Vânius Vinícius Dipe

Efeitos da restrição alimentar materna sobre a prole de ratas *Wistar*: Avaliações teratogênicas clássicas e de imunoteratologia

São Paulo
2009

Vânus Vinícius Dipe

Efeitos da restrição alimentar materna sobre a prole de ratas *Wistar*: Avaliações teratogênicas clássicas e de imunoteratologia

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

Orientador:

Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak

São Paulo

2009

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.2153
FMVZ

Dipe, Vânius Vinícius

Efeitos da restrição alimentar materna sobre a prole de ratas *Wistar*.
Avaliações teratogênicas clássicas e de imunoteratologia / Vânius Vinícius
Dipe. – São Paulo : V. V. Dipe, 2009.
180 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2009.

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

Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak.

1. Restrição alimentar. 2. Teratogênese. 3. Imunoteratogenicidade.
4. Ratos Wistar. I. Título.

PARECER DA COMISSÃO DE BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da restrição alimentar materna sobre a prole de ratas Wistar. I- Avaliações teratogênicas clássicas. II-Aplicação de protocolos de imunotoxicologia", protocolado sob o nº1403/2008, utilizando 350 (trezentos e cinquenta) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Maternal feed restriction effects in Wistar rats offspring. I-Classical teratogenic evaluations. II-Immunotoxocology protocols application in weaning pups and adults", protocol number 1403/2008, utilizing 350 (three hundred fifty) rats, under the responsibility Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 27 de maio de 2008

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DIPE, Vânius Vinícius

Título: Efeitos da restrição alimentar materna sobre a prole de ratas *Wistar*.
Avaliações teratogênicas clássicas e de imunoteratologia

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. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

**Dedico à Deus que simplesmente
decidiu manter aceso o mais nobre
sentimento de amor a um ente presente.**

**Ao ente presente, Otávio meu filho: que Deus possa iluminar todos
os momentos de sua vida.**

**Não importa se são momentos de trevas
ou de alegrias, eles estão sempre ali, do
lado, por isso dedico ao meu pai Elias
Dipe Neto e à minha mãe Ana Maria
Borges Dipe.**

**São poucos os que tem força,
disposição, dedicação e que estão
aptos para transmitir mais do que
uma educação científica, dedico
então à minha orientadora Silvana
Lima Górnaiak.**

AGRADECIMENTOS

- À minha família: Irmã Vanessa (muito obrigado), ao Chicão e a Valéria (muito obrigado por tudo), Vó Nina, Tias Lena, Amália e Regina.
- Ao Dr. Cirineu Augusto Ferreira, “a dor é inevitável, mas o sofrimento é opção”, muito obrigado pelos ensinamentos de sabedoria.
- À Elida Adalgisa Neri, foram muitos os momentos que você me deu força. Obrigado
- Ao pessoal do CEPTOX, essenciais para a realização desta dissertação: Paulo César (PC), Ester, Isis, Júlia, André, Vinícius (Japa), Adilson, Marquinhos, Estevão, Solange e Marcos Barbosa.
- Aos meus irmãos científicos de São Paulo: Luciana Lippi, Luciana Cunha, Juliana, Fabiana, Andréia, Heidge, Hamasato, Wanderley, Alison, Altamir, Beatriz, Domênica, Tereza, Bruno e Patrícia.
- Aos professores do VPT: Luciano Felício, Luis Carlos Sá Rocha, João Palermo Neto, Catão, Paulo Maiorka, Lílian, Maria Lúcia Z. Dagli (Malu) e Helenice de Sousa Spinosa.
- Ao Dr. Jim Pfister do *Poisonous Plant Research Laboratory* – USDA-ARS.
- Ao pessoal dos laboratórios do VPT: Priscila, Ricardo (Jibóia) e Marguiti.
- Aos secretários da pós-graduação, muito obrigado pela atenção e

amizade: Dayse, Cláudia, Daura e Carlos Alberto.

- Às secretárias do VPT que sempre foram atenciosas: Cris, Silvia e Adriana .
- Aos funcionários da Biblioteca pelo auxílio na finalização desta dissertação.
- Aos funcionários da FZEA-USP
- À CAPES pelo apoio financeiro

RESUMO

DIPE, V. V. **Efeitos da restrição alimentar materna sobre a prole de ratas *Wistar*: Avaliações teratogênicas clássicas e de imunoteratologia.** [Effects of maternal feed restriction in *Wistar* rats offspring: Evaluations by classical and immunoteratology protocols]. 2009. 180 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A Organização Mundial da Saúde revela que mais de 20 milhões de crianças nascem com baixo peso ao nascimento em todo o mundo, sendo a má nutrição o principal fator desencadeante. Estudos realizados nas duas últimas décadas mostram que o *status* nutricional materno pode ser crítico no desenvolvimento de teratogenicidade; porém não há trabalhos que comprovem a associação entre restrição alimentar materna e a ocorrência de malformações. No entanto, o conceito de teratogênese não se restringe apenas às malformações estruturais logo após o nascimento, também são consideradas alterações funcionais, como aquelas comportamentais ou no sistema imune, entre outras, que podem se manifestar somente na maturação pós-natal. Assim, o presente trabalho visou verificar os efeitos da restrição alimentar materna durante a gestação, avaliando-a por meio tanto do protocolo clássico de teratogenicidade, como através de protocolos de imunoteratologia, analisando-se neste caso, as possíveis alterações no sistema imune da prole após o desmame e também na idade adulta. Foram empregadas ratas *Wistar* prenhes, divididas em cinco grupos iguais, um controle (CO) no qual os animais receberam ração *ad libitum*, e nos demais grupos, as fêmeas foram submetidas à restrição alimentar, do 6º ao 17º dia de gestação, diminuindo-se em 15 (E15), 40 (E40), 55 (E55) e 70% (E70) da quantidade de ração consumida pelos animais do grupo CO. Por meio do protocolo clássico de teratogenicidade, verificaram-se as possíveis alterações ósseas e viscerais sobre a prole. Empregou-se ainda o protocolo de imunoteratologia, no qual foram realizados testes nas proles tanto ao desmame como na idade adulta, e aferiu-se os seguintes parâmetros: hemograma, peso relativo do timo e do baço, celularidade do baço e da medula óssea; a imunidade inata: atividade de macrófagos peritoneais por meio da fagocitose, produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico; a imunidade humoral: produção de anticorpos pelo ensaio do *plaque forming cell* e a titulação de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro; e a imunidade celular: avaliação da

hipersensibilidade tardia. Em relação às avaliações teratogênicas clássicas, estas mostraram haver, naqueles filhotes provenientes das ratas submetidas às restrições alimentares (E40, E55 e E70), diminuição no peso ao nascimento, aumento da proporção de fetos mortos até uma hora após o nascimento e aumento do número de fetos com ureter sinuoso; no entanto, não foi constatada a ocorrência de malformações graves, que pudessem colocar em risco a vida do concepto. Já as avaliações pós-natais revelaram diminuição no ganho de peso, do nascimento até a idade adulta, das proles provenientes das ratas do grupo E70. Em relação às alterações imunoteratogênicas, houve aumento no peso relativo do timo e da resposta imune celular nas proles destas mães submetidas à maior restrição alimentar, quando estes animais foram avaliados aos 21 dias de idade. Quando realizou-se este estudo nas proles com 70 dias (idade adulta), os filhotes provenientes de mães das diferentes restrições alimentares apresentaram aumento da resposta imune humoral; além disto aqueles filhotes de mães E70, mostraram aumento da resposta imune celular. Os dados apresentados na presente pesquisa permitem sugerir que a restrição alimentar em ratas *Wistar* durante a organogênese fetal, embora não promova malformações estruturais, produz prole de menor peso ao nascimento e é capaz de gerar alterações significantes no sistema imune dos filhotes.

Palavras-chave: Restrição alimentar. Teratogênese. Imunoteratogenicidade. Ratos *Wistar*.

ABSTRACT

DIPE, V. V. **Effects of maternal feed restriction in *Wistar* rats offspring: Evaluations by classical and immunoteratology protocols.** [Efeitos da restrição alimentar materna sobre a prole de ratas *Wistar*. Avaliações teratogênicas clássicas e de imunoteratologia]. 2009. 180 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The World Health Organization has reported that more than 20 million children worldwide are born with low birth weight, with malnutrition the main triggering factor. Studies in the past two decades have shown that maternal nutritional status may be critical in the development of teratogenicity, but there are no studies that directly relate maternal feed restriction and malformation. However, teratogenicity is not restricted only to structural abnormalities at birth, but may also include functional changes, such as behavioral or immune system alterations, among others, which may manifest themselves only in the postnatal period of maturation. Thus, this work aimed to assess the effects of maternal food restriction in pregnant rats using classical and immunoteratogenic protocols to evaluate the offspring. Thus, possible immune system changes were evaluated in the offspring after weaning and after maturation. Pregnant females were divided into five groups, a control group (CO) in which the animals received feed *ad libitum*, and four other groups, in which females were fed a restricted amount based on the total ingested by controls: 15% (E15), 40% (E40), 55% (E55) and 70% (E70) during days 6 to 17 of gestation. Rats were humanely euthanized and teratogenicity was evaluated using skeletal and visceral measurements. Immunoteratogenic effects were determined in weaned and mature offspring (10 weeks) using blood, thymus and spleen relative weights and spleen and bone marrow cellularity. In addition, innate immunity was determined using activity of peritoneal macrophages through phagocytosis, and production of hydrogen peroxide and nitric oxide. Humoral immunity was determined using production of antibodies by the plaque-forming cell assay and titers of anti-sheep red blood cells. Cellular immunity was determined by evaluating delayed type hypersensitivity. Traditional teratogenic indices showed that pups from females subjected to feed restriction (E40, E55 and E70) had a decrease in birth weight, an increased proportion of dead fetuses up to one hour after birth, and an increase in the number of fetuses with

kinked ureter. No major malformations serious enough to threaten the life of the conceptus were observed. There was a postnatal decrease in weight gain in offspring from mothers of group E70 from birth to adulthood. There was also immune system changes, with an increase in the thymus relative weight (E40, E55, E70) and cellular immune response in offspring (21 days of age). When offspring were evaluated after maturation, those pups from mothers with feed restriction had increased humoral immune responses; in addition offspring from the E70 group showed an increase in cellular immune response. The data presented in this study suggest that feed restriction in *Wistar* rats during organogenesis does not promote structural malformations, but instead results in offspring with lower birth weights, and also promoted significant changes in the immune system of rat pups.

Keywords: Feed restriction. Teratogenesis. Immuno-teratogenicity. Wistar Rats.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Consumo de ração (em gramas), avaliado a cada três dias, a partir do 6º dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libtum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões.....79
- Tabela 2 – Número de neonatos por ninhada das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70%, em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libtum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo.....82
- Tabela 3 – Número total de filhotes fêmeas, provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70%, em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libtum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo.....83
- Tabela 4 – Número total de filhotes machos, provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libtum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo.....84
- Tabela 5 – Viabilidade fetal, até uma hora após o nascimento, de filhotes provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libtum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentados o número de neonatos por grupo e os números de neonatos vivos e mortos após este período85
- Tabela 6 – Peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libtum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo87
- Tabela 7 – Peso das placentas das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libtum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo.....88

Tabela 8 – Porcentagem de perda pré-implantação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo	89
Tabela 9 – Porcentagem de perda pós-implantação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo	90
Tabela 10 – Exame esquelético dos fetos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. Para os dados paramétricos são apresentados as médias, erros-padrões e números de animais por grupos. Para os dados não-paramétricos são apresentados o número de eventos e o número de animais por grupo	91
Tabela 11 – Variações em esternóbrios de fetos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São mostrados o número de animais por grupo, o número de ocorrência de cada variação e o número total de variações.....	91
Tabela 12 – Exame visceral dos fetos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentados o número de eventos e o número de animais por grupo	92
Tabela 13 – Número de fêmeas que realizaram canibalismo logo após o parto. As ratas foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação.....	98
Tabela 14 – Consumo de ração (em gramas), avaliada a cada três dias a partir do 6º dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	98
Tabela 15 – Consumo de ração materno durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	101

Tabela 16 – Ganho de peso durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	102
Tabela 17 – Peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	103
Tabela 18 – Ganho de peso durante a lactação dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	104
Tabela 19 – Avaliação do índice de fagocitose de macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	105
Tabela 20 – Avaliação da produção de H ₂ O ₂ (em nMols) induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	106
Tabela 21 – Avaliação da produção de H ₂ O ₂ (em nMols) não induzida pelo phorbol miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	107
Tabela 22 – Avaliação da produção de NO (em nMols) por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	108

Tabela 23 – Reação de hipersensibilidade tardia (<i>Delayed type hypersensitivity</i> – DTH) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. As proles foram sensibilizadas, via subcutânea, com BSA-V (<i>Bovine serum albumin – factor V</i>) quatro dias antes do desafio com BSA-V no coxim plantar. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	109
Tabela 24 – Peso relativo do baço (g/100g de p.v.) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	110
Tabela 25 – Celularidade do baço das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	111
Tabela 26– Celularidade da medula óssea das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	112
Tabela 27 – Peso relativo do timo (g/100g de p.v.) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	113
Tabela 28 – Título de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (SRBC) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. Os animais foram sensibilizados, via intraperitoneal , com SRBC, sete dias antes da coleta de sangue e obtenção do soro. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	114
Tabela 29 - <i>Plaque-forming cell</i> (PFC/10 ⁵ cél) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	115

Tabela 30 – Leucócitos das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libtum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	116
Tabela 31 – Eritrócitos das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libtum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	117
Tabela 32 – Volume corpuscular médio (V.C.M.) (μm^3) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libtum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	118
Tabela 33 – Hemoglobina das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libtum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	119
Tabela 34 – Hemoglobina corpuscular média (H.C.M.) (pg) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libtum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	120
Tabela 35 – Concentração de hemoglobina corpuscular média (C.H.M.) (%) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libtum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	121
Tabela 36 – Hematócrito das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libtum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	122
Tabela 37 – Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libtum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	123

Tabela 38 – Número de fêmeas que realizaram canibalismo logo após o parto. As ratas foram submetidas as diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo controle (CO); do 6º ao 17º dia de gestação	128
Tabela 39 – Consumo de ração (em gramas), avaliada a cada três dias a partir do 6º dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	128
Tabela 40 – Consumo de ração materno durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	131
Tabela 41 – Ganho de peso materno durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	132
Tabela 42 – Peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	133
Tabela 43 – Ganho de peso durante a lactação dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	134
Tabela 44 – Ganho de peso do desmame à idade adulta dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	135
Tabela 45 – Avaliação do índice de fagocitose de macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	136

Tabela 46	– Avaliação da produção de H ₂ O ₂ (em nMols) induzida pelo phorbol miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	137
Tabela 47	– Avaliação da produção de H ₂ O ₂ (em nMols) não induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	138
Tabela 48	– Avaliação da produção de NO (em nMols) por macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	139
Tabela 49	– Reação de hipersensibilidade tardia (<i>Delayed type hypersensitivity</i> – DTH) da prole com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. As proles foram sensibilizadas, via subcutânea, com BSA-V (<i>Bovine serum albumin</i> – <i>factor V</i>) quatro dias antes do desafio com BSA-V no coxim plantar. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	140
Tabela 50	– Peso relativo do baço (g/100g de p.v.) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	141
Tabela 51	– Celularidade do baço das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	142
Tabela 52	– Celularidade da medula óssea das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	143

Tabela 53 – Peso relativo do timo (g/100g de p.v.) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).	144
Tabela 54 – Título de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (SRBC) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. Os animais foram sensibilizados, via intraperitoneal, com SRBC, sete dias antes da coleta de sangue e obtenção do soro. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).	145
Tabela 55 – <i>Plaque-forming cell</i> (PFC/10 ⁵ células) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).	146
Tabela 56 – Leucócitos das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).	147
Tabela 57 – Eritrócitos das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).	148
Tabela 58 – Volume corpuscular médio (V.C.M.) (μm^3) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).	149
Tabela 59 – Hemoglobina corpuscular média (H.C.M.) (pg) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).	150

Tabela 60 – Concentração de hemoglobina corpuscular média (C.H.M.) (%) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	151
Tabela 61 – Hematócrito das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	152
Tabela 62 – Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n).....	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exposição do útero gravídico através da laparotomia, observação de implantes e fetos viáveis.....	57
Figura 2 - Fetos prontos para a análise óssea com os ossos corados pela alizarina <i>red</i>	58
Figura 3 – Consumo de ração (em gramas), avaliado a cada três dias, a partir do 6º dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6 ao 17º dia de gestação.....	80
Figura 4 – Ganho de peso maternal (em gramas) do 0 ao 5º dia de gestação (0-5), a cada três dias do 6 ao 20º dia de gestação, e ganho de peso total (0-20) durante a gestação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6 ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett.....	81
Figura 5 – Número de neonatos, por ninhada, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70%, em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA seguida do teste de Dunnett.....	82
Figura 6 – Número total de filhotes, fêmeas, provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70%, em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA seguida do teste de Dunnett.....	83
Figura 7 – Número total de filhotes, machos, provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA seguida do teste de Dunnett.....	84
Figura 8 – Viabilidade fetal, até uma hora após o nascimento, de filhotes provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentados os números de fetos vivos e mortos após este período. * $p < 0,05$ versus grupo controle, teste exato de Fisher	85

Figura 9 – Fetos provenientes das ratas que foram submetidas a 70% de restrição alimentar e que morreram uma hora após a cesariana (fetos 1 e 3), verificando-se que estes apresentavam a tez cianótica. Por outro lado, o feto 2, proveniente de rata do grupo CO, apresentase com a tez normocorada	86
Figura 10 – Peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnet	87
Figura 11 – Peso das placentas das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnet.....	88
Figura 12 – Porcentagem de perda pré-implantação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões	89
Figura 13 – Porcentagem de perda pós-implantação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões	90
Figura 14 – Consumo de ração (em gramas), avaliada a cada três dias a partir do 6º dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6º ao 17º dia de gestação.....	99
Figura 15 – Ganho de peso maternal (em gramas) do 0 ao 6º dia de gestação (GD 0-6), a cada três dias do 6º ao 21º dia de gestação, e ganho de peso total (GD 0-21) durante a gestação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnet	100
Figura 16 – Consumo de ração materno durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA.....	101

Figura 17 – Ganho de peso durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. *** $p < 0,001$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett	102
Figura 18 – Peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões.* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ versus o grupo controle, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.....	103
Figura 19 – Ganho de peso durante a lactação dos filhotes machos da ninhada provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett.....	104
Figura 20 – Avaliação do índice de fagocitose de macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA.....	105
Figura 21 – Avaliação da produção de H_2O_2 (em nMols) induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$ versus o grupo controle. ANOVA seguida do teste de Dunnett	106
Figura 22 – Avaliação da produção de H_2O_2 (em nMols) induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA.....	107
Figura 23 – Avaliação da produção de NO (em nMols) por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis.....	108

Figura 24 – Reação de hipersensibilidade tardia (<i>Delayed type hypersensitivity</i> – DTH) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. As proles foram sensibilizadas, via subcutânea, com BSA-V (<i>Bovine serum albumin – factor V</i>) quatro dias antes do desafio com BSA-V no coxim plantar. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus o grupo controle, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.	109
Figura 25 – Peso relativo do baço (g/100g de p.v.) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA.....	110
Figura 26 – Celularidade do baço das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA	111
Figura 27 – Celularidade da medula óssea das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões.....	112
Figura 28 – Peso relativo do timo (g/100g de p.v.) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus o grupo controle ANOVA seguida do teste de Dunnett.....	113
Figura 29 – Título de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (SRBC) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. Os animais foram sensibilizados, via intraperitoneal, com SRBC, sete dias antes da coleta de sangue e obtenção do soro. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis.....	114

Figura 30 –	<i>Plaque-forming cell</i> (PFC/10 ⁵) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n). ANOVA.....	115
Figura 31 –	Leucócitos das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA.....	116
Figura 32 –	Eritrócitos das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA.....	117
Figura 33 –	Volume corpuscular médio (V.C.M.) (μm ³) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. *p<0,05 versus o grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett.....	118
Figura 34 –	Hemoglobina das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis.....	119
Figura 35 –	Hemoglobina corpuscular média (H.C.M.) (pg) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões.....	120
Figura 36 –	Concentração de hemoglobina corpuscular média (C.H.M.) (%) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões	121
Figura 37 –	Hematócrito das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis.....	122

Figura 38 – Plaquetas das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis	123
Figura 39 – Consumo de ração (em gramas), avaliada a cada três dias a partir do 6° dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação	129
Figura 40 – Ganho de peso maternal (em gramas) do 0 ao 6° dia de gestação (GD 0-6), a cada três dias do 6 ao 21° dia de gestação, e ganho de peso total (GD 0-21) durante a gestação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões. * $p<0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnet.....	130
Figura 41 – Consumo de ração materno durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões	131
Figura 42 – Ganho de peso materno durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p<0,05$; ** $p<0,001$;*** $p<0,001$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett	132
Figura 43 – Peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões.* $p<0,05$ versus o grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett	133
Figura 44 – Ganho de peso durante a lactação dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p<0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnet.....	134

Figura 45 – Ganho de peso do desmame à idade adulta dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett.....	135
Figura 46 – Avaliação do índice de fagocitose de macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões.....	136
Figura 47 – Avaliação da produção de H_2O_2 (em nMols) induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA seguida do teste de Dunnett	137
Figura 48 – Avaliação da produção de H_2O_2 (em nMols) não induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões.....	138
Figura 49 – Avaliação da produção de NO (em nMols) por macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA seguida do teste de Dunnett.....	139
Figura 50 – Reação de hipersensibilidade tardia (<i>Delayed type hypersensitivity</i> – DTH) da prole com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. As proles foram sensibilizadas, via subcutânea, com BSA-V (<i>Bovine serum albumin</i> – factor V) quatro dias antes do desafio com BSA-V no coxim plantar. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus o grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett.....	140

Figura 51 – Peso relativo do baço (g/100g de p.v.) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões.....	141
Figura 52 – Celularidade do baço das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões.....	142
Figura 53 – Celularidade da medula óssea das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA.....	143
Figura 54 – Peso relativo do timo (g/100g de p.v.) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA.....	144
Figura 55 – Título de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (SRBC) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. Os animais foram sensibilizados, via intraperitoneal , com SRBC sete dias antes da coleta de sangue e obtenção do soro. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett.....	145
Figura 56 – <i>Plaque-forming cell</i> (PFC/ 10^5) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)	146
Figura 57 – Leucócitos das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. Os animais foram sensibilizados, via intraperitoneal , com SRBC, sete dias antes da coleta de sangue e obtenção do soro. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA.....	147

Figura 58 – Eritrócitos das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn	148
Figura 59 – Volume corpuscular médio (V.C.M.) (μm^3) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis	149
Figura 60 – Hemoglobina corpuscular média (H.C.M.) (pg) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA	150
Figura 61 – Concentração de hemoglobina corpuscular média (C.H.M.) (%) das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA	151
Figura 62 – Hematócrito das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis	152
Figura 63 – Plaquetas das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta <i>ad libitum</i> (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis	153

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
C.H.C.M	concentração de hemoglobina corpuscular média
CEPTOX.....	Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária
dl	decilitro
DTH.....	<i>Delayed type hypersensitivity</i>
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	grama
H.C.M	hemoglobina corpuscular média
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
IF	índice de fagocitose
ip	intraperitoneal
Kg.....	kilograma
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
nMol	nanomols
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PFC	<i>Plaque forming cell</i>
pg	picograma
PMA	Miristato acetado de phorbol

RPM rotações por minuto

SRBC serum red blood cell

Th..... *T helper*

TCR..... receptor de célula T

USP Universidade de São Paulo

V.C.M volume corpuscular médio

VPT Departamento de Patologia Veterinária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	36
2 REVISÃO DE LITERATURA	38
2.1 UM BREVE HISTÓRICO SOBRE A TERATOLOGIA	39
2.2 SOBRE OS PRINCÍPIOS DA TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO E PROTOCOLOS PARA AVALIAÇÃO DE TERATOGENICIDADE	42
3 OBJETIVOS	50
3.1 OBJETIVO GERAL	50
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 REAGENTES E APARELHOS	53
4.2 ANIMAIS	55
4.3 ACASALAMENTO	55
4.4 PARÂMETROS AVALIADOS APÓS A CESARIANA	56
4.5 EXAME ESQUELÉTICO	57
4.6 EXAME VISCERAL	58
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS	59
4.7.1 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) por macrófagos peritoneais	60
4.7.2 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais	61
4.7.3 Execução da técnica para avaliação da fagocitose por macrófagos peritoneais	62
4.8 AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA	63
4.9 AVALIAÇÃO DO PESO RELATIVO DE TIMO E BAÇO, E CELULARIDADE DO BAÇO E DA MEDULA ÓSSEA	63
4.10 AVALIAÇÃO DO PFC PARA QUANTIFICAÇÃO DE PLASMÓCITOS PRODUTORES DE ANTICORPOS ANTI-SRBC NO BAÇO	64
4.10.1 A sensibilização	64
4.10.2 O ensaio do PFC	65

4.10.3 O plaqueamento	66
4.11 TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SRBC EM RATOS.....	66
4.12 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR POR MEIO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA (DTH)	68
4.13 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	69
4.13.1 Experimento 1: Avaliações teratogênicas clássicas	69
4.13.2 Experimento 2: Avaliação do desenvolvimento e de imunoteratologia das proles (machos) aos 21 dias de idade	70
4.13.3 Experimento 3: Avaliação do desenvolvimento e de imunoteratologia das proles (machos) aos 70 dias de idade	71
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
5 RESULTADOS.....	74
5.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÕES TERATOGENICAS CLÁSSICAS	75
5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E DE IMUNOTERATOLOGIA DAS PROLES (MACHOS) AOS 21 DIAS DE IDADE.....	93
5.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E DE IMUNOTERATOLOGIA DAS PROLES (MACHOS) AOS 70 DIAS DE IDADE.....	124
6 DISCUSSÃO	154
7 CONCLUSÕES	169
REFERÊNCIAS.....	172

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

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

Pouco se sabe sobre os efeitos da subnutrição materna e as conseqüências na vida adulta; no entanto, estudos experimentais e epidemiológicos têm relacionado a subnutrição fetal às doenças metabólicas e cardiovasculares desenvolvidas na vida adulta (BARKER, 1995). Além disso, sugere-se que deva haver o comprometimento no sistema imune de indivíduos adultos que sofreram restrição alimentar durante a vida fetal; no entanto, são necessários mais estudos sobre estas alterações (MOORE, 1998). Assim sendo, a Organização Mundial da Saúde (WHO) estimula pesquisas básicas sobre a nutrição durante a gestação para que possam ser realizadas intervenções, principalmente nos países em desenvolvimento (LINDMARK, 2003).

Além do ser humano, é importante também considerar que nos animais de produção, a escassez de alimento em fêmeas gestantes deve também promover alterações significantes nas proles e, conseqüentemente, um grande impacto econômico, já que é provável que estes animais devam ter menor índice de crescimento, ganho de peso e maior susceptibilidade às doenças, entre outros fatores (ZHANG, 2002).

Nesse sentido, é de fundamental importância a realização de pesquisas em modelos experimentais para melhor entender estas alterações.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 UM BREVE HISTÓRICO SOBRE A TERATOLOGIA

O estudo das alterações estruturais do organismo em desenvolvimento surgiu antes mesmo da linguagem escrita. Neste sentido, cita-se a descoberta de uma escultura em mármore que foi encontrada no sul da Turquia, datada em 6500 a.C., a qual representa gêmeos unidos. Já no Egito foram encontradas pinturas de 5000 anos atrás que ilustram indivíduos neonatos apresentando malformações tais como fenda palatina e acondroplasia. Acredita-se que figuras mitológicas como ciclopes e sereias tenham suas origens no nascimento de crianças malformadas (WARKANY, 1977).

Os Babilônios, Gregos e Romanos, acreditavam que os infantes malformados seriam capazes de prever o futuro e por isso eram chamados de *monstrum* que é uma palavra latina derivada de *monstrare* (mostrar) ou *monere* (avisar). Por outro lado, a palavra teratologia origina-se da palavra grega *teras* que significa monstro (KALTER, 2002).

Hipócrates e Aristóteles acreditavam que o desenvolvimento anormal poderia ser decorrente de causas físicas, como trauma ou pressão uterina; no entanto, Aristóteles também acreditava que as emoções maternas poderiam influenciar o desenvolvimento da criança; assim, este filósofo orientava mulheres grávidas contemplar lindas estátuas para aumentar a beleza de seus filhos (CHERNOFF et al., 1989).

Séculos se passaram e alguns tratados foram escritos na tentativa de fornecer explicações naturais para a ocorrência das malformações. No entanto, a maioria delas era absurda e não se descartavam as causas sobrenaturais (GÓRNIAK, 2008).

Foi somente no século XIX que a teratologia experimental iniciou-se, a partir de estudos realizados por Etienne Geoffrey Saint-Hilaire (1772-1844). Nestes trabalhos, evidenciaram-se malformações em embriões de galinha quando os ovos foram expostos a traumas físicos e a agentes tóxicos (MORIN, 1996).

No início do século XX, estudos mostraram que várias condições ambientais tais como, temperatura, toxinas microbianas e drogas seriam capazes de modificar o normal desenvolvimento de aves, répteis, peixes e anfíbios (ROGERS; KAVLOCK, 2001). No entanto, os pesquisadores acreditavam que os mamíferos eram mais resistentes às adversidades ambientais, sendo que o primeiro relato nestas espécies animais ocorreu somente na década de 1930, quando Hale (1935), mostrou que porcas tratadas com uma dieta deficiente em vitamina A durante a gestação, pariam filhotes com anoftalmia e fenda palatina.

Em 1940, diversos experimentos demonstraram que deficiências na dieta materna e outros fatores ambientais poderiam afetar o desenvolvimento intrauterino de ratos (WARKANY; NELSON, 1940; WARKANY; SCHRAFFENBERGER, 1940; WARKANY, 1945). No entanto, no ser humano tais observações só foram confirmadas poucos meses mais tarde, a partir de um levantamento realizado em vítimas da fome durante a Segunda Guerra Mundial, em Leningrado na União Soviética, no qual se verificou que 50% de todas as crianças nascidas na primeira metade de 1941 pesavam menos que 2,5Kg; além disso, constatou-se que o índice de neonatos nascidos prematuramente aumentou para 41,2%. Observou-se ainda

por meio deste levantamento que o índice de abortos cresceu significativamente, chegando ao redor de 5,6% e a ocorrência de enfermidades entre os neonatos aumentou 32,3%, causado pela baixa viabilidade e conseqüente susceptibilidade à pneumonia (ANTONOV, 1947).

Embora tivesse sido demonstrado que embriões de mamíferos, incluindo o ser humano, eram também suscetíveis às influências externas como deficiências nutricionais e infecções intra-uterinas, essas informações não causaram impacto na época (WILSON, 1973). Assim, passaram-se três décadas sem que grandes pesquisas nesta área fossem realizadas. No entanto, o grande divisor de águas neste ramo da ciência ocorreu em 1961, quando se estabeleceu a associação entre a ingestão da talidomida, um medicamento utilizado como sedativo empregado em situações para controle da ansiedade e náuseas, por mulheres gestantes, e o nascimento de crianças severamente malformadas, as quais apresentavam normalmente focomelia, malformação caracterizada por encurtamento dos membros. Portanto, a partir desta constatação foi que a teratologia ganhou notoriedade como ciência e os primeiros princípios foram redigidos por especialistas da Organização Mundial da Saúde em 1967 (WHO, 1967).

A partir deste episódio da talidomida, houve um grande incremento nas pesquisas em teratologia, além disso, verificou-se a grande necessidade de se avaliar os riscos de teratogenicidade de xenobióticos. No entanto, as diferenças entre os protocolos dos diferentes países em relação ao período de administração das substâncias e as espécies animais usadas, foram o estímulo para a criação de novas diretrizes para avaliar a toxicidade reprodutiva dos diferentes medicamentos (CLÁUDIO et al., 1999). Tais normas foram aprovadas pela agência norte-americana “*United States Food and Drug Administration*” (US-FDA) e por autoridades

governamentais similares na Europa e no Japão. Foram também propostos regulamentos para testar os possíveis efeitos teratogênicos de produtos de biotecnologia, vacinas, ingredientes alimentares e determinados agentes químicos (CHRISTIAN, 2001; WHO, 2001).

Atualmente, esses protocolos de avaliação são empregados por várias agências normativas no mundo todo, embora existam ainda pequenas variações entre os diferentes protocolos. Além disso, por causa de alguns fatores, como experiência prévia, aumento do conhecimento relativo à biologia do desenvolvimento, a quantidade imensa de produtos que devem ser avaliados e os custos dos testes, mudanças freqüentes têm sido introduzidas nesses protocolos de avaliação (GÓRNIAK, 2008).

2.2 SOBRE OS PRINCÍPIOS DA TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO E PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO DE TERATOGENICIDADE

A toxicologia do desenvolvimento abrange o estudo da cinética, mecanismo de ação tóxica, patogênese e as conseqüências da exposição aos agentes tóxicos ou condições que levam ao desenvolvimento anormal do animal (ROGERS; KAVLOCK, 2001), e tem seus conceitos baseados nos princípios gerais da teratologia propostos por Wilson (1973), sendo estes os seguintes: a susceptibilidade para o desenvolvimento de teratogênese depende do genótipo do conceito e o modo como este interage com fatores ambientais adversos; a susceptibilidade para o desenvolvimento de teratogênese varia de acordo com o estágio do desenvolvimento em que ocorreu a influência adversa; agentes

teratogênicos agem em mecanismos específicos durante o desenvolvimento celular e tecidual e geram eventos anormais; o acesso de influências adversas em tecidos em desenvolvimento depende da natureza do agente; as quatro manifestações de um desenvolvimento anormal são a morte, malformação, crescimento retardado e deficiências funcionais; as manifestações de um desenvolvimento anormal tem a frequência e o grau aumentados com o aumento da dose.

Em 2001 a Conferência Internacional para Harmonização (ICH) estabeleceu que os estudos de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento deveriam ser realizados em seis estágios diferentes, a saber: estágio A (período anterior ao acasalamento até a concepção) e avalia as funções reprodutivas de animais adultos, incluindo espermatogênese, oogênese e fertilização; estágio B (período entre a concepção e a implantação) e avalia as funções reprodutivas da fêmea adulta, bem como as fases de pré-implantação e implantação do conceito; estágio C (período entre a implantação e o fechamento do palato duro) e tem por objetivo avaliar as funções reprodutivas da fêmea adulta e a organogênese do embrião; estágio D (período entre o fechamento do palato duro até o final da gestação) no qual se procura avaliar as funções reprodutivas da fêmea adulta, desenvolvimento e crescimento fetal; estágio E (período entre o nascimento e o desmame), destinado à avaliação das funções reprodutivas da fêmea adulta e a adaptação do neonato à vida extra-uterina; estágio F (período entre o desmame e a maturidade sexual) e tem por finalidade avaliar o desenvolvimento e crescimento após o desmame, adaptação à vida independente e a obtenção da maturidade sexual (CHRISTIAN, 2001).

O estágio C é aquele que comumente é escolhido para a administração de xenobióticos, e compreende o 6º-7º até o 17º dia de gestação em ratos e o 6º-7º até o 19º dia de gestação em coelhos (MANSON; KANG, 1994; KRINKE, 2000;

CHRISTIAN, 2001). No entanto, estudiosos do assunto concordam em aumentar o período de administração das substâncias e sugerem que os testes de toxicidade perinatal sejam feitos em mais de uma geração (CLAUDIO; BEARER; WALLINGA, 1999).

Enquanto que atualmente, muitas novas informações estão disponíveis sobre a origem das desordens do desenvolvimento resultante da exposição perinatal de substâncias químicas, há uma grande preocupação dos pesquisadores, relativa à acurácia dos protocolos existentes para aferir adequadamente os potenciais riscos da exposição aos diversos xenobióticos durante o desenvolvimento. Neste sentido, embora existam pequenas variações nos protocolos de avaliação de risco de toxicologia peri-natal entre as agências de regulamentação; de maneira geral, estas requerem, para o teste, um grupo de animais controle e, no mínimo, outros três, nos quais os animais receberão as diferentes doses da substância química a ser avaliada. Em geral, a escolha destas doses é baseada seguindo-se os seguintes critérios: uma que produza efeitos tóxicos, uma outra dose na qual os animais não manifestem qualquer alteração de toxicidade e a outra, intermediária entre estas. A substância a ser testada deverá ser administrada, no mínimo, da implantação à cesariana. Um dia antes do parto, as fêmeas são submetidas à cesariana, avaliando-se o número de corpos lúteos implantados, sendo os fetos e a placenta pesados e, a seguir, metade da prole utilizada para avaliação esquelética e a outra metade para pesquisa de anormalidades viscerais (US-EPA, 1991; US-FDA, 1994; OECD, 2001).

Se por um lado a ICH tem conseguido obter a harmonização dos protocolos de avaliação de toxicidade reprodutiva, por outro, muita controvérsia existe atualmente no que se refere à adequação e a validade de tais protocolos. De fato,

estes até hoje são baseados no conhecimento da toxicologia reprodutiva e do desenvolvimento de quase meio século atrás, sendo que estes modelos foram diretamente influenciados pela tragédia ocorrida com a talidomida, que, sem dúvidas, teve um papel fundamental para o desenvolvimento da teratologia; no entanto, a simples observação de malformações e/ou anomalias somente não traduz, em hipótese nenhuma, o risco de teratogênese de uma dada substância química. Basicamente, um ponto deve ser reavaliado quando se consideram os atuais protocolos utilizados, seria que estes apenas indicam os possíveis efeitos tóxicos mais óbvios que são a morte, alteração no desenvolvimento e as alterações estruturais (malformações/anomalias) (GÓRNIAK, 2008).

Portanto, alterações mais sutis, mas não menos importantes, são descartadas da avaliação da teratogenicidade. Por outro lado, deve-se considerar que tem sido grande a preocupação das agências de regulamentação de se estabelecer e incorporar protocolos, tanto de neurotoxicidade (CLÁUDIO et al., 2000; LADICS et al., 2005), quanto de imunotoxicidade (HOLSAPPLE et al., 2005; LADICS et al., 2005), já que se sabe que no feto ambos os sistemas são bem mais susceptíveis aos agentes tóxicos. Para tais estudos é necessário que as proles sejam mantidas vivas até, pelo menos, o final da lactação, permitindo a aplicação dos diferentes testes nestes animais. Esta avaliação tem, ainda, outra grande vantagem adicional, que é a de se avaliar alterações morfológicas também nos filhotes adultos, já que este tipo de avaliação nos fetos é bastante comprometida, pois nesta fase não há o completo desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas, o que também torna praticamente inviável avaliações funcionais (US-EPA, 1991).

Assim, recentemente, testes mais refinados, para avaliar a funcionalidade dos órgãos têm sido propostos para inclusão nos protocolos determinados pelas

agências normatizadoras. Nesse sentido, a agência US-EPA incluiu uma diretriz de avaliações de neuroteratologia para a investigação da segurança de novas substâncias. Embora tais avaliações representem um grande avanço, deve-se ressaltar que estas ainda não expõem os animais em todos os períodos críticos de vulnerabilidade do sistema nervoso em desenvolvimento; além disso, os testes para avaliar as mudanças neuroquímicas são insuficientes ou não são requisitados para a maioria dos xenobióticos (CLAUDIO et al., 2000).

Em relação à imunoteratologia, atualmente, a US-EPA prepara diretrizes para avaliar as substâncias quanto ao potencial tóxico no conceito. Entretanto, neste momento a US-FDA apenas sugere, que as próprias indústrias responsáveis pela substância, façam alguns testes para avaliar os efeitos sobre o sistema imune em desenvolvimento.

Se por um lado, ainda não há normas estabelecidas pelas diversas agências regulamentadoras para avaliar os riscos que os xenobióticos representam para a ocorrência de imunoteratogênese (HOLSAPPLE et al., 2005), desde 1970, deve-se considerar que o sistema imune em desenvolvimento é mais sensível aos imunotóxicos (ROBERTS; CHAPMAN, 1981; DIETERT; LEE; BUNN, 2002); portanto, os resultados de avaliações imunotóxicas em animais adultos, preconizados por algumas agências como a US-FDA, não correspondem, em hipótese nenhuma, aos resultados obtidos em animais em desenvolvimento. Assim, as agências subestimam as avaliações de xenobióticos com relação à imunoteratologia, e o risco é eminente para aqueles que entram em contato com as novas substâncias liberadas para o uso, não só o ser humano, mas também animais de produção (HOLSAPPLE; AERTS; VAN-ASSCHE, 2003). Em relação a estes animais, é necessário se considerar que deva haver grandes prejuízos econômicos

advindos das manifestações decorrentes de imunotoxicidade durante o desenvolvimento fetal, pois estas incluem: redução da resistência aos parasitas, bactérias e vírus; aumento da susceptibilidade às alergias e doenças autoimunes idiopáticas; hipersensibilidades e autoimunidade causada por medicamentos ou alimentos (KAAMAR; PISTL; MIKULA, 1999).

A imunotoxicologia do desenvolvimento também é uma ferramenta para esclarecer dúvidas sobre a restrição alimentar materna, já que pouco é conhecido sobre o impacto da desnutrição da fêmea gestante para o desenvolvimento fetal intrauterino e a vida pós-natal dos filhotes (CARNEY, 2004), diferente do que ocorre em relação à restrição alimentar em animais adultos, que tem muitas informações sobre os seus efeitos (ROSSO; LEDERMAN, 1981; CHAPIN et al., 1993; COKELAERE et al., 1998).

A partir dos estudos realizados por Khera (1984), nos quais o autor preconizou que a toxicidade materna, como por exemplo, a queda do ganho de peso, promoveria indiretamente alteração no conceito, como embrio-letalidade ou malformações, gerou-se um grande impasse no que se refere à interpretação dos resultados de toxicologia reprodutiva quando se utilizam xenobióticos e/ou doses destes que possam causar diminuição no ganho de peso da fêmea gestante, pois não fica evidente se a alteração no conceito foi devido a uma ação direta do agente tóxico sobre os diversos sistemas fetais, ou se foi causado pela ação indireta que resulta em diminuição no consumo de alimento pela fêmea prenhe (KHERA, 1984; ROGERS; KAVLOCK, 2001).

Procurando esclarecer este impasse, um estudo recente conduzido por Fleeman et al. (2005), visou avaliar os efeitos da restrição alimentar materna sobre o desenvolvimento fetal de ratas. Neste estudo, um grupo de fêmeas prenhes recebeu

ração *ad libitum* durante a gestação e os demais grupos foram submetidos à restrição alimentar, do 6º ao 17º dia de gestação, de 15, 40, 55 e 70%. Para as avaliações fetais foi empregado apenas o método clássico de avaliação teratogênica, isto é, avaliação óssea e visceral dos fetos, sendo que os resultados indicaram que esta restrição, mesmo naquelas fêmeas que perderam até 15% do peso gestacional materno, produziu apenas redução do peso fetal. Assim, os resultados desse trabalho apontaram que o *status* nutricional materno não promoveria efeitos teratogênicos.

Baseando-se nos conhecimentos referentes à toxicologia do desenvolvimento e da imunoteratologia, o trabalho aqui desenvolvido visou verificar, se de fato, a restrição alimentar materna durante a gestação não promoveria alterações morfológicas e/ou no sistema imune do concepto.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da restrição alimentar materna sobre a prole de ratas *Wistar*, por meio de avaliações teratogênicas clássicas e de imunoteratologia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação por meio de protocolos clássicos de teratogenicidade (avaliação óssea e visceral) das proles de ratas *Wistar* sob diversos regimes de restrição alimentar durante a gestação.
- Avaliação das proles de ratas sob diversos regimes de restrição alimentar durante a gestação, ao desmame (21º dia de vida) e na idade adulta (70º dia de vida), por meio de protocolo de imunoteratologia, empregando-se:
 - ✓ Imunopatologia: hemograma, peso relativo do timo e do baço, celularidade do baço e da medula óssea.
 - ✓ Testes para avaliação da imunidade inata: atividade de macrófagos peritoneais (fagocitose, produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico).

- ✓ Testes para avaliação da imunidade humoral: produção de anticorpos pelo ensaio do *Plaque Forming Cell* e a titulação de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro.
- ✓ Testes para avaliação da imunidade celular: reação de hipersensibilidade tardia (DTH).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E APARELHOS

- Acetona (Synth)
- Ácido acético (Synth)
- Ácido clorídrico (1N) - (Synth)
- Adjuvante completo de freund (Sigma)
- Albumina sérica bovina – fração V (Gibco®)
- Álcool etílico 70° (Archote)
- Álcool etílico 80° (Archote)
- Álcool etílico 96° (Archote)
- Alizarina vermelha
- Cloreto de sódio (Nuclear®)
- Etilenodiamino-tetracético-dissódico (EDTA) (Synth®)
- Glicerina
- Glutaraldeído 25% (Nuclear)
- Hidróxido de potássio
- Hidróxido de sódio (Merck)
- Lâminas e lamínulas (Glasstechica)
- Leitor de Elisa (Labsystems®)
- Líquido de buin
- Meio de cultura RPMI-1640 (Gibco)

- Meio RPMI – 1640 (Gibco)
- Meio tioglicolato – Brewer (Bibco[®])
- Microscópio óptico de contraste de fase (Nikon[®])
- Microscópio óptico de luz (Olympus[®])
- Miristato acetato de forbol (PMA) (INC[®])
- Nitrito de sódio (NaNO₂) (Synth[®])
- Nitrito de sódio (Synth);
- Paquímetro digital (Worker[®])
- Peróxido de hidrogênio a 30% (Merck[®])
- Placas de 6 e de 96 wells com fundo chato e fundo em U
- Propilenoglicol
- Reagente de Griess
- Seringas descartáveis de 0,5mL, 1,0mL e de 10mL (Rynco)
- Solução de azul de trypan (Gibco[®])
- Solução de glutaraldeído
- Solução de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco[®])
- Solução tampão de fosfato (PBS)
- Soro bovino fetal (Gibco[®])
- Tripan-blue 4% (Gibco)
- Zymosan-A (Sigma[®])

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos e fêmeas, com 60 dias de idade, provenientes do biotério do departamento de Patologia – FMVZ – USP. Os animais foram alojados em caixas de plástico fosco com tampas metálicas, medindo 40x50x20cm, as quais foram mantidas em salas com temperatura e umidade ambiente constantes (21-24° C e 65 – 70%, respectivamente). Os animais foram utilizados em conformidade com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da FMVZ-USP, protocolo nº 1403/2008. A iluminação da sala foi mantida em um ciclo de noite/dia de 12h, sendo a fase clara iniciada às 7 horas. Os animais foram alimentados com a ração NUVILAB NUVITAL-CR1® e receberam água *ad libitum* em todos os experimentos.

4.3 ACASALAMENTO

Para as avaliações teratogênicas clássicas as fêmeas foram colocadas com os machos para o acasalamento, às 8:00 horas e retirados às 10:00 horas na proporção de um macho para cada quatro fêmeas. Já para as avaliações de imunoteratogenicidade das proles, as fêmeas foram colocadas com os machos para o acasalamento às 19:00 horas e retiradas às 8:00 horas do dia seguinte na proporção de um macho para cada duas fêmeas. A confirmação da prenhez foi realizada pela presença de espermatozóide no lavado vaginal, sendo esta verificada

por meio da observação microscópica diária do esfregaço vaginal. A presença de espermatozóides no esfregaço vaginal foi considerada como indicador do dia 0 da gestação.

4.4 PARÂMETROS AVALIADOS APÓS A CESARIANA

As ratas prenhes foram anestesiadas com xilazina e quetamina nas doses respectivamente de 5mg/Kg e 50mg/Kg. Foi realizada a laparotomia e exposição dos cornos uterinos (fig1), para a contagem de pontos de implantações e reabsorções. Os ovários foram removidos e com o auxílio de uma lupa, foi feita a contagem dos corpos lúteos para avaliação da quantidade de óvulos liberados. O útero gravídico foi pesado, e foi observado o número total de fetos, a viabilidade fetal logo após o nascimento, viabilidade fetal até uma hora após o nascimento, peso, sexo e o peso das placentas. As perdas embrionárias, no período de pré-implantação e no período de pós-implantação, foram calculadas por meio da seguinte proporção:

$$\% \text{ perda pré-implantação} = (\text{CL} - \text{IM}) \times 100 / \text{CL}$$

$$\% \text{ perda pós-implantação} = (\text{IM} - \text{FV}) \times 100 / \text{IM}$$

Onde: CL= número de corpos lúteos

FV= número de fetos vivos

IM= número de implantações

Figura 1- Exposição do útero gravídico através da laparotomia, observação de implantes e fetos viáveis

4.5 EXAME ESQUELÉTICO

Para a análise óssea, quatro filhotes de cada ninhada foram colocados em acetona, permanecendo nesta solução por 24 horas. Os filhotes foram submetidos ao procedimento de evisceração. Após esse procedimento, foi realizada a diafanização que consiste em colocar os fetos em uma solução de KOH 0,8%, preparada diariamente com água destilada e alizarina, conforme o método proposto por Staples e Schenell (1964) no qual esta solução é trocada diariamente por 4 dias. Posteriormente, os fetos foram conservados em solução clareadora até o dia da análise esquelética (Figura 2) que foi realizada segundo Taylor (1986). Em seguida os fetos foram observados em um estereoscópio com aumento de 10X. Foram analisados então o grau de ossificação através da contagem dos ossos dos principais centros de ossificação (falanges, metacarpos, metatarsos, costelas,

vértebras caudais e esternébrios) e a ocorrência de variações e malformações ósseas.

Figura 2 - Fetos prontos para a análise óssea com os ossos corados pela alizarina red

4.6 EXAME VISCERAL

Para o exame visceral foram selecionados quatro filhotes de cada ninhada que foram colocados em 220ml do líquido bouin para fixação das estruturas viscerais e descalcificação dos ossos por um período de quatro dias. Logo após os fetos foram colocados em álcool 80° por dois dias e, posteriormente em álcool 90° por no mínimo quatro dias até a leitura. Em seguida, foi empregado o método de secções seriadas segundo Wilson (1965) para análise de malformações e anomalias internas.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Sete dias antes do sacrifício dos animais com 21 dias de idade, foi injetado por via ip, 1ml de meio tioglicolato para eliciação de macrófagos nesta cavidade. Já para a avaliação dos animais adultos, não foi injetada nenhuma substância para eliciação de macrófagos. Após a eutanásia desses animais em câmara de CO₂, foram injetados 10ml de PBS a 4°C na cavidade peritoneal de cada animal e, após uma massagem abdominal, foi colhida uma suspensão de células através de punção dessa cavidade. Posteriormente essas células foram colocadas em tubos plásticos de polipropileno devidamente acondicionados em gelo. A suspensão de células coletada foi quantificada em câmara de Neubauer sendo a viabilidade celular observada através da coloração com azul de trypan 0,1% aceitando-se no mínimo 95% de viabilidade, esse procedimento foi realizado para a avaliação da prole com 70 dias de idade, já para a avaliação da prole com 21 dias de idade as células foram quantificadas através do *Animal Blood Counter* (Horiba®). Após a contagem, as suspensões de células conservadas em banho de gelo foram ajustadas para $2,0 \times 10^6$ células/ml de RPMI-1640 completo.

4.7.1 Avaliação da produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos peritoneais residentes

A quantificação da concentração de peróxido de hidrogênio liberado pelas células do peritônio de ratos foi baseado no método descrito e adaptado para microensaio por Pick e Mizel (1981), e modificado por Russo et al. (1989).

Esta técnica consiste na utilização de uma placa de 96 poços de fundo chato composta por 12 colunas e 8 linhas. A primeira coluna foi preenchida com 100 mL da solução de vermelho de fenol, a qual foi chamada de branco. Nas 2^a, 3^a, 4^a e 5^a colunas foram colocadas, em quadruplicatas, concentrações molares e previamente conhecidas de H₂O₂, a saber: 5, 10, 20, 40 e 80 nMols de H₂O₂/100ml da solução de vermelho de fenol, de modo a permitir a obtenção de uma curva-padrão. O número de células foi ajustado para 2x10⁶/mL de solução de vermelho de fenol. Nas colunas restantes da mesma placa (4^o até 12^o), foram plaqueados 100mL dessa solução por poço, sendo cada grupo plaqueado em quadruplicata. Para cada grupo, as primeiras quatro linhas da mesma coluna foram utilizadas para testar a liberação espontânea de H₂O₂, nas quatro últimas linhas verificou-se a liberação induzida de H₂O₂ adicionando-se 10mL de uma solução de 10 ng/ml de miristato acetato de forbol (PMA) por poço. As placas foram fechadas e incubadas em estufa a 37°C/1 hora. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 10 µl de NaOH 1N. A concentração de H₂O₂ de cada grupo foi avaliada através da leitura da absorbância em microleitor de oito canais com filtro de 640nm. Os resultados obtidos foram transformados em nMols de H₂O₂ liberados por 2,0 x10⁶ células peritoneais, mediante equação de regressão linear com base na curva padrão.

4.7.2 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos

O H_2O_2 , o nitrito NO_2^- e outras espécies de radicais livres de O_2 , como o óxido nítrico (NO), são produtos inorgânicos secretados pelos macrófagos; embora a produção destes dois últimos ainda não tenha sido padronizada, elas podem ser inferidas através da medida de níveis de NO_2^- .

Assim, foi utilizada uma placa de 96 poços de fundo chato, na primeira coluna foi colocado apenas 50mL de RPMI-1640 que foi denominada de branco. Nas 2ª e 3ª colunas colocou-se, em quadruplicata, 50mL de concentrações molares previamente conhecidas de nitrito de sódio, a saber: 0,05; 1,0; 3,0; 6,0; nMols de NO_2^- diluídos em meio RPMI-1640, de modo a permitir a obtenção de uma curva padrão. Após a coleta das células peritoneais, foi preparada uma suspensão de $2,0 \times 10^6$ cél/ml em RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino e 50mL desta solução foi colocado na placa de 96 poços com fundo chato, sendo uma coluna de 8 poços para cada animal. Em todos os poços foi adicionado 50mL do reagente de Griess. A placa foi mantida em estufa a 37°C por 10 minutos e seguiu-se a leitura em um leitor de Elisa no comprimento de onda de 540nm. Os resultados foram obtidos em absorbância. A produção de NO_2^- foi medida em octuplicata para cada animal. Os resultados obtidos foram transformados em nMols de NO liberados por $2,0 \times 10^6$ células peritoneais, mediante equação de regressão linear com base na curva padrão.

4.7.3 Execução da técnica para avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais

Das amostras de suspensão celular colhidas da cavidade peritoneal de cada animal, foi distribuído um volume de 200 µl sobre lamínulas de vidro (13 mm de diâmetro) acondicionadas, uma a uma, dentro dos poços de placas de seis poços (com 16 mm de diâmetro), as quais foram mantidas por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a adesão dessas células sobre as lamínulas; essas foram lavadas com PBS a 4°C e incubadas com RPMI-1640 em estufa a 37°C/1 hora, na presença de 1,0 mg de zymosan-A (diluído para a concentração de 50 mg/ml em cada poço das placas. Em seguida, as lamínulas foram lavadas vigorosamente com PBS a 4°C, sendo fixadas por 10 minutos com uma solução de glutaraldeído que foi diluída em 1,0 ml de água filtrada em Filtro Milli-Q plus[®].

Após o período de incubação e de conservação das células aderidas à lamínula, essas foram coradas com panótico rápido, foi realizada a quantificação microscópica do número de células com capacidade de fagocitose por meio de um microscópio óptico de fase. O cálculo final foi realizado contando-se o número de células que fagocitaram uma ou mais partículas de zymosan-A dividido pelo número total de células contadas, sendo que foram contadas 200 células aderidas à lamínula. O índice de fagocitose (em %) foi definido multiplicando-se por 100 o valor deste cálculo final. A técnica de fagocitose foi executada conforme descrição realizada por Pasetti (1993).

4.8 AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA

Os animais foram anestesiados com xilazina/quetamina (5,0mg/kg e 50mg/kg, respectivamente). Imediatamente foi realizada a coleta de sangue, por punção da veia hepática, em seringas não heparinizadas. Estas coletas foram realizadas no período matutino entre às 8:00 e 9:00 horas da manhã. Foram coletados 5 mL de sangue, que foram transferidos para um frasco contendo 0,05µl de solução aquosa de eilenodiamino-tetracético-dissódico (EDTA) a 10%, produzindo-se uma adequada homogeneização. O hemograma foi realizado segundo procedimento recomendado por Birgel (1982). Para a avaliação da prole adulta, o hemograma foi realizado no Hospital Veterinário da FMVZ-USP no *campus* de Pirassununga. Já para avaliação da prole com 21 dias foi coletado 1 ml de sangue através de punção cardíaca e o hemograma foi realizado através do *Animal Blood Counter* (Horiba®).

4.9 AVALIAÇÃO DO PESO RELATIVO DE TIMO E BAÇO, E CELULARIDADE DO BAÇO E DA MEDULA ÓSSEA

Após o sacrifício dos animais em câmara de CO₂, procedeu-se à pesagem do timo e do baço. Em seguida foi retirada e pesada uma porção do baço. Posteriormente, a porção do baço foi divulsionada com o auxílio de duas lâminas Perfecta® para microscopia e lavada com 10 mL de solução gelada de RPMI-1640 com pH 7,4. Os esplenócitos foram coletados e mantidos em gelo, até a contagem.

As células da medula óssea foram obtidas da cavidade femoral de cada animal, após a lavagem da mesma com 5,0 mL de solução gelada de RPMI-1640 ajustada para o pH 7,4. As células foram acondicionadas em tubos de polipropileno e dispersas com auxílio de pipeta tipo “Pasteur” até obter-se uma suspensão celular homogênea. Para a avaliação dos animais adultos, a viabilidade e contagem global das células tanto do baço como da medula óssea foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de trypan, diluído 6x em PBS, e com o auxílio de um microscópio de contraste de fase Nikon®. Já para a avaliação das proles com 21 dias, as leituras das suspensões celulares foram realizadas utilizando o *Animal Blood Counter* (Horiba®).

4.10 AVALIAÇÃO DO PFC PARA QUANTIFICAÇÃO DE PLASMÓCITOS PRODUTORES DE ANTICORPOS ANTI-SRBC NO BAÇO

4.10.1 A sensibilização

Para a imunização dos ratos, eritrócitos de carneiro (SRBC) foram lavados 3x em salina (3000rpm, 15 min, a 10°C) e uma suspensão de células a $2,0 \times 10^9$ SRBC/mL foi preparada. Cada rato adulto recebeu 1,0 mL e cada rato com 21 dias recebeu 0,5mL desta suspensão por via ip.

4.10.2 O ensaio do PFC

Para a preparação do SRBC que foi utilizado para plaquear as amostras, os eritrócitos de carneiro foram lavados 3x (na mesma rotação que acima), na última lavada, tirou-se o sobrenadante e homogeneizaram-se os eritrócitos no tubo (SRBC total). Desta solução de SRBC total, fez-se uma diluição de 1:2 (p.ex. 0,5mL de SRBC total + 0,5mL de salina) e manteve-se em gelo até o momento de plaquear.

Após a eutanásia dos animais sensibilizados o baço foi coletado, pesado. Logo após foi retirada e pesada uma porção desse órgão que foi divulsionada. Em seguida os esplenócitos dos mesmos foram centrifugados (centrífuga 15000rpm, 10minutos, 4°C), o sobrenadante retirado, e adicionada solução salina 0,2% a qual foi homogeneizada por 20 segundos com o pellet de células para promover a lise das células vermelhas e imediatamente depois foi adicionado o mesmo volume de uma solução salina a 1,6%. Os esplenócitos foram contados e foi preparada uma suspensão celular em meio RPMI-1640 com $12,0 \times 10^6$ células/mL.

Para a preparação da placa, preparou-se uma solução de bacto ágar a 0,5% em RPMI. Esta solução foi colocada em homogeneizador magnético sob agitação e aquecimento até fervura. Após fervura, foi adicionado dietilaminoetil (DAE)-dextrano (1,6 mL de uma solução 0,05% de DEAE para cada 100mL de ágar). Enquanto isso, foram colocados em banho-maria sob a temperatura de 46 a 48°C, microtubos (1,5mL) já com a identificação das amostras. Em cada microtubo, ainda no banho-maria, foi adicionada 0,5mL da solução de bacto ágar.

4.10.3 O plaqueamento

Para plaquear, adicionou-se em um microtubo de 0,5mL: 25 μ L da suspensão de SRBC (1:2) + 100 μ L da suspensão de esplenócitos e 70 μ L de soro de cobaia (sistema complemento). Após fazer esta mistura de suspensões celulares, transferiu-se para o microtubo com bácto Agar, o qual foi submetido ao vórtex por 5 vezes e em seguida foi plaqueado em lâmina de histologia, previamente limpa com álcool 70°, 50 μ L desta suspensão. Cuidadosamente foi colocada uma lamínula (22x22mm) sobre a gota. Aguardou-se alguns minutos e a lamínula foi selada com esmalte incolor. As placas foram levadas à estufa a 37°C por 3 horas. Após este período, os halos de lise dos SRBC foram contados em microscópio de contraste de fase Nikon® e representados com número de PFC/10⁵ esplenócitos.

4.11 TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-ERITRÓCITOS DE CARNEIRO (ANTI-SRBC) EM RATOS

A técnica de titulação de anticorpos anti-SRBC foi realizada, com modificações, de acordo com Sharma et al. (1984). Para tal, os eritrócitos de carneiro (SRBC- *sheep red blood cell*) foram coletados assepticamente em tubo heparinizado de carneiro reprodutor adulto, sadio, pertencente à Prefeitura do *campus* de Pirassununga da USP, o número do animal foi anotado para eventuais coletas posteriores de sangue.

O tubo de sangue total, após homogeneizado, foi mantido em geladeira (4°C) por pelo menos 24 horas antes de ser administrado nos ratos para promover a sensibilização dos mesmos. Antes da sensibilização, os eritrócitos de carneiro foram lavados 3 vezes em PBS (centrifugação a 4000rpm, por 10 minutos) e uma suspensão de SRBC foi ajustada para $2,0 \times 10^9$ eritrócitos de carneiro/mL, sendo esta concentração injetada, por via ip, em cada rato.

Sete dias após a sensibilização, foram coletados, por punção cardíaca, amostras de sangue. O sangue foi mantido em temperatura ambiente por 45 minutos e submetido à centrifugação a 4000rpm, por 10 minutos. O soro foi então colocado em banho-maria a 56°C, para a desnaturação das proteínas do sistema complemento e posteriormente congelado a -20°C, até o momento da titulação.

Para a titulação, foi colocado no primeiro poço de uma placa de 96 poços de fundo em U, 30 µL de soro de rato sadio não sensibilizado com o SRBC (fonte de sistema complemento) e em cada poço subsequente (linha) foram colocados 30 µL de salina. A seguir, foram então plaqueadas as amostras de soro coletadas dos ratos da seguinte forma: na primeira linha de poços, plaqueou-se 30 µL de soro de animal não sensibilizado no primeiro poço (controle negativo); deste, retirou-se 30 µL e adicionou-se no segundo poço e assim por diante, até o 12º poço (diluição seriada). Na seqüência de linhas, plaqueou-se o soro dos animais sensibilizados.

Após a diluição seriada do soro, foram adicionados a cada poço, 30 µL da suspensão de SRBC a 10%.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C, por uma hora, e após este período fez-se a leitura. Estabeleceu-se o título de anticorpos como sendo aquele em que o botão de eritrócitos formado (hemossedimentação) foi semelhante àquele do controle negativo, bem como semelhante às diluições subsequentes; isto é, a

partir do momento em que não mais foi observada a hemólise ocasionada pelos anticorpos anti-SRBC.

O título de anticorpos foi expresso de acordo com a graduação da diluição realizada nos poços da placa, sendo a primeira diluição (1/2) tida como título 1, e assim subseqüentemente.

4.12 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR POR MEIO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIA- *DELAYED TYPE HYPERSENSITIVITY* (DTH)

Para a sensibilização imunológica dos ratos, foi injetado por via subcutânea, na base da cauda de cada animal, 0,1mL de BSA- Fração V (*Bovine serum albumin-fraction V*) (1,0mg/mL em PBS) emulsificado em Adjuvante Completo de Freund na razão 1:1. Após sete dias, preparou-se o *heat-aggregated* BSA, aquecendo-se o BSA (10mg/mL em salina) por 1 hora em banho maria a 75°C. Esta solução foi centrifugada a 2000rpm, por 10 minutos, para remover o excesso de salina; a seguir a solução foi injetada (0,1mL/rato) no coxim plantar do membro posterior.

Após 24 horas do desafio com o *heat-aggregated* BSA, o edema resultante foi medido com paquímetro digital Worker®. A avaliação da resposta imune celular (DTH) foi expressa a partir da subtração do valor obtido na mensuração do coxim plantar do membro posterior direito (BSA) 24 horas depois do desafio com aquele valor da mensuração antes da aplicação do inóculo.

4.13 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.13.1 Experimento 1: Avaliações Teratogênicas Clássicas

Foram empregadas fêmeas gestantes divididas em cinco grupos, um controle (CO) no qual os animais receberam ração *ad libitum* durante todo o período gestacional, e os demais grupos, nos quais as fêmeas foram submetidas às restrições alimentares de 15, 40, 55 e 70%, do 6º ao 17º dia de gestação. O ganho de peso foi mensurado entre os dias 0-5 da gestação, a cada três dias a partir do sexto dia de gestação e do 6º ao 20º dia de gestação. O consumo alimentar foi avaliado a cada três dias a partir do 6º dia de gestação. No 21º dia de gestação as ratas foram submetidas à secção cesariana, em seguida avaliou-se, o número de corpos lúteos, o número de implantes, o peso das placentas, a viabilidade fetal logo após o nascimento, a viabilidade fetal até uma hora após o nascimento, o peso e o sexo dos filhotes. Também foram calculadas as porcentagens de perda pré e pós-implantação e os neonatos foram submetidos às análises ósseas e viscerais.

4.13.2 Experimento 2: Avaliação do desenvolvimento e de imunoteratologia das proles (machos) aos 21 dias de vida.

Foram empregadas ratas *Wistar* prenhes divididas em cinco grupos, um controle (CO) no qual os animais receberam ração *ad libitum* durante todo o período gestacional, e os demais grupos, nos quais as fêmeas foram submetidas às restrições alimentares de 15, 40, 55 e 70%, do 6º ao 17º dia de gestação. Os animais receberam água *ad libitum* durante todo o período experimental. O ganho de peso foi mensurado entre os dias 0-5 da gestação, a cada três dias a partir do sexto dia de gestação e do 6º ao 20º dia de gestação. Também foi avaliado o ganho de peso materno durante a lactação. O consumo alimentar materno foi avaliado a cada três dias a partir do sexto dia de gestação até o final da lactação. Três dias após os nascimentos houve a transferência de filhotes (quando necessário) entre as fêmeas pertencentes ao mesmo grupo, com o objetivo de padronizar as ninhadas que ficaram, quando possível, com cinco machos e três fêmeas.

Os filhotes destas fêmeas submetidas às diferentes restrições alimentares foram, imediatamente após o desmame, avaliados da seguinte forma:

A- foram selecionados, ao acaso, aproximadamente 10 filhotes machos de cada grupo de ratas submetidas às diferentes restrições alimentares. Logo após, esses filhotes receberam 2ml de meio tioglicolato por injeção intraperitoneal e sete dias após foram submetidos à avaliação da atividade de macrófagos peritoneais (fagocitose, produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico). Além disso, foi coletado sangue desses animais através de punção cardíaca para avaliação do hemograma.

B- foram selecionados, ao acaso, aproximadamente 10 filhotes machos de cada grupo de ratas submetidas às diferentes restrições alimentares. Logo após, esses filhotes foram sensibilizados com eritrócitos de carneiro por via ip e foram avaliados quanto à produção de anticorpos por plasmócitos do baço através do *Plaque forming cell* (PFC); título anti-SRBC; peso relativo de timo e baço; celularidade de baço e medula óssea.

B- foram selecionados, ao acaso, aproximadamente 10 filhotes machos de cada grupo de ratas submetidas às diferentes restrições alimentares. Logo após, esse filhotes foram submetidos à avaliação da imunidade celular através da reação de hipersensibilidade tardia (DTH).

4.13.3 Experimento 3: Avaliação do desenvolvimento e de imunoteratologia das proles (machos) aos 70 dias de vida.

Foram empregadas ratas *Wistar* prenhes divididas em cinco grupos, um controle (CO) no qual os animais receberam ração *ad libitum* durante todo o período gestacional, e os demais grupos, nos quais as fêmeas foram submetidas às restrições alimentares de 15, 40, 55 e 70%, do 6º ao 17º dia de gestação. Os animais receberam água *ad libitum* durante todo o período experimental. O ganho de peso foi mensurado entres os dias 0-5 da gestação, a cada três dias a partir do 6º dia de gestação e do 6º ao 20º dia de gestação. Também foi avaliado o ganho de peso materno durante a lactação. O consumo alimentar materno foi avaliado a cada três dias a partir do 6º dia de gestação até o final da lactação. Três dias após os

nascimentos houve a transferência de filhotes, quando necessário, entre as fêmeas pertencentes ao mesmo grupo, com o objetivo de padronizar as ninhadas que ficaram, quando possível, com cinco machos e três fêmeas. Os filhotes machos destas fêmeas submetidas às diferentes restrições alimentares foram, imediatamente após o desmame, separados e colocados em gaiolas (5 animais cada) e monitorados semanalmente quanto ao ganho de peso e consumo de ração até atingirem a idade adulta. Assim foram realizadas as seguintes avaliações:

A- aproximadamente 10 filhotes machos adultos receberam 2ml de meio tioglicolato por injeção intraperitoneal e sete dias após foram submetidos à avaliação da atividade de macrófagos peritoneais (fagocitose, produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico).

B- aproximadamente 10 filhotes machos adultos foram anestesiados para coleta de sangue através da veia hepática para realização do hemograma completo e após a eutanásia em câmara de CO₂, foi realizada a avaliação dos pesos relativos de timo e baço; celularidade de baço e medula óssea.

C- aproximadamente 10 filhotes machos adultos foram avaliados quanto à produção de anticorpos anti-SRBC e foi verificada a produção de anticorpos anti-SRBC por plasmócitos no baço através do *Plaque forming cell* (PFC).

D- aproximadamente 10 filhotes machos adultos foram avaliados quanto à reação de hipersensibilidade tardia (DTH).

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foi utilizado o *software* Prisma 5.0, e os resultados obtidos foram apresentados na forma de média e seus respectivos erros-padrões.

Foi empregado o teste estatístico de Bartlett, para se verificar a homocedasticidade dos dados (GAD; WEIL, 1989). Caso os dados fossem paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA (SNEDCOR, 1946) para comparação das médias entre os vários grupos. Para detecção das diferenças significantes entre os grupos, após a ANOVA, o teste de escolha foi o de Dunnett, uma vez que todos os grupos apresentavam número de observações (n) aproximadamente semelhantes (GAD; WEIL, 1989). Caso os dados não fossem paramétricos foi realizado o teste de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn. Para as análises de contingência foi realizado o teste exato de Fisher. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada capaz de revelar diferenças significantes entre os grupos.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÕES TERATOGÊNICAS CLÁSSICAS

A tabela 1 mostra e a figura 3 ilustra o consumo de ração a cada três dias, do 6° ao 17° dia de gestação, e o consumo de ração total do 6° ao 20° dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo controle (CO); do 6° ao 17° dia de gestação. A análise de variância revelou haver diferenças significantes entre os grupos em relação ao consumo de ração entre os dias 6-8, 9-11 e 6-20 ($F=181,2$; $F=93,27$; $F=82,18$; respectivamente, $df=4/45$ e $p<0,05$). O teste de Dunnett empregado subsequentemente revelou haver diminuição significativa ($p<0,05$) no consumo de ração nos grupos das ratas submetidas às restrições alimentares de 40, 55 e 70% em relação ao grupo CO. A ANOVA também revelou haver diferenças significantes entre os grupos em relação ao consumo de ração entre os dias 12-14 e 15-17 ($F=147,3$; $F=1,178$; respectivamente, $df=4/45$ e $p<0,05$). O teste de Dunnett empregado posteriormente revelou haver diminuição significativa ($p<0,05$) no consumo de ração nos grupos de ratas que foram submetidos às diferentes restrições alimentares (15, 40, 55 e 70%). No entanto, o teste estatístico empregado não revelou haver diferenças significantes no consumo de ração entre os dias 18-20 da gestação.

A figura 4 ilustra o ganho de peso materno durante a gestação, entre o 0 e 5° dia, a cada três dias entre o 6° e 20°, e o ganho de peso total (0 ao 20°). O teste estatístico (ANOVA) revelou não haver diferenças no ganho de peso entre os grupos

nos cinco primeiros dias de gestação. No entanto, este mesmo teste estatístico revelou haver diferenças significantes entre os grupos, entre os dias 6-8, 9-11, 12-14 e 0-20 ($F=66,12$; $F=13,85$; $F=17,89$; $F=11,77$; respectivamente, $df=4/45$ e $p<0,05$). O teste de Dunnett revelou haver diminuição significativa ($p<0,05$) no ganho de peso nos grupos das ratas submetidas às restrições alimentares de 40, 55 e 70% em relação ao grupo CO. A ANOVA revelou haver diferenças significantes no ganho de peso entre os grupos nos dias 15-17 ($F=9,77$; $df=4/45$ e $p<0,05$), sendo que o teste de Dunnett empregado em seguida mostrou uma diminuição ($p<0,05$) no ganho de peso de todos os grupos de ratas que foram submetidas às restrições alimentares, em relação ao grupo que recebeu ração *ad libitum* (CO) durante toda a gestação. Entre o 18° e 20° dia da gestação a análise de variância revelou haver diferenças significantes ($F=22,79$; $df=4/45$ e $p<0,05$) entre os grupos. O teste de Dunnett mostrou um aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) em todos os grupos de ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares (15, 40, 55 e 70%) em relação ao grupo CO.

A tabela 2 mostra e a figura 5 ilustra o número de neonatos por ninhada, o teste estatístico empregado (ANOVA) não evidenciou alterações significativas entre os grupos. Esse teste estatístico também não revelou haver diferenças entre os grupos, em relação ao número total de filhotes fêmeas por ninhada (Tabela 3 e Figura 6) e ao número de filhotes machos por ninhada (Tabela 4 e Figura 7). No entanto, a análise de variância empregada revelou haver diferenças ($F=19,42$; $df=4/498$ e $p<0,05$) no peso ao nascimento dos neonatos (Tabela 6 e Figura 10). O teste de Dunnett realizado em seguida, mostrou uma diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) no peso ao nascimento dos filhotes das ratas submetidas às restrições alimentares de 40, 55 e 70% em relação ao grupo CO.

A tabela 7 mostra e a figura 11 ilustra o peso das placentas das ratas pertencentes aos diferentes grupos. A ANOVA revelou haver diferenças significantes ($F=19,23$; $df= 4/501$ e $p<0,05$) entre os grupos. O teste de Dunnett realizado subsequentemente mostrou diminuição significativa ($p<0,05$) no peso das placentas das ratas submetidas às restrições alimentares de 40, 55 e 70% em relação ao grupo CO.

A tabela 8 mostra e a figura 12 ilustra a porcentagem de perda pré-implantação embrionária. A análise de variância não revelou haver diferença entre os grupos. A tabela 9 mostra e a figura 13 ilustra a porcentagem de perda pós-implantação embrionária, sendo que a ANOVA também não mostrou diferença entre os grupos.

A tabela 10 mostra o resultado relativo ao exame esquelético dos fetos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares, 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo controle (CO); do 6º ao 17º dia de gestação. Não houve nenhum feto afetado por malformações ósseas em todos os grupos. O teste exato de Fisher não revelou diferenças significantes nos fetos e nas ninhadas com pelo menos um feto acometidos por variações esqueléticas e 5º e/ou 6º esternébrios não ossificados.

A tabela 11 mostra os números de variações em esternébrios (rudimentar, em borboleta, ausente, em *Shaped* e bipartido) dos fetos dos diferentes grupos e o número total de variações em esternébrios. O teste exato de Fisher não evidenciou diferenças significantes entre os grupos.

Em relação ao exame visceral, verificou-se que não houve malformações viscerais, ausência de órgãos (cérebro, coração, pulmões, rins, fígado, estômago, intestino, testículos, ovários e timo) e defeitos em septo interventricular nos fetos

provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares. No entanto, o teste exato de Fisher revelou haver aumento ($p<0,05$) no número de variações viscerais nos neonatos provenientes das ratas submetidas a 70% de restrição alimentar. Este mesmo teste estatístico também evidenciou aumento ($p<0,05$) no número de ninhadas com pelo menos um feto afetado por variações viscerais, nos grupos de ratas que sofreram 40 e 55% de restrição alimentar, durante a gestação. O teste exato de Fisher revelou ainda haver aumento significativo ($p<0,05$) nos números de neonatos com ureteres sinuosos; e nas ninhadas (com pelo menos um feto com ureter sinuoso), das ratas que foram submetidas a 70% de restrição alimentar (Tabela 12).

Além disto, o teste estatístico empregado revelou haver diminuição ($p<0,05$) na viabilidade fetal verificada até uma hora após o nascimento, daqueles neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às restrições alimentares de 40, 55 e 70% em relação ao grupo CO; do 6 ao 17º dia de gestação (tabela 5 e figura 8).

A figura 9 apresenta os fetos provenientes das ratas que foram submetidas a 70% de restrição alimentar e que morreram antes da primeira hora após a cesariana (fetos 1 e 3), verificando-se que estes se apresentavam com tez cianótica. Por outro lado, o feto proveniente de rata do grupo CO (feto 2), apresentou-se com a tez normocorada.

Tabela 1 – Consumo de ração (em gramas), avaliado a cada três dias, a partir do 6º dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Dias de gestação	Controle (n=10) ^a	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=10)	55 (n=10)	70 (n=10)
6-8^b	48,50±1,5	48±0	36±0*	27±0*	18±0*
9-11^b	51,2±1,4	48±0	36±0*	27±0*	18±0*
12-14^b	59,3±3,4	48±0*	36±0*	27±0*	18±0*
15-17^b	72,2±2,8	48±0*	36±0*	27±0*	18±0*
18-20	55,8±1,9	62,1±4,7	65,3±2,5	64,5±3,2	64,2±4,0
6-20	266,2±10,9	254,1±4,7	215,3±2,7*	172,5±3,2*	137,5±4,3*

* $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett.

^a Número de animais por grupo

^b Período de restrição alimentar

Figura 3 – Consumo de ração (em gramas), avaliado a cada três dias, a partir do 6º dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6 ao 17º dia de gestação

Figura 4 – Ganho de peso materno (em gramas) do 0 ao 5º dia de gestação (0-5), a cada três dias do 6º ao 20º dia de gestação, e ganho de peso total (0-20) durante a gestação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 2 – Número de neonatos por ninhada das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70%, em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo

	Controle (n=10)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=10)	55 (n=10)	70 (n=10)
Neonatos por ninhada	8,89 ± 0,51	7,9 ± 0,88	10,20 ± 0,41	10,00 ± 0,63	9,10 ± 0,62

Figura 5 – Número de neonatos por ninhada, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70%, em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 3 – Número total de filhotes fêmeas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70%, em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo

	Controle (n=10)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=10)	55 (n=10)	70 (n=10)
Nº de fêmeas/ninhada	4,30 ± 0,53	4,1 ± 0,52	5,5 ± 0,5	4,7 ± 0,66	4,8 ± 0,48

ANOVA

Figura 6 – Número total de filhotes fêmeas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70%, em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 4 – Número total de filhotes machos, provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo

	Controle	Restrição alimentar (%)			
	(n=10)	15 (n=10)	40 (n=10)	55 (n=10)	70 (n=10)
Nº de machos/ninhada	4,20 ± 0,62	4,30 ± 0,66	4,30 ± 0,53	4,6 ± 0,67	4,30 ± 0,57

ANOVA

Figura 7 – Número total de filhotes machos, provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 5 – Viabilidade fetal, até uma hora após o nascimento, de filhotes provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentados o número de neonatos por grupo e os números de neonatos vivos e mortos após este período

	Controle (n=80)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=73)	40 (n=61)	55 (n=96)	70 (n=64)
Vivos/Mortos	61/19	51/22	26/35*	47/49*	34/30*

*p<0,05 *versus* grupo controle, teste exato de Fisher.

Figura 8 – Viabilidade fetal, até uma hora após o nascimento, de filhotes provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentados os números de fetos vivos e mortos após este período. *p<0,05 *versus* grupo controle, teste exato de Fisher

Figura 9 – Fetos provenientes das ratas que foram submetidas a 70% de restrição alimentar e que morreram uma hora após a cesariana (fetos 1 e 3), verificou-se que estes apresentavam a tez cianótica. Por outro lado, o feto 2, proveniente de rata do grupo CO, apresentou-se com a tez normocorada

Tabela 6 – Peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo

	Controle (n=113)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=60)	40 (n=127)	55 (n=100)	70 (n=99)
Peso ao nascimento	4.49	4.42	4.11	4.04	3.97
	±	±	±	±	±
	0.03	0.04	0.06*	0.04*	0.04*

* $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 10 – Peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 7 – Peso das placentas das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo

	Controle (n=113)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=60)	40 (n=127)	55 (n=100)	70 (n=99)
Peso das placentas	0.50 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.45 ± 0.006*	0.42 ± 0.008*	0.42 ± 0.006*

* $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 11 – Peso das placentas das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 8 – Porcentagem de perda pré-implantação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo

	Controle (n=10)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=10)	55 (n=10)	70 (n=10)
Porcentagem de perda pré-implantação	5,20±2,90	12,41±4,45	6,30±3,05	7,70±3,38	13,20±3,415

Figura 12 – Porcentagem de perda pré-implantação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Tabela 9 – Porcentagem de perda pós-implantação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo

	Controle (n=10)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=10)	55 (n=10)	70 (n=10)
Porcentagem de perda pré-implantação	12,25 ± 3,8	5,00 ± 2,11	5,4 ± 2,56	9,90 ± 3,00	8,00 ± 3,47

Figura 13 – Porcentagem de perda pós-implantação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Tabela 10 – Exame esquelético dos fetos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que receberam dieta *ad libitum* (controle - CO), do 6º ao 17º dia de gestação. Para os dados paramétricos são apresentados as médias, erros-padrões e números de animais por grupos. Para os dados não-paramétricos são apresentados o número de eventos e o número de animais por grupo

		Restrição alimentar (%)				
		Controle	15	40	55	70
Exame Fetal	F (n=25)	F (n=25)	F (n=25)	F (n=25)	F (n=25)	F (n=25)
	N (n=10)	N (n=10)	N (n=10)	N (n=10)	N (n=10)	N (n=10)
Malformações esqueléticas	F ¹	0	0	0	0	0
	N ²	0	0	0	0	0
Variações esqueléticas	F ¹	6	13	12	12	6
	N ²	3	6	5	5	3
Esternébrios 5 e 6 não ossificados	F ¹	1	4	6	0	1
	N ²	1	4	2	1	1
Grau de ossificação		44,44±3,54	42,52±2,1	42,24±3,88	44,28±3,86	44±2,48

(1) F(fetos afetados)

(2) N (ninhada com pelo menos 1 feto afetado)

Tabela 11 – Variações em esternébrios de fetos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São mostrados o número de animais por grupo, o número de ocorrência de cada variação e o número total de variações

Variações em esternébrios						
	Rudimentar	Borboleta	Ausente	Shaped	Bipartido	Total
CO (25) ^a	1	4	1	0	0	6
E85(25)	3	3	2	1	0	9
E60(25)	4	3	3	0	0	10
E45(25)	0	3	0	1	3	7
E30(25)	0	6	1	2	0	9

^a Entre parênteses número de animais por grupo; Teste exato de Fisher

Tabela 12 – Exame visceral dos fetos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentados o número de eventos e o número de animais por grupo

		Restrição alimentar (%)				
Exame visceral		Controle	15	40	55	70
		F(n=18)	F(n=18)	F(n=19)	F(n=24)	F(n=23)
		N (n=10)	N (n=10)	N (n=10)	N (n=10)	N (n=10)
Variações Viscerais	F ¹	3	8	4	10	13*
	N ²	2	7*	4	6	9*
Ureter sinuoso	F ¹	3	8	4	6	9*
	N ²	2	7*	4	6*	9*
Ureter dilatado	F ¹	0	1	0	0	1
	N ²	0	1	0	0	1
Malformações viscerais	F ¹	0	0	0	0	0
	N ²	0	0	0	0	0
Defeitos em septo interventricular	F ¹	0	0	0	0	0
	N ²	0	0	0	0	0
Ausência de órgãos	F ¹	0	0	0	0	0
	N ²	0	0	0	0	0

(1) F(fetos afetados)

(2) N (ninhada com pelo menos 1 feto afetado)

*p<0,05 *versus* grupo controle, teste exato de Fisher.

5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E DE IMUNOTERATOLOGIA DAS PROLES AOS 21 DIAS DE IDADE.

A tabela 13 mostra o número de fêmeas que realizaram canibalismo logo após o parto, o teste exato de Fisher não revelou diferenças significantes entre os grupos.

A tabela 14 mostra e a figura 14 ilustra o consumo de ração a cada três dias do 6° ao 17° dia de gestação, e o consumo de ração total do 6° ao 20° dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo controle (CO); do 6° ao 17° dia de gestação. A ANOVA revelou haver diferenças significantes entre os grupos durante os dias de gestação 6-8, 9-11, 12-14, 15-17, 18-20 e 6-20 ($F=88,72$; $F=142,7$; $F=295,8$; $F=115,7$; $F=51,37$; $F=67,10$; respectivamente, $df=4/25$ e $p<0,05$). O teste de Dunnett realizado subsequentemente revelou haver diminuição ($p<0,05$) no consumo de ração das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares em relação ao grupo controle, entre os dias 6-8, 9-11, 12-14, 15-17 e 6-20. Este mesmo teste estatístico mostrou haver aumento ($p<0,05$) no consumo de ração das ratas que foram submetidas às restrições alimentares de 55 e 70% em relação ao grupo controle, entre os dias de gestação 18-20.

A figura 15 ilustra o ganho de peso materno durante a gestação do 0 ao 5° dia, a cada três dias entre o 6 e 20°, e o ganho de peso total (0 ao 20° dia). A análise de variância não revelou haver diferenças entre os grupos nos cinco primeiros dias de gestação. No entanto, esse mesmo teste estatístico evidenciou diferenças significativas entre os grupos nos dias 6-8, 9-11, 12-14, 15-17, 18-20 e 0-20 ($F=35,52$; $F=17,37$; $F=7,48$; $F=14,63$; $F=18,75$; $F=8,25$; respectivamente, $df=4/25$ e

$p<0,05$). O teste de Dunnett, empregado posteriormente, revelou diminuição ($p<0,05$) no ganho de peso das ratas submetidas às diferentes porcentagens de restrição alimentar em relação ao grupo controle, entre os dias 6-8, 9-11 e 15-17. Esse mesmo teste estatístico mostrou haver diminuição ($p<0,05$) no ganho de peso das ratas que foram submetidas à restrição alimentar de 40, 55 e 70% em relação ao grupo controle, entre os dias 12-14 e 0-20. Entre os dias de gestação 18-20, o teste de Dunnett revelou haver aumento ($p<0,05$) no ganho de peso das ratas submetidas a 15, 40, 55 e 70% de restrição alimentar em relação ao grupo controle.

A tabela 15 mostra e a figura 16 ilustra o consumo de ração materno durante a lactação. A ANOVA não mostrou haver diferença significativa entre os grupos. Já a tabela 16 mostra e a figura 17 ilustra o ganho de peso materno durante a lactação, a análise de variância ($F=8,44$; $df= 4/25$ e $p<0,05$) revelou haver diferença significativa ($p>0,05$) no ganho de peso das ratas dos diferentes grupos. O teste de Dunnett realizado subsequentemente revelou haver aumento ($p<0,001$) no ganho de peso, durante a lactação, das ratas que sofreram restrição alimentar de 70% durante a gestação, em relação ao grupo controle.

A tabela 17 mostra e a figura 18 ilustra o peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que receberam as diferentes restrições alimentares em relação ao grupo controle. O teste de Kruskal-Wallis ($KW=37,38$) revelou haver diferenças significantes entre os grupos. O teste de Dunn realizado posteriormente evidenciou haver diminuição no peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas à restrição alimentar de 40 ($p<0,05$), 55 ($p<0,001$) e 70% ($p<0,001$) em relação ao grupo controle.

A tabela 18 mostra e a figura 19 ilustra o ganho de peso durante a lactação dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas dos diferentes grupos. A

ANOVA ($F=1,85$; $df= 4/25$ e $p<0,05$) revelou haver diferenças significantes entre os grupos. O teste de Dunnett ($p<0,05$) realizado posteriormente mostrou uma diminuição significativa no ganho de peso dos filhotes machos da ninhada proveniente das ratas que foram submetidas a 70% de restrição alimentar durante a gestação.

Em relação à atividade de macrófagos peritoneais, a análise de variância (ANOVA) não revelou haver diferenças entre as proles com 21 dias, provenientes de ratas submetidas às diferentes restrições alimentares em relação aquelas proles do grupo controle, quando foram avaliados o índice de fagocitose (Tabela 19 e Figura 20) e a produção de H_2O_2 não induzida pelo PMA (Tabela 21 e Figura 22). No entanto esse mesmo teste estatístico revelou haver diferenças significantes ($F=5,94$; $df=4/47$ e $p<0,05$) entre os grupos, em relação à produção de H_2O_2 induzida pelo PMA. O teste de Dunnett realizado subsequentemente mostrou haver aumento significativo neste parâmetro nas proles (21 dias) de ratas submetidas às restrições alimentares de 15 ($p<0,05$), 40($p<0,001$), 55 ($p<0,05$) e 70% ($p<0,001$), em relação ao grupo controle (tabela 20 e figura 21). A tabela 22 mostra e a figura 23 ilustra a produção de NO por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias dos diferentes grupos. O teste de Kruskal-Wallis não revelou haver diferenças entre os grupos.

Em relação à imunidade celular, a tabela 23 mostra e a figura 24 ilustra a reação de hipersensibilidade tardia (DTH). O teste de Kruskal-Wallis ($KW=19,8$ e $p<0,05$) revelou haver diferenças entre os grupos. O teste de Dunn realizado subsequentemente mostrou aumento significativo no DTH da prole (21 dias) das ratas submetidas às restrições alimentares de 40 e 70% durante a gestação.

Em relação às análises dos órgãos linfóides, a ANOVA não revelou haver diferenças entre os grupos, em relação ao peso relativo do baço (Tabela 24 e Figura

25), celularidade do baço (Tabela 25 e Figura 26) e celularidade da medula óssea (Tabela 26 e Figura 27). No entanto esse mesmo teste estatístico detectou diferenças ($F=8,43$; $df=4/43$ e $p<0,05$) entre os grupos quando avaliado o peso relativo do timo. O teste de Dunnett empregado subsequentemente revelou haver aumento do peso relativo do timo das proles com 21 dias provenientes de ratas que foram submetidas às restrições alimentares de 15 ($p>0,001$), 40 ($p<0,05$), 55 ($p>0,001$) e 70% ($p>0,001$) em relação ao grupo controle (Tabela 27 e Figura 28).

Em relação à imunidade humoral, a tabela 28 mostra e a figura 29 ilustra o título de anticorpos anti-SRBC das proles com 21 dias provenientes das ratas dos diferentes grupos. O teste de Kruskal-Wallis não evidenciou diferenças entre os grupos. A análise de variância também não detectou nenhuma diferença entre as proles com 21 dias, quando foi avaliado o *Plaque forming cell* (PFC) (Tabela 29 e Figura 30).

Quando realizado o hemograma das proles com 21 dias provenientes das ratas dos diferentes grupos, a análise de variância não detectou diferenças significantes entre os grupos em relação ao número de leucócitos (Tabela 30 e Figura 31), número de eritrócitos (Tabela 31 e Figura 32), hemoglobina corpuscular média (Tabela 34 e Figura 35), concentração de hemoglobina corpuscular média (Tabela 35 e Figura 36). O teste de Kruskal-Wallis também não revelou haver diferenças no hematócrito (Tabela 36 e Figura 37) e na concentração de hemoglobina (Tabela 33 e Figura 34) das proles com 21 dias de vida, provenientes das ratas dos diferentes grupos.

No entanto, a ANOVA detectou diferenças ($F=3,59$; $df=4/44$ e $p<0,05$) entre os grupos em relação ao volume corpuscular médio (Tabela 32 e Figura 33). O teste de Dunnett ($p<0,05$) realizado posteriormente revelou haver aumento significativo em

todas as proles das ratas submetidas às diferentes restrições alimentares em relação ao grupo controle.

Tabela 13 – Número de fêmeas que realizaram canibalismo logo após o parto. As ratas foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação

	Controle (n=11)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=7)	70 (n=7)
Canibalismo materno	1	2	2	3	3

Teste exato de Fisher

Tabela 14 – Consumo de ração (em gramas), avaliado a cada três dias a partir do 6° dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

Dias de gestação	Controle (n=8) ^a	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=4)	70 (n=4)
6-8^b	57,37±2,64	48*	36*	27*	18*
9-11^b	58,62±1,95	48*	36*	27*	18*
12-14^b	52,62±1,29	48*	36*	27*	18*
15-17^b	61,87±2,57	48*	36*	27*	18*
18-20	63,87±3,48	66±5,62	77,42±2,64	90±8,59*	86,75±4,60*
6-20	290,37±6,88	258±5,623*	221,46±2,64*	198±8,59*	158,75±4,60*

* $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett.

^a Número de animais por grupo

^b Período de restrição alimentar

Figura 14 – Consumo de ração (em gramas), avaliada a cada três dias a partir do 6º dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação

Figura 15 – Ganho de peso materno (em gramas) do 0 ao 6º dia de gestação (0-5), a cada três dias do 6º ao 20º dia de gestação, e ganho de peso total (0-20) durante a gestação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 15 – Consumo de ração materno durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=8)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=4)	70 (n=4)
Consumo de ração durante a lactação	789.66 ± 46.83	883.71 ± 33.61	847.71 ± 43.84	855.50 ± 5.74	934.5 ± 18.24

ANOVA

Figura 16 – Consumo de ração materno durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 16 – Ganho de peso durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=8)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=4)	70 (n=4)
Ganho de peso materno durante a lactação	14.75 ± 1.65	14.71 ± 2.16	14.57 ± 4.05	27.75 ± 6.73	48.75 ± 11.10***

* $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 17 – Ganho de peso durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões.
*** $p < 0,001$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 17 – Peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=60)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=62)	40 (n=51)	55 (n=40)	70 (n=40)
Peso ao nascimento	6,08±0,11	5,66±0,1398	5,60±0,12	5,22± 0,12	5,17±0,11

* p<0,05; *** p<0,001 *versus* o grupo controle, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Figura 18 – Peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * p<0,05; *** p<0,001 *versus* o grupo controle, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn

Tabela 18 – Ganho de peso durante a lactação dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=8)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=4)	70 (n=4)
Ganho de peso dos machos das ninhadas durante a lactação	29,40 ± 2,25	27,02 ± 0,67	27,95 ± 0,97	27,61 ± 1,06	23,00 ± 0,40*

* $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnet.

Figura 19 – Ganho de peso durante a lactação dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnet

Tabela 19 – Avaliação do índice de fagocitose de macrófagos peritoneais das proles com 21 dias proveniente das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=9)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=9)	40 (n=9)	55 (n=9)	70 (n=9)
Índice de Fagocitose	56,89	65,00	57,89	58,11	57,50
±	±	±	±	±	±
(%)	2,43	3,34	4,66	3,64	3,82

ANOVA

Figura 20 – Avaliação do índice de fagocitose de macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 20 – Avaliação da produção de H_2O_2 (em nMols) induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=11)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=8)	55 (n=9)	70 (n=10)
Produção de H_2O_2 induzida pelo PMA (nMols)	59,46 ± 6,44	106,3 ± 12,16*	131,2 ± 14,45***	107,4 ± 14,01*	119,2 ± 10,92**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$, *versus* grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 21 – Avaliação da produção de H_2O_2 (em nMols) induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$ *versus* o grupo controle. ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 21 – Avaliação da produção de H_2O_2 (em nMols) não induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=11)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=11)	40 (n=8)	55 (n=10)	70 (n=10)
Produção de H_2O_2 não induzida pelo PMA (nMols)	42,50 ± 6,13	27,15 ± 6,04	40,16 ± 5,68	20,03 ± 6,71	33,08 ± 8,39

ANOVA

Figura 22 – Avaliação da produção de H_2O_2 (em nMols) induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 22 – Avaliação da produção de NO (em nMols) por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=11)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=8)	55 (n=9)	70 (n=10)
Avaliação da produção de NO (nMols)	11,14 ± 1,56	11,22 ± 1,83	12,01 ± 1,63	13,40 ± 1,95	12,54 ± 1,17

Teste de Kruskal-Wallis

Figura 23 – Avaliação da produção de NO (em nMols) por macrófagos peritoneais das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 23 – Reação de hipersensibilidade tardia (*Delayed type hypersensitivity* – DTH) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. As proles foram sensibilizadas, via subcutânea, com BSA-V (*Bovine serum albumin* – *factor V*) quatro dias antes do desafio com BSA-V no coxim plantar. São apresentadas as médias, erros-padrão e número de animais por grupo (n). Obs.: Não houve filhotes suficientes do grupo 55% de restrição alimentar para a realização deste teste

	Controle (n=10)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=8)	55 (n=9)	70 (n=9)
Reação de hipersensibilidade tardia (DTH)	0,30 ± 0,04	0,61 ± 0,08	0,93 ± 0,14***	-----	0,69 ± 0,06**

** p<0,01; *** p<0,001 versus o grupo controle, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Figura 24 – Reação de hipersensibilidade tardia (*Delayed type hypersensitivity* – DTH) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. As proles foram sensibilizadas, via subcutânea, com BSA-V (*Bovine serum albumin* – *factor V*) quatro dias antes do desafio com BSA-V no coxim plantar. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ** p<0,01; *** p<0,001 versus o grupo controle, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Obs.: Não houve filhotes suficientes do grupo 55% de restrição alimentar para a realização deste teste

Tabela 24 – Peso relativo do baço (g/100g de p.v.) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=10)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=8)	70 (n=7)
Peso relativo do baço (g/100g de p.v.)	4,04 ± 0,23	4,25 ± 0,31	4,76 ± 0,27	4,36 ± 0,40	5,16 ± 0,34

ANOVA

Figura 25 – Peso relativo do baço (g/100g de p.v.) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 25 – Celularidade do baço das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=10)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=8)	70 (n=7)
Celularidade do baço (nº de células x10⁷)	4,04 ± 0,23	4,25 ± 0,31	4,76 ± 0,27	4,36 ± 0,40	5,16 ± 0,34

ANOVA

Figura 26 – Celularidade do baço das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 26 – Celularidade da medula óssea das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=10)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=8)	70 (n=7)
Celularidade da medula óssea	9,44	7,09	6,86	8,20	7,74
(nº de células x10⁷)	± 0,97	± 0,67	± 0,85	± 0,72	± 0,45

ANOVA

Figura 27 – Celularidade da medula óssea das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 27 – Peso relativo do timo (g/100g de p.v.) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=10)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=8)	70 (n=7)
Peso relativo do timo (g/100g de p.v.)	2,73 ± 0,19	3,78 ± 0,08***	3,46 ± 0,13**	3,57 ± 0,10***	3,61 ± 0,14***

p<0,01; *p<0,001 versus o grupo controle ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 28 – Peso relativo do timo (g/100g de p.v.) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. **p<0,01; ***p<0,001 versus o grupo controle ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 28 – Título de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (SRBC) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. Os animais foram sensibilizados, via intraperitoneal, com SRBC, sete dias antes da coleta de sangue e obtenção do soro. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=10)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=8)	70 (n=7)
Título de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro	4,70	6,70	6,22	5,00	5,85
	±	±	±	±	±
	0,73	0,74	0,27	0,46	0,34

Teste de Kruskal-Wallis

Figura 29 – Título de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (SRBC) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. Os animais foram sensibilizados, via intraperitoneal, com SRBC, sete dias antes da coleta de sangue e obtenção do soro. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 29 – *Plaque-forming cell* (PFC/ 10^5 cél) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=10)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=8)	70 (n=7)
PFC (PFC/10^5 cel)	2,60 ± 0,49	4,60 ± 0,74	1,66 ± 0,37	2,62 ± 0,82	2,71 ± 0,47

ANOVA

Figura 30 - *Plaque-forming cell* (PFC/ 10^5) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n). ANOVA

Tabela 30 – Leucócitos das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=11)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=9)	70 (n=10)
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	3,13 $\pm$ 0,50	4,02 $\pm$ 0,35	4,35 $\pm$ 0,66	4,34 $\pm$ 0,31	3,55 $\pm$ 0,21

ANOVA

Figura 31 – Leucócitos das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 31 – Eritrócitos das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=11)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=9)	70 (n=10)
Eritrócitos (x10³/mm³)	4,54 ± 0,39	4,47 ± 0,35	4,70 ± 0,35	5,08 ± 0,22	4,78 ± 0,15

ANOVA

Figura 32 – Eritrócitos das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 32 – Volume corpuscular médio (V.C.M.) (μm^3) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=11)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=9)	70 (n=10)
V.C.M (μm^3)	61,36 $\pm$ 0,63	63,40 $\pm$ 0,45*	63,56 $\pm$ 0,58*	63,44 $\pm$ 0,50*	63,60 $\pm$ 0,40*

*p<0,05 versus o grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 33 – Volume corpuscular médio (V.C.M.) (μm^3) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. *p<0,05 versus o grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 33 – Hemoglobina das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=11)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=9)	70 (n=10)
Hemoglobina (g/dl)	9,53 ± 0,95	9,50 ± 0,94	10,76 ± 0,47	10,56 ± 1,16	10,57 ± 0,33

Teste de Kruskal-Wallis

Figura 34 – Hemoglobina das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 34 – Hemoglobina corpuscular média (H.C.M.) (pg) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=11)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=9)	70 (n=10)
H.C.M (pg)	21,11 ± 0,35	21,76 ± 0,35	22,02 ± 0,24	21,99 ± 0,23	22,07 ± 0,27

ANOVA

Figura 35 – Hemoglobina corpuscular média (H.C.M.) (pg) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Tabela 35 – Concentração de hemoglobina corpuscular média (C.H.M.) (%) das proles com 21 dias provenientes das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=11)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=9)	70 (n=10)
C.H.M. (%)	34,51 ± 0,27	34,34 ± 0,43	34,71 ± 0,25	35,09 ± 0,16	34,91 ± 0,35
ANOVA

Figura 36 – Concentração de hemoglobina corpuscular média (C.H.M.) (%) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Tabela 36 – Hematócrito das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=11)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=9)	70 (n=10)
Hematócrito (%)	28,02	22,03	29,71	33,23	30,31
	± 2,51	± 3,07	± 2,17	± 0,45	± 0,96

Teste de Kruskal-Wallis

Figura 37 – Hematócrito das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 37 – Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=11)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=10)	40 (n=9)	55 (n=9)	70 (n=10)
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	542,4 ± 62,13	528,2 ± 70,82	573,4 ± 85,40	763,6 ± 32,11	588,0 ± 51,64

Teste de Kruskal-Wallis.

Figura 38 – Plaquetas das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis

6.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E DE IMUNOTERATOLOGIA DAS PROLES AOS 70 DIAS DE IDADE

A tabela 38 mostra que nenhuma das ratas dos diferentes grupos realizaram canibalismo logo após o parto.

A tabela 39 mostra e a figura 39 ilustra o consumo de ração a cada três dias do 6° ao 17° dia de gestação, e o consumo de ração total do 6° ao 20° dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo controle (CO); do 6° ao 17° dia de gestação. A análise de variância (ANOVA) revelou haver diferenças entre os grupos ($p < 0,05$), entre os dias 6-8, 9-11, 12-14, 15-17, 18-20 e 6-20 ($F=212,8$; $F=109,0$; $F=51,99$; $F=95,12$; $F=1,9$; $F=46,81$; respectivamente, $df=4/32$ e $p < 0,05$). O teste de Dunnett empregado subsequentemente revelou uma diminuição ($p < 0,05$) no consumo de ração das ratas que foram submetidas às restrições alimentares de 40, 55 e 70% em relação ao grupo controle, entre os dias 6-8, 9-11, 12-14 e 6-20.

A figura 40 ilustra o ganho de peso materno durante a gestação do 0 ao 5° dia, a cada três dias entre o 6° e 20° dia, e o ganho de peso total (0 ao 20° dia). A ANOVA não revelou haver diferenças entre os grupos nos cinco primeiros dias de gestação. No entanto, esse mesmo teste estatístico detectou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias 6-8, 9-11, 12-14, 15-17, 18-20 e 6-20 ($F=52,41$; $F=41,05$; $F=9,11$; $F=13,04$; $F=13,99$; $F=11,17$; respectivamente, $df=4/32$ e $p < 0,05$). O teste de Dunnett, empregado posteriormente, revelou haver diminuição ($p < 0,05$) no ganho de peso das ratas submetidas às restrições alimentares de 40, 55 e 70% em relação ao grupo controle, entre os dias 6-8, 9-11 e 12-14. Entre os dias de gestação 18-20, esse mesmo teste estatístico mostrou haver aumento ($p < 0,05$)

no ganho de peso das ratas submetidas às restrições alimentares de 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo controle. Entre o 6° e 20° dia de gestação, o teste de Dunnett revelou haver uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no ganho de peso das ratas que sofreram restrição alimentar de 40, 55 e 70% em relação ao grupo controle.

A tabela 40 mostra e a figura 41 ilustra o consumo de ração materno durante a lactação. A ANOVA não mostrou diferenças entre os grupos. Já a tabela 41 mostra e a figura 42 ilustra o ganho de peso materno durante a lactação, a análise de variância ($F=11,75$; $df= 4/33$ e $p < 0,05$) revelou haver diferença significativa no ganho de peso das ratas dos diferentes grupos. O teste de Dunnett realizado subsequentemente revelou um aumento no ganho de peso, durante a lactação, das ratas que sofreram restrição alimentar de 40 ($p < 0,05$), 50 ($p < 0,01$) e 70% ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

A tabela 42 mostra e a figura 43 ilustra o peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que receberam as diferentes restrições alimentares em relação ao grupo controle. A ANOVA ($F=17,9$; $df=4/170$ e $p < 0,05$) revelou haver diferenças significantes entre os grupos. O teste de Dunnett ($p < 0,05$) realizado posteriormente detectou haver diminuição no peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às restrições alimentares de 40, 55 e 70% em relação ao grupo controle.

A tabela 43 mostra e a figura 44 ilustra o ganho de peso durante a lactação dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas dos diferentes grupos. A análise de variância revelou haver diferenças significantes ($F=2,158$; $df= 4/32$ e $p < 0,05$) entre os grupos. O teste de Dunnett realizado em seguida mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no ganho de peso dos filhotes machos das ninhadas

provenientes das ratas que foram submetidas a 70% de restrição alimentar durante a gestação.

A tabela 44 mostra e a figura 45 ilustra o ganho de peso do desmame à idade adulta (70 dias) dos machos das ninhadas provenientes das ratas dos diferentes grupos. A ANOVA revelou haver diferenças significantes ($F=2,158$; $df= 4/32$ e $p<0,05$) entre os grupos. O teste de Dunnett realizado em seguida mostrou haver diminuição significativa ($p<0,05$) no ganho de peso dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas que foram submetidas a 55 e 70% de restrição alimentar durante a gestação.

Em relação à atividade de macrófagos peritoneais, a análise de variância não revelou diferenças entre as proles com 70 dias de vida, provenientes de ratas submetidas às diferentes restrições alimentares e aquelas proles do grupo controle, quando avaliados o índice de fagocitose (Tabela 45 e Figura 46), produção de H_2O_2 induzida pelo PMA (Tabela 46 e Figura 47) e produção de H_2O_2 não induzida pelo PMA (Tabela 47 e Figura 48). A tabela 48 mostra e a figura 49 ilustra a produção de NO por macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas dos diferentes grupos. A ANOVA ($p<0,05$) não revelou haver diferenças significantes entre os grupos.

Em relação à imunidade celular, a tabela 49 mostra e a figura 50 ilustra a reação de hipersensibilidade tardia (DTH). A ANOVA revelou haver diferenças ($F=5,057$; $df=4/29$ e $p<0,05$) entre os grupos. O teste de Dunnett realizado subsequentemente mostrou haver aumento significativo ($p<0,05$) no DTH da prole com 70 dias proveniente das ratas submetidas à restrição alimentar de 70% em relação ao grupo controle.

Em relação às análises dos órgãos linfóides, a ANOVA não revelou diferenças no peso relativo do baço (Tabela 50 e Figura 51), celularidade do baço (Tabela 51 e Figura 52), celularidade da medula óssea (Tabela 52 e Figura 53) e peso relativo do timo (Tabela 53 e Figura 54).

Em relação à imunidade humoral, a tabela 54 mostra e a figura 55 ilustra o título de anticorpos anti-SRBC das proles com 70 dias provenientes das ratas dos diferentes grupos. A análise de variância ($F=6,18$; $df=4/37$ e $p<0,05$) detectou diferenças entre os grupos. O teste de Dunnett realizado posteriormente revelou aumento significativo no título de anticorpos anti-SRBC das proles com 70 dias provenientes de ratas que foram submetidas a 15, 40, 55 e 70% de restrição alimentar em relação ao grupo controle. A ANOVA não detectou nenhuma diferença entre as proles com 70 dias, na formação do *plaque forming cell* (PFC) (Tabela 55 e Figura 56).

Quando realizado o hemograma das proles com 70 dias provenientes das ratas submetidas às diferentes restrições alimentares, a ANOVA não revelou haver diferenças significantes entre os grupos em relação ao número de leucócitos (Tabela 56 e Figura 57), número de eritrócitos (Tabela 57 e Figura 58), hemoglobina corpuscular média (Tabela 59 e Figura 60) e concentração de hemoglobina corpuscular média (Tabela 60 e Figura 61). O teste de Kruskal-Wallis também não revelou haver diferenças no hematócrito (Tabela 61 e Figura 62), volume corpuscular médio (Tabela 58 e Figura 59) e número de plaquetas (Tabela 62 e Figura 63).

Tabela 38 – Número de fêmeas que realizaram canibalismo logo após o parto. As ratas foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo controle; do 6 ao 17º dia de gestação

	Controle (n=8)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=8)	70 (n=7)
Canibalismo materno	0	0	0	0	0

Tabela 39 – Consumo de ração (em gramas), avaliado a cada três dias a partir do 6º dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

Dias de gestação	Controle (n=8) ^a	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=8)	70 (n=7)
6-8^b	48,38± 1,86	48	36*	27*	18*
9-11^b	54,56±1,48	48	36*	27*	18*
12-14^b	57,75± 4,11	48	36*	27*	18*
15-17^b	70,13± 3,13	48*	36*	27*	18*
18-20	55,63± 2,47	55,86±5,06	68,43±2,88	63,63±4,09	61,88±4,16
6-20	260,1±12,88	247,9±5,06	212,4±2,88*	171,6±4,09*	138,4±6,11*

* $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett.

^a Número de animais por grupo

^b Período de restrição alimentar

Figura 39 – Consumo de ração (em gramas), avaliado a cada três dias a partir do 6º dia de gestação, das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação

Figura 40 – Ganho de peso maternal (em gramas) do 0 ao 5º dia de gestação (0-5), a cada três dias do 6º ao 20º dia de gestação, e ganho de peso total (0-20) durante a gestação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 40 – Consumo de ração materno durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=8)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=8)	70 (n=7)
Consumo de ração materno durante a lactação (g)	1040 ± 68,46	1068 ± 43,36	1016 ± 51,71	1018 ± 49,22	1114 ± 45,82

ANOVA

Figura 41 – Consumo de ração materno durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 41 – Ganho de peso materno durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=8)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=8)	70 (n=7)
Ganho de peso materno durante a lactação (g)	26,12 ± 3,78	37,5 ± 3,6	44,71 ± 2,3*	46,25 ± 4,45**	66,28 ± 6,25**

*p<0,05; **p<0,001 *versus* o grupo controle. ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 42 – Ganho de peso materno durante a lactação das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,001 *versus* grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 42 – Peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=39)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=35)	40 (n=35)	55 (n=32)	70 (n=34)
Peso ao nascimento (g)	6,96±0,13	6,74±0,12	6,16±0,09*	6,26±0,01*	5,77±0,11*

* p<0,05 versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 43 – Peso ao nascimento dos neonatos provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões.*p<0,05 versus o grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 43 – Ganho de peso durante a lactação dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=8)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=8)	70 (n=7)
Ganho de peso (g)	42,10 ± 2,26	39 ± 1,81	39,58 ± 2,08	36,67 ± 0,76	35,17 ± 1,99*

* $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 44 – Ganho de peso durante a lactação dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 44 – Ganho de peso do desmame à idade adulta dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=8)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=8)	70 (n=7)
Ganho de peso(g)	42,10 ± 2,26	39 ± 1,81	39,58 ± 2,08	36,67 ± 0,76*	35,17 ± 1,99*

*p<0,05 *versus* grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 45 – Ganho de peso do desmame à idade adulta dos filhotes machos das ninhadas provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. *p<0,05 *versus* grupo controle; ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 45 – Avaliação do índice de fagocitose de macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=8)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=8)	40 (n=8)	55 (n=9)	70 (n=8)
Índice de Fagocitose (%)	36,125 ± 4,36	42,187 ± 5,86	45,7 ± 3,26	34,72 ± 5,76	45,9 ± 3,17

Figura 46 – Avaliação do índice de fagocitose de macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Tabela 46 – Avaliação da produção de H_2O_2 (em nMols) induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=9)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=8)	40 (n=8)	55 (n=9)	70 (n=8)
H_2O_2 com PMA (nMols)	76,15 ± 7,00	64,56 ± 8,17	73,21 ± 10,52	55,64 ± 13,79	75 ± 5,45

Figura 47 – Avaliação da produção de H_2O_2 (em nMols) induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 47 – Avaliação da produção de H_2O_2 (em nMols) não induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=9)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=8)	40 (n=8)	55 (n=7)	70 (n=7)
H_2O_2 sem PMA (nMols)	52,89 ± 8,55	38,71 ± 7,95	54,04 ± 10,82	41,97 ± 11,32	51,90 ± 9,24

Figura 48 – Avaliação da produção de H_2O_2 (em nMols) não induzida pelo phorbol-miristato de acetato (PMA) por macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Tabela 48 – Avaliação da produção de NO (em nMols) por macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=9)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=8)	40 (n=8)	55 (n=8)	70 (n=8)
NO (nMols)	13,28	16,15	10,50	12,62	8,30
	±	±	±	±	±
	3,99	5,720	1,820	2,90	1,29

Figura 49 – Avaliação da produção de NO (em nMols) por macrófagos peritoneais das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 49 – Reação de hipersensibilidade tardia (*Delayed type hypersensitivity* – DTH) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. As proles foram sensibilizadas, via subcutânea, com BSA-V (*Bovine serum albumin – factor V*) quatro dias antes do desafio com BSA-V no coxim plantar. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=7)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=6)	70 (n=7)
DTH (mm)	0,280	0,110	0,832	1,050	1,160
	± 0,144	± 0,100	± 0,25	± 0,280	± 0,235*

* $p < 0,05$ versus o grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 50 – Reação de hipersensibilidade tardia (*Delayed type hypersensitivity* – DTH) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. As proles foram sensibilizadas, via subcutânea, com BSA-V (*Bovine serum albumin – factor V*) quatro dias antes do desafio com BSA-V no coxim plantar. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus o grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 50 – Peso relativo do baço (g/100g de p.v.) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=9)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=8)	40 (n=8)	55 (n=9)	70 (n=8)
Peso relativo do baço (g/100g p.v.)	0,300	0,283	0,276	0,280	0,281
	±	±	±	±	±
	0,0130	0,008	0,008	0,034	0,0320

Figura 51 – Peso relativo do baço (g/100g de p.v.) das proles com 21 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Tabela 51 – Celularidade do baço das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=9)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=8)	40 (n=8)	55 (n=9)	70 (n=7)
Celularidade do baço (nº de células brancas x10⁷)	18,710 ± 4,069	13,92 ± 3,56	19,75 ± 3,23	21,55 ± 8,58	18,58 ± 3,27

Figura 52 – Celularidade do baço das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões

Tabela 52 – Celularidade da medula óssea das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=8)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=6)	55 (n=8)	70 (n=8)
Celularidade da medula óssea (n° de células brancas x10⁷)	17,95 ± 1,38	14,77 ± 0,60	15,42 ± 1,34	14,55 ± 1,44	14,38 ± 0,80

ANOVA

Figura 53 – Celularidade da medula óssea das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 53 – Peso relativo do timo (g/100g de p.v.) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=8)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=8)	40 (n=8)	55 (n=9)	70 (n=8)
Peso Relativo de Timo (g/100g p.v.)	0,16	0,164	0,157	0,170	0,140
	±	±	±	±	±
	0,006	0,010	0,0264	0,008	0,0190

ANOVA

Figura 54 – Peso relativo do timo (g/100g de p.v.) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 54 – Título de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (SRBC) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. Os animais foram sensibilizados, via intraperitoneal, com SRBC, sete dias antes da coleta de sangue e obtenção do soro. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=9)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=8)	40 (n=8)	55 (n=9)	70 (n=8)
Título anti-SRBC	5	7,25	7,37	7	7,125
	±	±	±	±	±
	0,726	0,25*	0,183*	0,235*	0,834*

* $p < 0,05$ versus grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 55 – Título de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (SRBC) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. Os animais foram sensibilizados, via intraperitoneal, com SRBC sete dias antes da coleta de sangue e obtenção do soro. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle, ANOVA seguida do teste de Dunnett

Tabela 55 – *Plaque-forming cell* (PFC/ 10^5 células) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=8)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=8)	70 (n=6)
PFC/ 10^5 células	7,87 ± 3,08	9 ± 3,69	8 ± 1,38	9,25 ± 1,25	6,66 ± 1,60

Figura 56 – *Plaque-forming cell* (PFC/ 10^5) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

Tabela 56 – Leucócitos das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=7)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=7)	70 (n=10)
Leucócitos /mm ³	7,87 ± 3,08	9 ± 3,69	8 ± 1,38	9,25 ± 1,25	6,66 ± 1,60

ANOVA

Figura 57 – Leucócitos das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. Os animais foram sensibilizados, via intraperitoneal, com SRBC, sete dias antes da coleta de sangue e obtenção do soro. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 57 – Eritrócitos das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=7)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=7)	70 (n=10)
Eritrócitos. (milhões/mm³)	6,86 ± 0,06	6,73 ± 0,09	6,92 ± 0,16	6,77 ± 0,12	7,00 ± 0,11

Teste de Kruskal-Wallis

Figura 58 – Eritrócitos das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn

Tabela 58 – Volume corpuscular médio (V.C.M.) (μm^3) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=7)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=7)	70 (n=10)
V.C.M. (fl)	6,86 ± 0,06	6,73 ± 0,09	6,92 ± 0,16	6,77 ± 0,12	7,00 ± 0,11

Teste de Kruskal-Wallis

Figura 59 – Volume corpuscular médio (V.C.M.) (μm^3) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 59 – Hemoglobina corpuscular média (H.C.M.) (pg) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=7)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=7)	70 (n=10)
H.C.M. (pg)	21,24 ± 0,21	21,47 ± 0,54	21,57 ± 0,51	21,46 ± 0,35	21,13 ± 0,27

ANOVA

Figura 60 – Hemoglobina corpuscular média (H.C.M.) (pg) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 60 – Concentração de hemoglobina corpuscular média (C.H.M.) (%) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=7)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=7)	70 (n=10)
C.H.C.M. (%)	33,15	33,02	33,08	33,20	33,22
	±	±	±	±	±
	0,09	0,24	0,10	0,09	0,16

ANOVA

Figura 61 – Concentração de hemoglobina corpuscular média (C.H.M.) (%) das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6º ao 17º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. ANOVA

Tabela 61 – Hematócrito das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle	Restrição alimentar (%)			
	(n=7)	15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=7)	70 (n=10)
Hematócrito (%)	44,00	43,71	45,00	43,71	44,50
	±	±	±	±	±
	0,37	0,74	0,37	0,18	0,61

Teste de Kruskal-Wallis

Figura 62 – Hematócrito das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 62 – Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$) das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (controle), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias, erros-padrões e número de animais por grupo (n)

	Controle (n=7)	Restrição alimentar (%)			
		15 (n=7)	40 (n=7)	55 (n=7)	70 (n=10)
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	675,7 ± 74,03	550,7 ± 43,88	550,7 ± 37,33	720,7 ± 36,93	627,0 ± 25,57

Teste de Kruskal-Wallis

Figura 63 – Plaquetas das proles com 70 dias provenientes das ratas que foram submetidas às diferentes restrições alimentares: 15, 40, 55 e 70% em relação ao grupo de animais que recebeu dieta *ad libitum* (CO), do 6° ao 17° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrões. Teste de Kruskal-Wallis

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Vários são os relatos, tanto em humanos quanto nos animais, que vêm claramente evidenciando que a desnutrição pode promover nos indivíduos afetados, alterações, não só no metabolismo basal, mas também em outras funções, tais como as reprodutivas, as quais estão muito bem caracterizadas em animais de produção (CHANDRA, 1997; KIYMA et al., 2004; VELEZ; DONKIN, 2005); bem como no sistema imune, o que propicia que estes indivíduos apresentem maior incidência de infecções por patógenos oportunistas, devido à queda da imunidade, entre outras causas (CALDER; JACKSON, 2000).

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados colocando-se em foco os efeitos da desnutrição no desenvolvimento fetal, não só no que se refere aos conceitos clássicos de teratogênese, isto é, malformações, já muito bem estabelecidas, como também alterações que passam despercebidas no fenótipo do neonato no momento do nascimento, sendo tais disfunções observadas apenas numa fase posterior da vida destes indivíduos. Entre estas alterações, citam-se as do sistema imune (DEVEREUX; BARKER; SEATON, 2002) e as comportamentais (VIEAU et al., 2007), o desenvolvimento de diabetes (GODFREY; BARKER, 2000) e a hipertensão (REMACLE; BIESWAL; REUSENS, 2004).

Portanto, o conceito de teratogenicidade não mais se restringe às características: morte, alteração no desenvolvimento e alterações estruturais (malformações), sendo este bastante ampliado, incluindo-se agora a evidenciação de alterações mais sutis, como aquelas neurológicas e metabólicas no conceito. O presente trabalho teve como objetivo verificar se, de fato, a desnutrição materna

poderia ocasionar não só aquelas alterações morfológicas, as quais foram avaliadas por meio dos protocolos clássicos de teratogênese, mas também se filhotes de mães submetidas à restrição alimentar desenvolveriam, numa fase posterior ao nascimento (no desmame e na idade adulta), disfunções nas diferentes respostas imunológicas, caracterizando, assim, a imunoteratogenicidade.

Um estudo recentemente realizado por Fleeman et al. (2005), no qual ratas gestantes foram submetidas à restrição alimentar de 15, 40, 55 e 70% da quantidade diária de ração consumida por um grupo de fêmeas que se alimentavam “*ad libitum*” (grupo controle), evidenciou que mesmo aquelas gestantes submetidas à maior restrição alimentar (70%), não apresentaram inviabilidade e/ou malformação fetal, sendo apenas verificado nas proles alterações consideradas como não-graves, tanto na avaliação óssea, quanto na visceral, sendo sugerido por estes autores a reversão de tais achados na vida pós-natal, o que não comprometeria, destarte, a viabilidade destes filhotes.

Assim, neste estudo, procurou-se realizar um protocolo idêntico àquele proposto por Fleeman et al. (2005), submetendo-se as ratas prenhes às mesmas porcentagens de restrição alimentar que o delineado naquele trabalho; no entanto, aqui nesta pesquisa avaliou-se também os filhotes após o nascimento, analisando o sistema imune destes animais, tanto na idade pré-púbere (21 dias de vida), quanto na idade adulta (70 dias de vida).

À semelhança do reportado naquele estudo realizado por Fleeman et al. (2005), na presente pesquisa não se observou inviabilidade fetal à secção cesariana, bem como malformações estruturais macroscópicas; no entanto, divergiu daquele estudo no que se refere aos resultados provenientes das análises ósseas e viscerais; assim, aqui não foram observados nos fetos ausência da ossificação do 5º

e 6° esternóbrio, bem como defeitos na membrana septo-ventricular. Por outro lado, no presente trabalho, verificou-se que os neonatos apresentaram um aumento no número de ureteres sinuosos.

Sabe-se que em humanos, e possivelmente também nos animais, a diminuição da ingestão de alimentos, em níveis em torno de 50% da dieta normal, pode promover alterações renais (GODFREY; BARKER, 2000) e também redução da gordura peri-renal de sustentação. Esta última observação caracteriza a doença denominada nefroptose, na qual a ausência de tecido de sustentação promove a “caída” dos rins e flacidez dos ureteres, tornando-os mais sinuosos. Para a reversão deste quadro é proposto como um dos tratamentos não-invasivos, um aporte nutricional adequado (BARBER; THOMPSON, 2004). Assim, é possível sugerir, neste momento, que a presença de ureteres sinuosos nos neonatos, aqui estudados, também seja decorrente da falta de sustentação renal, haja vista que os fetos avaliados nesta pesquisa tiveram menor peso ao nascimento que aqueles de mães do grupo controle.

Uma observação que deve ser levada em consideração quando se compara as discrepâncias entre os dados obtidos naquele estudo realizado por Fleeman et al. (2005) e este ora apresentado, é o fato de que as linhagens de ratos utilizadas em ambas as pesquisas foram diferentes; desta maneira, aqui neste estudo foram empregadas ratas *Wistar*, enquanto que naquele trabalho as fêmeas utilizadas foram as da linhagem *Sprague-Dawley*. Este resultado aqui encontrado tem importante implicação no que se refere à interpretação dos dados obtidos em estudos de teratologia. Neste sentido, é amplamente conhecido que pode haver variação entre espécies e por isso, há grande preocupação ao se realizar a extrapolação de resultados entre diferentes espécies animais em um estudo de teratologia

(SCHARDEIN, 2000). Assim, nesta pesquisa verificou-se que a resposta a um dado agente/fator teratógeno pode também variar em relação à linhagem da espécie animal testada.

Por outro lado, deve-se considerar as similaridades de alguns resultados entre os experimentos, os aqui realizados e aqueles reportados por Fleeman et al. (2005). Desta maneira, em ambos os estudos não se observaram alterações no desempenho reprodutivo, isto é, perdas pré e pós-implantação, morte e reabsorções fetais. Também, nas duas pesquisas, verificou-se que aquelas proles de mães que foram submetidas à restrição alimentar apresentaram, ao nascimento, diminuição no peso.

De fato, o baixo peso ao nascimento dos filhotes de mães sob restrição alimentar durante a gestação, já está bem estabelecido, sendo tanto este efeito, bem como a diminuição no tamanho e no peso da placenta, atribuídos ao decréscimo do aporte nutricional materno (MELLOR, 1983; HOLEMANS; AERTS; VAN ASSCHE, 1998; FLEEMAN, 2005).

Neste estudo, durante a realização das primeiras secções cesarianas para avaliação fetal, foi verificado que muitos dos neonatos de mães sob o regime de restrição alimentar morriam rapidamente, logo após o nascimento. Assim, foi introduzido um protocolo neste projeto de pesquisa para analisar a viabilidade dos neonatos, e assim, poder aferir se haveria diferença neste parâmetro entre os neonatos dos grupos experimentais e controle. Para tal, se propôs avaliar a sobrevivência dos mesmos em um período de até uma hora após o seu nascimento. Deste modo, foi possível verificar que, de fato, as fêmeas submetidas a 40, 55 e 70% de restrição alimentar apresentaram uma maior proporção de fetos mortos até a primeira hora de vida.

Sabe-se que mamíferos ao nascimento possuem um tipo de gordura específico, denominado de tecido adiposo marrom, que ao se oxidar, ao contrário do que ocorre posteriormente e depois durante toda a vida, não produz ATP e sim irá gerar calor para manter o recém-nascido aquecido (KLINGENBERG; HUANG¹, 1999 apud NELSON; COX, 2006, p. 710). Destarte, é possível levantar a hipótese de que a morte precoce destes filhotes de mães submetidas à restrição alimentar seja decorrente da menor presença deste tipo específico de ácido graxo e, conseqüentemente, haverá o desenvolvimento de hipotermia. A despeito da necessidade de se realizar mais estudos objetivando-se dosar a quantidade deste tipo de gordura nestes neonatos, sugere-se a incorporação deste parâmetro aqui proposto (isto é, sobrevivência até uma hora após o nascimento), nos protocolos de teratogenicidade, pois o mesmo poderá contribuir significativamente, uma vez que o aumento da mortalidade do neonato indicará, indiretamente, alterações fisiológicas no feto.

Segundo Cláudio et al. (1999), a maior limitação dos protocolos de avaliação de risco de teratogenicidade entre as agências de regulamentação é de que não há o exame dos filhotes em nenhuma fase pós-natal, o que, na maioria das vezes, poderá levar a erros no julgamento sobre o possível efeito teratogênico de uma substância. De fato, uma pesquisa realizada neste laboratório, na qual ratas foram expostas a baixas doses de cianeto de potássio durante a gestação, mostrou que embora os filhotes destas mães se apresentassem totalmente dentro da normalidade quando da avaliação por meio dos protocolos clássicos de teratogenicidade, a avaliação numa fase posterior (após o desmame) revelou que estes animais mostravam alterações evidentes no tecido hepático, renal e no SNC

¹ Klingenberg, M.; Huang, S. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v.1415, p.271-296, 1999.

(SOUZA et al., 2007). Portanto, o presente trabalho não se restringiu apenas às avaliações imediatamente após o nascimento, este também objetivou avaliar a prole de ratas sob restrição alimentar tanto no desmame (21 dias) até o período de adultos jovens (70 dias).

Esta pesquisa claramente evidenciou que as proles de ratas sob a maior restrição alimentar, tiveram um menor ganho de peso desde o nascimento até a idade adulta. Além disso, verificou-se que os descendentes de ratas prenhes com 55% de restrição alimentar conseguiram restabelecer o peso normal somente após o desmame. Esta observação demonstra que a restrição alimentar materna durante a organogênese fetal é capaz de alterar o desenvolvimento pós-natal dos filhotes por um período prolongado, o que já identifica a ocorrência de efeitos teratogênicos funcionais.

Em estudo semelhante, conduzido por Carney et al. (2004), os autores submeteram ratas *Sprague Dawley* gestantes à restrição de até 50% da quantidade de ração ingerida por fêmeas do grupo que teve acesso livre ao alimento (grupo controle), durante toda a gestação e lactação (ou seja, um total de 42 dias), e foi observado que as proles destas ratas apresentaram diminuição no ganho de peso durante a fase de lactação. No entanto, após este período, os filhotes conseguiram se recuperar e ganhar peso de forma semelhante àqueles pertencentes às mães do grupo controle. Os autores daquele estudo sugeriram que a diminuição no ganho de peso dos neonatos poderia ser revertida até a idade adulta, diferente dos resultados aqui verificados. No entanto, é importante considerar que naquela pesquisa foram utilizadas ratas de linhagem diferente (*Sprague-Dawley*) daquela aqui empregada (*Wistar*). Assim, mais uma vez, este estudo evidencia a diferença entre linhagens de ratos no que se refere à toxicologia do desenvolvimento, o que reforça a teoria de

que a extrapolação de dados entre linhagens deve ser realizada com bastante cautela.

A comparação dos resultados entre aqueles provenientes do estudo conduzido por Carney et al. (2004) e os aqui obtidos, no que se refere ao desenvolvimento do neonato, permite sugerir que a linhagem *Wistar* seja mais sensível aos efeitos da restrição alimentar materna sobre o ganho de peso pós-natal dos filhotes que a linhagem *Sprague-Dawley*. Corrobora com esta conjectura aquele trabalho realizado por Woodall et al. (1996), no qual também foi empregado ratas *Wistar* sob regime de restrição de ração de até 30% do que ingeriam aquelas gestantes que tinham livre acesso ao alimento, durante toda a gestação, e se observou que estas fêmeas tiveram proles incapazes de reverter o baixo peso corpóreo após o período de lactação, sendo que o peso foi semelhante entre as diferentes proles somente quando estas estavam com 210 dias de vida.

O baixo peso ao nascimento tem sido objeto de vários estudos atualmente; neste sentido, observa-se uma correlação altamente positiva entre o baixo peso ao nascimento e doenças na vida adulta, tais como, a hipertensão arterial, diabetes tipo II e doenças cardíacas; além disto, verifica-se que neonatos com peso menor apresentam comprometimento do desenvolvimento renal e alterações nas liberações hormonais (GODFREY, 2000). Além destas afecções, um estudo epidemiológico conduzido por Phillips et al. (1993), evidenciou que crianças nascidas com peso menor que a média apresentam alta tendência em desenvolver doenças auto-imunes, principalmente aquelas relacionadas à tireóide. Ainda, a desnutrição materna vem sendo relacionada com a maior suscetibilidade de crianças desenvolverem infecções por patógenos oportunistas (CALDER; JACKSON, 2000).

Dessa forma, os resultados experimentais que correlacionam a restrição alimentar materna e o sistema imune da prole têm ganhado atenção por parte dos pesquisadores. De fato, esta associação entre a desnutrição da gestante e a alteração no sistema imune do neonato já vem sendo descrita há mais de quatro décadas. Por exemplo, o estudo conduzido por Kenney (1969) mostrou que uma dieta com apenas 5% de proteínas, administrada a ratas do início da gestação até o 18º dia de prenhez, promove retardo no crescimento, tanto do timo quanto do baço dos filhotes ao nascimento. Ainda, o trabalho realizado por Carney (2004) mostrou que uma dieta com restrição alimentar materna de 50%, não só durante a gestação, mas também na lactação, promoveu a diminuição no peso relativo do timo da prole avaliada logo após o desmame.

No presente trabalho, embora não tenha sido avaliado o peso relativo de órgãos linfóides dos neonatos logo após o nascimento, verificou-se que estes, aos 21 dias de vida, tiveram aumento no peso relativo do timo.

O timo é um órgão linfóide primário, onde ocorre a maturação e o desenvolvimento de linfócitos do tipo T. Este tecido tem sua organogênese iniciada ainda na vida fetal, em torno do 13º dia de gestação no rato, quando células imaturas, os timócitos, começam a migrar para o timo e colonizá-lo (DIETERT et al., 2000; HOLLADAY; SMIALOWICZ, 2000). Este processo continua até os primeiros dias pós-parto, sendo, a partir deste momento, observado uma involução do peso relativo deste órgão linfóide (GOOD et al., 1962). Vale ainda salientar que o timo é extremamente sensível aos efeitos da desnutrição; assim, sabe-se que a diminuição da ingestão de microelementos como o Zinco (BEACH; GERSHWIN; HURLEY; 1982; TUORMAA, 1995) e ainda de outros nutrientes como aminoácidos (LI et al.,

2007) e vitaminas (BÁEZ-SALDAÑA; ORTEGA, 2004), pode promover a involução precoce e atrofia deste órgão.

Assim, reunindo-se estas informações, pode-se levantar a hipótese de que, em relação aos dados aqui obtidos, na verdade não houve um aumento no peso relativo do timo daqueles filhotes de mães sob restrição alimentar e sim uma involução normal do timo daquelas proles de mães com dietas adequadas; ou seja, enquanto o timo dos filhotes de ratas sem restrição já iniciaram um processo de involução tímica, o timo daqueles filhotes de mães desnutridas, ainda estava em processo de colonização, levando ao retardo na involução. Corrobora com esta hipótese o fato destes ratos já na idade adulta possuírem o peso relativo de timo semelhante em todos os grupos de animais.

A resposta imune celular desempenha um papel extremamente importante na defesa do organismo contra infecções, participando também na patogênese da rejeição aos tecidos transplantados e no desenvolvimento de doenças auto-imunes. A reação de hipersensibilidade tardia, o DTH (*Delayed Type Hypersensitivity*), é considerado como o melhor modelo *in vivo* para avaliar a resposta imune celular em ratos (CÓRDOBA et al., 2008). Assim, após a sensibilização do animal com o antígeno (BSA), há a apresentação antigênica do mesmo ao sistema imune adquirido, especificamente aos linfócitos do tipo *Helper 1* (Th1), os quais se ativam e quando de um segundo contato com o mesmo antígeno, estas mesmas células passam a produzir citocinas que promoverão no local do desafio a ativação de macrófagos, proliferação celular e efeito quimiotático para mais linfócitos do tipo Th1, os quais se acumulam no local e, adicionado ao efeito inflamatório da atividade de macrófagos, promove no local do desafio um aumento de volume, ou

desenvolvimento de um tumor, que caracteriza a atividade da resposta imune celular (HENNINGSEN et al., 1984).

Da mesma forma, as avaliações dos títulos de anticorpos anti-SRBC e também do PFC são metodologias clássicas empregadas por diversos segmentos científicos, inclusive são preconizadas por agências internacionais de normatização para avaliação de risco toxicológico de xenobióticos, como a *U.S. Environmental Protection Agency* (US-EPA), a *U.S. Food and Drug Administration* (US-FDA), bem como, a *Organization for Economic Cooperation and Devevolpment* (OECD), como instrumento laboratorial para determinação da resposta imune humoral (LUSTER et al., 1988). A resposta imune humoral aqui estudada é classificada com sendo do tipo T-dependente, uma vez que a produção de anticorpos por linfócitos B depende da participação de linfócitos do tipo *Helper 2* (Th2), cujas citocinas sintetizadas e liberadas sobre os linfócitos B, farão com que estes se proliferem e passem a produzir anticorpos específicos aos antígenos apresentados (MOSMANN; SAD, 1996).

O presente estudo claramente revelou que proles de ratas submetidas à restrição alimentar apresentaram um aumento na resposta imune celular, tanto aos 21 quanto aos 70 dias de vida. Ainda, o experimento realizado com a prole adulta com o objetivo de avaliar a resposta imune humoral, revelou um aumento nos títulos de anticorpos anti-SRBC em todas as proles de mães submetidas às diferentes restrições alimentares. Apesar de haver estudos epidemiológicos mostrando que o baixo peso ao nascimento está fortemente relacionado à diminuição nas respostas imunes (SAHA et al., 1983; CHATRATH et al., 1997), o trabalho conduzido por Ballow et al. (1986) revelou que crianças prematuras com peso de, no máximo, 1,5 kg não apresentavam alterações na produção de imunoglobulinas quando avaliados

até o décimo mês de vida. Além disso, Carney et al. (2004), demonstraram por meio de experimentos em ratos, que a restrição alimentar materna, do sétimo dia de gestação até o final da lactação, não alterou a produção de anticorpos da prole, tanto quando avaliados ao desmame como na idade adulta, sendo que esses autores sugeriram que a má nutrição materna não seria capaz de provocar alterações imunológicas nas proles.

No entanto, no presente estudo, as respostas imunes avaliadas não somente estavam na normalidade, como apresentaram-se aumentadas; tanto no que se refere à resposta imune celular, verificada por meio do DTH, quanto à humoral, que foi avaliada por meio da titulação de anticorpos. Esta pesquisa concorda com um trabalho realizado por Kenney (1969), no qual o autor promoveu restrição protéica a ratas prenhes, e que também foi observado o aumento nos títulos anti-eritrócitos de carneiro nas proles avaliadas na idade adulta. Porém, este autor, naquele momento, não levantou uma hipótese plausível acerca deste fenômeno.

Com base nos resultados aqui obtidos e associando-os com o conhecimento do mecanismo imunológico envolvido nos ensaios imunes que foram realizados, pode-se teorizar que as principais células que estão sendo alvo da restrição de nutrientes durante a vida intra-uterina sejam os linfócitos T (Th1 e Th2). Porém, como explicar o aumento de suas atividades?

Sabe-se que a origem do repertório antigênico de linfócitos está no rearranjo de *locus* gênicos específicos, ou seja, que a informação necessária para gerar o conjunto enormemente diverso de anticorpos e de receptores de linfócitos T (TCR) já está presente no ácido desoxirribonucléico (DNA) de cada indivíduo; cuja variabilidade gerada poderá tornar o hospedeiro mais apto ou não em responder a um desafio imunológico (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Em outras palavras,

as respostas imunes geradas por um indivíduo estão diretamente relacionadas ao seu DNA e, ainda, muitas das características quanto à antigenicidade podem ser herdadas, como, por exemplo, aquelas relacionadas aos processos alérgicos, em que pais atópicos poderão gerar descendentes também atópicos (POSTMA et al., 2000).

Nos últimos anos, os estudos acerca de efeitos ambientais na indução de alterações no DNA, têm crescido de forma relevante, como aqueles estudos sobre a epigênese. A epigenética é definida como um fenômeno molecular que regula a expressão gênica sem que haja alterações na sequência do DNA (JONES; TAKAI, 2001). A mais estudada modificação epigênica é a metilação de nucleotídeos de ilhas CpG que são essenciais para o desenvolvimento de mamíferos. A metilação dessas ilhas do DNA é usada para regular a transcrição de genes, alterar o posicionamento de cromossomos, influenciar na inativação do cromossomo X, controlar genes “imprintados” e inibir DNAs ditos “parasitas” (JONES; TAKAI, 2001; MORGAN et al., 2005; RUDEN et al., 2005), ou seja, tem como função promover a maior ou menor expressão de um determinado gene.

Vale ressaltar no momento, que vários fatores ambientais podem interferir no processo de epigênese, alterando os padrões de expressão de um dado DNA, podendo levar à síntese inadequada de uma determinada proteína ou, ainda, ativar genes que podem desencadear o desenvolvimento de neoplasias (LICCHESI et al., 2008). Dentre estes, os fatores que podem promover a desmetilação ou metilação inapropriada do DNA, para inibir ou induzir a expressão gênica de um dado éxon, estão àqueles relacionados ao aporte de nutrientes pelo animal. A nutrição, durante o desenvolvimento fetal, pode influenciar o padrão de metilação do DNA, pois os carbonos oriundos das biomoléculas (proteínas, açúcares e lipídeos) são

fundamentais para a formação de radicais metil (VAN DEN VEYVER, 2002). Assim a má nutrição durante o desenvolvimento fetal poderia afetar o padrão de metilação do DNA, ou seja, acarretar em hipometilação do mesmo e, assim, contribuir para o aumento de susceptibilidade às doenças crônicas na vida adulta (LUCAS, 1991).

De fato, vários estudos vêm correlacionando os efeitos epigenéticos com o desenvolvimento, não só de carcinogenicidade, mas também de doenças relacionadas ao sistema imune, como as autoimunidades, por exemplo, o lúpus eritematoso sistêmico (BALLESTAR; ESTELLER; RICHARDSON, 2006) e a artrite reumatóide (SANCHEZ-PERNAUTE et al., 2008) e também que a epigenese pode estar relacionada ao desenvolvimento de reações de hipersensibilidade, ou seja, de reações alérgicas como asma, atopia, eczema e dermatites de contato (DEMISSIE et al., 1997; SHAHEEN et al., 1999).

Nesse sentido, em um estudo conduzido por Quddus et al. (1993), verificou-se que a desmetilação do DNA de linfócitos T de camundongos fez com que houvesse uma expressão exacerbada das citocinas IFN γ e IL-4, citocinas estas envolvidas nas respostas imunes celular e humoral, respectivamente. Além disso, foi verificado que camundongos que receberam linfócitos Th1 ou Th2 desmetilados, tinham maior produção espontânea de anticorpos anti-DNA, o que sugere a predisposição destes animais ao desenvolvimento de auto-imunidades (YUNG et al., 2001). Outros estudos nesta linha de pesquisa, com culturas celulares contendo linfócitos TCD4⁺ desmetilados e associados com linfócitos B autólogos, verificaram que houve uma super estimulação na produção de IgG por linfócitos B (OELKE et al., 2004). Portanto, é possível sugerir no presente trabalho que a ocorrência de hipometilação de células T possa estar contribuindo para a maior produção de anticorpos anti-SRBC por linfócitos B.

Assim, neste momento, na tentativa de explicar o inusitado resultado obtido nesta pesquisa, pode-se hipotetizar que a redução no aporte nutricional dos fetos em desenvolvimento poderia estar promovendo, não apenas alterações estruturais no timo, como também modificações nos padrões de metilação em linfócitos T, os quais, ao entrarem em contato com os antígenos inoculados, responderam de forma exacerbada a estes desafios imunogênicos.

Por outro lado, não restam dúvidas que ensaios mais verticalizados devam ser realizados para, de fato, verificar se a desnutrição durante a gestação pode vir a promover, na prole, alterações que levam ao desenvolvimento de auto-imunidades, como também conduzir estudos mais sensíveis, com o objetivo de se mostrar que o *status* nutricional pode interferir no padrão de metilação do DNA e, conseqüentemente, acarretar em diferentes anomalias que podem levar a efeitos teratogênicos na prole.

Os resultados obtidos na presente pesquisa sugerem fortemente a necessidade da incorporação dos protocolos de imunoteratologia em estudos de teratogenicidade. Verificou-se, ainda, que também é necessária grande cautela ao se extrapolar os dados de teratologia obtidos de uma para outra linhagem de mesma espécie animal.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A restrição alimentar em ratas *Wistar* prenhes, durante o período de organogênese fetal:

- Diminuiu o peso ao nascimento dos filhotes e o peso da placenta, das ratas que foram submetidas às restrições alimentares de 40, 55 e 70%, durante a gestação, de forma restrição dependente.
- Não produziu malformações ósseas e/ou viscerais nas proles das ratas submetidas às diferentes restrições alimentares durante a gestação.
- Promoveu o aumento da ocorrência de ureteres sinuosos dos fetos das ratas submetidas a 40, 55 e 70% de restrição alimentar durante a gestação.
- Diminuiu a viabilidade fetal, na avaliação até uma hora após o nascimento, daqueles neonatos provenientes das ratas prenhes submetidas às porcentagens de restrição alimentar de 40, 55 e 70%.
- Diminuiu o ganho de peso pós-natal, do nascimento até a maturidade, das proles do grupo de ratas que foram submetidas a 70% de restrição alimentar durante a gestação.
- Promoveu aumento do peso relativo do timo dos filhotes provenientes das ratas submetidas às diferentes restrições alimentares, avaliados aos 21 dias; no entanto, não alterou o hemograma, o peso relativo do baço, a celularidade do baço e a celularidade da medula óssea, destas proles, avaliadas tanto com 21 como aos 70 dias de vida.

- Não alterou a atividade fagocítica, a produção espontânea de água oxigenada e a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais, nas proles das ratas submetidas às diferentes restrições alimentares, tanto com 21 como aos 70 dias de vida.
- Promoveu aumento da produção de anticorpos anti-SRBC das proles provenientes das ratas submetidas às diferentes porcentagens de restrição alimentar durante a gestação, quando avaliados aos 70 dias de vida.
- Não aumentou a produção de anticorpos por plasmócitos do baço nas proles das ratas submetidas às diferentes porcentagens de restrição alimentar durante a gestação, avaliadas tanto com 21 como aos 70 dias de vida.
- Induziu o aumento da reação de hipersensibilidade tardia naqueles filhotes provenientes das ratas submetidas a 40 e 70% de restrição alimentar, quando avaliados aos 21 dias de vida.
- Aumentou a reação de hipersensibilidade tardia dos filhotes provenientes das ratas submetidas a 70% de restrição alimentar, quando avaliados aos 70 dias de idade.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A., K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Maturação dos linfócitos B e Expressão dos Genes das Imunoglobulinas. In: ABBAS, A., K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular & Molecular**. RIO DE JANEIRO, RJ: Revinter, 2000. p. 72-82.
- ANTONOV A. N. Children born during the siege of Leningrad in 1942. **Journal Pediatrics**, v.30, p. 250-259, 1947.
- BÁEZ-SALDAÑA, A.; ORTEGA, E. Biotin deficiency blocks thymocyte maturation, accelerates thymus involution, and decreases nose-rump length in mice. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 1970-1977, 2004.
- BALLESTAR, E.; ESTELLER, M.; RICHARDSON, B. C. The Epigenetic Face of Systemic Lupus Erythematosus. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 7143-7147, 2006.
- BARBER, N. J.; THOMPSON, P. M. Nephroptosis and nephropexy – hung up on the past? **European Urology**, v. 46, p. 428-433, 2004.
- BARKER D. J. P. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ (Clinical Research ed.)**, v. 311, p. 171–174, 1995.
- BEACH, R. S.; GERSHWIN, M. E.; HURLEY, L. S. Gestational zinc deprivation in mice: persistence of immunodeficiency for three generations. **Science**, v. 218, p. 469–471, 1982.
- BIRGEL, E. H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J. (Ed.). **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 2-34.
- CALDER, P. C.; JACKSON, A. A. Undernutrition, infection and immune function. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 3-29, 2000.
- CARNEY, E. W.; ZABLOTNY, C. L.; MARTY, M. S.; CRISSMAN, J. W.; ANDERSON, P. A.; WOOLHISER, M.; AND HOLSAPPLE, M. The effects of feed restriction during *in utero* and postnatal development in rats. **Toxicological Sciences: an official Journal of the Society of Toxicology**, v. 82, p. 237–249, 2004.
- CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 460–463, 1997.
- CHAPIN, R. E.; GULANTI, D. K.; BARNES, L. H.; TEAGUE, J. L. The effects of feed restriction on reproductive function in Sprague-Dawley rats. **Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 20, p. 23-29, 1993.

CHATRATH, R.; SAILI A, J.; AIN, M.; DUTTA, A.K. Immune status of full-term small-for-gestational age neonates in India. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 43, p. 345-348., 1997.

CHERNOFF, N.; ROGERS, J. M.; ALLES, A. J.; ZUCKER, R. M.; ELSTEIN, EDWARD, K. H.; MASSARO, J.; SULIK, K. K. Cell cycle alterations and cell death in cyclophosphamide teratogenesis. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 9, p. 199-209, 1989.

CHRISTIAN, M. S. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW (Ed.). **Principles and method of toxicology**. 4. ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001. p. 1301–138.

CLÁUDIO, L.; BEARER, C. F.; WALLINGA, D. Assessment of the U.S. environmental protection agency methods for identification of hazards to developing organisms, part II: the developing toxicity testing guideline. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 35, p. 554-563, 1999.

CLAUDIO, L.; KWA, W.; RUSSELL, A.; WALLINGA, D. Contemporary issues in toxicology: Testing methods for developmental neurotoxicity of environmental chemicals. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164, p. 1–14, 2000.

COKELAERE, M.; DAENENS, P.; DECUYPERE, E.; FLO, G.; KUHN, E.; VAN BOVEN, M; VERMAUT, S. Reproductive performance of rats treated with defatted jojoba meal or simmondsin before or during gestation. **Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial**, v. 36, p. 13-19, 1998.

CÓRDOBA, F.; WIECZOREK, G.; PREUSSING, E.; BIGAUD, M. Modeling of delayed type hypersensitivity (DTH) in the non-human primate (NHP). **Discovery Today: Disease Models**, v. 5, p. 63-71, 2008.

DEMISSIE, K.; ERNST, P.; JOSEPH, L.; BECKLAKE, M. R. Birth weight and preterm birth in relation to indicators of childhood asthma. **Canadian Respiratory Journal**, v. 4, p. 91-97, 1997.

DEVEREUX, G.; BARKER, R. N.; SEATON, A. Antenatal determinants of neonatal immune responses to allergens. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 32, p. 43-50, 2002.

DIETERT, R. R.; ETZEL, R. A.; CHEN, D.; HALONEN, M.; HOLLADAY, S. D.; JARABEK, A. M.; LANDRETH, K.; PEDEN, D. B.; PINKERTON, K.; SMIALOWICZ, R. J.; ZOETIS, T. Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: Immune and respiratory systems work group summary. **Environmental health perspectives**, v. 1008, p. 483-490, 2000.

DIETERT, R. R.; LEE, J. E.; BUNN, T. L. Developmental immunotoxicology: Emerging issues. **Human & Experimental Toxicology**, v. 21, p. 479-485, 2002.

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

GAD, S. C.; WEIL, C. S. Statistics for toxicologists. In: HAYES, A. W. (Ed.). **Principles and methods of toxicology**. New York: Raven Press, 1989. p. 435-483.

GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. P. Fetal nutrition and adult disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p.1344S–1352S, 2000.

GOOD, R. A.; DALMASSO, A. P.; MARTINEZ, C.; ARCHER, O. K.; PIERCE, J. C.; PAPERMASTER, B. W. The role of the thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 116, p. 773-796, 1962.

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

HALE, F. Pigs born without eyeballs. **The Journal of Heredity**, v. 7, p. 105-106, 1935.

HOLEMANS, K.; AERTS, L.; VAN ASSCHE, F. A. Fetal growth and long-term consequences in animal models of growth retardation. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 81, p. 149–156, 1998.

HOLLADAY, S. D.; SMIALOWICZ, R. J. Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicantes depend on time of exposure. **Environmental Health Perspectives**, v.108, p.463-473, 2000.

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

HOLSAPPLE, M. P.; BURNS-NAAS, L. A.; HASTINGS, K. L.; GREGORY LADICS, S. AMY, L. LAVIN, S. A. L.; MAKRIS, S. L.; YANG, Y.; MICHAEL, I.; LUSTER, M. I. Forum : A proposed testing framework for developmental immunotoxicology (DIT). **Toxicological Sciences**, v. 83, p. 18-24, 2005.

JONES, P. A.; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, v. 293, p. 1068-1070, 2001.

KALTER, H. Letters to the editor: origin and meaning of “Teratology”. **Teratology**, v. 65, p. 3-4. 2002.

KAAMAR, P.; PISTL, J.; MIKULA, I. Immunotoxicology and veterinary medicine. **Acta Veterinária Brunensis**, v. 68, p. 57-79, 1999.

KENNEY, M. A. Development of spleen and thymus in offspring of proteindeficient rats. **The Journal of Nutrition**, v. 98, p. 202-208, 1969.

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

KIYMA, Z.; ALEXANDER, B. M.; VAN, E. A.; MURDOCH, W. J.; HALLFORD, D. M.; MOSS, G. E. Effects of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in ewes. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 2548-2557, 2004.

KRINKE, G. J. **The laboratory rat**. London: Academic Press, 2000.

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

LI, P.; YIN, YU-LONG LI, D.; KIM, S. W.; WU, G. Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition**, v. 98, p. 237–252, 2007.

LICCHESI, J. D.; WESTRA, W. H.; HOOKER, C. M.; HERMAN, J. G. Promoter hypermethylation of hallmark cancer genes in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 2570–2578, 2008.

LINDMARK, G. **Energy and protein intake in pregnancy**. 2003 Geneva: The World Health Organization: Reproductive Health Library. Disponível em: >http://apps.who.int/rhl/pregnancy_childbirth/antenatal_care/nutrition/glcom/en/index.html>. Acesso em: 2 jul. 2009.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. In: BOCK, G. R.; WHELAN J. (Ed.). **The childhood environment and adult disease**. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons, 1991. p. 38–55.

MANSON, J. M.; KANG, Y. J. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: HAYES, A. W. (Ed.). **Principles and methods of toxicology**. 3. ed. New York: Raven Press, 1994.p. 989–1037.

MELLOR, D. J. Nutritional and placental determinants of fetal growth rate in sheep and consequences for the newborn lamb. **The British Veterinary Journal**, v. 139, p. 307–324, 1983.

MOORE, S. E. Nutrition, immunity and the fetal and infant origins of disease hypothesis in developing countries. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p. 241–247. 1998.

MORGAN, H. D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**, v. 14, p. 47–58, 2005.

MORIN, A. Teratology "from Geoffroy Saint-Hilaire to the present". **Bulletin de l'Association des anatomists**, v. 80, p. 17-31, 1996.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v.17, p.138-146, 1996.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline for the Testing of Chemicals 414**. Prenatal Developmental Toxicity Study, 2001. Disponível em:<
<http://www.oecd.org/dataoecd/18/15/1948482.pdf>>. Acesso em: 2 jul. 2009.

OELKE, K.; LU, Q.; RICHARDSON, D.; WU, A.; DENG, C.; HANASH, S.; RICHARDSON, B. Overexpression of CD70 and overstimulation of IgG Synthesis by Lupus T cells and T cells treated with DNA methylation inhibitors. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, p. 1850–1860,2004.

PASSETI, T. A. **Regulação genética de atividades funcionais de macrófagos inflamatórios. Influência na resistência à infecção experimental pelo *Toxoplasma gondii***. 1993. 87 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

PHILLIPS, D. I. W. Birth weight and the future development of diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, p. B150–B155, 1998.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.

POSTMA, D. S.; KOPPELMAN, G. H.; MEYERS, D. A. The genetics of atopy and airway hyperresponsiveness. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, p.118–123., 2000.

QUDDUS, J.; JOHNSON, K. J.; GAVALCHIN, J.; AMENTO, E. P.; CHRISP C. E.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p. 38-53, 1993.

REMACLE, C.; BIESWAL, F.; REUSENS, B. Programming of obesity and cardiovascular disease. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 28, p. 46-53, 2004.

ROBERTS, D. W.; CHAPMAN, J. R. Concepts essential to the assessment of toxicity to the developing immune system. In: KIMMEL, C. A., BUELKE-SAM, J. (Ed.), **Developmental Toxicology**. New York: Raven Press, 1981. p. 167-189.

ROGERS, J. M.; KAVLOCK, J. Developmental toxicology. In: CURTIS, D. K. (Ed.). **Cassaret & Doull's toxicology: the basic science of poisonous**. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 301-333.

ROSSO, P.; LEDERMAN, S. A. Effects of obesity, food restriction and pregnancy on fetal and maternal weight and on body composition in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 111, p. 2162-2171, 1981.

RUDEN, D. M.; XIAO, L.; GARFINKEL, M. D.; LU, X. Hsp90 and environmental impacts on epigenetic states: a model for the trans-generational effects of diethylstilbesterol on uterine development and cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 14, p. 149-155, 2005.

RUSSO, M.; TEIXEIRA, H. C.; MARCONDES, M. C. G.; BARBUTO, J. A. N. Superoxide independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. **Brazilian Journal of Medical Research**, v. 22, p. 1271-1273, 1989.

SAHA, K.; KAUR, P.; SRIVASTAVA, G.; CHAUDHURY, D. S. A six-months' follow-up study of growth, morbidity and functional immunity in low birth weight neonates with special reference to intrauterine growth retardation in small-for-gestational-age infants. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 29, p. 278-282., 1983.

SALMAN, H.; BERGMAN, M.; BESSLER, H.; ALEXANDROVA, S.; DJALDETTI, M. Ultrastructure and phagocytic activity of rat peritoneal macrophages exposed to low temperatures in vitro. **Cryobiology**, v. 41, p. 66-71, 2000.

SANCHEZ-PERNAUTE, C. OSPELT, M. NEIDHART AND S. GAY. Epigenetic clues to rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v.30, p.12-20., 2008.

SCHARDEIN, J. L. Principles of teratogenesis applicable to drug and chemical exposure. In: SCHARDEIN. **Chemically Induced Birth Defects**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 1-65.

SHAHEEN, S. O.; STERNE, J. A.; MONTGOMERY, S. M.; AZIMA, H. Birth weight, body mass index and asthma in young adults. **Thorax**, v. 54, p. 396-402, 1999.

SHARMA, K. K.; MEDIRATTA, P. K.; REETA, K. H.; MAHAJAN, P. Effect of repeated locoweed feeding on peripheral lymphocytic function and plasma protein in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 2090-2093, 1984.

SNEDCOR, G. W. **Statistical Methods**. 4. ed. Ames: College Press, 1946. 324 p.

SOUSA, A. B.; MAIORKA, P. C.; GONÇALVES, I. D.; SÁ, L. R. M.; GÓRNIK, S. Evaluation of effects of prenatal exposure to the cyanide and thiocyanate in *Wistar* rats. **Reproductive Toxicology**, v. 23, p. 568-577., 2007.

STAPLES, R. E.; SCHENELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in KOH-alizarin S method for fetal bone. **Stain Technology**, v. 39, n. 1, p. 61-63, 1964.

TAYLOR, P. Skeletal examination. In: TAYLOR, P. **Practical teratology**. London: Academic Press, 1986. p. 77-100.

TUORMAA, T. E. The adverse effects of zinc deficiency. **Journal of Orthomolecular Medicine**, v. 10, p. 149-164, 1995.

US-EPA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment**. Washington, 1991. Register 56, p.63798-63826, 1991. Disponível em: <<http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/DEVTOX.PDF>. Acesso em 2 julho 2009. Fed>. Acesso em: inserir a data de acesso ao site.

US-FDA. UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products**. New Hampshire, United States: International Conference on Harmonization (ICH) Harmonized Tripartite Guideline for Industry (ICH-S5A), 1994. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM129282.pdf> >. Acesso em: 2 jul. 2009.

VAN DEN VEYVER, I. B. Genetic effects of methylation diets. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 255-282, 2002.

VELEZ, J. C.; DONKIN, S. S. Feed restriction induces pyruvate carboxylase but not phosphoenolpyruvate carboxykinase in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2938–2948, 2005.

VIEAU, D.; SEBAAI, N.; LÉONHARDT, M.; DUTRIEZ-CASTELOOT, I.; MOLENDI-COSTE, O.; LABORIE, C.; BRETON, C.; SYLVIE DELOOF, S.; LESAGE, J. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. 16-20, 2007.

WARKANY, J. History of teratology. In: Wilson, J.G.; Fraser, F.C. **Handbook of teratology**. New York: Plenum Press, 1977. v. 1, p. 3-45,

WARKANY, J. Manifestations of prenatal nutritional deficiency. **Vitamins and Hormones**, v. 3, p. 73-103, 1945.

WARKANY, J.; NELSON, R. C. Appearance of skeletal abnormalities in the offspring of rats reared on a deficient diet. **Science**, v. 92, p. 383-384, 1940.

WARKANY, J.; SCHRAFFENBERGER, E. Congenital malformation induced in rats by roentgen rays. **The American Journal of Roentgenology and Radium Therapy**, v. 57, p. 455-463, 1940.

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

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles for evaluating health risks to reproduction associated with exposure to chemicals. **Environmental Health Criteria**, v. 225, p. 185, 2001.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles of the testing of drugs for teratogenicity. **World Health Organization Technical Report**, v. 364, p. 5-18, 1967.

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

WILSON, J. G. **Environment and birth defects**. New York: Academic Press, 1973.

WOODALL, S. M.; JOHNSTON, B. M.; BREIER, B. H.; GLUCKMAN, P. D. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. **Pediatric Research**, v. 40, p. 438-443, 1996.

YUNG, R.; KAPLAN, M.; RAY, D.; SCHNEIDER, K.; MO, R. R.; JOHNSON, K.; RICHARDSON, B. C. Autoreactive murine Th1 and Th2 cells kill syngeneic macrophages and induce autoantibodies. **Lupus**, v. 10, p. 539-546, 2001.

ZHANG, W.; NAKAO, T.; KIDA, K.; MORIYOSHI, M.; NADADA, K. Effect of Nutrition during Pregnancy on Calf Birth Weights and Viability and Fetal Membrane Expulsion in Dairy Cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 48, p. 415-422, 2002.