste do reflexo de geotaxia negativa. A: plataforma utilizada para a avaliação do reflexo de geotaxia negativa. B: filhote com a cabeça posicionada para baixo. C, D e E: filhote executando a rotação. F: filhote com a cabeça posicionada para cima.

3.4.9 Avaliação comportamental da prole

A avaliação comportamental da prole foi realizada por meio dos testes de vocalização e de campo aberto. Para isto, foram utilizados um filhote macho e uma fêmea tatuados com nanquim na pata dianteira direita no DPN1.

Todos os experimentos comportamentais foram realizados em salas de comportamento, situadas nas dependências do Biotério do Departamento de

Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), sempre durante o período da manhã (8:00 – 12:00horas), procurando-se, assim, minimizar possíveis interferências de alterações no ritmo circadiano. Antes de cada experimento e entre cada sessão, os aparatos foram limpos com uma solução a 5% de álcool em água. Procedimento este adotado com o objetivo de eliminar pistas olfativas do animal anterior, e assim, evitar possíveis interferências no comportamento dos animais avaliados.

3.4.10 Vocalização ultrassônica

Os roedores emitem vocalizações como uma ferramenta de comunicação para representar as condições emocionais e ambientais em que o animal se encontra (TAKAHASHI; KASHINO; HIRONAKA, 2010). Os filhotes, quando isolados de suas mães, emitem vocalizações (frequência de 30-50 KHz) que são indicativas de solicitação materna (INSEL; HILL; MAYOR, 1986; ISE et al., 2008).

Para tal, os filhotes foram avaliados com 11 dias de vida, momento em que começam a responder a estímulos sociais como a separação materna (BRUNELLI; HOFER, 1996), foram submetidos aos testes de vocalização.

O experimento ocorreu em uma sala com isolamento acústico com o auxílio de um microfone ultrassônico (modelo D940 Pettersson Elektronik AB®, Uppsala, Suécia) ajustado para a escala de frequência 40 kHz, posicionado acima do animal em uma distância de 10cm (Figura 3). As vocalizações foram gravadas por cinco minutos como arquivos de som do tipo.wav (Notebook HP Pavilion dv5 PC, Palo Alto, CA, EUA) com o auxílio do software Ultravox durante o período da manhã (8:00 – 12:00h). Os parâmetros avaliados foram: o número de vocalizações; o tempo total, médio, máximo e mínimo de vocalizações; e o tempo total, médio, máximo e mínimo de silêncio, correspondente a frequência estabelecida.

Figura 3 - Equipamento para o teste de vocalização ultrassônica

Fonte: (KELLER, 2014)

Legenda: A: software Ultravox; B: canais de frequência; C: microfone; D: caixa de acondicionamento do filhote em estudo

3.4.11 Atividade geral em campo aberto

O teste de campo aberto permite avaliar a atividade locomotora, ansiedade e atividade exploratória (HALL, 1936; LISTER, 1990; PRUT; BELZUNG, 2003; FRUSSA-FILHO, 2010).

O campo aberto é um teste frequentemente utilizado nas pesquisas comportamentais, entre os principais motivos estão a facilidade e rapidez em sua execução. Brevemente, o aparato consiste em uma arena circular, com dimensões variáveis, onde os animais são alocados no centro podendo se deslocar livremente e a avaliação é realizada pela observação do comportamento do animal.

As sessões foram realizadas em dois momentos. Na infância, nos DPN15, 18 e 21 foram realizadas sessões de 3 min em uma arena circular (60 cm de diâmetro x

20 cm de altura) e na idade adulta, no DPN75 a prole adulta foi avaliada por um período de 5 min em uma arena circular (100 cm de diâmetro x 20 cm de altura).

Na sala de experimentação (com tamanho de 2 m x 2 m) cada sessão, foi gravada com o auxílio de uma câmera filmadora localizada acima do aparato conforme ilustra a figura 4.

Após a gravação, os vídeos foram analisados através do software Ethovision® versão XT-7 (Noldus Information Technology®, Leesburg, VA, USA). O programa subdivide virtualmente a arena em estudo em duas zonas: central e periférica e realiza uma análise de movimento e reconhecimento comportamental.

Foram analisados parâmetros relacionados com a atividade locomotora, exploratória e de ansiedade. A atividade locomotora foi avaliada por meio da distância total percorrida e velocidade de locomoção no aparato ao longo da sessão. E os parâmetros de ansiedade foram avaliados através da análise do tempo de permanência do animal nas zonas central e periférica e pelo número total de entradas nestas zonas.

Figura 4 - Gravação do teste de campo aberto para filhotes

Fonte: (KELLER, 2014)

Legenda: A: câmera filmadora; B: campo aberto utilizado para o teste em filhotes; C: monitor para visualização do teste

3.4.12 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (5 e 50 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular), coletando-se, a seguir, por punção intracardíaca, o sangue, para a realização do hemograma e da dosagem bioquímica.

Para a avaliação do hemograma, utilizou-se anticoagulante EDTA. O hemograma foi realizado em um sistema automatizado ABX VET®, HORIBA,

avaliando-se os seguintes parâmetros: células brancas (WBC), células vermelhas (RBC), hemoglobina (HGB), hemacrócito (HCT), plaquetas (PLT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC).

Para a análise bioquímica, coletou-se amostras de sangue, sem anticoagulante, que foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos para retração do coágulo e, em seguida, estas foram submetidas à centrifugação (4000 rpm, 10 min) para a coleta do soro, o qual foi acondicionado em tubos plásticos de 2 mL e imediatamente estocados a uma temperatura de -80°C até o momento da realização das diferentes determinações bioquímicas.

As avaliações dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamil transferase (GGT), glicose, proteína total, albumina, globulina, colesterol total, triglicérides, ureia e creatinina foram realizadas por meio da utilização de Kit comercial da Laborlab em equipamento da CELM[®] – SBA 200, o qual tem como princípio o teste UV otimizado de acordo com a Federação Internacional de Química Clínica (IFCC). A metodologia empregada para determinação dos níveis das substâncias citadas anteriormente estão de acordo com as especificações recomendadas pelo fabricante.

3.4.13 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi empregado o programa GraphPad Prism 6,01[®] (GraphPad software Inc., San Diego, Ca, USA). Logo, foram utilizados testes de variância (Anova) simples ou bifatorial, seguido de pós-teste de Tukey, dependendo do experimento analisado. Sendo considerada diferença de variância com $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, e respectivos limites mínimo e máximo.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram delineados conforme a seguinte descrição:

4.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE *TRIGONELLA FOENUM-GRÆCUM* NAS RATAS LACTANTES. ESTUDO DE QUANTIFICAÇÃO DO VOLUME DA PRODUÇÃO DE LEITE

Foram empregadas 38 ratas que após terem sido acasaladas e diagnosticadas como prenhez conforme descrito no item 3.4.1, foram alocadas separadamente nas gaiolas durante todo o período gestacional.

No dia seguinte ao nascimento foi realizada a avaliação, padronização de cada ninhada (item 3.4.2). Considerando-se o peso da ninhada, as lactantes foram distribuídas de maneira estatisticamente homogênea em três grupos: fenogrego (n=13; FE), no qual as fêmeas receberam o extrato da semente da planta na dose de 370mg/Kg; o domperidona (n=11; DOM), em que as lactantes receberam o medicamento, por via oral, através de gavagem, na dose de 3mg/Kg e o controle (n=14; CO), no qual fêmeas receberam o veículo (água filtrada), no mesmo volume que aquele calculado para administração do fenogrego. O período das administrações foi do DPN1 ao DPN19.

No 3º, 6º, 9º, 12º, 15º e 19º DPN, foram avaliados o consumo de água e ração e o peso das ratas (item 3.4.4), além do peso da ninhada e individual (item 3.4.5).

A coleta de leite e quantificação do volume foi realizada no DPN14 e DPN19 (item 3.4.6).

4.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE *TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM* A RATAS LACTANTES

Foram empregadas 40 ratas que após terem sido acasaladas e diagnosticadas como prenhes (item 3.4.2) foram alocadas separadamente em gaiolas durante todo o período gestacional. No dia seguinte ao nascimento da prole (DPN1) foi realizada a distribuição estatisticamente homogênea de peso dos animais e separação em quatro grupos (n=10) que receberam uma das diferentes doses do extrato do fenogrego: 190,0 mg/Kg (grupo F 190), 370mg/Kg (grupo F 370) ou 740mg/Kg (grupo F 740) durante o DPN1 a DPN21. As ratas pertencentes ao grupo controle receberam água filtrada pela mesma via e período.

O consumo de água, ração e o peso das ratas foram avaliados conforme descrito no item 3.4.4, no 3º, 6º, 9º, 12º, 15º e 18º e 21º DPN.

No DPN22, as fêmeas foram submetidas à anestesia, para coleta de sangue, para avaliação hematológica e bioquímica (item 3.4.12), e, a seguir, aprofundou-se a anestesia até o animal vir a óbito.

4.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE *TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM* EM FÊMEAS LACTANTES. ESTUDO NOS FILHOTES

Após o nascimento, as proles de lactantes do Experimento 2 foram avaliadas, a partir do DPN1, verificando-se os seguintes parâmetros: peso da ninhada e individual, desenvolvimento físico e reflexológico, conforme descrito, respectivamente, nos itens 3.4.5, 3.4.7. e 3.4.8

No DPN11, os filhotes das diferentes proles foram avaliados quanto à vocalização, conforme descrito no item 3.4.10.

As avaliações comportamentais das proles no campo aberto foram realizadas em dois momentos distintos: na infância (DPN15, DPN18 e DPN21) e na fase adulta (DPN75), conforme descrito no item 3.4.11.

No dia DPN22 procedeu-se à coleta de sangue, conforme descrito no item 3.4.12 para avaliação hematológica e bioquímicae, a seguir, aprofundou-se a anestesia até o animal vir a óbito. Todos os parâmetros foram avaliados em um macho e uma fêmea por ninhada.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE *TRIGONELLA FOENUM-GRÆCUM* NAS RATAS DO 1º AO 19º DIA DE LACTAÇÃO. ESTUDO DE QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LEITE

As tabelas 1 e 2 mostram os dados relativos ao consumo de ração (em g) e água (em mL) de ratas provenientes dos grupos CO, FE e DOM, durante o período de tratamento DPN1 a DPN19. Como pode ser observado, no que se refere ao consumo de ração a Anova de duas vias mostrou diferenças estatisticamente significantes com relação aos dias de observação ($F(5/175) = 468,3$; $p < 0,0001$), sem diferenças entre os grupos e sem interação entre os fatores. O pós-teste de Tukey mostrou aumento do consumo de ração no DPN19 em ratas do grupo DOM, em relação aos animais do grupo CO ($p < 0,05$), bem como, DOM quando comparado as ratas do grupo FE ($p < 0,05$). Em relação ao consumo de água, a análise estatística revelou não haver diferenças significantes.

Tabela 1 – Consumo de ração (em g) de ratas

Período de avaliação (dias)	CO (n=14)	FE (n=13)	DOM (n=11)
1-3	90,39 ± 10,14	92,22 ± 12,15	91,07 ± 13,33
4-6	124,41 ± 3,49	131,05 ± 13,04	129,81 ± 14,88
7-9	152,42 ± 10,48	151,29 ± 19,40	158,59 ± 16,92
10-12	167,63 ± 9,77	171,99 ± 20,41	178,94 ± 16,16
13-15	160,89 ± 13,34	162,62 ± 20,41	170,05 ± 15,73
16-19	175,99 ± 15,06	177,39 ± 22,61 [#]	193,71 ± 16,19*

Legenda: Comparação entre os grupos controle, fenogrego (370,0mg/Kg/dia) e domperidona (3,0mg/Kd/dia) tratados ou não (CO) por via oral, através de gavagem, do 1º ao 19º dia do período lactacional. Os dados são apresentados como média ± SDM; $p < 0,05$ (*controle vs domperidona, [#]fenogrego vs domperidona); Anova seguido do teste de Tukey

Tabela 2 - Consumo médio de água (em mL) de ratas

Período de avaliação (dias)	CO (n=14)	FE (n=13)	DOM (n=11)
1-3	138,60 ± 15,43	153,95 ± 54,00	136,83 ± 19,60
4-6	162,69 ± 13,02	187,35 ± 40,10	188,40 ± 69,66
7-9	191,76 ± 19,61	211,88 ± 72,64	199,22 ± 34,87
10-12	208,31 ± 18,64	245,10 ± 64,83	216,57 ± 30,50
13-15	234,67 ± 36,61	247,55 ± 56,15	229,96 ± 34,44
16-19	244,44 ± 29,69	237,69 ± 38,87	262,17 ± 44,74

Legenda: Comparação entre os grupos controle, fenogrego (370,0mg/Kg/dia) e domperidona (3,0mg/Kd/dia) tratados ou não (CO) por via oral, através de gavagem, do 1º ao 19º dia do período lactacional. Os dados são apresentados como média ± SDM; $p > 0,05$; Anova seguido do teste de Tukey

A tabela 3 mostra os dados relativos ao ganho de peso (em g) das ratas pertencentes aos grupos CO, FE e DOM. A análise estatística empregada mostrou haver diferenças significantes neste parâmetro relativos aos dias de observação ($F(5/175) = 11,92$; $p < 0,0001$), bem como entre os grupos ($F(2/35) = 4,394$; $p = 0,0198$). Por outro lado, não foi observado interação entre os fatores. A aplicação do pós-teste de Tukey, revelou que entre o período 13º a 15º dia aqueles animais pertencentes ao grupo FE ($p < 0,05$) apresentaram perda de peso, quando comparado àqueles animais provenientes do grupo CO.

Tabela 3 - Ganho de peso (em g) de ratas

Dias	CO (n=14)	FE (n=13)	DOM (n=11)
1-3	11,35 ± 5,35	5,28 ± 7,18	6,90 ± 6,82
4-6	11,95 ± 7,32	7,79 ± 5,04	9,50 ± 6,14
7-9	5,70 ± 8,02	4,62 ± 5,65	4,60 ± 8,61
10-12	5,05 ± 5,69	1,75 ± 5,85	3,90 ± 7,42
13-15	7,85 ± 7,65	-0,82 ± 6,46*	4,90 ± 7,14
16-19	-2,90 ± 8,08	-1,45 ± 6,17	-4,20 ± 7,71

Legenda: Comparação entre os grupos controle, fenogrego (370,0mg/Kg/dia) e domperidona (3,0mg/Kd/dia) tratados ou não (CO) por via oral, através de gavagem, do 1º ao 19º dia do período lactacional. Os dados são apresentados como média ± SDM; *p<0,05 (*fenogrego vs controle); Anova seguido do teste de Tukey

A tabela 4 mostra o ganho de peso (em g) de ninhadas provenientes de ratas pertencentes aos diferentes grupos CO, FE e DOM. A análise estatística empregada mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos dos diferentes grupos.

Tabela 4 - Ganho de peso (em g) de ninhadas de ratas

Período de avaliação (dias)	CO (n=14)	FE (n=13)	DOM (n=11)
1-3	14,40 ± 1,66	15,80 ± 3,16	17,58 ± 5,12
4-6	19,65 ± 2,67	21,50 ± 2,56	23,45 ± 3,18
7-9	24,95 ± 3,14	24,60 ± 3,08	28,91 ± 4,43
10-12	26,05 ± 2,36	26,40 ± 3,42	29,05 ± 3,84
13-15	7,90 ± 5,84	10,90 ± 5,38	11,47 ± 6,13
16-19	34,60 ± 8,86	34,30 ± 8,77	36,81 ± 18,20

Legenda: Comparação entre os grupos controle, fenogrego (370,0mg/Kg/dia) e domperidona (3,0mg/Kd/dia) tratados ou não (CO) por via oral, através de gavagem, do 1º ao 19º dia do período lactacional. Os dados são apresentados como média ± SDM; p>0,05; Anova seguido do teste de Tukey; n=numero de ninhadas

A tabela 5 mostra os dados relativos ao ganho de peso (em g) dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas pertencentes aos grupos CO, FE, DOM. Assim, verifica-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) neste parâmetro no intervalo entre o DPN16 ao DPN19. A subsequente aplicação do teste de Tukey revelou, aqueles filhotes machos, provenientes do grupo DOM, mostraram maior ganho de peso ($F(2/35) = 6,661$; $p < 0,0035$), comparado aos filhotes do grupo CO ($p < 0,0001$), bem como, daqueles animais do grupo FE ($p < 0,05$). A aplicação destes mesmos testes estatístico revelou que os filhotes fêmeas, provenientes de lactantes do grupo DOM, apresentaram também ganho de peso que aquele animais do grupo CO ($p < 0,05$), no mesmo período (DPN16 ao DPN19).

Tabela 5 - Ganho de peso (em g) de filhotes machos e fêmeas

Período de avaliação (dias)		CO (n=14)	FE (n=13)	DOM (n=11)
1-3	♂	2,37 ± 0,47	2,72 ± 0,51	3,06 ± 0,95
	♀	2,25 ± 0,29	2,68 ± 0,48	2,94 ± 1,02
4-6	♂	3,43 ± 0,57	3,52 ± 0,66	3,97 ± 0,54
	♀	3,36 ± 0,54	3,55 ± 0,58	3,78 ± 0,72
7-9	♂	4,18 ± 0,53	4,20 ± 0,60	4,89 ± 0,82
	♀	4,17 ± 0,73	4,11 ± 0,56	4,87 ± 0,69
10-12	♂	4,54 ± 0,51	4,37 ± 0,55	4,82 ± 0,84
	♀	4,49 ± 0,50	4,26 ± 0,58	4,77 ± 0,75
13-15	♂	1,68 ± 0,97	1,72 ± 0,98	1,96 ± 1,12
	♀	1,34 ± 1,05	1,53 ± 0,98	1,67 ± 1,15
16-19	♂	5,49 ± 1,53	6,09 ± 1,75 [#]	7,23 ± 1,91 ^{****}
	♀	5,36 ± 1,43	6,03 ± 1,59	6,38 ± 2,00 [*]

Legenda: Comparação entre os grupos controle, fenogregó (370,0mg/Kg/dia) e domperidona (3,0mg/Kd/dia) tratados ou não (CO) por via oral, através de gavagem, do 1º ao 19º dia do período lactacional. Os dados são apresentados como média ± SDM. * $p < 0,05$ (♀ domperidona vs ♀ controle), **** $p < 0,0001$ (♂ domperidona vs ♂ controle), [#] $p < 0,05$ (♂ fenogregó vs ♂ domperidona); Anova seguido do teste de Tukey.

A tabela 6 mostra o volume de leite (em g) coletado das ratas dos grupos CO, FE e DOM, no DPN14 e DPN19. A análise estatística aplicada mostrou houve diferença nos dias de observação ($F(1/35) = 8,864$; $p=0,0053$).

Tabela 6 - Volume de leite (em mL) coletado de ratas

Dia de coleta	CO (n=14)	FE (n=13)	DOM (n=11)
14	1,36 ± 0,58	1,64 ± 0,44	1,52 ± 0,61
19	1,19 ± 0,60	1,18 ± 0,50	1,29 ± 0,57

Legenda: Comparação entre os grupos controle, fenogrego (370,0mg/Kg/dia) e domperidona (3,0mg/Kd/dia) tratados ou não (CO) por via oral, através de gavagem, do 1º ao 19º dia do período lactacional. Os dados são apresentados como média ± SDM; $p>0,05$, Anova seguido do teste de Tukey.

5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE *TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM* A RATAS LACTANTES ESTUDO 1 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM*

As tabelas 7 e 8 mostram o consumo de ração (em g) e de água (em mL) de ratas tratadas ou não (CO) com diferentes doses de FE durante todo o período lactacional (21 dias). Assim, no que se refere ao consumo de ração, a análise estatística aplicada, revelou não haver diferença significativa, em ambos parâmetros, durante todos os períodos avaliados.

Tabela 7 - Consumo médio de ração (em g) de ratas

Período de avaliação (dias)	CO (n=10)	Doses de Fenogrego (mg/Kg/dia)		
		190 (n=10)	370 (n=10)	740 (n=10)
1-3	89,27 ± 9,68	89,85 ± 13,69	88,95 ± 8,86	87,90 ± 8,54
4-6	125,06 ± 11,03	132,96 ± 8,92	127,09 ± 13,95	124,48 ± 20,74
7-9	150,01 ± 8,85	152,29 ± 15,64	155,61 ± 20,26	147,30 ± 15,68
10-12	165,4 ± 12,43	172,33 ± 15,49	167,31 ± 13,36	160,41 ± 11,87
13-15	184,09 ± 16,87	190,91 ± 15,92	183,29 ± 11,17	183,17 ± 18,50
16-18	205,81 ± 15,29	200,70 ± 23,14	196,70 ± 14,71	188,98 ± 16,88
19-21	147,09 ± 14,26	143,54 ± 16,88	137,33 ± 14,37	141,36 ± 11,75

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM $p > 0,05$; Anova seguido do teste de Tukey.

Tabela 8 - Consumo médio de água (em mL) de ratas

Período de avaliação (dias)	CO (n=10)	Doses de Fenogrego (mg/Kg/dia)		
		190 (n=10)	370 (n=10)	740 (n=10)
1-3	137,47 ± 9,55	145,58 ± 19,66	138,68 ± 15,31	135,11 ± 10,52
4-6	181,35 ± 17,34	196,44 ± 33,13	190,92 ± 37,85	172,94 ± 20,58
7-9	204,89 ± 17,86	216,55 ± 23,58	217,92 ± 30,25	210,15 ± 29,62
10-12	239,52 ± 22,05	243,67 ± 29,13	226,09 ± 25,83	224,77 ± 21,76
13-15	270,52 ± 27,00	269,85 ± 30,73	247,97 ± 25,85	256,32 ± 35,09
16-18	303,60 ± 44,82	295,24 ± 44,79	293,65 ± 66,28	278,33 ± 23,77
19-21	220,43 ± 30,33	214,44 ± 30,80	206,90 ± 27,31	215,51 ± 18,93

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM $p > 0,05$; Anova seguido do teste de Tukey.

A tabela 9 apresenta os dados relativos ao ganho de peso (em g), de ratas tratadas ou não (CO) com diferentes doses do extrato aquoso do FE durante todo o período de lactação (21 dias). Desta maneira, pode-se verificar que a análise estatística aplicada revelou não haver diferença significativa, quando comparou-se os valores dos grupos estudados.

Tabela 9 - Ganho de peso (em g) de ratas

Período de avaliação (dias)	CO (n=10)	Doses de Fenogrego (mg/Kg/dia)		
		190 (n=10)	370 (n=10)	740 (n=10)
1-3	12,37 ± 3,85	11,21 ± 4,38	9,64 ± 5,25	8,82 ± 4,08
4-6	4,87 ± 4,23	9,68 ± 3,78	3,80 ± 7,99	1,63 ± 12,52
7-9	6,88 ± 7,13	2,47 ± 13,49	11,09 ± 10,50	5,71 ± 4,79
10-12	6,57 ± 10,33	4,10 ± 9,19	3,96 ± 10,34	0,30 ± 9,53
13-15	-0,52 ± 5,82	4,81 ± 8,13	1,74 ± 7,94	5,06 ± 5,67
16-18	2,96 ± 6,18	1,87 ± 8,69	4,14 ± 6,15	4,43 ± 7,15
19-21	-5,00 ± 4,88	-5,57 ± 7,57	-4,56 ± 12,23	-5,27 ± 6,15

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM $p > 0,05$; Anova seguido do teste de Tukey.

A tabela 10 mostra os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros hematológicos das ratas tratadas ou não (CO) com diferentes doses do extrato aquoso de FE. Desta maneira, a aplicação da análise estatística de Anova revelou haver diferença estatisticamente significativa apenas nos valores de hemoglobina ($F(3/30) = 3,119$; $p = 0,0407$). A aplicação subsequente do pós-teste de Tukey mostrou haver diminuição significativa ($p < 0,05$) nas ratas do grupo FE370 em relação ao valor obtido das ratas do grupo CO.

Tabela 10 - Parâmetros hematológicos de ratas

Parâmetros	CO (n=9)	Doses de Fenogrego (em mg/kg/dia)		
		190 (n=8)	370 (n=9)	740 (n=8)
Leucócitos (x 10 ³ /mm ³)	3,48 ± 1,39	2,96 ± 1,02	3,39 ± 0,87	3,25 ± 1,23
Hemácias (x 10 ⁶ /mm ³)	7,94 ± 0,59	7,42 ± 0,55	7,35 ± 0,45	7,47 ± 0,34
HGB (g/dL)	16,14 ± 0,86	15,54 ± 0,76	15,24 ± 0,61*	15,36 ± 0,33
HCT (%)	45,70 ± 3,13	43,30 ± 2,96	42,57 ± 2,73	43,49 ± 1,92
Plaquetas (x 10 ³ /mm ³)	663,11 ± 125,49	676,38 ± 81,54	700,44 ± 61,37	708,50 ± 102,81
VCM (fm ³)	57,56 ± 1,59	58,50 ± 0,93	57,78 ± 1,39	58,38 ± 1,06
HCM (pg)	20,37 ± 0,77	20,99 ± 0,74	20,78 ± 0,94	20,61 ± 0,78
CHCM (g/dL)	35,38 ± 0,89	35,94 ± 1,06	35,84 ± 1,33	35,41 ± 1,14

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM *p<0,05 (FE 370 vs Controle); HGB= hemoglobina; HCT= hematócrito; VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média

Em relação à avaliação bioquímica, o teste estatístico aplicado, revelou não haver significantes, em nenhum dos parâmetros analisados (Tabela 11).

Tabela 11 – Bioquímica sérica de ratas

Parâmetros	CO (n=9)	Doses de Fenogrego (em mg/kg/dia)		
		190 (n=8)	370 (n=9)	740 (n=10)
AST (U/L)	188,11 ± 56,86	188,38 ± 36,90	205,11 ± 30,40	172,60 ± 29,72
ALT (U/L)	112,33 ± 29,16	106,88 ± 15,47	121,56 ± 22,72	114,10 ± 22,90
GGT (U/L)	1,11 ± 0,78	0,63 ± 1,06	0,56 ± 0,53	0,70 ± 0,82
ALP (U/L)	219,33 ± 64,13	201,88 ± 48,80	272,78 ± 91,02	292,50 ± 147,14
Glicose (mg/dL)	225,00 ± 56,26	206,38 ± 33,83	228,00 ± 43,14	236,40 ± 89,21
Proteína total (g/dL)	6,73 ± 1,21	6,58 ± 0,75	6,57 ± 1,10	6,26 ± 0,69
Albumina (g/dL)	4,06 ± 0,16	4,06 ± 0,30	4,30 ± 0,23	4,23 ± 0,46
Globulina (g/dL)	2,68 ± 1,11	2,51 ± 0,57	2,27 ± 1,13	2,03 ± 0,89
Colesterol (mg/dL)	81,89 ± 21,83	86,88 ± 24,19	102,22 ± 31,70	89,70 ± 24,96
Triglicérides (mg/dL)	72,56 ± 35,05	61,88 ± 21,27	92,22 ± 38,44	72,20 ± 39,93
Uréia (mg/dL)	84,33 ± 10,37	91,75 ± 11,34	89,56 ± 12,38	90,30 ± 7,99
Creatinina (mg/dL)	1,00 ± 0,10	1,01 ± 0,14	0,96 ± 0,18	0,91 ± 0,09

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM; p>0,05, Anova seguido do teste de Tukey. AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; GGT = gama glutamiltransferase; ALP= fosfatase alcalina.

5.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE *TRIGONELLA FOENUM-GRÆCUM* EM FÊMEAS LACTANTES. ESTUDO NOS FILHOTES

A tabela 12 apresenta os dados relativos ao ganho de peso (em g) de filhotes de ratas, tratadas ou não (CO) com diferentes doses do extrato aquoso de FE, durante todo o período de lactação (21 dias). Em relação ao peso da ninhada, o emprego da análise estatística revelou não haver diferença significativa, nos diferentes períodos avaliados.

Tabela 12 - Ganho de peso (em g) de ninhada de ratas

Período de avaliação (dias)	CO (n=10)	Doses de Fenogrego (mg/Kg/dia)		
		190 (n=10)	370 (n=10)	740 (n=10)
1-3	15,33 ± 2,89	14,35 ± 3,59	14,09 ± 2,56	16,25 ± 2,24
4-6	23,19 ± 2,47	18,01 ± 4,86	20,74 ± 3,37	19,29 ± 4,44
7-9	26,01 ± 3,48	29,32 ± 16,41	28,70 ± 11,45	25,12 ± 3,45
10-12	27,82 ± 2,44	27,30 ± 3,84	28,24 ± 3,41	26,21 ± 4,00
13-15	26,52 ± 4,55	27,97 ± 3,22	27,22 ± 3,74	27,46 ± 3,46
16-18	25,86 ± 4,31	27,78 ± 7,71	25,45 ± 3,88	25,19 ± 5,42
19-21	45,33 ± 7,33	46,21 ± 10,51	43,19 ± 11,92	45,81 ± 8,41

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM; $p > 0,05$, Anova seguido do teste de Tukey.

A tabela 13 apresenta os dados relativos ao ganho de peso (em g) dos filhotes machos e fêmeas das ratas tratadas ou não (CO) com diferentes doses de FE durante todo o período lactacional. Em relação aos filhotes machos a Anova de duas vias mostrou haver diferenças significantes neste parâmetro no que se refere ao período de avaliação ($F(14/504) = 3551$; $p < 0,0001$). No entanto, não foram detectadas alterações no que se refere à comparação entre os diferentes

tratamentos ($F(3/36) = 0,9152$; $p=0,4433$) e sem interação entre os fatores ($F(42/504) = 1,370$; $p=0,0655$). O emprego do pós teste de Tukey mostrou que no período compreendido entre o 57º ao 63º DPN, os filhotes machos, provenientes dos três diferentes grupos experimentais (FE190, FE370 e F740) apresentaram menor ganho de peso que aquele dos animais oriundos do grupo CO. Verificou-se também menor ganho de peso ($p<0,05$) dos filhotes machos do grupo FE190, no período entre 64º e 70º PND. Além disso, esta mesma análise estatística revelou que os filhotes machos do grupo FE370 apresentaram menor ganho de peso ($p<0,05$) que aqueles filhotes do grupo CO, na avaliação entre os dias 70º e 75º.

Em relação ao ganho de peso dos filhotes fêmeas, a Anova de duas vias mostrou diferença significativa no período de observação ($F(14/504) = 2968$; $p<0,0001$), sem diferença no tratamento ($F(3/36) = 1,435$; $p=0,2486$) e com interação entre os fatores ($F(42/504) = 1,841$; $p=0,0014$). O pós teste de Tukey mostrou diminuição significativa do ganho de peso, em relação ao do grupo CO, dos filhotes fêmeas, provenientes do FE740, no período entre o 43º e 49º dia DPN ($p<0,05$). O mesmo teste estatístico detectou menor ganho de peso dos filhotes fêmeas, dos três diferentes grupos experimentais, no período compreendido entre 57 ao 63º DPN ($p<0,0001$); e menor ganho de peso daquelas fêmeas provenientes do grupo FE740, do 64º ao 70º do DPN ($p<0,05$).

Tabela 13 - Ganho de peso (em g) de filhotes machos e fêmeas de ratas

(continua)

Período de avaliação (dias)		CO (n=10)	Doses de Fenogrego (mg/kg/dia)		
			190 (n=10)	370 (n=10)	740 (n=10)
1-3	♂	22,37 ± 2,55	23,69 ± 4,24	22,11 ± 3,94	22,86 ± 2,01
	♀	21,78 ± 1,90	22,52 ± 4,35	21,75 ± 4,04	22,08 ± 2,09
4-6	♂	34,08 ± 3,65	34,27 ± 6,11	32,70 ± 4,98	33,43 ± 3,22
	♀	33,24 ± 2,71	32,30 ± 5,17	32,53 ± 5,60	32,27 ± 3,07
7-9	♂	49,19 ± 5,08	47,26 ± 7,04	46,79 ± 4,57	47,08 ± 5,27
	♀	47,33 ± 4,57	45,58 ± 5,86	46,80 ± 5,28	45,85 ± 4,87
10-12	♂	64,68 ± 5,19	63,19 ± 9,51	64,10 ± 6,71	62,19 ± 6,26
	♀	62,52 ± 4,91	61,86 ± 6,99	63,91 ± 8,09	61,09 ± 5,36
13-15	♂	80,13 ± 6,06	79,65 ± 8,97	80,16 ± 7,59	78,01 ± 7,42
	♀	77,79 ± 5,47	77,64 ± 7,03	79,85 ± 9,36	76,50 ± 6,27
16-18	♂	94,90 ± 7,28	96,55 ± 10,20	95,70 ± 9,91	94,29 ± 8,70
	♀	91,44 ± 7,04	92,74 ± 8,59	95,82 ± 9,57	91,56 ± 5,69
19-21	♂	114,07 ± 10,55	117,11 ± 14,64	114,57 ± 14,94	113,83 ± 9,22
	♀	111,80 ± 9,96	112,80 ± 12,27	114,82 ± 13,37	110,75 ± 7,42
22-28	♂	72,19 ± 6,57	72,84 ± 10,63	71,66 ± 11,50	67,62 ± 7,61
	♀	70,09 ± 5,34	68,05 ± 8,57	69,24 ± 8,30	66,10 ± 4,55
29-35	♂	114,53 ± 10,24	107,41 ± 15,77	104,98 ± 16,92	106,18 ± 14,01
	♀	105,26 ± 8,51	96,55 ± 12,03	99,06 ± 13,15	97,47 ± 9,62
36-42	♂	157,21 ± 14,30	151,06 ± 14,77	149,20 ± 11,55	146,08 ± 8,21
	♀	133,19 ± 10,18	126,94 ± 7,88	126,92 ± 6,00	124,28 ± 5,11

(conclusão)

Período de avaliação (dias)		CO (n=10)	Doses de Fenogregro (mg/kg/dia)		
			190 (n=10)	370 (n=10)	740 (n=10)
43-49	♂	199,02 ± 16,97	190,50 ± 19,14	189,70 ± 17,15	189,02 ± 17,54
	♀	154,28 ± 12,30	149,00 ± 9,53	146,80 ± 7,78	143,86 ± 10,32*
50-56	♂	235,72 ± 19,75	227,20 ± 13,38	226,12 ± 15,34	224,80 ± 16,06
	♀	171,40 ± 12,80	165,50 ± 10,35	162,08 ± 8,55	160,42 ± 9,30*
57-63	♂	279,02 ± 19,01	256,10 ± 17,05*	261,42 ± 20,06*	260,06 ± 16,87*
	♀	192,20 ± 12,30	179,66 ± 10,15*	175,12 ± 8,66***	173,70 ± 10,21****
64-70	♂	294,72 ± 31,24	276,06 ± 18,92*	283,64 ± 19,42	282,80 ± 14,65
	♀	194,56 ± 16,93	188,94 ± 11,48	186,52 ± 8,95	182,66 ± 10,68*
71-75	♂	306,68 ± 30,84	288,86 ± 20,14*	297,12 ± 20,28	293,20 ± 21,47
	♀	201,04 ± 18,60	196,34 ± 11,55	191,76 ± 10,32	192,34 ± 14,09

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogregro, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM *p<0,05, ***p<0,001; ****p<0,0001. Anova seguido do teste de Tukey.

Em relação à avaliação dos parâmetros hematológicos dos filhotes machos e fêmeas das ratas tratadas ou não (CO) com diferentes doses de FE durante todo o período lactacional, a aplicação da análise estatística revelou não haver diferenças significantes nos diferentes parâmetros analisados (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14 - Parâmetros hematológicos de filhotes machos de ratas

Parâmetros	CO (n=9)	Doses de Fenogrego (em mg/kg)		
		190 (n=8)	370 (n=9)	740 (n=8)
Leucócitos (x 10 ³ /mm ³)	2,80 ± 0,88	2,54 ± 0,72	2,82 ± 0,81	3,06 ± 0,73
Hemácias (x 10 ⁶ /mm ³)	5,78 ± 0,87	5,33 ± 0,86	5,45 ± 0,38	5,75 ± 0,32
HGB (g/dL)	12,14 ± 2,06	11,15 ± 1,97	11,07 ± 1,29	11,90 ± 1,15
HCT (%)	35,80 ± 5,20	32,89 ± 6,18	33,18 ± 4,05	35,55 ± 3,52
Plaquetas (x 10 ³ /mm ³)	625,11 ± 201,71	553,75 ± 312,68	706,44 ± 220,83	705,50 ± 163,33
VCM (fm ³)	61,78 ± 2,91	61,38 ± 3,29	60,89 ± 5,09	61,75 ± 3,69
HCM (pg)	20,96 ± 0,98	20,93 ± 0,93	20,29 ± 1,79	20,65 ± 1,26
CHCM (g/dL)	33,84 ± 1,09	34,05 ± 1,16	33,38 ± 0,75	33,49 ± 0,38

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM; p>0,05, Anova seguido do teste de Tukey. HGB= hemoglobina; HCT= hematócrito; VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 15 - Parâmetros hematológicos de filhotes fêmeas

Parâmetros	CO (n=7)	Doses de Fenogrego (em mg/kg)		
		190 (n=8)	370 (n=8)	740 (n=8)
Leucócitos (x 10³/mm³)	2,27 ± 1,08	2,98 ± 0,85	2,40 ± 1,01	3,10 ± 0,79
Hemácias (x 10⁶/mm³)	5,50 ± 0,43	5,87 ± 0,41	5,55 ± 0,49	5,64 ± 0,50
HGB (g/dL)	11,94 ± 0,80	12,24 ± 1,23	11,45 ± 1,47	11,83 ± 1,12
HCT (%)	35,41 ± 2,53	36,84 ± 3,54	34,31 ± 4,70	35,18 ± 3,48
Plaquetas (x 10³/mm³)	485,00 ± 301,01	667,50 ± 166,97	552,00 ± 340,33	485,50 ± 296,45
VCM (fm³)	64,43 ± 2,99	62,63 ± 3,58	61,63 ± 5,10	62,25 ± 2,38
HCM (pg)	21,76 ± 1,53	20,86 ± 1,38	20,59 ± 1,74	20,94 ± 0,68
CHCM (g/dL)	33,79 ± 1,32	33,23 ± 0,70	33,39 ± 0,78	33,61 ± 0,33

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM; p>0,05, Anova seguido do teste de Tukey. HGB= hemoglobina; HCT= hematócrito; VCM= volume corpuscular médio; HCM= hemoglobina corpuscular média; CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média.

As tabelas 16 e 17 mostram os resultados obtidos na avaliação bioquímica sérica dos filhotes, respectivamente, machos e fêmeas de ratas tratadas ou não (CO) com diferentes doses de FE durante todo o período lactacional (21 dias). A análise de variância empregada revelou não haver diferenças significantes, em nenhum dos parâmetros bioquímicos avaliados.

Tabela 16 – Bioquímica sérica de filhotes machos de ratas

Parâmetros	CO (n=5)	Doses de Fenogrego (em mg/kg)		
		190 (n=4)	370 (n=3)	740 (n=3)
AST (U/L)	246,60 ± 43,89	250,50 ± 249,16	197,67 ± 44,50	147,67 ± 16,92
ALT (U/L)	55,80 ± 9,07	90,75 ± 44,16	63,00 ± 15,59	40,0 ± 7,21
GGT (U/L)	0,20 ± 0,45	0,25 ± 0,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
ALP (U/L)	346,20 ± 20,47	309,50 ± 89,28	276,33 ± 115,47	408,67 ± 37,17
Glicose (mg/dL)	166,60 ± 20,98	234,75 ± 66,93	192,33 ± 16,01	238,33 ± 7,57
Proteína total (g/dL)	5,83 ± 0,32	6,13 ± 0,22	6,27 ± 0,05	6,07 ± 0,38
Albumina (g/dL)	3,64 ± 0,11	3,78 ± 0,10	3,73 ± 0,15	3,77 ± 0,21
Globulina (g/dL)	2,19 ± 0,23	2,36 ± 0,13	2,54 ± 0,14	2,31 ± 0,43
Colesterol (mg/dL)	105,40 ± 14,62	103,00 ± 26,15	122,00 ± 39,36	112,33 ± 12,06
Triglicérides (mg/dL)	117,80 ± 24,22	141,50 ± 40,58	150,33 ± 61,26	165,67 ± 53,97
Uréia (mg/dL)	54,20 ± 2,68	71,75 ± 9,36	67,33 ± 21,22	57,00 ± 8,54
Creatinina (mg/dL)	0,97 ± 0,19	1,07 ± 0,14	1,31 ± 0,29	1,13 ± 0,17

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM; p>0,05, Anova seguido do teste de Tukey. AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; GGT = gama glutamiltransferase; ALP= fosfatase alcalina.

Tabela 17 – Bioquímica sérica de filhotes fêmeas de ratas

Parâmetros	CO (n=5)	Doses de Fenogrego (em mg/kg)		
		190 (n=3)	370 (n=3)	740 (n=4)
AST (U/L)	370,60 ± 210,95	302,67 ± 110,02	200,00 ± 32,42	263,67 ± 84,76
ALT (U/L)	92,80 ± 53,96	82,33 ± 31,79	69,67 ± 40,38	83,33 ± 44,75
GGT (U/L)	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,58	0,67 ± 1,15	0,00 ± 0,00
ALP (U/L)	360,60 ± 35,38	344,0 ± 16,46	376,67 ± 38,53	363,33 ± 89,37
Glicose (mg/dL)	226,40 ± 80,03	201,67 ± 65,99	214,67 ± 17,56	284,33 ± 31,09
Proteína total (g/dL)	5,99 ± 0,35	6,25 ± 0,50	6,07 ± 0,11	6,52 ± 0,66
Albumina (g/dL)	3,82 ± 0,20	3,87 ± 0,21	3,77 ± 0,15	3,93 ± 0,06
Globulina (g/dL)	2,17 ± 0,30	2,38 ± 0,33	2,30 ± 0,05	2,59 ± 0,60
Colesterol (mg/dL)	97,80 ± 20,75	109,00 ± 11,53	109,33 ± 28,36	123,00 ± 18,52
Triglicérides (mg/dL)	111,00 ± 23,95	158,67 ± 52,00	137,67 ± 58,52	180,00 ± 44,19
Uréia (mg/dL)	59,00 ± 6,00	65,33 ± 6,11	70,33 ± 13,32	66,67 ± 4,04
Creatinina (mg/dL)	0,98 ± 0,09	1,02 ± 0,20	1,36 ± 0,47	1,26 ± 0,13

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM; $p > 0,05$, Anova seguido do teste de Tukey. AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; GGT = gama glutamiltransferase; ALP= fosfatase alcalina.

Em relação ao desenvolvimento físico dos filhotes (Tabela 18), verifica-se que quanto ao tamanho dos filhotes machos, a aplicação do teste estatístico de Anova de duas vias mostrou não haver diferença significativa. Já no caso dos filhotes fêmeas, a análise estatística revelou diferença estatisticamente significativa entre os dias de observação ($F(2/72) = 2869$; $p < 0,0001$), bem como entre os grupos, DPN21 ($F(3/36) = 13,91$; $p < 0,0001$) e com interação entre os fatores ($F(6/72) = 85,70$; $p < 0,0001$). O emprego do pós-teste de Tukey revelou haver diminuição de tamanho em filhotes fêmeas do grupo FE740 ($p < 0,0001$), quando comparado com os filhotes fêmeas do grupo CO.

Tabela 18 - Parâmetros de desenvolvimento físico de filhotes machos e fêmeas de ratas

Parâmetros		CO (n=10)	Doses de Fenogrego (em mg/kg)		
			190 (n=10)	370 (n=10)	740 (n=10)
Tamanho (mm)					
DPN1	♂	47,15 ± 2,86	50,95 ± 3,88	49,45 ± 3,58	50,15 ± 3,48
	♀	46,90 ± 2,85	49,75 ± 3,26	49,0 ± 3,38	49,90 ± 2,76
DPN10	♂	71,60 ± 3,10	75,20 ± 5,18	75,60 ± 5,31	75,75 ± 1,92
	♀	71,25 ± 3,45	72,60 ± 3,63	74,75 ± 4,85	74,15 ± 2,36
DPN21	♂	100,85 ± 2,11	102,55 ± 5,73	98,90 ± 5,31	101,12 ± 5,12
	♀	99,55 ± 2,60	97,90 ± 5,29	98,80 ± 4,85	98,88 ± 4,36****
ED (dia)	♂	10,90 ± 0,88	10,70 ± 1,25	11,20 ± 1,14	10,50 ± 0,85
	♀	11,20 ± 0,79	10,80 ± 1,14	10,60 ± 0,84	10,50 ± 0,97
AO (dia)	♂	14,40 ± 0,84	13,80 ± 1,40	13,90 ± 1,10	13,90 ± 0,74
	♀	14,40 ± 0,70	13,50 ± 1,35	13,50 ± 1,27	13,70 ± 0,67
AA (dia)	♂	13,00 ± 0,82	13,00 ± 0,94	13,30 ± 0,95	13,00 ± 0,94
	♀	13,10 ± 0,74	12,70 ± 0,95	13,10 ± 0,88	13,10 ± 0,99
DT (dia)	♂	19,00 ± 1,89	18,30 ± 0,48	18,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00
AV (dia)	♀	36,80 ± 1,93	38,00 ± 1,15	36,80 ± 3,08	37,10 ± 1,97

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM; ****p<0,0001(♀ FE740 vs ♀ Controle). Anova seguido do teste de Tukey. ED = erupção dos dentes; AO = abertura dos olhos; AA = andar adulto DT = descida dos testículos e AV = abertura vaginal.

A tabela 19 mostra os parâmetros relativos ao desenvolvimento reflexológico dos filhotes machos e fêmeas. A aplicação da análise estatística mostrou não haver diferenças significantes quando compararam-se os valores entre os diferentes grupos, bem como não foi observada a interação nos parâmetros analisados.

Tabela 19 - Desenvolvimento reflexológico de filhotes machos e fêmeas de ratas

Parâmetros		CO (n=10)	Doses de Fenogrego (em mg/kg)		
			190 (n=10)	370 (n=10)	740 (n=10)
PP (dia)	♂	6,80 ± 0,79	5,90 ± 0,84	6,30 ± 0,63	6,15 ± 0,58
	♀	6,85 ± 0,78	5,90 ± 0,99	6,40 ± 0,66	5,90 ± 0,81
EP (dia)	♂	2,40 ± 0,52	2,50 ± 0,97	2,00 ± 0,00	2,30 ± 0,48
	♀	2,30 ± 0,48	2,30 ± 0,48	2,00 ± 0,00	2,30 ± 0,48
EA (dia)	♂	16,10 ± 0,32	16,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00
	♀	16,20 ± 0,42	16,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00
GEO (dia)	♂	5,70 ± 1,49	5,30 ± 1,57	4,90 ± 1,91	5,10 ± 2,02
	♀	5,70 ± 1,49	5,90 ± 1,20	5,00 ± 1,49	5,10 ± 1,73
SS (dia)	♂	13,70 ± 0,67	13,10 ± 0,99	13,70 ± 1,06	13,60 ± 0,52
	♀	13,60 ± 0,52	13,10 ± 1,10	13,40 ± 0,97	13,20 ± 0,92
SB (dia)	♂	13,60 ± 3,75	13,80 ± 2,04	13,50 ± 3,14	12,00 ± 1,76
	♀	14,90 ± 2,02	13,90 ± 2,73	13,60 ± 2,12	12,60 ± 3,17

Legenda: Comparação entre os grupos tratados ou não (Controle) com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia). Os dados são apresentados como média ± SDM; $p > 0,05$, Anova seguido do teste de Tukey. PP = preensão palmar; EP = endireitamento postural; EA = endireitamento no ar; GEO = geotaxia negativa; SS = sobressalto e SB = segurar na barra.

A figura 5 mostra os dados provenientes da avaliação do teste de vocalização no DPN11. O número de vocalizações, tempo total de vocalização, tempo médio de vocalização e tempo médio de silêncio foram os parâmetros utilizados na análise comportamental. A aplicação do teste de Anova de duas vias mostrou não haver diferença significativa entre os diferentes grupos estudados.

Figura 5 - Gráficos representativos dos parâmetros número de vocalizações (A), tempo total de vocalização (B), tempo médio de vocalização (C) e tempo médio de silêncio (D) dos filhotes machos e fêmeas

Legenda: Comparação entre os grupos de ratas tratadas ou não (CO) durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia), com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem. Os dados são apresentados como média $\pm$ SDM.

A figura 6 mostra os dados provenientes da avaliação no campo aberto destes filhotes, de ambos os gêneros, avaliados nos DPN15, DPN18 e DPN21. A distância total percorrida, a velocidade, o tempo de permanência no centro e o número de transições entre as zonas delimitadas foram os parâmetros utilizados na análise comportamental. Assim, em relação a todos os parâmetros avaliados neste aparelho, não foram detectadas diferenças significantes entre os valores obtidos dos quatro grupos de animais avaliados, tanto em filhotes machos quanto fêmeas.

Figura 6 - Gráficos representativos dos parâmetros distância percorrida (A), velocidade média (B), permanência no centro (C) e transições entre zonas (D) dos filhotes machos e fêmeas

Legenda: Comparação entre os grupos de ratas tratadas ou não (CO) durante a fase de lactação (do 1º ao 21º dia), com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem. Os dados são apresentados como média $\pm$ SDM. Nota: Os campos hachurados correspondem aos filhotes fêmeas.

A figura 7 mostra os valores obtidos dos filhotes, filhotes de ambos os gêneros, avaliados no campo aberto no DPN75. A distância total percorrida, a velocidade, o tempo de permanência no centro e o número de transições entre as zonas delimitadas foram os parâmetros utilizados na análise comportamental.

Assim, a comparação estatística dos dados relativos à distância total percorrida, velocidade média, e número de transições entre zonas, mostrou não haver diferenças significantes entre os quatro diferentes grupos, tanto de filhotes machos quanto o de fêmeas.

No entanto, em relação ao parâmetro tempo de permanência no centro análise de variância aplicada mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F(3/72) = 3,414$; $p=0,0219$). A aplicação subsequente do pós teste de Tukey permitiu verificar que aqueles filhotes machos, provenientes de mães do grupo FE370, apresentaram diminuição significativa do tempo de exploração da área central do aparato, quando comparado aquele dos machos provenientes do grupo CO ($p<0,05$).

Figura 7 - Gráficos representativos dos parâmetros distância percorrida (A), velocidade média (B), permanência no centro (C) e transições entre zonas (D) dos filhotes machos e fêmeas

Legenda: Comparação entre os grupos de ratas tratadas ou não (CO) durante toda a fase de lactação (do 1º ao 21º dia), com diferentes doses (190, 370 e 740 mg/kg) do extrato aquoso do fenogrego, administrado por via oral, através de gavagem. Os dados são apresentados como média $\pm$ SDM; * $p < 0,05$ (FE370 vs Controle) Anova seguido do teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Devido à escassez de estudos sobre a toxicidade da *Trigonella foenum graecum*, para a definição das doses do extrato que seriam utilizadas neste trabalho, valeu-se, de um estudo realizado com mulheres lactantes (DAMANIK; WAHLQVIST; WATTANAPENPAIBOON, 2006), no qual se calculou que a dose de planta empregada é em torno de 30mg/kg/dia. A extrapolação das doses para o estudo em animais foi realizada com base na área da superfície corpórea. Este cálculo considera os parâmetros biológicos das espécies, como utilização de oxigênio, gasto calórico, metabolismo basal, volume sanguíneo, proteína plasmática circulante e função renal (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008), e por isso é considerado mais adequado do que a conversão simples pelo peso corpóreo.

Assim, os das doses de fenogrego utilizadas no presente estudo, foram escolhidas com base na área da superfície corpórea, considerando o peso, a área corpórea (body surface area - BSA) e o fator para conversão de dose em mg/kg para dose em mg/m² (fator K_m), para humanos e ratos, respectivamente de 60Kg e 0,15Kg; 1,6m² e 0,025m²; 37 e 6.

A partir destes dados, foi possível calcular as três doses de fenogrego, a saber: 190, 370 e 740 mg/Kg/dia, obtidas a partir da fórmula: $DFe_A = \frac{DFe_H \times Km_H}{Km_A}$

Sendo:

$DFe_A = \text{Dose de Fenogrego em animais (mg} \times \text{Kg} \times \text{Dia)}$

$DFe_H = \text{Dose de Fenogrego em humanos (mg} \times \text{Kg} \times \text{Dia)}$

$Km_H = \text{fator Km para humanos}$

$Km_A = \text{fator Km para animais}$

Deve-se considerar que a menor dose aqui empregada foi definida como 190,0 mg/kg/dia, ou seja, foi feito um arredondamento para facilitar os cálculos para a administração do extrato para os animais.

Embora o consumo do fenogrego seja, em várias partes do mundo, uma das formas mais populares quando se objetiva o aumento da produção do leite materno

por mulheres, não foi encontrado na literatura estudos bem controlados, que de fato comprovassem esse efeito.

Outro fato importante refere-se à ausência de estudos relativos a segurança do consumo do fenogrego durante a lactação, seja para a mãe, bem como para o lactente. Esta inexistência de dados se reveste de uma importância ainda maior se considerarmos que estudos em animais de laboratório, nos quais se administrou o fenogrego em fêmeas gestantes, evidenciaram claramente efeitos embriotóxicos e teratogênicos; bem como alterações no desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole (KHALKI et al., 2010).

Dessa forma, o presente estudo foi dividido em duas partes, na primeira, foi objetivo avaliar o efeito galactagogo da semente de fenogrego através da coleta e mensuração do volume do leite das ratas, bem como avaliar os efeitos da administração do fenogrego durante a lactação na prole de ratas.

Para a avaliação da produção láctea foram padronizados alguns procedimentos, evitando-se o aparecimento de variáveis que poderiam interferir substancialmente na interpretação dos resultados; assim a ninhada foi padronizada com proles de seis filhotes, mantendo-se a mesma proporção de machos e fêmeas. A padronização do presente estudo foi determinada com base em dois estudos: no primeiro, realizado com diferentes tamanhos de ninhadas, verificou-se que não houve diferença significativa no volume de leite removido nas ninhadas ao comparar ninhadas com seis e nove animais (MORAG; POPLIKER; YAGIL, 1975). O segundo estudo que norteou este procedimento foi aquele no qual se verificou que há uma maior preferência nos cuidados maternos, incluindo amamentação, pelo macho em relação a fêmea (AGNISH; KELLER, 1997). Assim, com base em ambos estudos e a dificuldade em obter-se uma uniformização no gênero em ninhadas, com mais de seis animais, optou-se pela padronização com seis filhotes, sendo três machos e três fêmeas.

Sabe-se que o processo de desmame de ratos inicia-se a partir da terceira semana de vida, ocorrendo naturalmente o declínio do consumo de leite e, concomitantemente, o aumento da ingestão de comida e água (REDMAN; SWENEY, 1976). No entanto, apesar do desmame ocorrer partir do DPN14, é somente a partir do DPN18 que este processo se torna mais rápido. Portanto, no que se refere a produção de leite, há uma diminuição acentuada após o DPN15 (BABICKY et al., 1970). Desta maneira, na presente pesquisa foram escolhidos dois

dias para avaliação da produção de leite das ratas: DPN14, dia em que os filhotes começam a ingerir ração e água e a produção de leite ainda está mantida; e no DPN19, momento em que o processo de desmame é patente.

A quantificação do volume de leite é de fundamental importância para os estudos de fisiologia da lactação e de substâncias que interferem no processo de galactogênese. Brody e Nisbet¹ (1938 apud HANWELL; LINZELL, 1972, p.259-270) realizaram, por meio de dois métodos, a avaliação da produção de leite em ratas. No primeiro avaliou-se a quantidade de leite metabolizado através da perda de peso dos filhotes quando separados de suas mães. No segundo, estimava-se a produção láctea pela medição de O₂ nas trocas respiratórias dos filhotes. A partir destes estudos pioneiros, outras técnicas vêm sendo propostas, procurando-se melhor aferir com precisão a produção de leite. Assim, Hanwell e Linzell (1972) propuseram empregar a diferença de peso das glândulas mamárias cheias de leite de ratas separadas de seus filhotes e de animais controle não separados de suas ninhadas, na mesma fase da lactação. Embora o método fosse mais preciso que aquele proposto por Brody e Nisbet (1938), seria necessário realizar a eutanásia dos animais para a remoção do tecido mamário.

Outra técnica proposta seria de medir, além do peso dos filhotes, o peso das mães antes e após a amamentação, pois foi sugerido que a perda de peso da mãe durante a amamentação está diretamente relacionada com o ganho de peso dos filhotes. No entanto, verificou-se que a perda de peso das mães foi maior do que o ganho de peso dos filhotes, concluindo-se que a pesagem das mães tende a superestimar a quantidade de leite, pois a perda de água não é contabilizada na perda de peso total durante a amamentação (TREADWAY; LEDERMAN, 1986). Portanto, tal método também não se mostrou conveniente.

Atualmente, a técnica mais utilizada para a avaliação da produção láctea é aquela baseada na pesagem dos filhotes que são separados de suas mães e após este período retornam para mamar. A quantidade de leite é estimada pela diferença do peso dos filhotes após o término do período de separação e após a amamentação (SUBRAMANIAN; ABEL, 1988). Por outro lado, de uma maneira geral, os autores consideram que as técnicas que envolvem separação e pesagem dos animais tem influência de variáveis importantes. Neste sentido, sabe-se que o

¹ BROADY, S.; NISBET, R. Growth and development with special reference to domestic animals. A comparison of the amounts of energetic efficiencies of milk. **Research Bulletin**, v. 285, 1938.

período de separação, por exemplo, pode ocasionar estresse para a mãe e para os filhotes e assim alterar a quantidade de leite (HANWELL; LINZELL, 1972; ROMERO; CAÑAS; BALDWIN, 1975) e interferir em sua descida devido à inibição da ocitocina (TREADWAY; LEDERMAN, 1986).

Além disso, deve-se ponderar que a quantidade de leite residual no momento em que os filhotes são separados de suas mães ou após os filhotes terem retornado para mamar por uma hora pode alterar a quantificação final (ROMERO; CAÑAS; BALDWIN, 1975). Ainda, deve-se levar em conta que a perda de peso dos filhotes e das mães pela excreção fecal e urinária, aliada ao gasto de consumo de energia durante a mamada (REDDY; DONKER, 1965; HANWELL; LINZELL, 1972; ROMERO; CAÑAS; BALDWIN, 1975; RUSSELL, 1980), pode promover influência direta na quantificação do leite. Finalmente, deve-se também ser destacado que os métodos existentes para a quantificação de leite produzido são muito trabalhosos e que, por isto, podem estar sujeitos a erros sistemáticos.

Considerando todas estas limitações ao se empregar a metodologia para a quantificação do volume de leite de ratas, disponíveis até o momento, este grupo de pesquisa vem procurando padronizar um novo procedimento que permita maior exatidão na coleta de leite de ratas. Assim, foi utilizado um equipamento, que funcionaria analogamente à ordenhadeira mecânica de vacas, que foi criado neste laboratório e empregado para realização de coleta do leite de ratas (SOUSA, 2004).

Optou-se por realizar a coleta do leite quatro horas após a separação da mãe de sua ninhada, pois tal procedimento permite que se forme um volume lácteo considerável nas glândulas mamárias. Com o objetivo de auxiliar a remoção do leite, vinte minutos antes foi administrado, nas ratas, por via intraperitoneal, 3 UI de ocitocina, uma vez que esta substância acelera a remoção do leite, não interferindo no seu volume (MORAG, 1970).

A escolha de domperidona como “controle positivo” foi devido ao fato desta ser um antagonista de dopamina, principal neurotransmissor envolvido na inibição da secreção de prolactina (WAN et al., 2008), e assim, consequentemente, atua aumentando a produção láctea, fato muito bem documentado em mulheres (ASZTALOS, 2012; PAUL et al., 2015). Portanto, a dose de domperidona, aqui empregada, baseou-se em um estudo realizado em mulheres lactantes, o qual relata o aumento na produção de leite materno com a dose de 30 mg/dia (KNOPPERT et al., 2013). Assim, extrapolou-se a dose de domperidona empregada em mulheres,

seguindo-se o mesmo procedimento descrito para o cálculo das doses do extrato de fenogrego em ratos (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008). Dessa maneira, empregou-se a dose de 3 mg/kg/dia do medicamento.

Em relação a quantificação de leite, foi possível observar que a comparação entre os dias de coleta (DPN14 e DPN19), não revelou haver aumento no volume de leite. Quando esta mesma comparação foi feita entre os grupos, os resultados mostraram que embora aquelas fêmeas tratadas tanto com o fenogrego, quanto com a domperidona, tenham apresentado um aumento na produção láctea, estes valores não diferiram significativamente da produção de leite de ratas do grupo controle. Pouco pode ser especulado sobre estes resultados, principalmente no que se refere a não observação do efeito lactogênico da domperidona que, como já dito anteriormente, foi bem caracterizado em mulheres (DA SILVA et al., 2001). Portanto, neste momento pode-se sugerir, apenas, que seja necessária uma dose mais elevada de domperidona do que as aqui empregadas para se observar um efeito galactogogo significativo. Essa hipótese poderá ser elucidada por experimentos futuros, empregando-se doses diferentes de domperidona e avaliando-se os níveis sanguíneos de prolactina destas ratas.

Em relação ao fenogrego, embora a esse seja atribuído efeito galactogênico e, portanto, empregado por mulheres lactantes em várias partes do mundo, até o momento não existem estudos controlados, mesmo em humanos, que comprovem o aumento na produção de leite por meio de seu uso (SACHS, 2013). De fato, em um único estudo, encontrado na literatura, verificou-se que mulheres que empregavam a planta mostraram aumento não estatisticamente significativo na produção láctea, quando comparada às mães que não recebiam o fenogrego (SWAFFORD; BERENS, 2000). Da mesma maneira, as ratas tratadas com a planta, no presente estudo, embora apresentassem maior média de produção de leite, não diferiu significativamente das fêmeas que não receberam o extrato da semente do fenogrego. Portanto, igualmente ao que foi teorizado para a domperidona, é possível que a dose do extrato da planta empregada para este estudo (370mg/kg), não tenha sido suficiente para produzir o efeito desejado. Portanto, também serão necessários novos estudos, com doses mais elevadas, para verificar se, de fato, a *Trigonella foenum-graecum* teria efeito galactogogo.

Com relação à metodologia aqui proposta para a quantificação da produção de leite em ratas, esta pareceu bastante adequada, apresentando vantagens em

relação àqueles procedimentos até então empregados. Além disto, neste processo de avaliação, proposto na presente pesquisa, é possível obter quantidades razoáveis de leite; assim, este procedimento permite duas avaliações: a medida do leite obtido e a obtenção de amostras de leite para o estudo qualitativo do leite. No entanto, alguns ajustes deverão ser realizados no que se refere, principalmente, ao som alto, emitido pela bomba de vácuo para produzir a sucção, o que provavelmente causou efeito estressor nas mães. Além disso, algumas adequações em relação ao manuseio das ratas, como, por exemplo, a habituação desta fêmea várias vezes no aparelho e a mimetização do procedimento, antes dos dias da coleta, são manipulações que devem ser levados em consideração para estudos futuros.

A despeito de haver amplo uso popular do fenogrego, para diversas finalidades, tais como antipirético, anti-helmíntico, estimulante do apetite, protetor gástrico, anti-diabetogênico e principalmente galactogênico (TOPPO; AKHAND; PATHAK, 2009), são escassos os estudos referentes à avaliação de sua toxicidade. No entanto, no que se refere à toxicologia perinatal do fenogrego, há alguns trabalhos que mostram claramente que o consumo da planta na gestação promove efeitos embriotóxicos e teratogênicos. Um estudo conduzido por Skalli (2006), no Marrocos, associou a malformação em uma criança (hidrocefalia, espinha bífida e fenda palatina) com o consumo materno de sementes de fenogrego, usado para estimular o apetite e para dor de estômago.

Posteriormente, outras pesquisas, realizadas em camundongos, mostraram que a administração do fenogrego durante o período gestacional, produziu diminuição do tamanho da ninhada, aumento da mortalidade e redução do peso corpóreo, bem como, casos de malformação (espinha bífida) sem nenhum sinal de toxicidade materna (KHALKI et al., 2010). Este mesmo grupo de pesquisadores (KHALKI et al., 2012), a seguir, evidenciaram, também em camundongos, que proles de mães tratadas com o fenogrego durante a gestação, apresentaram retardo no crescimento e déficits neurocomportamentais. Uma pesquisa, na qual foram tratadas coelhas com a *Trigonella foenum-graecum* durante a gestação, também ratificou os achados em camundongos, verificando-se retardo no crescimento fetal, queda no peso do concepto e da placenta (KASSEM et al., 2006). Mais ainda, este mesmo estudo mostrou que o fenogrego produziu efeito antifertilidade em fêmeas e efeitos tóxicos em machos, como redução dos testículos e lesões em túbulos seminíferos e tecido intersticial.

Uma minuciosa busca na literatura revelou não existir nenhuma avaliação da toxicidade da *Trigonella foenum-graecum* durante a lactação, assim, o segundo objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade, tanto na lactante exposta à planta, quanto em sua prole.

A toxicidade sistêmica se manifesta por meio da redução nos consumos de água e ração, alterações de comportamento, apatia e má condição da pelagem, como a presença de pêlos arrepiados (MELLO, 2001), além da redução na massa corporal dos animais experimentais (RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002) e de alterações hematológicas e da bioquímica sanguínea (GONZALEZ; SILVA, 2003). Na presente pesquisa, a administração do fenogrego às fêmeas lactantes dos diferentes grupos tratados com a planta, não induziu alterações sistêmicas significantes em relação aos animais do grupo não tratado com a planta. Assim, os dados provenientes do peso, do consumo de água e de ração de ratos dos diferentes grupos experimentais, não revelaram qualquer diferença entre os valores dos animais do grupo controle comparado àqueles oriundos de lactantes dos três diferentes grupos experimentais. Da mesma forma, não se observou qualquer alteração clínica durante todo o período de lactação (21 dias). Além disso, o hemograma e bioquímica sérica dos ratos dos diferentes grupos avaliados também se mostraram dentro das variações fisiológicas normais para esta espécie (SANTOS, 2010).

Com relação aos resultados da bioquímica das lactantes, vale comentar sobre alguns parâmetros aqui encontrados. Não foram observadas diferenças nos níveis séricos, tanto de glicose, como de colesterol e triglicérides, entre fêmeas do grupo controle com aquelas que receberam o fenogrego. Essa observação tem importância e contrapõe o que foi proposto por Yadav e Baquer (2014), os quais, neste artigo de revisão referenciam vários estudos, de diferentes pesquisadores, que indicam que tanto no estudo experimental, em animais de laboratório, quanto em pacientes humanos, diabéticos ou não, houve um decréscimo significativo de glicose, o que aludiria ao uso da *Trigonella foenum-graecum* com finalidade antihiperglicêmica, portanto, sendo indicado para pacientes com diabetes. Ainda, nesta mesma revisão (YADAV; BAQUER, 2014), estes autores enumeram algumas pesquisas, que atribui efeito antilipidêmico ao fenogrego. Difícil conjecturar sobre a discrepância dos dados obtidos na presente pesquisa e aqueles estudos atribuindo efeito antidiabetogênico e antilipêmico da *Trigonella foenum-graecum*.

Tendo em vista, que este trabalho é o primeiro a avaliar a administração da planta a lactantes, é possível considerar que tais discrepâncias estejam vinculadas à condição fisiológica dos animais (lactantes).

Os resultados descritos anteriormente descartaram efeito tóxico direto do fenogrego sobre as mães lactantes, pelo menos nas doses utilizadas nesse trabalho. No entanto, como discutido anteriormente, a prole poderia ser exposta aos componentes da planta durante o aleitamento materno, portanto, nosso próximo passo foi determinar possíveis alterações nos filhotes, decorrentes da exposição indireta ao fenogrego.

O leite materno é uma mistura complexa cuja composição é dependente das atividades de secreção da glândula mamária e dos processos de transporte nela existentes, refletindo as necessidades nutricionais dos neonatos mamíferos (MCMANAMAN; NEVILLE, 2003). No entanto, o leite pode também ser uma via de excreção materna de substâncias tóxicas (BEGG et al., 2002). Portanto, diversas substâncias químicas podem ser transferidas pelo leite, representando uma importante fonte de intoxicação para o neonato. Como exemplos de toxinas encontradas em plantas temos alcalóides pirrolizidínicos e ptaquilosídeos (MEDEIROS; GÓRNIK; GUERRA, 1999, SANDINI et al., 2014); hormônios como a medorxiprogesterona (SAXENA; SHRIMANKER; GRUDZINSKAS, 1977) e também muitos contaminantes ambientais, como o mercúrio e o chumbo, que podem causar retardo no desenvolvimento da prole (OSKARSSON; PALMINGER-HALLEN; SUNDBERG, 1995).

Deve-se ressaltar que a lactação, é um período no qual os recém-nascidos ainda estão mais sensíveis, que os adultos, aos efeitos tóxicos das substâncias, já que se sabe que o neonato tem baixa capacidade de biotransformar os xenobióticos pela imaturidade dos sistemas enzimáticos (ALCORN; MCNAMARA, 2003).

A literatura mostra que a administração de fenogrego causa diminuição do peso da prole desde o nascimento até a juventude (DPN28), evidenciando retardo no crescimento intra-uterino (KHALKI et al., 2010 e 2012). Neste estudo, verificou-se, a partir do DPN43, diminuição significativa no peso corpóreo da prole de fêmeas, principalmente naquelas cujas mães foram tratadas com a maior dose da planta (FE 740), alteração que perdurou até a idade adulta (DPN70). Um dos componentes da *Trigonella foenum graecum* é a isoflavona, substância com atividade estrogênica (SREEJA; ANJU, 2010). Uma vez que substâncias com atividade estrogênica

modulam o metabolismo de glicose e lipídeos, induzindo perda de peso (CEDERROTH; NEF, 2009), e que a isoflavona pode ser veiculada pelo leite (DOERGE, 2011), é possível especular que tal fenômeno esteja vinculado a este princípio ativo. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para corroborar essa hipótese, visto que não observou-se alterações significativas tanto na descida testicular quanto na abertura vaginal; processos de maturação sexual iniciados no começo da puberdade e que resultam de um complexo de interações entre o hipotálamo, pituitária anterior e órgãos sexuais secundários (SMITH; DAMASSA; DAVIDSON, 1977).

Os parâmetros do desenvolvimento físico estão relacionados com o fator de crescimento epidérmico (EGF). De fato, estudos realizados em ratos e hamsters mostraram que a administração do EGF foi capaz de acelerar a abertura dos olhos e a erupção dos dentes incisivos, atrasar a abertura do conduto auditivo e da abertura vaginal (CALAMANDREI; ALLEVA, 1989; SMART et al., 1989). Os dados aqui obtidos mostraram que a administração das diferentes doses de fenogrego durante a lactação não provocou mudanças em nenhum dos parâmetros do desenvolvimento físico. Dessa forma, é possível sugerir que os lactentes de mães tratadas com o fenogrego não foram expostos a princípios ativos que interferissem no EGF.

A avaliação dos testes reflexológicos é de extrema importância, pois estes refletem a maturação do sistema nervoso central (SNC). O teste de preensão palmar, por exemplo, é um reflexo motor primitivo que envolve a maturação do SNC e sistema periférico (DORCE et al., 2009). O reflexo de endireitamento postural, de endireitamento no ar, bem como o de geotaxia negativa são testes que refletem a maturação do sistema vestibular e do cerebelo (CHIAVEGATTO; OLIVEIRA; BERNARD, 1997; ZHANG et al., 2010). Em particular, a regulação da postura envolve três sistemas periféricos, o sistema vestibular, o exteroceptivo e o proprioceptivo, além da participação dos estímulos do sistema visual para obtenção da postura (ALTMAN; SUDARSHAN, 1975).

Os dados obtidos não mostraram diferenças significantes em nenhum dos parâmetros reflexológicos, indicando que o tratamento com as diferentes doses de fenogrego durante o período pós-natal não promoveu danos no SNC da prole. No entanto, vale a pena ressaltar que, recentemente um estudo utilizando 1g/kg/dia de fenogrego durante o período pré-natal, causou atraso no endireitamento postural e geotaxia negativa na prole de camundogos (KHALKI et al., 2013). Pode-se dizer

que essa divergência de resultados pode ser devido a diferentes fatores como, a espécie animal utilizada, a dose e o período de tratamento, uma vez que, no presente estudo o tratamento ocorreu no período pós-natal, ou seja durante a lactação.

As interações entre mãe-filhote no *Rattus norvegicus* são compostos por uma série de comportamentos, dentre estes está a vocalização ultrassônica. Assim, por exemplo, a emissão de um som de alta frequência (40-50 kHz) emitido pelo filhote, faz com que a mãe verifique que o filhote desviou-se do ninho, permitindo que essa possa recuperá-lo (FARREL; BATTES, 2000). Assim sendo, estas chamadas parecem ser de grande valor para a sobrevivência do filhote. O teste de vocalização ultrassônica permite detectar a redução da comunicação do filhote com suas mães; portanto, se fosse detectada a alteração no padrão de vocalização de filhotes, poderia se supor que algum componente presente no fenogrego, excretado pelo leite promoveria alteração nesse comportamento do lactente, caracterizando possível neurotoxicidade. De fato, vários estudos, com diferentes xenobióticos como por exemplo, o flúor (FLACE et al., 2010) ou casos de transtornos neurológicos como o autismo (KIRSTEN, 2013) mostraram prejuízo na vocalização da prole. No entanto, nenhuma alteração foi detectada na avaliação da vocalização ultrassônica de filhotes de ratas, dos diferentes grupos tratados com a planta durante a lactação.

O andar adulto sobre as quatro patas dos roedores, principalmente do rato, torna-se predominante entre os 12 e 13 dias de vida (ALTMAN; SUDARSHAN, 1975), ou seja, quando o animal tem seus olhos abertos, ele passa a andar de maneira normal, sem encostar o ventre na superfície. Assim, é natural que com a medida que a idade passa, a atividade locomotora aumenta. Dessa forma, foi objetivo também neste estudo, avaliar a atividade locomotora na infância durante diferentes dias por meio do teste de campo aberto. Para tanto foi utilizado o aparato conhecido como campo aberto, que permite avaliar alterações na atividade geral e motora do animal quando submetido a manipulações experimentais. Por meio deste teste é possível verificar os efeitos farmacológicos e toxicológicos de uma determinada substância.

Assim, este teste foi aplicado em nosso estudo para avaliarmos os efeitos do fenogrego sobre a atividade motora da prole de ratas tratadas com diferentes doses de extrato de fenogrego durante a lactação. Khalki et al. (2012, 2013) demonstraram que a prole de camundongas, tratadas durante o período pré-natal com o fenogrego

nas doses de 500 e 1000 mg/kg/dia, apresentaram diminuição de atividade locomotora quando testadas no campo aberto. No entanto, nesta pesquisa, verificou-se que o fenogrego administrado às lactantes não alterou a atividade motora da prole avaliada, tanto durante a infância, bem como na idade adulta.

Desta maneira, pode-se sugerir que a ausência de alteração na atividade motora dos animais tratados com fenogrego em comparação ao estudo citado deve-se principalmente a três fatores: o primeiro é a espécie utilizada, que foi ratos, enquanto que os estudos existentes na literatura foram conduzidos, empregando-se camundongos como sujeito experimental. O segundo fator é o período de tratamento da mãe juntamente com a via de exposição do filhote ao fenogrego (gestação x lactação). Deste modo, pode-se sugerir que o(s) princípio(s) ativo(s) do fenogrego responsável(is) pela neurotoxicidade observada pelo estudo conduzido por Khalki et al. (2012), podem ter passagem transplacentária. Sendo que, na presente pesquisa, a administração do fenogrego às mães ocorreu somente durante a lactação, portanto, é possível supor que esta(s) substância(s) tóxicas podem não ser veiculadas pelo leite.

Finalmente, deve-se considerar a dose e concentrações de princípios ativos diferentes nestes dois estudos. É razoável pensar que a maior dose aqui utilizada, (740 mg/Kg/dia), seja baixa quando comparada àquelas empregadas na gestação (KHALKI et al., 2012, 2013).

Por fim, para que fosse descartada qualquer dúvida quanto possíveis alterações no comportamento da prole em decorrência do tratamento de suas genitoras com o fenogrego, os mesmos animais foram avaliados no campo aberto novamente na fase adulta. E de fato, o fenogrego não interferiu na atividade motora do animal, seja a curto ou longo prazo.

Em resumo, tendo em vista a pouca informação sobre os efeitos diretos do fenogrego sobre as lactantes e sua possível influência no desenvolvimento da prole lactente, o presente projeto buscou fazer um estudo sistemático para verificar alguns dos resultados descritos na literatura. Assim, esta pesquisa permitiu pela primeira vez, mostrar que o fenogrego não promoveu o atribuído efeito galactagogo em ratas nas diferentes doses utilizadas.

Este resultado corrobora a suposição de que os trabalhos que indicam o efeito estimulante de produção láctea da planta carecem de um maior detalhamento experimental. No que diz respeito aos possíveis efeitos tóxicos do fenogrego, não observamos nenhuma alteração significativa nas mães lactantes. Já no caso da prole, notamos alteração apenas na perda de peso da prole feminina, ou seja, de forma global nossos dados não sugerem efeitos tóxicos diretos e indiretos do fenogrego. Tendo em vista os dados da literatura sobre alterações no desenvolvimento fetal devido à exposição ao fenogrego durante a gestação, nossos dados sugerem que não há princípios ativos tóxicos no fenogrego, ou que, se houver, estes não devem ser veiculados em quantidades significantes pelo leite.

Portanto, apesar de serem necessários novos experimentos utilizando doses maiores da planta para corroborar de forma irrefutável os dados descritos acima, nosso trabalho suporta a ideia de que o uso do fenogrego no período de lactação não representa grande risco para a prole e lactantes.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A administração de fenogrego durante a lactação (DPN1 a DPN21) em ratas:

- Não causou aumento no volume de leite destes animais expostos ao extrato aquoso da planta, na dose de 370 mg/kg; durante a lactação;
- Não causou toxicidade sistêmica, nem alteração no ganho de peso, bem como no consumo de água e ração das ratas expostas ao fenogrego durante a lactação (DPN1 a DPN21);
- Não alterou a vocalização da prole de ratas expostas ao fenogrego durante a lactação (DPN1 a DPN21);
- Não modificou o desenvolvimento físico e reflexológico da prole de ratas expostas ao fenogrego durante a lactação (DPN1 a DPN21);
- Casou diminuição do peso corpóreo da prole feminina, evidenciada após a puberdade, de ratas expostas a maior dose fenogrego (740 mg/kg) durante a lactação (DPN1 a DPN21);
- Não promoveu mudanças na atividade motora da prole durante a infância, bem como na idade adulta, de ratas expostas ao fenogrego (740 mg/kg) durante a lactação (DPN1 a DPN21).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABASCAL, K.; YARNELL, E. Botanical galactagogues. **Alternative and Complementary Therapies**, v. 14, n. 6, p. 288–294, 2008.

ACADEMY OF BREASTFEEDING MEDICINE PROTOCOL COMMITTEE. ABM clinical protocol# 9: use of galactagogues in initiating or augmenting the rate of maternal milk secretion (First revision January 2011). **Breastfeeding Medicine**, v. 6, n. 1, p. 41-49, 2011.

ABO EL-NOR, S. A. H.; KHATTAB, H. M.; AL-ALAMY, H. A.; SALEM, F. A.; ABDON, M. M. Effect of some medicinal plants seeds in the rations on the productive performance of lactating buffaloes. **International Journal of Dairy Science**, v. 2, n. 4, p. 348-355, 2007.

AGNISH, N. D.; KELLER, K. A. The rationale for culling of rodent litters. **Toxicological Sciences**, v. 38, n. 1, p. 2–6, 1997.

ALCORN, J.; MCNAMARA, P. J. Pharmacokinetics in the newborn. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 29, n. 55, p. 667-686, 2003.

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

AVENDAÑO, P.; MATSON, D. O.; LONG, J.; WHITNEY, S.; MATSON, C.; PICKERING, L. K. Costs associated with office visits for diarrhea in infants and toddlers. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 12, p. 897–902, 1993.

ASZTALOS, E. V.; CAMPBELL-YEO, M.; KISS, A.; KNOPPERT, D. C.; ITO, S. Enhancing breast milk production with Domperidone in mothers of preterm neonates (EMPOWER trial). **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 12, n. 1, p. 87, 2012.

BABICKY, A.; OSTADALOVA, I.; PARIZEK, J.; KOLAR J.; BIBR, B. Use of radioisotope techniques for determining the weaning period in experimental animals. **Physiologia Bohemoslovaca**, v. 19, p. 457–467, 1970.

BACHRACH, V. R. G.; SCHWARZ, E.; BACHRACH, L. R. Breastfeeding and the risk of hospitalization for respiratory disease in infancy: a meta-analysis. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 157, p. 237–243, 2003.

BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 1, p. 49-74, 2013.

BASCH, E.; ULBRICHT, C.; KUO, G.; SZAPARY, P.; SMITH, M. Therapeutic applications of fenugreek. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 1, p. 20–27, 2003.

BEGG, E. J.; DUFFULL, S. B.; HACKETT, L. P.; ILETT, K. F. Studying drugs in human milk: time to unify the approach. **Journal of Human Lactation**, v. 18, n. 4, p. 323-332, 2002.

BERNIER, M. O.; PLU-BUREAU, G.; BOSSARD, N.; AYZAC, L.; THALABARD, J. C. Breastfeeding and risk of breast cancer: a meta-analysis of published studies. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 4, p. 374-386, 2000.

BETZOLD, C. M. Galactagogues. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 49, n. 2, p. 151– 154, 2004.

BINNS, C.; LEE, M. K. Exclusive breastfeeding for six months : the WHO six months recommendation in the Asia Pacific Region. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition** , v. 23, p. 344–350, 2014.

BORCH-JOHNSEN, K.; MANDRUP-POULSEN, T.; ZACHAU-CHRISTIANSEN, B.; JONER, G.; CHRISTY, M.; KASTRUP, K.; NERUP, J. Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus. A hypothesis. **Lancet**, v. 2, p. 1083–1085, 1984.

BRUNELLI, S. A.; HOFER, M. A. Development of ultrasonic vocalization responses in genetically heterogeneous National Institute of Health (N:NIH) rats. II. Associations among variables and behaviors. **Developmental Psychobiology**, v. 29, p. 517–528, 1996.

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

CEDERROTH, C. R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: a review. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 304, n. 1, p. 30-42, 2009.

CHAVES, R. G.; LAMOUNIER, J. A.; CÉSAR, C. C. Medicamentos e amamentação: atualização e revisão aplicadas à clínica materno-infantil. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 25, n. 3, p. 276–288, 2007.

CHAVES, R. G.; LAMOUNIER, J. A.; SANTIAGO, L. B.; VIEIRA, G. O. Uso de galactagogos na prática clínica para o manejo do aleitamento materno. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 18, n. 4-S1, p. 146-153, 2008.

CHIAVEGATTO, S.; OLIVEIRA, C. A.; BERNARD, 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, n. 6, p. 511–6, 1997.

DA SILVA, O. P.; KNOPPERT, D. C.; ANGELINI, M. M.; FORRET, P. A. effect of domperidone on milk production in mothers of premature newborns: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Canada Medical Association Journal**, v. 164, n. 1, p. 17-21, 2001.

DAMANIK, R.; WAHLQVIST, M. L.; WATTANAPENPAIBOON, N. Lactagogue effects of Torbangun, a Batakese traditional cuisine. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 267–274, 2006.

DENNEHY, C.; TSOUROUNIS, C.; BUI, L.; KING, T. L. The use of herbs by California Midwives. **JOGNN - Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing**, v. 39, p. 684–693, 2010.

DEWEY, K. G.; HEINIG, M. J.; NOMMSEN-RIVERS, L. A. Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants. **Journal of Pediatrics**, v. 126, p. 696–702, 1995.

DEWEY, K. G.; HEINIG, M. J.; NOMMSEN-RIVERS, L. A. Maternal weight-loss patterns during prolonged lactation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 162-166, 1993.

DIXIT, P.; GHASKADBI, S.; MOHAN, H.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant properties of germinated fenugreek seeds. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 977–983, 2005.

DOERGE, D. R.; Bioavailability of soy isoflavones through placental/lactational transfer and soy food. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, n. 2, p. 145-147, 2011.

DORCE, A. L.; BELLOT, R. G.; DORCE, V. A.; NENCIONI, A. L. Effects of prenatal exposure to Tityus bahiensis scorpion venom on rat offspring development. **Reproductive Toxicology**, v. 28, p. 365–370, 2009.

FARRELL, W. J.; ALBERTS, J. R. Ultrasonic vocalizations by rat pups after adrenergic manipulations of brown fat metabolism. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, n. 4, p. 805-813, 2000.

FERGUSON, D. M.; WOODWARD, L. J. Breast feeding and later psychosocial adjustment. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 13, p. 144–157, 1999.

FLACE, P.; BENAGIANO, V.; VERMESAN, D.; SABATINI, R.; INCHINGOLO, A. M.; , AUTERI, P.; AMBROSI, G.; TARULLO, A.; CAGIANO, R. Effects of developmental fluoride exposure on rat ultrasonic vocalization, acoustic startle reflex and pre-pulse inhibition. **European Review for Medical and Pharmacological Science**, v. 14, n. 6, p. 507-512, 2010.

FORINASH, A. B.; YANCEY, A. M.; BARNES, K. N.; MYLES, T. D. The Use of Galactogogues in the breastfeeding mother. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 46, n. 10, p. 1392-1404, 2012.

FRUSSA-FILHO, R. Assessment of motor function in rodents behavioral models sharing simplicity and multifaceted applicability – part 1: The open field test. In: ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. **Animal model as tools in ethical biomedical research**. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2010. p.286–303.

GABAY, M. P. Galactogogues: medications that induce lactation. **Journal of Human Lactation**, v. 18, n. 3, p. 274–279, 2002.

GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p.179-198.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. **Journal of Comparative Psychology**, v. 22, p. 345–352, 1936.

HANWELL, A.; LINZELL, J. L. A simple technique for measuring the rate of milk secretion in the rat. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 43, p. 259–270, 1972.

HEALTH CANADA. **Domperidone maleate—association with serious abnormal heart rhythms and sudden death (cardiac arrest)**. 2015. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/medeff/advisories-avis/prof/2012/domperidone_hpc-cps-eng.php>. Acesso em: 14 fev. 2015.

HEYSER, C. J. Assessment of developmental milestones in rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, p. 8.18.1-8.18.15, 2003.

HOWIE, P. W.; FORSYTH, J. S.; OGSTON, S. A.; CLARK, A.; FLOREY, C. D. Protective effect of breast feeding against infection. **BMJ**, v. 300, n. 6716, p. 11-16, 1990.

HUGGINS, K. E. Fenugreek: one remedy for low milk production. [2003?]. Disponível em: <<http://www.breastfeedingonline.com/fenuhugg.shtml#sthash.f9DCbEf4.dpbs>>. Acesso em: 03 fev.2015

INSEL, T. R.; HILL, J. L.; MAYOR, R. B. Rat pup ultrasonic isolation calls: possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 1263–1267, 1986.

ISE, S.; NAGANO, N.; OKUDA, S.; OHTA, H. Corticotropin-releasing factor modulates maternal separation-induced ultrasonic vocalization in rat pups via activation of CRF1 receptor. **Brain Research**, v. 1234, p. 59–65, 2008.

TERUYA, K.; COUTINHO, S. B. Sobrevivência infantil e aleitamento materno. In: REGO, J. D. **Aleitamento materno**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2006. p.16.

KASSEM, A.; AGHBARI, A.; MOLHAM, A. H.; AL-MAMARY, M. Evaluation of the potential antifertility effect of fenugreek seeds in male and female rabbits. **Contraception**, v. 73, n. 3. p. 301-306, 2006.

KENNEDY, K. I.; VISNESS, C. M. Contraceptive efficacy of lactational amenorrhoea. **The Lancet**, v. 339, n. 8787, p. 227-230, 1992

KHALKI, L.; BA-M'HAMED, S. ; BENNIS, M.; CHAIT, A.; SOKAR, Z. Evaluation of the developmental toxicity of the aqueous extract from *Trigonella foenum-graecum* (L.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 321–325, 2010.

KHALKI, L.; BA-M'HAMED, S. ; SOKAR, Z.; BENNIS, M.; VINAY, L.; BRAS, H.; VIEMARI, J. C. Prenatal exposure to fenugreek impairs sensorimotor development and the operation of spinal cord networks in mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–12, 2013.

KHALKI, L.; BENNIS, M.; SOKAR, Z.; BA-M'HAMED, S. The developmental neurobehavioral effects of fenugreek seeds on prenatally exposed mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 672–7, 2012.

KHOSLA, P.; GUPTA, D. D.; NAGPAL, R. K. On blood glucose in normal and diabetic rats. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 173–174, 1995.

KIRSTEN, T. B. **Lipopolissacarídeo no início do período pré-natal como modelo experimental de autismo e prejuízos dopaminérgicos estriatais**. 2012. 194 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária Zootécnica, Universidade de São Paulo, 2012.

KNOPPERT, D. C.; PAGE, A.; WARREN, J.; SEABROOK, J. A.; CARR, M.; ANGELINI, M.; KILLICK, D.; SILVA, O. P. The effect of two different domperidone doses on maternal milk production. **Journal of Human Lactation**, v. 29, n. 1, p. 38–44, 2013.

LEUNG, A. K. C.; SAUVE, R. S. Breast is best for babies. **Journal of the National Medical Association**, v. 97, n. 7, p. 1010–9, 2005.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 46, p. 321–340, 1990.

MCLEOD, D.; PULLON, S.; COOKSON, T.; Factors influencing continuation of breastfeeding in a cohort of women. **Journal of Human Lactation**, v. 18, n. 4, p. 335-343, 2002.

MCMANAMAN, J. L.; NEVILLE, M. C. Mammary physiology and milk secretion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 5, p. 629-641, 2003.

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

MAYER, E. J.; HAMMAN, R. F.; GAY, E. C.; LEZOTTE, D. C.; SAVITZ, D. A.; KLINGENSMITH, G. J. Reduced risk of IDDM among breast-fed children. The Colorado IDDM registry. **Diabetes**, v. 37, p. 1625–1632, 1988.

MEDEIROS, R. M. T.; GORNIK, S. L.; GUERRA, J. L. Effects of milk from goat fed *Crotalaria spectabilis* seeds on growing rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 1 - 9, 1999.

MELLO, F. B. Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**. UFRGS, v. 29, n. 2, p. 153-154, 2001.

MOHAMED, A. H.; EL-SAIDY, B. E. Influence of some medicinal plants mixtures as feed additives on balady lactating goats performance and some feeding utilization. **The Journal of Agricultural Science**, v. 29, p. 185, 2004.

MORAG, M. Estimation of milk yield in the rat. **Laboratory Animals**, v. 4, p. 259–272, 1970.

MORAG, M.; POPLIKER, F.; YAGIL, R. Effect of litter size on milk yield in the rat. **Laboratory Animals**, v. 9, n. 1, p. 43–47, 1975.

OKAMOTO, Y.; OGURA, P. L. Antiviral factors in human milk: implications in respiratory syncytial virus infection. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v. 351, p. 137–143, 1989.

OSKARSSON, A.; PALMINGER-HALLEN, I.; SUNDBERG, J. Exposure to toxic elements via breast milk. **Analyst**, v. 120, n. 3, p. 765-770, 1995.

PAUL, C.; ZÉNUT, M.; DORUT, A.; COUDORÉ, M. A.; VEIN, J.; CARDOT, J. M.; BALAYASSAC, D. Use of Domperidone as a Galactagogue Drug A Systematic Review of the Benefit-Risk Ratio. **Journal of Human Lactation**, v. 31, n. 1, p. 57-63, 2015.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3–33, 2003.

PULLAN, C. R.; TOMS, G. L.; MARTIN, A. J.; GARDNER, P. S.; WEBB, J. K.; APPLETON, D. R. Breast-feeding and respiratory syncytial virus infection. **British Medical Journal**, v. 281, p. 1034–1036, 1980.

RAZA, M.; AL-SHABANAH A. O.; EI-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED A. A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Sciences Pharmaceutica**, v. 70, p.135-145, 2002.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **Faseb Journal**, v. 22, n. 3, p. 659–661, 2008.

REDDY, R. R.; DONKER, J. D. Lactation studies. VI. Effects of different intervals between nursing and duration of suckling on rate of milk production in sprague-dawley rats in the first lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 48, p. 978–982, 1965.

REDMAN, R. S.; SWENEY, L. R. Changes in diet and patterns of feeding activity of developing rats. **The Journal of Nutrition**, v. 106, p. 615–626, 1976.

RIORDAN, J. M. The cost of not breastfeeding: a commentary. **Journal of Human Lactation**, v. 13, p. 93–97, 1997.

ROMERO, J. J.; CAÑAS, R.; BALDWIN, R. L. A technique for estimating milk production in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 105, p. 413–420, 1975.

RUIZ-PALACIOS, G. M.; CALVA, J. J.; PICKERING, L. K.; LOPEZ-VIDAL, Y.; VOLKOW, P.; PEZZAROSSO, H.; WEST S. Protection of breast-fed infants against *Campylobacter diarrhea* by antibodies in human milk. **The Journal of Pediatrics**, v. 116, p. 707–713, 1990.

RUSSELL, J. A. Milk yield, suckling behaviour and milk ejection in the lactating rat nursing litters of different sizes. **The Journal of Physiology**, v. 303, p. 403–415, 1980.

SANDINI, T. M.; UDO, M. S.; REIS-SILVA, T. M.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. D. S. Prenatal exposure to integerrimine N-oxide impaired the maternal care and the physical and behavioral development of offspring rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 36, p. 53-63, 2014

SACHS, H. C. The transfer of drugs and therapeutics into human breast milk: an update on selected topics. **Pediatrics**, v. 132, p. e796-809, 2013

SANTOS, M. R. V.; SOUZA, V. H.; MENEZES, I. A. C.; BITENCURT, J. L.; REZENDE-NETO, J. M.; BARRETO A. S.; CUNHA, F. A.; MARÇAL, R. M.; TEIXEIRA-SILVA, F.; QUÍNTANS-JÚNIOR, L. J.; BARBOSA, A. P. O. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 6, n. 10, p. 1-6, 2010.

SAXENA, B. N.; SHRIMANKER, K.; GRUDZINSKAS, J. G. Levels of contraceptive seroids in breast milk and plasma of lactating women. **Contraception**, v. 16, n. 6, p. 605-613, 1977

SCHAFFIR, J.; CZAPLA, C. Survey of lactation instructors on folk traditions in breastfeeding. **Breastfeeding Medicine**, v. 7, n. 4, p. 230-233, 2012.

SIM, T. F.; SHERRIFF, J.; HATTINGH, H. L.; PARSONS, R.; TEE, L. B. The use of herbal medicines during breastfeeding: a population-based survey in Western Australia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 317, 2013.

SKALLI, S. Malformations associées à la prise de fenugrec au cours de la grossesse. **Bulletin d'Informations de Pharmacovigilance**, v. 3, 2006. Disponível em: <http://pharmacies.ma/pharmacie/upload/Sections/file/bip_novembre_2006.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2015.

SMART, J. L.; DA SILVA, V. A.; MALHEIROS, L. R.; PAUMGARTTEN, F. J.; MASSEY, R. F. Epidermal growth factor advances some aspects of development but retards others in both rats and hamsters. **Journal of Developmental 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 rat. **Endocrinology**, v. 101, p. 173–180, 1977.

SOUSA, A. B. **Avaliação dos efeitos tóxicos do cianeto e do tiocianeto no período perinatal. Estudo em ratos**. 2004. 225 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SREEJA, S.; ANJU, V. S. *In vitro* estrogenic activities of fenugreek *Trigonella foenum graecum* seeds. **Indian Journal of Medical Research**, v. 131, p. 814–819, 2010.

SRINIVASAN, K. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): a review of health beneficial physiological effects. **Food Reviews International**, v. 22, p. 203–224, 2006.

SUBRAMANIAN, M. G.; ABEL, E. L. Alcohol inhibits suckling-induced prolactin release and milk yield. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 5, n. 2, p. 95–98, 1988.

SUJA PANDIAN, R.; ANURADHA, C. V.; VISWANATHAN, P. Gastroprotective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) on experimental gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 278, p. 393–397, 2002.

SUMAYYA, A. R.; AMATULLAH, N. Screening and biochemical quantification of phytochemicals in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 165-169, 2012.

SWAFFORD, S.; BERENS P. Effect of fenugreek on breast milk production. **Academy of Breastfeeding Medicine News and Views**, v. 6, n. 3, p. 21, 2000. Trabalho apresentado a 5th International Meeting of the Academy of Breastfeeding Medicine.

SZUCS, K. A.; AXLINE, S. E.; ROSENMAN, M. B. Induced lactation and exclusive breast milk feeding of adopted premature twins. **Journal of Human Lactation**, v. 26, n. 3, p. 309-313, 2010.

TAKAHASHI, N.; KASHINO, M.; HIRONAKA, N. Structure of rat ultrasonic vocalizations and its relevance to behavior. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. 1–7, 2010.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90 day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p. 183-196, 2002.

TERASAWA, E.; FERNANDEZ, D. L. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 111–151, 2001.

TIRAN, D. The use of fenugreek for breastfeeding women. **Complementary Therapies in Nursing & Midwifery**, v. 9, n. 3, p. 155-156, 2003.

TOMA, T. S.; REA, M. F. Benefits of breastfeeding for maternal and child health: an essay on the scientific evidence. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. S235–S246, 2008.

TOPPO, F. A.; AKHAND, R.; PATHAK, A. K. Pharmacological actions and potential uses of *Trigonella foenum-graecum*: a review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 2, n. 4, p. 29-38, 2009.

TUNG, K. H.; GOODMAN, M. T.; WU, A. H.; McDUFFIE, K.; WILKENS, L. R.; KOLONEL, L. N.; NOMURA, A. M. Y.; TERADA, K. Y.; CARNEY, M. E.; SOBIN, L. H. Reproductive factors and epithelial ovarian cancer risk by histologic type: a multiethnic case-control study. **American Journal of Epidemiology**, v. 158, n. 7, p. 629-638, 2003.

TREADWAY, J. L.; LEDERMAN, S. A. The effects of exercise on milk yield, milk composition, and offspring growth in rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 44, n. 4, p. 481-488, 1986.

TURKYILMAZ, C.; ONAL, E.; HIRFANOGLU, I. M.; TURAN, O.; KOÇ, E.; ERGENEKON, E.; ATALAY, Y. The effect of galactagogue herbal tea on breast milk production and short-term catch-up of birth weight in the first week of life. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 17, n. 2, p. 139-42, 2011.

UNICEF. **Aleitamento materno na primeira hora depois do parto pode reduzir a mortalidade infantil**. Nova Iorque, UNICEF, 2007. Disponível em: <http://www.unicef.org/brazil/pt/media_9993.htm>. Acesso em: 10 fev. 2015.

WAN, E. W. X.; DAVEY, K.; PAGE-SHARP, M.; HARTMANN, P. E.; SIMMER, K.; ILETT, K. F. Dose-effect study of domperidone as a galactagogue in preterm mothers with insufficient milk supply, and its transfer into milk. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 283-289, 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global burden of disease: 2004 update**. Geneva: World Health Organization, 2008.

WHO, UNICEF, USAID. **Indicators for assessing infant and young child feeding practices**. Geneva: World Health Organization, 2008.

YADAV, U. C. S.; BAQUER, N. Z. Pharmacological effects of *Trigonella foenum-graecum* L. in health and disease. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, p. 243-54, 2014.

ZAPANTIS, A.; STEINBERG, J. G.; SCHILIT, L. Use of herbals as galactagogues. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 25, n. 2, p. 222-231, 2012.

ZBINDEN, G. Experimental methods in behavioral teratology. **Archives of Toxicology**, v. 48, p. 69-88, 1981.

ZHANG, Y.; LI, N.; YANG, J.; ZHANG, T.; YANG, Z. Effects of maternal food restriction on physical growth and neurobehavior in newborn Wistar rats. **Brain Research Bulletin**, v. 83, n. 1-2, p. 1–8, 2010.

ZUPPA, A. A.; SINDICO, P.; ORCHI, C.; CARDUCCI, C.; CARDIELLO, V.; CATENAZZI, P.; ROMAGNOLI, C. Safety and efficacy of galactogogues: substances that induce, maintain and increase breast milk production. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 162–74, 2010.