UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Estudos comportamentais e bioquímicos da exposição perinatal ao
Senecio brasiliensis na prole de ratos

Thaísa Meira Sandini

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Estudos comportamentais e bioquímicos da exposição perinatal ao
Senecio brasiliensis na prole de ratos

Thaísa Meira Sandini

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S217e Sandini, Thaísa Meira
Estudos comportamentais e bioquímicos da exposição perinatal
ao *Senecio brasiliensis* na prole de ratos / Thaísa Meira Sandini. --
São Paulo, 2012.
140p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Spinosa, Helenice de Souza

1. Toxicologia reprodutiva 2. Toxicologia experimental I. T.
II. Spinosa, Helenice de Souza, orientador.

615.9 CDD

Thaísa Meira Sandini

Estudos comportamentais e bioquímicos da exposição perinatal ao
Senecio brasiliensis na prole de ratos

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa
Orientadora/Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de 2012.

Este trabalho:

- Faz parte do Projeto Temático intitulado “Toxinas de importância em Medicina Veterinária. Estudos de imunotoxicidade e teratogenicidade: avaliação da imunotoxicidade, neurotoxicidade e teratogenicidade em roedores e caprinos”, aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo nº 2006/06397-8) o qual é coordenado pela Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak e tem como colaboradora a Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa.
- Recebeu auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2010/ 04896-0).
- Foi desenvolvido no Biotério do Departamento de Patologia Animal (VPT) e no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Quero um dia dizer as pessoas, que nada foi em vão...
Que o amor existe, que vale a pena se doar as amizades e
as pessoas, que a vida é bela sim e que eu sempre dei o
melhor de mim...e que valeu a pena!

(Mário Quintana)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder força, saúde, vontade e determinação.

Aos meus pais, Antônio Nestor e Maria, por terem me proporcionado uma história de vida com mil estímulos reforçadores, que confiaram em meus passos, que aumentaram a probabilidade de padrões comportamentais relacionados a perseguir meus objetivos, independente dos obstáculos e da distância; por terem me ensinado regras, que se transformaram em valores. A vocês, exemplos de vida e força, agradeço a possibilidade da realização de um grande sonho.

Aos demais familiares, a minha irmã, aos meus tios, tias, primos e primas pela torcida e apoio ao longo da minha formação.

Ao meu namorado, Daniel, pelo companheirismo, incentivo, ajuda, paciência nos muitos fins de semana que passei pelo biotério, momentos de alegria e tranquilidade!

À minha orientadora Prof. Dra. Helenice de Souza Spinosa pela oportunidade de inserção no meio científico; por ser um exemplo de profissionalismo, dedicação, seriedade e por todo o apoio!

A Prof. Dra. Martha Maria Bernardi pela atenção, amizade e apoio!

Aos demais professores que ajudaram de uma forma ou de outra, em especial, ao Prof. Dr. Jorge Camilo Flório e a Prof. Dra. Primavera Borelli.

Aos funcionários do biotério do VPT pelos cuidados aos animais utilizados no experimento e pela amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do VPT: Herculano, Nicolle e Vagner pelo auxílio nos experimentos e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia do VPT: Cláudio e Luciano, na ajuda pela confecção das lâminas estudadas.

Aos demais funcionários, em particular a Ester do CEPTOX (USP-Pirassununga) pela ajuda nas análises bioquímicas.

À Mariana Sayuri que esteve presente ao meu lado em muitos experimentos. Obrigada pela ajuda!

Ao Daniel Sanches pela ajuda na análise das lâminas histológicas.

A Graziela Batista da Silva pela ajuda na análise sanguínea.

A todos os colegas da pós-graduação do VPT, em especial: Aline, Adriano, Andréia, Atílio, Beatriz, Eduardo, Esther, Fabiana, Fernando, Luciana Cunha, Luciana Lippi, Maria Izabel, Lucas, Mariane, Thalita, Thiago Marinho, Thiago Kirsten, Vanessa. Valeu pelo apoio e momentos de descontração!

A todos os colegas da pós-graduação da Toxicologia, em especial: Ana Lúcia, André, Carla, Carine, Daniel, Isabel, José, Natalinha, Tiago, Vânia.

Aos amigos sólaricos: André Ribeiro, André Linguini, Alex Kanno, Carlos Eduardo, Daniel Kazahaya, Diego Horita, Henrique Rofatto.

À secretária da Toxicologia, Samantha, pela sua competência.

À Universidade de São Paulo, ao Programa de Toxicologia e Análises Clínicas e ao Departamento de Patologia Animal pela oportunidade

A FAPESP pelo apoio financeiro, imprescindível para o desenrolar deste projeto.

A todos os demais que, apesar de não terem sido mencionados, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Sandini, T.M. **Estudos comportamentais e bioquímicos da exposição perinatal ao *Senecio brasiliensis* na prole de ratos**. 2012, 140f, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012

Senecio brasiliensis, conhecida popularmente como maria-mole, é uma das principais causas de intoxicação em animais de produção, principalmente em eqüinos e bovinos. A toxicidade desta planta ocorre devido à presença dos alcalóides pirrolizidínicos (APs), os quais sofrem biotransformação no fígado gerando como metabólitos tóxicos os pirróis. Além disso, esses compostos tóxicos podem ser transferidos para o homem através de produtos comestíveis de origem animal contaminados ou pelo uso na medicina popular. Até o momento, não há relatos a respeito de seus efeitos tóxicos sobre a prole de animais expostos durante a gestação. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos da exposição perinatal ao *S. brasiliensis*. Ratas Wistar fêmeas prenhes receberam por gavagem, do 6º até o 20º dia de gestação, diferentes doses de *S. brasiliensis* (3, 6 e 9 mg/Kg/dia). Durante o período de gestação foi avaliado o peso materno, consumo de água e de ração; ainda, nas progenitoras se avaliou o comportamento materno e materno agressivo. Na prole avaliaram-se os parâmetros do desenvolvimento físico e reflexológico; quando adultos avaliou-se aspectos comportamentais, hematológicos, bioquímicos, anatomopatológico e níveis de neurotransmissores. Os resultados mostraram diminuição no consumo de ração e no ganho de peso nos diferentes grupos experimentais, de forma dose-dependente. Ratas tratadas com a maior dose de *S. brasiliensis* apresentaram prejuízo no comportamento materno e materno agressivo. Os filhotes provenientes de ratas que receberam as doses de 6 e 9 mg/Kg apresentaram atraso para o início do desenvolvimento físico e reflexológico. Na prole adulta masculina proveniente da maior dose experimental observou-se aumento da atividade motora no campo aberto, bem como aumento na frequência de entrada e no tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Na natação forçada observou-se aumento no tempo de escalada na prole feminina proveniente da maior dose, enquanto na prole masculina advinda dos grupos de 6 e 9 mg/Kg notou-se diminuição no tempo de

natação. Na avaliação do comportamento estereotipado observou-se aumento deste comportamento em fêmeas advindas do grupo de maior dose experimental. Ainda, na prole adulta, foram observadas alterações hematológicas e bioquímicas; a análise histopatológica revelou aumento de células multinucleadas em animais provenientes dos grupos de 6 e 9 mg/Kg e com relação a análise dos neurotransmissores, foram observadas alterações a nível estriatal. Estes resultados indicam que a exposição durante a gestação ao *S. brasiliensis* causa toxicidade materna acompanhada de prejuízo em ambos comportamentos, materno e materno agressivo. Com relação à prole, houve prejuízo no desenvolvimento físico e reflexológico, e na idade adulta foram observadas alterações comportamentais e hematológicas, bem como algumas alterações bioquímicas e anatomopatológicas.

Palavras chave: *Senecio brasiliensis*, alcalóides pirrolizidínicos, toxicologia do desenvolvimento, ratos.

ABSTRACT

Sandini, T.M. **Behavioral and biochemical studies of perinatal exposure to *Senecio brasiliensis* in rats offspring.** (Estudos comportamentais e bioquímicos da exposição perinatal ao *Senecio brasiliensis* na prole de ratos). 2012, 140f - Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012

Senecio brasiliensis popularly known as “Maria Mole” (=lazy Mary), is a principal cause of poisoning in livestock, mainly in horses and cattle. The toxicity of this plant is caused by pyrrolizidine alkaloids (PAs) that are metabolized by hepatic enzymes to very toxic pyrrole metabolites. In addition, these compounds can be transferred to humans through animal products or using this plant as popular medicine. There are no reports about its toxic effects on the offspring. Thus, the aim of this study was evaluate the possible toxic effects of prenatal exposure to *S. brasiliensis* on rat offspring. Pregnant Wistar rats received different doses of *S. brasiliensis* (3, 6 and 9 mg/kg, by gavage, from 6th to 20th pregnancy day. During the gestational period were evaluated the maternal weight gain and water and food intakes, as well in dams were evaluated maternal and maternal aggressive behavior. In offspring were evaluated physical and reflexologic development and, when adult, the offspring were evaluated for behavioral aspects, haematological, biochemical, anatomopathological parameters, and neurotransmitters levels. The results showed decreased a dose-dependent decrease in food intake and weight gain of dams. Dams treated with the highest *S. brasiliensis* dose showed impairment in maternal and maternal aggressive behavior. The offspring exposed to 6 and 9 mg/Kg of *S. brasiliensis* showed delay at the beginning of the physical and reflexologic development. In adult male offspring the highest dose was observed increased on open field motor activity and the frequency of entries and spent time on open arms of the elevated plus-maze. In forced swimming test was observed increase on climbing time female offspring exposed to highest dose and decrease swimming time in male offspring from 6 mg/kg and 9 mg/kg doses. On stereotypic behavior test, only the female offspring exposed to the highest dose showed increase of this behavior. The adult offspring showed few haematological and biochemical alterations, and the

study histopathology demonstrated increased of hepatic multinucleated cells in animals exposed to both 6 and 9 mg/kg groups ;on the neurotransmitters levels alterations only at striatum. These results suggest that the *S. brasiliensis* exposure during the pregnancy cause maternal toxicity and impairment in both maternal and aggressive maternal behavior. The offspring showed damage in physical and reflexologic development, while in adulthood was observed behavioral and changes and some haematological, biochemical and anatomopathological alterations.

Key-words: *Senecio brasiliensis*, pyrrolizidine alkaloids, development toxicity, rats

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Sobre a importância da intoxicação por plantas	26
1.2 Sobre o gênero <i>Senecio</i> : descrição e distribuição da planta	26
1.3 Sobre a toxicidade em animais	28
1.4 Sobre princípios ativos, mecanismo de ação e patogenia.....	30
1.5 Sobre a toxicologia do desenvolvimento	34
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Animais.....	39
3.2 Matéria vegetal e obtenção do resíduo butanólico	39
3.3 Drogas utilizadas.....	40
3.4 Procedimentos	40
3.4.1 Administração do resíduo butanólico (RB) de <i>Senecio brasiliensis</i>	40
3.4.2 Acasalamento e diagnóstico de prenhez.....	41
3.4.3 Avaliação do consumo de água e de ração, bem como do ganho de peso gestacional	42
3.4.4 Avaliação do desempenho reprodutivo	42
3.4.5 Avaliação do comportamento materno e materno agressivo.....	42
3.4.6 Estudo anatomopatológico das ratas	45
3.4.7 Avaliação da prole durante a lactação.....	45
3.4.7.1 Desenvolvimento físico.....	45
3.4.7.2 Desenvolvimento reflexológico	47
3.4.8 Avaliação comportamental da prole adulta.....	48
3.4.8.1 Atividade geral em campo aberto	49
3.4.8.2 Comportamento no labirinto em cruz elevado	50
3.4.8.3 Interação social	51
3.4.8.4 Natação forçada	53
3.4.8.5 Avaliação da catatonia induzida por haloperidol	54
3.4.8.6 Comportamento estereotipado induzido por apomorfina	55

3.4.9 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos.....	57
3.4.10 Estudo anatomopatológico	58
3.4.11 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos.....	58
3.4.11.1 Colheita das estruturas cerebrais e preparo das amostras	58
3.4.11.2 Aparelho	59
3.4.11.3 Preparo das soluções.....	59
3.5 Delineamento experimental.....	61
3.5.1 Experimento 1: Avaliação de ratas expostas ao <i>Senecio brasiliensis</i> durante a prenhez (DG6 ao DG20)	61
3.5.2 Experimento 2: Efeitos da exposição ao <i>Senecio brasiliensis</i> durante a prenhez (DG6 ao DG20) no desenvolvimento físico e reflexológico da prole de ratas	61
3.5.3 Experimento 3: Efeitos da exposição ao <i>Senecio brasiliensis</i> durante a prenhez (DG6 ao DG20) na prole adulta.....	61
3.6 Análise Estatística	62
4 RESULTADOS.....	64
4.1 Experimento 1: Avaliação de ratas expostas ao <i>Senecio brasiliensis</i> durante a prenhez (DG6 ao DG20)	65
4.1.1 Avaliação do consumo de água e de ração, bem como do ganho de peso gestacional.....	65
4.1.2 Avaliação do desempenho reprodutivo das ratas expostas ao <i>Senecio brasiliensis</i> durante a prenhez (DG6 ao DG20).....	67
4.1.3 Avaliação do comportamento materno e materno agressivo das ratas expostas ao <i>Senecio brasiliensis</i> durante a prenhez (DG6 ao DG20) .	68
4.1.4 Estudo anatomopatológico das ratas	76
4.2 Experimento 2: Efeitos da exposição ao <i>Senecio brasiliensis</i> durante a prenhez (DG6 ao DG20) no desenvolvimento físico e reflexológico da prole de ratas	78
4.3 Experimento 3: Efeitos da exposição ao <i>Senecio brasiliensis</i> durante a prenhez (DG6 ao DG20) na prole adulta.....	93
4. 3.1 Atividade geral em campo aberto	93
4.3.2 Comportamento no labirinto em cruz elevado	94
4.3.3 Interação social	98
4.3.4 Natação forçada	98

4.3.5 Avaliação da catatonia induzida por haloperidol	101
4.3.6 Avaliação da estereotipia induzida por apomorfina	102
4.3.7 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos.....	104
4.3.8 Estudo anatomopatológico	108
4.3.9 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos.....	111
5 DISCUSSÃO	113
6 CONCLUSÕES	125
7 REFERÊNCIAS.....	128
8 ANEXOS.....	141
8.1 Aprovação Comité de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas	141
8.1 Aprovação Comité de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Senecio brasiliensis</i>.....	27
Figura 2 - Principais alcalóides encontrados em <i>Senecio brasiliensis</i>.....	30
Figura 3 - Estrutura principal dos alcalóides pirrolizidínicos	31
Figura 4 - Características estruturais essenciais para a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos: 1. anel 3-pirrolina; 2. grupamentos hidroxilas ligado ao anel pirrolina; 3. grupamentos esterificados; e 4. cadeia ramificada no resíduo ácido	32
Figura 5 - Fotografias de espermatozóides obtidos de swab vaginal de ratas; a) emaranhado de espermatozóides (20x) e b) estruturas de um espermatozóide (100x): (A) porção da cabeça; (B) porção intermediária; (C) porção da cauda.	41
Figura 6 - Parâmetros observados no comportamento materno de ratas: A – recuperação dos filhotes; . B – comportamento materno total (STERN et al., 2002)	43
Figura 7 - Geoataxia negativa. A: filhote de rato sobre a plataforma com a cabeça voltada para baixo. B: filhote de rato sobre a plataforma com a cabeça voltada para cima	48
Figura 8 - Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual da prole adulta de ratos.....	49
Figura 9 - Labirinto em cruz elevado	51
Figura 10 - Arena de campo aberto com ratos submetidos a avaliação da interação social	52
Figura 11 - Parâmetros observados no teste da natação forçada: imobilidade, natação e escalada (CRYAN, MARKOU E LUCKI, 2002)	54
Figura 12 - Aparato utilizado para a avaliação da catatonia induzida por 1 mg/Kg de haloperidol, por via intraperitoneal. A: um bastão de vidro suspense a 11 cm da bancada. B: rato em catatonia.....	55
Figura 13 - Gaiola de arame empregada para avaliação do comportamento estereotipado em ratos.....	56
Figura 14 - Cromatograma obtido na análise de uma solução contendo padrões e seus respectivos tempo de retenção em minutos: NOR (2,681),	

DOPAC (4,348), DA (5,643), 5HIAA (7,007), HVA (10,402) e 5HT (12,840).....60

Figura 15 - Comportamento materno: escores para o tempo de recuperação de filhotes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 8 animais por grupo. Análise de não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo teste de Dunn's: **p<0,01 e ***p<0,001.70

Figura 16 - Comportamento materno: escore do tempo para agrupamento dos 8 filhotes, escore do tempo e número de filhotes presentes no início da primeira amamentação, e escore da presença de comportamento materno total (CMT) de ratas expostas ou não (controle) a ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 8 animais por grupo. Análise de Variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) e paramétrica seguida pelo teste de Dunn's: **p<0,01 e Dunnett: ***p<0,001.....71

Figura 17 - Número de células multinucleadas de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 5 ratas por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Dunnett: *p<0,05, **p<0,01.....77

Figura 18 - Peso (em g) dos filhotes machos e fêmeas, em diferentes dias de vida, provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo *pair feeding* recebeu durante a gestação, a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. São apresentadas as médias e o e.p.m; n = 9 e 10 animais de cada gênero por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Bonferroni: *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,00180

Figura 19 - Parâmetros do desenvolvimento físico da prole de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo *pair feeding* recebeu durante a gestação, a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 9 e 10 animais de cada gênero por grupo.

Análise de Variância seguida pelo teste de Dunnett: *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.....	84
Figura 20 - Parâmetros do desenvolvimento reflexológico da prole de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo <i>pair feeding</i> recebeu durante a gestação, a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 9 e 10 animais de cada gênero por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Bonferroni: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001	87
Figura 21 - Locomoção da prole adulta masculina e feminina de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 10 animais de cada gênero por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste d pelo teste de Bonferroni: ***p<0,001.....	94
Figura 22 - Porcentagem de entrada e tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado da prole adulta de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 10 animais de cada gênero por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Bonferroni: *p<0,05, *p<0,01.....	97
Figura 23 - Tempo de escalada e de natação da prole adulta masculina e feminina de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 8 animais de cada gênero por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Bonferroni: *p<0,05.	100
Figura 24 - Número de células multinucleadas do fígado da prole adulta de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e o e.m.p; n = 13 ou 16 animais por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Dunnett: ***p<0,001.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escores para o tempo (em segundos) de recuperação de todos os oito filhotes e início da amamentação.	44
Tabela 2 - Escala de escores para avaliação do comportamento estereotipado induzido por apomorfina, proposta por Setler et al. (1976)	57
Tabela 3 - Testes comportamentais realizados nas proles provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> , do 6º ao 20º dia de gestação.....	62
Tabela 4 - Ingestão hídrica (em mL) de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> , via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; n = número de ratas por grupo.....	65
Tabela 5 - Consumo de ração (em g) de ratas expostas ou não (controle) <i>Senecio brasiliensis</i> , via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = número de ratas por grupo.....	66
Tabela 6 - Ganho de peso gestacional (em g) de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> , via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo pair feeding recebeu durante a gestação a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão, n = número de ratas por grupo	67
Tabela 7 - Parâmetros reprodutivos e canibalismo (em %) de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> , via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo pair feeding recebeu durante a gestação a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão, n = número de ratas por grupo	68
Tabela 8 - Parâmetros da atividade geral observada em campo aberto, no 6º dia pós-parto, de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> , via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = número de ratas por grupo por grupo.....	73

- Tabela 9** - Parâmetros do comportamento agressivo materno de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = número de ratas por grupo.....74
- Tabela 10** - Peso relativo dos órgãos (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = número de ratas por grupo77
- Tabela 11** - Peso (em g) dos filhotes machos e fêmeas, em diferentes dias de vida, provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo pair feeding recebeu durante a gestação, a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 9 e 10 animais de cada gênero por grupo.....79
- Tabela 12** - Parâmetros do desenvolvimento físico dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo pair feeding recebeu durante a gestação, a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 9 e 10 animais de cada gênero por grupo.....83
- Tabela 13** - Parâmetros do desenvolvimento reflexológico dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo pair feeding recebeu durante a gestação, a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 9 e 10 animais de cada gênero por grupo.....86
- Tabela 14** - Frequência de locomoção dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 10 animais de cada gênero por grupo.....89
- Tabela 15** - Frequência de levantar dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 10 animais de cada gênero por grupo.....90

Tabela 16 - Imobilidade (em segundos) dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 10 animais de cada gênero por grupo.....	91
Tabela 17 - Frequência de <i>grooming</i> dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 10 animais de cada gênero por grupo.....	92
Tabela 18 - Parâmetros da atividade geral em campo aberto da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 10 animais de cada gênero por grupo	93
Tabela 19 - Parâmetros do comportamento no labirinto em cruz elevado da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> do 6º ao 20º dia de gestação. São as médias e respectivos erros, ; n = 10 animais de cada gênero por grupo	96
Tabela 20 - Parâmetros do teste de interação social da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 6 pares de cada gênero por grupo	98
Tabela 21 - Parâmetros do teste de natação forçada da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 8 animais de cada gênero por grupo.....	99
Tabela 22 - Catatonia induzida por 1,0 mg/kg de haloperidol na prole adulta masculina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao <i>Senecio brasiliensis</i> do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos em número de animais com catatonia em relação ao número total e a respectiva porcentagem;n = 9 animais por grupo....	101

- Tabela 23** - Catatonia induzida por 1,0 mg/kg de haloperidol na prole adulta feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos em número de animais com catatonia em relação ao número total e a respectiva porcentagem; n = 8 animais por grupo... 102
- Tabela 24** - Estereotipia induzida por 0,6 mg/kg de apomorfina na prole adulta masculina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos como média dos escores de estereotipia e os respectivos erros padrão; n = 9 animais por grupo 103
- Tabela 25** - Estereotipia induzida por 0,6 mg/kg de apomorfina na prole adulta feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos como média dos escores de estereotipia e erros padrão; n = 9 animais por grupo..... 104
- Tabela 26** - Parâmetros hematológicos da prole adulta masculina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos como médias e respectivos erros padrão; n = 6 animais por grupo. 106
- Tabela 27** - Parâmetros hematológicos da prole adulta feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos como médias e respectivos erros padrão, n = 6 animais por grupo 107
- Tabela 28** - Parâmetros bioquímicos séricos da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos como médias e respectivos erros padrão; n = 10 animais de cada gênero por grupo. 108
- Tabela 29** - Peso relativo dos órgãos (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão, n = número de animais de cada gênero por grupo107

Tabela 30 - Número de células multinucleadas do fígado da prole adulta proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 13 e 16 animais por grupo... 110

Tabela 31 - Níveis de neurotransmissores e seus metabólitos em córtex pré-frontal, estriato, hipocampo e hipotálamo da prole adulta proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = número de animais de cada gênero por grupo 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT = alanina aminotransferase
ANOVA = Análise de variância
APO = Apomorfina
APs – alcalóides pirrolizidínicos
AST = aspartato animotransferase
BA = braços abertos
BF = braços fechados
CA = campo aberto
CE = comportamento estereotipado
CEPTOX = Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária
HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência
CM = comportamento materno
CMT = comportamento materno total
DA = dopamina
DA = dopamina
DG = dia de gestação
DNA = ácido desorribonucléico
DOPAC = ácido 3,4, dihidroxifenilacético,
DPN = dia pós natal
EBA = números de entradas nos braços abertos
EDTA = ácido etilenodiamino-tetracético-dissódico
EGF – fator de crescimento epidérmico
FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g – grama
GGT = gama-glutamilttransferase
5-HIAA = ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT = serotonina
h = hora
HVA = ácido homovanílico
IGF-I = fator de crescimento semelhante à insulina
kg – quilograma

LH = hormônio luteinizante

mg – miligrama

min = minutos

mL – miligrama

NOR = noradrenalina

p – nível de significância

RB = resíduo butanólico

rpm = rotações por minuto

seg = segundos

TBA = tempo de permanência nos braços abertos

TGF- α = fator de crescimento transformador- α

VPT = Departamento de Patologia Animal

USP = Universidade de São Paulo

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sobre a importância da intoxicação por plantas

As intoxicações por plantas em animais de produção no Brasil são conhecidas desde a época da colonização do nosso país e, ainda nos dias de hoje, estão entre as causas mais comuns de morte de bovinos adultos, resultando em perdas econômicas diretas e indiretas. Ressalta-se que, no estado do Rio Grande do Sul a intoxicação atribuída a plantas é uma das principais causas de morte entre bovinos (BARROS *et al.*, 2007; LUCENA *et al.*, 2010; KARAM e MOTTA, 2011). Estima-se que, metade dessas mortes são causadas por diferentes espécies de *Senecio*, totalizando uma perda anual de US\$ 7,5 milhões por ano (MÉNDEZ e RIET-CORREA, 2008).

No entanto, a morte não é a principal perda econômica, uma vez que a grande maioria das plantas causa intoxicação crônica (TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000). Nesse sentido, observaram-se prejuízos econômicos diretos, como, por exemplo, diminuição do índice reprodutivo, diminuição na produção de carne, leite ou lã, aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas e, não menos importante, distúrbios na esfera reprodutiva, tais como aborto ou má formações.

As preocupações com relação à intoxicação por plantas tóxicas em animais de produção são, de fato, de particular interesse tanto para a saúde veterinária quanto pública. Essa importância está relacionada ao consumo de produtos de origem animal, como, leite, carne, ovos e mel contaminados por toxinas destas plantas, acarretando, dessa forma, em intoxicação indireta no ser humano.

Nesse contexto, fica evidente a importância do conhecimento sobre a toxicidade de plantas tóxicas, uma vez que ainda são escassos os estudos sobre os princípios tóxicos da maioria das plantas tóxicas brasileiras e como estas agem, durante a idade fértil.

1.2 Sobre o gênero *Senecio*: descrição e distribuição da planta

Mundialmente são descritas mais de 1200 espécies de *Senecio*. Destas, sabe-se que cerca de 25 espécies são comprovadamente tóxicas para o homem e animais domésticos (TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000). No Brasil, na década 60 a literatura relatava aproximadamente 128 espécies de *Senecio* (MONTIDOME e FERREIRA, 1966); no entanto, passado alguns anos observou-se

haver 85 espécies de *Senecio* (CABRERA e KLEIN, 1975) e, mais recentemente, relata-se a ocorrência de 67 espécies, em função da transferência de algumas espécies para outros gêneros (HIND, 1993). Dentre essa diversidade de espécies de *Senecio* sp., destaca-se no estado do Rio Grande do Sul a *Senecio brasiliensis* (figura1) conhecida popularmente como “flor das almas”, “tasneirinha” e principalmente “maria mole”; também pode ser observada em áreas altas e frescas da região sudeste do Brasil (PILATI e BARROS, 2007).

Figura 1 - *Senecio brasiliensis*

“*Senecio brasiliensis* pertence à família Asteraceae; é uma planta perene, herbácea, com caule liso e ramificado, que pode atingir de 1–2 metros de altura” (CORRÊA, 1984). Esta planta apresenta a facilidade de propagar-se rapidamente, principalmente sob condições ambientais ideais, como a umidade e a luz para a brotação e a temperatura para floração (KARAM *et al.*, 2002). Dessa forma, é considerada uma planta invasora, muito comum em terrenos baldios, pastagens e eventualmente em lavouras.

No Brasil, o comportamento fenológico das plantas do gênero *Senecio* spp. permite a presença de várias espécies no campo, inclusive sua emergência e brotação em qualquer período do ano, favorecendo sua ingestão (KARAM *et al.*, 2002). No entanto, o consumo desta planta pelos bovinos no Rio Grande do Sul

ocorre principalmente entre os meses de maio a agosto, período no qual as plantas estão em brotação e a disponibilidade de pastagem diminui, uma vez que esta planta apresenta baixa palatabilidade (BARROS, METZDORF e PEIXOTO, 1987; MÉNDEZ e RIET-CORREA, 2008).

Vale a pena destacar que *Senecio* é a planta tóxica de maior importância para bovinos, sendo responsável, sozinha, por cerca de 50% de todas as mortes no estado do Rio Grande do sul (RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001; RISSI *et al.*, 2007). Possivelmente, estes valores são mais elevados, uma vez que estes dados foram baseados na morte de animais somente no estado do Rio Grande do Sul.

1.3 Sobre a toxicidade em animais

Até a década de 1980 sabia-se pouco sobre a toxicidade da *Senecio brasiliensis* para os animais domésticos no Brasil. Os poucos estudos sobre a intoxicação desta planta, sob condições naturais de exposição, se limitavam às espécies eqüina e bovina. De fato, em um estudo, relatou-se em eqüinos possível intoxicação por *Senecio brasiliensis*, em São Paulo (CARVALHO e MAUGÉ, 1946) e outra no estado do Paraná (CURIAL e GUIMARÃES, 1958).

A intoxicação por *Senecio* acomete principalmente bovinos, sendo evidenciado através de estudos epidemiológicos desta intoxicação no estado Rio Grande do Sul, onde foram apresentados dados de 24 surtos em bovinos e um em eqüinos (KARAM *et al.*, 2004).

Devido à importância da intoxicação causada por essa planta, estudos experimentais com *Senecio brasiliensis* foram realizados em bovinos, pois esta é a espécie mais frequentemente afetada. Verificou-se que a morbidade pela intoxicação nestes animais varia entre 1% a 30%, e a letalidade é praticamente 100% (MÉNDEZ *et al.*, 1990; BASILE *et al.*, 2005). A sintomatologia observada mostrou perda de peso, tenesmo retal e pelagem grossa; também se observaram distúrbios digestivos e, ocasionalmente, icterícia, fotossensibilização, polidipsia e edema cutâneo da barbel. Ainda, foram relatadas lesões microscópicas como hepatomegalia, fibrose e hiperplasia de células epiteliais dos ductos biliares, e alguns animais apresentaram lesões histológicas no sistema nervoso central, caracterizadas por discretos focos de malácia e leve satellitose (BASILE *et al.*, 2005).

Neste contexto, sabe-se que a intoxicação ocorre em animais adultos, principalmente vacas por permanecerem por maior tempo na propriedade e ingerirem, ao longo do tempo, maior quantidade de *Senecio* (MÉNDEZ e RIET-CORREA, 2000). Os machos são menos susceptíveis do que as fêmeas devido ao tipo de lesão provocada pelos alcalóides pirrolizidínicos, e ao processo metabólico, pois as enzimas do citocromo P450 tem maior atividade nos machos do que nas fêmeas (MACLACHLAN e CULLEN, 1998). A intoxicação, ainda pode variar conforme a idade, visto que em recém-nascidos estas enzimas tem menor atividade do que nos animais adultos (MACLACHLAN e CULLEN, 1998).

Estudos experimentais realizados em ovinos mostraram que a intoxicação por *Senecio brasiliensis* causou icterícia, aumento do fígado com uma acentuação no padrão lobular e coloração escura nos rins (BARROS *et al.*, 1989). Em casos de intoxicação natural por *Senecio brasiliensis* em ovinos, observaram-se apatia, anorexia, emagrecimento progressivo, fotossensibilização, icterícia, incoordenação motora, andar compulsivo a esmo, decúbito e morte em casos mais severos (ILHA *et al.*, 2001). Achados de necropsia em eqüinos intoxicados por *Senecio brasiliensis* mostraram icterícia, ascite e megalocitose de hepatócitos; observou-se também que alguns animais apresentaram distúrbios neurológicos, como andar cambaleante e incoordenação motora (PILATI e BARROS, 2007).

Sabe-se que a toxicidade causada pelos alcalóides pirrolizidínicos (APs) esta relacionada com a susceptibilidade das diferentes espécies animais e com o balanço entre as reações de bioativação, desintoxicação e excreção de alcalóides (CHEEKE, 1994). Os bovinos e eqüinos são bastante suscetíveis à intoxicação por *Senecio sp.*, sendo 30 a 40 vezes mais sensíveis do que ovinos e caprinos (CRAIG *et al.*, 1991), pois estes animais podem consumir esta planta sem adoecer na maioria das vezes (MÉNDEZ, 1993). Em particular, a resistência dos ovinos à ação hepatotóxica dos alcalóides pirrolizidínicos está relacionada à peculiaridades de sua flora ruminal (CRAIG *et al.*, 1992) e aos sistemas enzimáticos do fígado, o que resulta em uma excelente detoxificação dos APs (HUAN *et al.*, 1998).

Em condições naturais, os animais passam longos períodos ingerindo pequenas quantidades da planta; assim, as lesões ocorrem de forma crônica e progressiva (TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000). Na maioria dos casos os animais apresentam lesões sem a ocorrência de sintomas, o que dificulta a realização de um diagnóstico preciso. Uma alternativa para se diagnosticar

intoxicações por *Senecio brasiliensis* é a realização da biópsia hepática, embora seja necessário fazer um diagnóstico diferencial com intoxicações por outras plantas que causam cirrose hepática, aflatoxicose e intoxicações por nitrosaminas (TOKARNIA, DÖBEREINER e PEIXOTO, 2000; PILATI e BARROS, 2007; KARAM e MOTTA, 2011).

1.4 Sobre princípios ativos, mecanismo de ação e patogenia

Como citado anteriormente, as plantas do gênero *Senecio* são conhecidas por causarem toxicidade hepática em animais herbívoros, como bovinos, ovinos e equinos, e esta toxicidade está relacionada com um grupo de constituintes pertencentes ao metabolismo secundário da planta, os alcalóides pirrolizidínicos (APs).

Nas espécies de *Senecio*, os APs são sintetizados exclusivamente como N-óxido da senecionina; estes são transportados para os órgãos superiores da planta, onde sofrem alterações estruturais, originando, dessa forma, os diferentes APs (MACEL, VRIELING e KLINKHAMER, 2004). Em relação ao *Senecio brasiliensis* os principais alcalóides presentes são a integerrimina e a senecionina e, como alcalóide secundário, a retrorsina (figura 2) (MONTIDOME e FERREIRA, 1966; TRIGO *et al.*, 2003)

Figura 2 - Principais alcalóides encontrados em *Senecio brasiliensis*

Quimicamente os APs são compostos que contém nitrogênio no anel heterocíclico e são geralmente substâncias básicas. O núcleo básico de aminoálcool recebe o nome de necina (núcleo pirrolizidina), sendo constituído por dois anéis fundidos de cinco membros unidos por um único átomo de nitrogênio; a porção ácida é chamada de ácido nécico (ácido alifático) e é composta por uma ou duas ramificações de éster carboxílico (figura 3) (SILVA, BOLZAN e HEINZMANN, 2006; CHEN, MEI e FU, 2010).

Figura 3 - Estrutura principal dos alcalóides pirrolizidínicos

A estrutura básica responsável pela hepatotoxicidade dos APs é determinada por quatro características estruturais mínimas (PRAKASH *et al.*, 1999): 1) um anel 3-pirrolina; 2) um ou dois grupamentos hidroxilas ligado ao anel pirrolina; 3) um ou dois grupamentos esterificados e 4) uma cadeia ramificada no resíduo ácido (figura 4). No entanto, a característica imprescindível para causar a toxicidade hepática aguda e crônica é a presença de uma insaturação na necina nos carbonos 1 e 2, característica esta observada nos APs da planta *Senecio brasiliensis* (CHEEKE, 1988).

Figura 4 - Características estruturais essenciais para a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos: 1. anel 3-pirrolina; 2. grupamentos hidroxilas ligado ao anel pirrolina; 3. grupamentos esterificados; e 4. cadeia ramificada no resíduo ácido

Após a absorção, a circulação portal transporta os APs até o fígado onde são biotransformados pelas enzimas microsossomais hepáticas do citocromo P450, originando os pirróis, compostos estes responsáveis pela toxicidade do *Senecio* (MATTOCKS *et al.*, 1986). Os processos de biotransformação dos APs após sua ingestão apresentam três principais caminhos: hidrólise, oxidação e desidrogenação (MATTOCKS *et al.*, 1986; FU *et al.*, 2002). As duas primeiras reações estão envolvidas com o mecanismo de detoxificação, enquanto a desidrogenação esta relacionada com a formação dos pirróis, responsáveis pela toxicidade (SANTOS *et al.*, 2008).

A toxicidade dos pirróis está relacionada com sua alta reatividade e, por esse motivo, são denominados agentes alquilantes, pois se ligam facilmente ao DNA. Além disso, os pirróis atuam inibindo a mitose dos hepatócitos, levando a megalocitose, necrose e, conseqüentemente, redução do número de hepatócitos, os quais são substituídos por tecido conjuntivo fibroso, iniciando-se, assim, o quadro clínico e a morte, devido à disfunção hepática (MATTOCKS, 1968; SANTOS *et al.*, 2008). Ainda, com relação às lesões hepáticas, estas podem afetar as células parenquimatosas (hepatócitos), células não parequimatosas (células de Kupffer, células Ito, células endoteliais, células de ductos biliares e linfócitos associados ao fígado), bem como a matriz extracelular hepática (SHIRATORI *et al.*, 1993; TORRES e COELHO, 2008). No entanto, parte dos pirróis escapa pela circulação geral, causando lesões em outros tecidos, como nos rins e pulmões, gerando nefrose e

pneumonia intersticial (RADOSTITS *et al.*, 2002), uma vez que as enzimas do citocromo P450 também estão presente nestes órgãos (TORRES *et al.*, 1997).

Lesões histológicas no sistema nervoso central, caracterizadas por discretos focos de malácia, leve satellitose, edema de meninge, entre outros achados, estão associados ao quadro clínico de perturbações neurológicas descritas em casos de intoxicações bovinas e eqüinas (BARROS, METZDORF e PEIXOTO, 1987; GAVA e BARROS, 1997; PILATI e BARROS, 2007). No entanto, a lesão histológica não é provocada pela ação direta do alcalóide, mas sim pela incapacidade do fígado em biotransformar a amônia. A elevada quantidade de amônia leva ao acúmulo desta substância no encéfalo, onde a mesma reage com o ácido α cetoglutarico para formar a glutamina. A depleção do ácido α cetoglutarico, que é um intermediário do ciclo do ácido cítrico, prejudica a formação do ATP, reduzindo os seus níveis, comprometendo o metabolismo cerebral normal (CHEEKE, 1988). Em razão disto a hiperamonemia determina o quadro clínico que é denominado encefalopatia hepática.

Com relação aos seres humanos, a principal manifestação da intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos é a doença veno-oclusiva hepática, caracterizada por dor epigástrica com distensão abdominal devido à ascite . Na maioria dos casos, a intoxicação ocorre devido ao uso crônico da planta na forma de chá . Sabe-se que a intoxicação por APs pode ocorrer através do consumo de produtos de origem animal contaminados como o leite (DICKINSON, COOKE e MOHAMED, 1976; MOLYNEUX e JAMES, 1990; HOOGENBOOM *et al.*, 2011). No entanto, ainda não há descrições de intoxicações em seres humanos devido ao consumo desses alcalóides presentes no leite. Nesse contexto, estudos mostraram que a ingestão de ração por ratos contendo leite de cabra contaminado com APs promoveu alterações hepáticas e pneumotóxicas nesses animais (MEDEIROS, GÓRNIK e GUERRA, 1999). Além disso, ressalta-se ainda a ação teratogênica de APs em seres humanos observada em recém-nascidos, cujas mães consumiram, durante a gestação, chá ou alimentos que continham estes princípios tóxicos (ROULET *et al.*, 1988; HUXTABLE, 1989; RASENACK *et al.*, 2003). Dessa forma, estes trabalhos evidenciam que apesar de diferentes formas de intoxicações relacionadas aos APs, as lesões causadas são prejudiciais tanto para a saúde humana quanto dos animais de produção.

1.5 Sobre a toxicologia do desenvolvimento

A toxicologia do desenvolvimento estuda os efeitos adversos que ocorrem nos organismos em desenvolvimento, expostos a diferentes agentes químicos antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal e pós-natal até a puberdade. A toxicologia do desenvolvimento engloba a teratologia e a toxicologia da reprodução (BARROS e SOLANGE, 1996). Inicialmente, a teratologia estava relacionada apenas com alterações de ordem morfológica, mas, atualmente, é o estudo das anomalias e malformações ligadas a perturbações do desenvolvimento embrionário ou fetal, incluindo malformações estruturais, retardo no crescimento, dano no desenvolvimento e até mesmo morte (ADAMS, 1989; HANSEN e YANKOWITZ, 2002; EMA *et al.*, 2010). Estas alterações podem ser causadas pela ação direta de um agente tóxico sobre o feto ou através da ação no organismo materno (CHAHOUUD *et al.*, 1999; BERNARDI, 2011).

A toxicologia do desenvolvimento é tida ainda como a área do conhecimento que evidencia a ocorrência de efeitos adversos no organismo em desenvolvimento que pode ser resultado de uma exposição anterior à concepção (nos pais), durante o desenvolvimento pré-natal ou pós-natal até o período de maturação sexual (EPA, 1996). Mais recentemente, é área que estuda os efeitos nocivos causados por agentes tóxicos em um conceito em desenvolvimento (GÓRNIAK, SPINOSA e BERNARDI, 2008).

O efeito tóxico de uma substância pode ocorrer durante todo o desenvolvimento embriofetal de um mamífero, no entanto, as consequências podem variar conforme o período de exposição. O desenvolvimento embriofetal de mamíferos pode ser dividido em quatro períodos: implantação, organogênese ou organogenético, desenvolvimento fetal e período neonatal. A exposição a agentes tóxicos no período inicial do desenvolvimento (implantação) pode variar conforme o número de células atingidas pelo agente tóxico, ou seja, quanto maior o número de células atingidas, maior será a chance de ocorrer uma embriofetalidade. O período de organogênese abrange desde a proliferação e migração celular até a formação de órgãos rudimentares; nesta fase ocorre maior suscetibilidade à ação do agente tóxico, podendo acarretar em malformações estruturais. Após a organogênese, segue-se o período fetal e neonatal; exposições que se iniciam durante estes períodos podem causar anormalidades celulares e teciduais, podendo interferir em

funções normais de importantes sistemas, tais como o sistema nervoso central, o sistema imune ou o sistema endócrino, além de causar retardo geral do desenvolvimento (LEMONICA, 2008).

As categorias de risco teratogênico incluem fármacos, agentes químicos, infecciosos e físicos, alterações maternas e/ou metabólicas (WILSON *et al.*, 2007). Seus mecanismos atuam de forma direta ou indireta no funcionamento intra ou extra celular através de interferências relacionadas com: processo mitótico, alterações intercelulares, biossíntese de enzimas, pH celular, balanço osmótico, deficiência nutricional, aumento excessivo da morte celular e com os controles de metilação do DNA (WELSCH, 1992; RUTLEDGE, 1997; HOLLIDAY, 1998; ROGERS *et al.*, 2000). Ainda nesse contexto, vale a pena lembrar que toxinas naturais podem atravessar a membrana placentária, interferindo no desenvolvimento embrionário e fetal .

Nesse sentido, fica evidente a importância de se estudar os possíveis efeitos teratogênicos dos APs de *Senecio brasiliensis* na prole de ratos, uma vez que esta planta, além de apresentar interesse veterinário, é de grande importância para a saúde pública, pois pode afetar a saúde do ser humano de forma direta ou indireta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos comportamentais e bioquímicos da exposição ao resíduo butanólico de *Senecio brasiliensis* durante o período perinatal na prole de ratas, desde o nascimento até a idade adulta.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar:

- o peso materno, consumo de água e de ração de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* durante a prenhez (DG6 ao DG20);
- o comportamento materno e materno agressivo de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* durante a prenhez (DG6 ao DG20);
- o desenvolvimento ponderal dos filhotes expostos ao *Senecio brasiliensis* durante a prenhez;
- o desenvolvimento físico e reflexológico da prole de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* durante a prenhez;
- a interação social, o comportamento no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, a natação forçada, a catatonia e o comportamento estereotipado da prole adulta exposta ao *Senecio brasiliensis* durante a gestação;
- os parâmetros hematológicos e bioquímicos, bem como o nível de neurotransmissores e seus metabólitos no sistema nervoso central e os achados anatomopatológicos da prole adulta exposta ao *Senecio brasiliensis* durante a gestação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus*, Wistar fêmeas, virgens, sexualmente maduras, com aproximadamente 80 dias de idade, pesando aproximadamente 180 g e machos da mesma espécie, pesando em torno de 250 g, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (40 x 50 x 20 cm) mantidas em uma sala com temperatura controlada ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e com ciclo de doze horas claro-escuro, sendo a luz acesa às 6:00 horas. Água e comida foram fornecidas *ad libitum* aos animais durante todo procedimento experimental. Os animais foram mantidos nestas condições por um período de adaptação de no mínimo cinco dias antes do início do experimento.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob protocolo nº 1905/2010, em 26/05/2010.

3.2 Matéria vegetal e obtenção do resíduo butanólico

As folhas secas e moídas de *Senecio brasiliensis* foram fornecidas pela Profa. Dra Ana Lucia Pereira Schild, coordenadora do Laboratório Regional de Diagnóstico, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. As mesmas foram coletadas na região de Pelotas, no Estado do Rio Grande do Sul, no início de 2008, e identificadas como *Senecio brasiliensis* (Spreng.) Less. var. *brasiliensis*, Voucher número 24.592. O material vegetal foi seco à sombra em temperatura ambiente, moído e congelado à -20°C até o momento da extração.

Na extração dos alcalóides realizada por Elias et al. (2011), empregou-se a técnica de Stas-Otto modificado, no qual 900 g de *Senecio brasiliensis* foram maceradas em etanol 92% durante 3 dias e o macerado filtrado para obtenção do extrato etanólico. O procedimento foi repetido 4 vezes, até o esgotamento do material e as frações foram reunidas. Posteriormente, o solvente foi eliminado em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura aproximada de 40°C . O extrato isento de etanol foi acidificado com uma solução de ácido tartárico a 10% em água e filtrado para obtenção de um resíduo ceroso de coloração esverdeada. Esta solução

foi fracionada por partição, inicialmente extraída com acetato de etila e, em seguida, com clorofórmio, exaustivamente, obtendo-se respectivamente soluções de acetato de etila e clorofórmica. Após evaporação dos solventes obteve-se os respectivos resíduos: resíduo acetato de etila (RAE) e resíduo clorofórmico ácido (RCH^+). Posteriormente, a solução aquosa ácida restante foi alcalinizada com hidróxido de amônio até atingir um pH 9-10 e extraída consecutivamente com clorofórmio e uma solução hidrobutanólica (butanol saturado com água). As soluções clorofórmica e hidrobutanólica foram evaporadas totalmente para obtenção dos seguintes resíduos: clorofórmico alcalino (RCOH^-) e butanólico (RB). Este último resíduo, no qual se encontram os alcalóides pirrolizidínicos, foi administrado aos animais, tomando-se o cuidado de mantê-lo em dessecador até o momento do uso, quando então foi diluído em água destilada para obter as diferentes concentrações e, após isso, foi mantido em geladeira.

A quantificação dos alcalóides presentes no RB foi feita empregando-se a técnica de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) sendo encontrado 69% de interregimina N-óxido (ELIAS *et al.*, 2011). Assim, as doses empregadas no presente estudo de 3,0 6,0 e 9,0 mg/kg, correspondem respectivamente a 2.07, 4.14 e 6.21 mg/kg de integerrimina N-óxido.

3.3 Drogas utilizadas

Xilazina (Xilazin ®) e Cetamina (Cetamin®) para realização da coleta de sangue e posterior eutanásia.

Haloperidol (Janssen – Farmacêutica®) para avaliação da catatonía.

Apomorfina (Sigma®) para avaliação do comportamento estereotipado.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Administração do resíduo butanólico (RB) de *Senecio brasiliensis*

A administração do RB foi feita às fêmeas do 6º ao 20º dias de gestação (DG), por via oral, através de gavagem, nas doses de 3,0; 6,0 e 9,0 mg/Kg de peso vivo, as quais correspondem, respectivamente a 2,07, 4,14 e 6,21 mg/Kg de

integerrimina N-óxido, conforme em estudo prévio realizado em nosso laboratório sobre o sistema imune (ELIAS *et al.*, 2011).

3.4.2 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

Para o acasalamento as fêmeas foram colocadas duas a duas com os machos no período noturno (a partir das 18:00 horas). Na manhã seguinte (7:00 horas), os machos foram retirados, os lavados vaginais foram coletados e observados em microscópio, primeiramente em aumento de 5X, seguindo para o aumento de 10X e por fim 40X. O diagnóstico de prenhez foi realizado pela presença de espermatozóide no lavado vaginal (figura 5), e este foi considerado como o dia 0 de gestação (DG0). Essas ratas prenhes foram, então, acondicionadas individualmente em gaiolas moradias, onde permaneceram durante todo o período experimental.

Figura 5 - Fotografias de espermatozóides obtidos de swab vaginal de ratas; a) emaranhado de espermatozóides (20x) e b) estrutura de um espermatozóide (100x): (A) porção da cabeça; (B) porção intermediária; (C) porção da cauda.

3.4.3 Avaliação do consumo de água e de ração, bem como do ganho de peso gestacional

O peso corpóreo de cada animal foi mensurado a cada três dias, sendo o ganho de peso gestacional avaliado no DGO, DG7, DG14 e DG21. Durante o período gestacional o consumo de água e ração foram medidos semanalmente.

Uma vez que a desnutrição materna pode ser implicada em alterações do desenvolvimento da prole (Fleeman, 2005, Cappon, 2005, Zhang et al., 2010) incluiu-se um grupo adicional denominado *pair-feeding*. Este grupo recebeu a mesma quantidade de ração consumida pelo grupo experimental de maior dose (9 mg/Kg de RB).

3.4.4 Avaliação do desempenho reprodutivo

Para a avaliação do desenvolvimento reprodutivo de ratas foram avaliados os seguintes parâmetros: duração de prenhez, número de filhotes vivos/mortos ou com possíveis alterações físicas, número total de filhotes por ninhada, peso total da ninhada, número total de filhotes fêmeas e machos de cada rata.

3.4.5 Avaliação do comportamento materno e materno agressivo

O comportamento materno inclui ações que as fêmeas executam para garantir o sucesso da sobrevivência e do desenvolvimento de sua prole (MANN, 2006), já que em várias espécies, como, por exemplo, nos ratos, os filhotes são imaturos ao nascer. A avaliação do comportamento materno (CM) foi realizada pela manhã do 5º dia pós-natal (DPN 5), período no qual este se apresenta em sua máxima intensidade. Para tanto, as mães foram privadas de seus filhotes uma hora antes do início do teste comportamental. Após 60 minutos da separação da mãe/filhotes, iniciou-se o teste propriamente dito, colocando-se os filhotes posicionados, cada um deles, nos vértices e nos pontos médios de cada lado da gaiola, sendo a mãe introduzida no centro desta. As observações comportamentais foram realizadas durante 60 minutos consecutivos (3600 s) e filmadas para posterior análise comportamental. Os parâmetros analisados foram:

- tempo para a mãe recuperar o 1° filhote;
- tempo para recuperação do 2° filhote;
- tempo para recuperação do 3° filhote;
- tempo para recuperação do 4° filhote;
- tempo para a rata agrupar todos os filhotes;
- tempo para rata iniciar a amamentação;
- número de filhotes presentes no início da amamentação;

Para o de tempo de recuperação dos filhotes e início da amamentação, se optou pela avaliação em escores, conforme mostrado na tabela 1.

- presença/ausência do comportamento materno total (CMT), sendo considerado positivo (escore 1) quando a rata permanece em cifose fisiológica por um período maior ou igual há três minutos consecutivos com todos os oito filhotes reunidos e negativo (escore 2) na ausência deste.

A figura 6 mostra alguns dos parâmetros observados no comportamento materno de ratas.

A

B

Figura 6 - Parâmetros observados no comportamento materno de ratas: A – recuperação dos filhotes; . B – comportamento materno total (STERN et al., 2002).

Tabela 1 - Escores para o tempo (em segundos) de recuperação de todos os oito filhotes e início da amamentação.

Tempo (s)	Escore
0 a 360	1
361 a 720	2
721 a 1080	3
1081 a 1440	4
1441 a 1800	5
1801 a 3600	6
Não ocorrência do comportamento	7

Além do comportamento materno, ratas lactantes também apresentam comportamento agressivo na presença de um intruso (HUNTINGFORD, 1989; GAMMIE, 2005). Com esse objetivo, avaliou-se a agressão materna das ratas em relação à presença de um intruso junto à prole. Assim, pela manhã do DPN6 (9h – 12h) os animais foram levados ao laboratório de comportamento e aguardou-se 15 minutos para a habituação. A seguir, as ratas foram colocadas no campo aberto, durante três minutos, para avaliação motora (para detalhes, veja item 3.3.8.1) e após 15 min o comportamento materno agressivo foi avaliado colocando-se um macho intruso, virgem, de peso similar à rata mãe na caixa moradia na qual estavam a mãe e os filhotes. Logo após, o comportamento foi filmado por 10 min, sempre tendo o cuidado para manter a integridade dos filhotes. Os parâmetros analisados foram:

- tempo e frequência de investigação social do macho na fêmea e vice-versa, isto é, tempo e número de vezes no qual um passa perseguindo e cheirado o outro;
- tempo e frequência de vezes que o intruso cheira os filhotes;
- tempo e frequência de vezes que a mãe esteve com os filhotes;
- tempo e frequência de boxe dos membros torácicos;
- tempo e frequência de boxe dos membros pélvicos;
- latência para a primeira luta;
- tempo e o número de lutas durante os 10 min.

Tanto os parâmetros do comportamento materno, como do materno agressivo foram analisados com auxílio do programa de análises comportamentais Etholog 2.2 (OTTONI, 2000).

3.4.6 Estudo anatomopatológico das ratas

Para o estudo anatomopatológico foi feita a eutanásia (5 mg/kg de xilazina + 50 mg/kg de cetamina) das ratas logo após o desmame dos filhotes (21º dia pós-natal – DPN 21). Os órgãos estudados foram: fígado, baço, pulmão, rim direito e esquerdo, que foram pesados em balança analítica, para o cálculo do peso relativo de cada órgão. Para tal cálculo, empregou-se a seguinte fórmula: peso do órgão / peso corpóreo x 100. A seguir, fragmentos representativos do fígado foram coletados para a análise histológica.

3.4.7 Avaliação da prole durante a lactação

Com o objetivo de diminuir qualquer estresse ou até mesmo abandono da mãe pelos filhotes, o manuseio dos filhotes sempre foi feito com delicadeza, tendo-se o cuidado de lavar as mãos e passá-las na maravalha da gaiola antes de tocá-los. No dia do nascimento procurou-se observar o número de filhotes nascidos e, apenas no segundo dia de vida (DPN2) os filhotes foram pesados e sexados através do método da distância anogenital, mantendo-se, sempre que possível, 8 filhotes por ninhada, em proporções iguais de sexo; os demais filhotes foram submetidos à eutanásia, após análise de malformações externas.

A lactação ocorreu até o DPN21, sendo realizado o desmame e posterior separação dos animais em gaiolas pelo sexo e tratamento.

As medidas de peso corporal foram realizadas aos 2, 7, 14, 21, 28, 35 e 75 dias de vida, anotando-se o peso de um filhote macho e de uma fêmea por ninhada, previamente indentificados com tinta nanquim, na pata posterior direita de cada um desses animais no DPN2.

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

3.4.7.1 Desenvolvimento físico

O desenvolvimento físico foi acompanhado nos mesmos filhotes utilizados para a medida do peso corpóreo. A avaliação de cada animal, iniciada no DPN2, foi feita até a ocorrência de cada um dos seguintes parâmetros :

- desdobramento de orelha: foi observado entre o 2º e o 5º dia da lactação;

- aparecimento de pêlos: foi observado entre o 6° e o 8° dia da lactação, constatado pelo aparecimento de penugem na superfície dorsal de cada filhote;
- erupção dos dentes incisivos: observada pela abertura da boca dos filhotes escolhidos, entre o 6° e o 12° dia da lactação, sendo registrado o dia exato do aparecimento do esmalte dos dentes superiores e também dos inferiores;
- abertura dos olhos: registrado o dia da ocorrência da primeira fresta da abertura dos dois olhos. Esta observação foi realizada entre o 10° e o 15° dia da lactação;
- dia de andar adulto: o filhote foi colocado sobre uma superfície plana (balcão) e observou-se se este se apóia sobre as quatro patas sem encostar o ventre na superfície plana, sendo este considerado o dia de andar adulto. Este parâmetro é observado a partir do 12° da lactação;
- descida dos testículos: foi observado o dia em que os dois testículos desceram para o escroto. Esta observação iniciou-se entre o 18° e o 30° dia de vida dos filhotes;
- abertura vaginal: foi registrado o dia da ocorrência da fresta vaginal. Esta observação foi realizada a partir do 30° dia de vida dos filhotes;
- atividade motora: foi realizada do 15° ao 21° dia da lactação. Cada animal escolhido (1 fêmea e 1 macho/ninhada) foi colocado individualmente no centro do campo aberto, sendo observado por 3 min., sempre durante o mesmo período do dia (manhã). O campo aberto consiste de uma arena de madeira, que para filhotes possui 40 cm de diâmetro, cercada por parede lateral de 27 cm de altura. O chão da arena é dividido em vinte e cinco partes aproximadamente iguais. Entre a observação de um animal e outro, o aparelho foi limpo com solução de álcool a 5% para evitar-se a interferência do odor do animal anterior. Observou-se a frequência de locomoção, de levantar e de *grooming*. Define-se uma unidade de locomoção o ato de o animal penetrar com as quatro patas em uma das divisões do chão da arena; unidade de levantar corresponde à postura de o animal permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima, podendo ou não tocar com as patas dianteiras nas paredes do campo aberto; e o *grooming* é um comportamento de auto-limpeza (frequência que o animal lambe as patas ou os pêlos, fazendo sua higiene). O registro da frequência dos parâmetros foi feito por intermédio de um contador manual.

Os dados foram analisados, tomando-se a ninhada como unidade.

3.4.7.2 Desenvolvimento reflexológico

A avaliação do desenvolvimento reflexológico foi feita com os mesmos filhotes submetidos à avaliação do desenvolvimento físico. Os filhotes foram observados diariamente até que 100% dos filhotes marcados de cada ninhada apresentassem os seguintes reflexos e comportamentos:

- reflexo de preensão palmar: foi avaliado tocando-se o cósimo plantar de um dos membros torácico do filhote com a ponta de um clipe. O critério para a ocorrência do reflexo é caracterizado pela contração dos dedos da pata ao contato físico com o clipe, este é o único reflexo que desaparece ao longo do tempo;

- reflexo de endireitamento: o animal foi colocado em decúbito dorsal, sendo medida a ocorrência ou não da resposta de virar o corpo para a posição de decúbito ventral. O critério para o registro desse reflexo é caracterizado pelo retorno do animal a posição quadrupedal, isto é, apoiado sobre os quatro membros. O período de latência máximo para este teste é de 10 segundos. Este reflexo é observado do 5º ao 10º dia da lactação;

- reflexo de esquiva ao abismo: o filhote foi colocado em uma plataforma, com suas patas dianteiras tocando sua margem. Anota-se o dia em que o filhote tenta afastar-se para longe da margem. Este reflexo foi observado a partir do 5º dia de lactação até o dia da sua aparição;

- reflexo de geotaxia negativa: o filhote foi colocado sobre uma rampa com aproximadamente 45º de inclinação, com a cabeça direcionada para baixo, como mostra a figura 7. Observou-se, então a latência (não superior a 30 segundos), para o animal voltar à posição oposta, ou seja, com a cabeça voltada para cima. Quando o animal não apresentou este reflexo na 1ª tentativa, ele pode ser testado mais 2 vezes com idêntica latência. Este reflexo foi observado a partir do 5º dia de lactação até o dia da sua aparição

Figura 7 - Geoataxia negativa. A: filhote de rato sobre a plataforma com a cabeça voltada para baixo. B: filhote de rato sobre a plataforma com a cabeça voltada para cima

- reflexo de sobressalto: o filhote foi separado dos demais da prole e foi exposto a um estalido curto e seco (estalar dos dedos), conforme proposto . Quando o animal apresentou um tremor generalizado logo após o ruído, indica que o conduto auditivo está aberto. É registrado o dia em que o animal apresenta pela primeira vez este reflexo. Este teste é realizado a partir do 11º dia da lactação.

Para cada parâmetro do desenvolvimento físico e reflexológico foi observado e anotado o dia de aparecimento do critério examinado.

3.4.8 Avaliação comportamental da prole adulta

Para a avaliação comportamental da prole adulta, utilizou-se um macho e uma fêmea de cada ninhada para cada teste, sempre se evitando o uso de um mesmo animal para mais de um procedimento.

3.4.8.1 Atividade geral em campo aberto

Inicialmente, o teste do campo aberto (*open-field*) foi criado para medir respostas comportamentais tais como a atividade motora, a hiperatividade e comportamentos exploratórios (ARCHER, 1973; TREMML *et al.*, 1998). Atualmente, este teste comportamental também é usado para avaliar ansiedade em roedores (LISTER, 1990; BELZUNG, W. E. CRUSIO e R. T. GERLAI, 1999).

O aparelho utilizado no presente estudo consiste de uma arena circular de madeira (diâmetro de 97 cm x 27 cm de altura). O fundo deste aparelho é dividido em vinte e cinco partes aproximadamente iguais por meio de três círculos concêntricos e 16 segmentos de reta, convenientemente distribuídos, como ilustra a figura 8.

Figura 8 - Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual da prole adulta de ratos

Cada rato foi colocado individualmente no centro da arena do campo aberto, sempre no período da manhã. Cada sessão teve duração de 5 min., observando-se simultaneamente os seguintes parâmetros:

- frequência de locomoção: uma unidade de medida corresponde à colocação das quatro patas dentro do espaço delimitado pelas quatro linhas que compõem uma subdivisão do chão da arena;

- frequência de levantar: uma unidade de medida corresponde ao movimento do animal apoiar-se nas patas posteriores, com a cabeça dirigida para cima e com o corpo perpendicular em relação ao chão da arena;

- duração de imobilidade: total de ausência de movimentos, registrou-se a duração em segundos deste parâmetro;

- defecação: ao final dos cinco minutos contou-se o número de bolos fecais.

O registro das frequências dos parâmetros de locomoção e levantar foram feitos por intermédio de contador manual. Para a medida da duração de imobilidade utilizou-se um cronômetro. Entre um animal e outro, o aparelho foi limpo com solução de álcool a 5% para evitar-se a interferência do odor do animal anterior.

3.4.8.2 Comportamento no labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado é um dos modelos mais amplamente usados para detectar atividade ansiolítica de drogas (HOGG, 1996). O teste baseia-se na aversão natural de roedores aos espaços abertos e foi validado tanto em ratos (PELLOW *et al.*, 1985), como em camundongos (STEPHENS *et al.*, 1986; LISTER, 1987).

O labirinto é constituído de uma estrutura de madeira pintada de cor cinza chumbo fosco, em forma de cruz, com dois braços abertos (BA) (50 x 10 cm) e dois braços fechados (BF) (50 x 10 x 40 cm) conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm) e elevado a 55 cm do chão, conforme ilustra à figura 9.

O rato foi colocado, individualmente, no centro do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados e, durante 5 min, observou-se os seguintes parâmetros:

- números de entradas nos braços abertos (EBA);
- tempo de permanência nos braços abertos (TBA);
- número de avaliação de risco: frequência em que o animal apresenta o comportamento de esticar a cabeça para fora dos limites da plataforma dos BA;
- auto-limpeza (*grooming*);
- número de levantar;

- frequência de locomoção: número de entradas nos BA + número de entradas nos BF.

Com os dados obtidos, calculou-se a porcentagem de entradas e do tempo despendido nos braços abertos e fechados, conforme mostrado a seguir:

$$\% \text{ EBA} = \frac{\text{EBA} \times 100}{\text{EBA} + \text{EBF}}$$

$$\% \text{ TBA} = \frac{\text{TBA} \times 100}{\text{TBA} + \text{TBF}}$$

Figura 9 - Labirinto em cruz elevado

O registro de entradas nos braços abertos e fechados foi feito por intermédio de contador manual. Cronometrou-se (em segundos) o tempo de permanência nos braços do labirinto. Entre as observações de cada animal, o labirinto foi limpo com solução de álcool 5%.

3.4.8.3 Interação social

O teste de interação social explora o efeito que ambientes desconhecidos e intensamente iluminados exercem sobre o comportamento dos animais expostos (FILE e PELOW, 1985). Este modelo assume o fato de que ratos em situações de

ansiedade, não interagem com outro animal da mesma espécie (FILE e PELOW, 1985; FILE, ZANGROSSI JR e ANDREWS, 1993).

A avaliação da interação social é realizada através da observação direta de duplas de ratos em uma arena (semelhante àquela utilizada para o teste de campo aberto, porém em ambiente mais iluminado), medindo o tempo em que dois ratos, não familiares, interagem entre si. Para tal procedimento, dois dias antes deste teste, cada animal foi colocado na arena por 10 minutos. No dia seguinte, o rato foi colocado novamente na arena, porém desta vez com seu par (cujo peso não diferiu de 10 gramas), também por um período de 10 minutos, para habituação com seu respectivo parceiro. Após 24 horas do treinamento foi realizado o teste propriamente dito, que consiste em introduzir os pares no campo aberto ao mesmo tempo e medir sua interação por 10 minutos (figura 10).

Figura 10 - Arena de campo aberto com ratos submetidos a avaliação da interação social

O tempo de interação social foi medido como a somatória do tempo, em segundos, de cheirar, passar por cima ou subir no parceiro, coçar o parceiro, seguir e caminhar em volta do parceiro.

As observações foram realizadas sempre no mesmo período do dia (pela manhã). Após cada sessão a arena foi limpa com uma solução de álcool 5%, para a introdução de novos pares.

Os parâmetros observados na avaliação da interação social foram analisados com auxílio do programa de análises comportamentais Etholog 2.2 (OTTONI, 2000).

3.4.8.4 Natação forçada

O teste da natação forçada, desenvolvido na década de 70 (PORSOLT, LE PICHON e JALFRE, 1977) tem sido o modelo mais empregado para avaliação pré-clínica de atividade antidepressiva de diferentes drogas, devido a sua fácil utilização, grande reprodutibilidade entre os laboratórios e habilidade de detectar um grande espectro de drogas antidepressivas (CRYAN, MARKOU e LUCKI, 2002).

O teste foi feito através da colocação do rato no interior de um recipiente para natação (vaso cilíndrico de vidro, medindo 25 cm de diâmetro por 60 cm de altura, com coluna de 30 cm de água a temperatura média de 25°C), sendo aí mantido por 15 minutos (sessão de treinamento). Após este período de tempo, o animal foi retirado, seco e aquecido (mantido em gaiola, sob luz incandescente) por 10 minutos. No dia seguinte após a sessão de treinamento, o animal foi recolocado no recipiente para natação por 5 minutos (sessão de teste), avaliando-se, por meio de cronômetro:

- a latência para iniciar a imobilidade;
- o tempo total de imobilidade;
- o tempo de escalada;
- o tempo de nado (figura 11).

Figura 11 - Parâmetros observados no teste da natação forçada: imobilidade, natação e escalada (CRYAN, MARKOU E LUCKI, 2002)

3.4.8.5 Avaliação da catatonia induzida por haloperidol

A catatonia ou catalepsia em animais de laboratório é definida como uma dificuldade para corrigir uma postura externamente imposta, como por exemplo, ratos apoiados apenas sobre o trem posterior com as patas anteriores apoiadas em uma barra de vidro horizontal (SANBERG *et al.*, 1988). Para tal avaliação usou-se o haloperidol, uma droga antipsicótica que atua através do bloqueio de receptores dopaminérgicos da via nigroestriatal, levando há aumento dos efeitos extrapiramidais. Dessa forma, esse modelo animal pode ser usado para avaliar a integridade do sistema dopaminérgico nigroestriatal.

No presente estudo foi empregado o modelo de catatonia com adaptações (CARLINI, 1973). Assim, retirou-se o rato da gaiola moradia e injetou-se por via intraperitoneal 1 mg/kg de haloperidol (Janssen – Farmacêutica®), recolocou-se o animal na gaiola e aguardou-se 10 minutos. Passado o tempo de 10 minutos, os ratos foram testados individualmente, colocando-os em pé com os membros torácicos apoiados em um bastão de vidro posicionado na barra horizontal a 11 cm da bancada (figura 12). Considerou-se positivo para o teste de catatonia o animal que permanecesse na mesma posição por tempo igual ou superior a 30 segundos. Se

por ventura, o animal saísse da posição antes dos 30 segundos, o procedimento poderia ser repetido por mais duas vezes, antes de uma nova sessão. Caso o animal não respondesse uma terceira e última tentativa o mesmo era considerado negativo para a catatonia naquela sessão.

Foram feitas doze sessões de observações de catatonia, respectivamente aos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 minutos após a administração do haloperidol. Cronômetros foram utilizados neste teste.

Figura 12 - Aparato utilizado para a avaliação da catatonia induzida por 1 mg/Kg de haloperidol, por via intraperitoneal. A: um bastão de vidro suspenso a 11 cm da bancada. B: rato em catatonia

3.4.8.6 Comportamento estereotipado induzido por apomorfina

Apomorfina (APO) é um agonista dopaminérgico, utilizada para estudos do comportamento associado ao sistema dopaminérgico (DAVIES, JACKSON e REDFERN, 1974; ICHIHARA, NABESHIMA e KAMEYAMA, 1988; ESTRELLA, BREGONZIO e CABRERA, 2002), e esse sistema, por sua vez, tem sido associado com algumas psicopatologias, entre elas a esquizofrenia, e com a Doença de Parkinson (GOLDMAN *et al.*, 1998). Assim, o comportamento estereotipado induzido pela apomorfina pode se usado para avaliar a integridade do sistema dopaminérgico.

Para a avaliação do comportamento estereotipado (CE) os ratos foram acondicionados individualmente em gaiolas de metal (30 x 15 x 19 cm) (figura 13), com livre acesso a água e comida durante 6 horas, para a habituação do animal à gaiola. Uma hora antes do início do experimento, para evitar possíveis interferências nas observações, o bebedouro e a ração foram retirados. O CE foi então induzido pela administração de 0,6 mg/kg de apomorfina (Sigma®), por via subcutânea, sendo o comportamento quantificado por uma escala de escores (SETLER, SARAU e MCKENZIE, 1976) – tabela 2.

A avaliação do CE foi feita a intervalos de 10 minutos na primeira hora após a administração de apomorfina e, posteriormente, aos 90 e 120 minutos.

Figura 13 - Gaiola de arame empregada para avaliação do comportamento estereotipado em ratos.

Tabela 2 - Escala de escores para avaliação do comportamento estereotipado induzido por apomorfina, proposta por Setler et al. (1976)

Escore	Comportamento
0	Adormecido ou parado
1	Ativo
2	Predominantemente ativo, mas com curtos períodos de farejar, levantar-se estereotipado
3	Atividade estereotipada constante, tal como farejar, levantar-se ou balançar a cabeça, mas com atividade locomotora ainda presente
4	Atividade estereotipada constante realizada em um só local
5	Atividade estereotipada constante, mas com curtos períodos de lambrar e/ou morder
6	Lambrar e/ou roer as barras da gaiola

3.4.9 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos

Para a coleta de sangue, através de punção cardíaca, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (5 e 50 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular). Utilizou-se anticoagulante EDTA para a avaliação do hemograma completo. O hemograma foi realizado por meio de um sistema automatizado ABX VET®, HORIBA. As extensões sangüíneas foram coradas pelo método May Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) e analisadas ao microscópio óptico para a contagem diferencial de leucócitos circulantes.

Para a realização da análise bioquímica, coletou-se amostras de sangue, sem anticoagulante, que foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos para retração do coágulo e, em seguida, estas foram submetidas à centrifugação (4000 rpm, 10 minutos) para a coleta do soro, o qual foi acondicionado em *ependorfs* de 2 mL e imediatamente congelados a -80°C, para então serem submetidos às diferentes avaliações bioquímicas.

As determinações dos níveis séricos de ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), GGT (gama-glutamilttransferase), uréia e creatinina

foram realizados por meio da utilização de *kit* comercial da marca Bioclin em equipamento da CELM – SBA 200, obedecendo as instruções do fabricante.

3.4.10 Estudo anatomopatológico

Os animais que não receberam nenhuma droga (haloperidol ou apomorfina) para a indução de comportamento foram submetidos à eutanásia para a avaliação dos níveis de neurotransmissores (ver item 3.3.11) e estudo dos achados anatomopatológicos.

Após a abertura e inspeção das cavidades torácica e abdominal, os seguintes órgãos foram retirados e pesados: fígado, pulmões, rins e baço. Os pesos relativos desses órgãos foram obtidos, conforme descrito no item 3.3.6.

Para o estudo histológico utilizou-se o fígado (por ser o órgão alvo dos APs), que foi fixado em formol 10% tamponado, processado seguindo as técnicas de rotina para coloração por hematoxilina e eosina.

3.4.11 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos

Para essa avaliação foram coletadas quatro estruturas do encéfalo: hipotálamo, córtex pré-frontal, hipocampo e estriato, sendo então preparadas e posteriormente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (FELICIO *et al.*, 1996) .

3.4.11.1 Colheita das estruturas cerebrais e preparo das amostras

Os animais foram decapitados em guilhotina e o encéfalo foi rapidamente retirado, colocado sobre uma placa de gelo, com a finalidade de obtenção de um micro-ambiente o mais frio possível, para então realizar a retirada das estruturas. Estas foram acondicionadas *em eppendorfs* e rapidamente colocadas em gelo seco, para um rápido congelamento, sendo a seguir pesadas e estocadas, por até 20 dias, em freezer -80°. O procedimento de colheita das estruturas nunca ultrapassou o tempo de 3 minutos por animal.

As estruturas encefálicas congeladas foram homogeneizadas, com o auxílio de uma caneta sonicadora de alta frequência, com solução gelada de ácido

perclórico (ClHO_4) 0,1 M (Merck®) contendo 0,02% de metabissulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA (ácido 3,4-dihidroxibenzilamina – padrão interno para a avaliação dos neurotransmissores), sendo o volume de 15 vezes o peso para o córtex pré-frontal, o hipotálamo e o hipocampo, e de 20 vezes para o estriato.

Após a homogeneização, para melhor precipitação das proteínas e ácidos nucleicos, deixou-se os homogenatos *overnight* em refrigerador (10°C). Na manhã seguinte, o material foi centrifugado a 10.000 rpm (centrífuga Harrier 18/80 MSE da Sanyo® - refrigerada a 4°C), por um período de 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta automática e armazenado em *eppendorfs*, sendo estocado em freezer -80°C para a realização da quantificação através de técnicas empregando cromatografia líquida.

3.4.11.2 Aparelho

Para as avaliações neuroquímicas foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica. O aparelho é constituído por uma bomba de solvente, sistema injetor e um forno de coluna para manutenção da temperatura. O detector eletroquímico empregado é composto por um registrador de dois canais e um integrador de sinal (modelo Chromatopac), todos da marca SHIMADZU®. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de octadecilsilano (C-18) (SHIMADZU®), medindo 150 x 4,6 mm, com 5 μm de tamanho de partícula, acoplada a uma pré-coluna e filtro de linha. O detector eletroquímico foi mantido com potencial de +0,83 V no eletrodo do trabalho, enquanto o forno foi mantido a uma temperatura constante de 45°C .

3.4.11.3 Preparo das soluções

A fase móvel utilizada foi preparada adicionando-se em 1 litro de H_2O Mili-Q: 4,20 g de ácido cítrico, 7,16 g de fosfato de sódio dibásico (NaH_2PO_4), 556,0 mg de ácido heptanossulfônico (HSA), 40,0 mg de EDTA e 80,0 mL de metanol grau HPLC. O pH desta solução foi ajustado para 3,0 com auxílio de ácido ortofosfórico (H_3PO_4).

Posteriormente, a fase móvel foi filtrada em um sistema a vácuo e deareado por 30 minutos com um fluxo de hélio antes de ser incorporada no sistema

cromatográfico, onde permaneceu circulando por uma noite (*overnight*), com fluxo constante de 1,2 mL/min.

As soluções-padrão foram preparadas utilizando-se 1 nM de cada um dos seguintes padrões: ácido 3,4 dihidroxibenzilamina (DHBA), cloridrato de dopamina (DA), ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC – metabólito da DA), ácido homovanílico (HVA – metabólito da DA), cloridrato de serotonina (5HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA – metabólito da 5HT) e noradrenalina (NOR), todos da Sigma®. Estes foram diluídos em uma solução de ácido clorídrico 0,1 M e 0,02% de metabissulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) em água, distribuídos em tubos de *ependorf* (1,5 mL) e, em seguida, estocados em freezer -80°C até o momento da análise. Para o desenvolvimento da curva de calibração os padrões foram diluídos 5.000, 10.000 e 20.000 vezes em ácido perclórico 0,1 M filtrados, para então serem injetados no cromatógrafo. Os neurotransmissores e seus metabólitos foram reconhecidos a partir do seu tempo de retenção na coluna cromatográfica (figura 14), comparando-as com os padrões, enquanto a determinação da concentração dos mesmos foi realizada utilizando-se o valor da área do pico na equação otida para a curva de calibração. O limite de detecção foi de 0,2 ng para DA, DOPAC, HVA, 5HT, 5HIAA e NOR.

Figura 14 - Cromatograma obtido na análise de uma solução contendo padrões e seus respectivos tempo de retenção em minutos: NOR (2,681), DOPAC (4,348), DA (5,643), 5HIAA (7,007), HVA (10,402) e 5HT (12,840).

3.5 Delineamento experimental

3.5.1 Experimento 1: Avaliação de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* durante a prenhez (DG6 ao DG20)

Após diagnóstico de prenhez (item 3.4.2), as fêmeas foram separadas em cinco grupos: um grupo controle (n=10) que receberam água filtrada, via gavagem; três grupos experimentais que receberam, pela mesma via, oral, diferentes doses (3, 6 e 9 mg/kg) do RB de *Senecio brasiliensis* (n=10 por grupo); e um grupo *pair feeding* (n=9). A gavagem foi feita do 6° ao 20° dia de gestação. Durante a gestação foram avaliados o peso materno e o consumo de água e de ração, conforme descrito no item 3.4.3. Após o nascimento realizou-se a avaliação dos parâmetros reprodutivos, conforme (item 3.4.4).

No DPN5 e DPN6 as ratas foram avaliadas quanto ao comportamento materno e materno-agressivo, conforme descrito no item 3.4.5.

Após o desmame (DPN21) as ratas foram submetidas à eutanásia para avaliação anatomopatológica, conforme descrito no item 3.4.6.

3.5.2 Experimento 2: Efeitos da exposição ao *Senecio brasiliensis* durante a prenhez (DG6 ao DG20) no desenvolvimento físico e reflexológico da prole de ratas

Foram utilizadas as proles das ratas dos grupos controle, experimental e *pair feeding*, sendo um macho e uma fêmea de cada ninhada. Nesses animais avaliou-se o peso corpóreo (item 3.4.7), o desenvolvimento físico (item 3.4.7.1) e o reflexológico (item 3.4.7.2).

3.5.3 Experimento 3: Efeitos da exposição ao *Senecio brasiliensis* durante a prenhez (DG6 ao DG20) na prole adulta

As proles provenientes de animais dos grupos controle e experimentais, quando adultas (75 – 110 dias de idade), foram submetidas aos diferentes testes comportamentais, conforme descrito no item 3.4.8. A tabela 3 mostra o número de

animais empregados por grupo (n), a idade (DPN) e o período do dia em que foi realizado o teste, bem como a duração de cada um deles.

Tabela 3 - Testes comportamentais realizados nas proles provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação

Teste Comportamental	n ♂/♀	DPN	Período do dia (h)	Duração do teste (min)
Campo aberto	10/10	75	8:00 - 12:00	5
Labirinto em cruz elevado	10/10	75	8:00 - 12:00	5
Interação social	06 pares	85	8:00 - 12:00	10
Natação forçada	7/7	90	13:00 - 16:00	5
Catatonía	8/9	100	13:00 - 16:00	120
Estereotípia	9/9	105 - 110	13:00 - 16:00	120

n = número de animais empregado por teste e sexo; DPN = dia pós-natal

Entre os DPN110 e DPN120 os animais que não foram empregados em nenhum teste comportamental foram submetidos à eutanásia para colheita de sangue e posterior análise hematológica (item 3.4.9) e análise bioquímica (item 3.4.9.), bem como para o estudo anatomopatológico (item 3.4.10) e avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos (3.4.11).

3.6 Análise Estatística

Empregou-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) para a realização das análises estatísticas. Para verificar a homocedasticidade dos dados utilizou-se o teste de Bartlett. Para dados paramétricos foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via ou, quando existiam dois fatores (tempo e tratamento) para serem avaliados, empregou-se a ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de

Bonferroni. Para análise não paramétrica foi utilizado Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de Dunns.

Em todas as análises efetuadas, as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Avaliação de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* durante a prenhez (DG6 ao DG20)

4.1.1 Avaliação do consumo de água e de ração, bem como do ganho de peso gestacional

A tabela 4 mostra a ingestão hídrica (em mL) de ratas expostas, via gavagem, a diferentes doses de *S. brasiliensis* do 6° ao 20° dia de gestação. A ANOVA de duas vias mostrou que houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3/108) = 7,07$, $p < 0,0002$) e aos dias de observação ($F(2/108) = 110,8$, $p < 0,0001$), não havendo interação entre os fatores ($F(6/108) = 1,53$, $p = 0,0176$). O teste de Bonferroni mostrou redução significativa do consumo de água dos animais do grupo 3 mg/kg ($p < 0,01$) e também dos animais do grupo 6 mg/kg ($p < 0,001$) na segunda semana gestacional (intervalo entre os dias 7-14), em relação aos animais do grupo controle.

Tabela 4 - Ingestão hídrica (em mL) de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, via gavagem, do 6° ao 20° dia de gestação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; n = número de ratas por grupo.

Dias	Controle	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
	(n= 10)	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
0 – 7	234,6 ± 9,55	225,7 ± 7,0	222,6 ± 12,8	237,3 ± 9,9
7 – 14	343,4 ± 11,9	292,9 ± 9,1**	278,8 ± 15***	319,1 ± 10
14 – 21	343,4 ± 8,1	344,3 ± 11,6	331 ± 9,7	344,9 ± 8,9

ANOVA seguida do teste de Dunnett: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A tabela 5 mostra o consumo semanal de ração (em g) de ratas expostas, via gavagem, a diferentes doses de *S. brasiliensis* do 6° ao 20° dia de gestação. A análise de variância ANOVA de duas vias mostrou que houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3/108) = 11,84$, $p < 0,0001$) e aos dias de observação ($F(2/108) = 8,36$, $p = 0,0004$), havendo interação entre os fatores $F(6/108) = 2,23$, $p = 0,004$). O teste Bonferroni mostrou diminuição estatisticamente significativa do consumo de ração na segunda semana

de gestação (intervalo entre os dias 7-14) no grupo de 9 mg/kg ($p<0,01$) e na última semana de gestação nos três grupos experimentais ($p<0,001$), em relação aos animais do grupo controle.

Tabela 5 - Consumo de ração (em g) de ratas expostas ou não (controle) *Senecio brasiliensis*, via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = número de ratas por grupo.

Dias	Controle (n= 10)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
		3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
0 – 7	153,5 ± 5,5	141,3 ± 5,0	137,4 ± 14,8	141,2 ± 6,0
7 - 14	179,4 ± 6,2	165,4 ± 7,9	165,9 ± 9,8	141,1 ± 5,8**
14 - 21	197,9 ± 4,4	155,2 ± 3,6***	150,6 ± 8,9***	135 ± 6,8***

ANOVA seguida do teste de Dunnett: ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$

A tabela 6 mostra o ganho de peso (em g) semanal de ratas expostas via gavagem, a diferentes doses ao *S. brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. A ANOVA de duas vias apontou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(4/132) = 7,93$, $p<0,0007$) e aos dias de observação ($F(2/132) = 221,49$, $p<0,0001$), havendo interação entre os fatores ($F(8/132) = 3,68$ $p<0,0001$). O teste Bonferroni mostrou redução significativa no ganho de peso gestacional na primeira semana (dias 0 a 7) e na última semana de gestação (dias 14 a 21) das ratas do grupo *pair feeding* ($p<0,01$) em relação aos animais do grupo controle; ainda na última semana gestacional observou-se redução do ganho de peso dos animais dos grupos experimentais, isto é, das ratas do grupo de 3 mg/kg ($p<0,01$), 6 mg/kg ($p<0,001$) e 9 mg/kg ($p<0,001$), em relação aos animais do grupo controle.

Tabela 6 - Ganho de peso gestacional (em g) de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo *pair feeding* recebeu durante a gestação a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão, n = número de ratas por grupo.

Dias	Controle (n= 10)	Pair Feeding (n=9)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
			3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
0-7	22,8 ± 2,5	8,9 ± 4,6**	21 ± 2,3	21,9 ± 2,9	18,9 ± 1,3
07-14	20,4 ± 1,8	17,3 ± 2,25	20,1 ± 1,4	12 ± 2,0	14,9 ± 1,9
14-21	68,6 ± 4,4	53 ± 3,26**	53,4 ± 4,1**	50,1 ± 3,3***	41 ± 5,1***

ANOVA seguida do teste de Dunnett: **p<0,01 e ***p<0,001.

4.1.2 Avaliação do desempenho reprodutivo das ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* durante a prenhez (DG6 ao DG20)

Quanto a avaliação do desempenho reprodutivo (tabela 7), a análise de variância ANOVA de uma via não apontou diferenças significantes entre os grupos nos diferentes parâmetros analisados, exceto no peso total da ninhada ($F(4/44) = 7,413$, $p < 0,0001$). O teste de Dunnett apontou redução significativa do peso das ninhadas provenientes de ratas do grupo de 6 mg/kg ($p < 0,001$) e 9 mg/kg ($p < 0,01$) *versus* animais do grupo controle. Em relação ao canibalismo após o nascimento a Análise de Variância não paramétrica de Kruskal-Wallis apontou diferenças significantes entre os grupos ($KW(4/15,28)$, $p < 0,0042$). O teste de Dunn's apontou aumento na % de canibalismo em ratas que receberam a dose de 9 m/kg.

É importante salientar que as ratas dos grupos 6 e 9 mg/kg apresentaram piloereção a partir da segunda semana de tratamento.

Tabela 7 - Parâmetros reprodutivos e canibalismo (em %) de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo *pair feeding* recebeu durante a gestação a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão, n = número de ratas por grupo.

Dados Reprodutivos	Controle (n= 10)	Pair-feeding (n = 9)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
			3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
Nº total de filhotes ^a	10,9 ± 0,4	10,6 ± 0,47	10,1 ± 0,84	8,8 ± 0,9	8,9 ± 1,04
Peso ninhada (g) ^a	87,1 ± 2,1	85,6 ± 5,27	73 ± 6,1	58 ± 5,7 ***	58,7 ± 5,0 **
Morte perinatal (%) ^b	0	22	10	20	10
Nº filhotes macho ^a	4,6 ± 0,4	6,6 ± 0,57	5,1 ± 0,5	4,1 ± 0,65	4,4 ± 0,56
Nº filhotes fêmeas ^a	5,8 ± 0,54	3,7 ± 0,22	4,9 ± 0,76	4,6 ± 0,5	4,4 ± 0,81
Tempo de gestação ^a	22 ± 0,0	22 ± 0,11	21,8 ± 0,13	22 ± 0,0	21,8 ± 0,13
Canibalismo (%) ^b	0	0	0	10	50**

^aANOVA seguida do teste de Dunnett: **p<0,01 e ***p<0,001

^bANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis: **p<0,01.

4.1.3 Avaliação do comportamento materno e materno agressivo das ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* durante a prenhez (DG6 ao DG20)

A figura 15 mostra os escores para o tempo de recuperação dos filhotes de ratas expostas ao *S. brasiliensis* durante a gestação. Análise de Variância não paramétrica de Kruskal-Wallis mostrou diferenças significantes entre os grupos na recuperação do 1º filhote (KW(4/13,96), p<0,003); 2º(KW(4/18,12) p<0,0004); 3º (KW(4/14,37), p<0,0024) e 4º filhote (KW(4/18,12), p<0,0004) e o teste de Dunn's mostrou aumento dos escores do grupo 9 mg/kg na recuperação do 1º filhote (p<0,01), 2º filhote (p<0,001), 3º filhote (p<0,01) e 4º filhote (p<0,001), quando comparado aos escores do grupo controle. Vale à pena citar que, durante o teste comportamental, as ratas do grupo controle recuperavam seus filhotes imediatamente, para depois explorar a caixa, sendo que, com as ratas do grupo de 9 mg/kg acontecia exatamente o oposto, ou seja, o interesse pela exploração da caixa moradia era maior do que pela recuperação dos filhotes.

Com relação à latência para o início da amamentação a análise estatística não apontou diferenças significantes. No entanto, quando se avaliou o número de filhotes que estavam junto à mãe no início da 1ª amamentação a ANOVA apontou redução significativa deste parâmetro ($F(3/28) = 16,29$, $p < 0,0001$) entre os grupos. O teste de Dunnett mostrou redução significativa no número dos filhotes presentes no início da amamentação em ratas pertencentes ao grupo de 9 mg/kg ($p < 0,001$) *versus* grupo controle (figura 16).

Em relação ao tempo para o agrupamento de todos os filhotes a análise estatística não apontou diferenças significantes entre os grupos (figura 16). Porém, quando se avaliou o CMT a Análise de Variância não paramétrica de Kruskal-Wallis mostrou diferenças significantes entre os grupos ($KW(4/13,29)$, $p < 0,0041$). O teste de Dunn's apontou redução significativa deste comportamento em ratas expostas a dose de 9 mg/kg ($p < 0,01$) *versus* grupo controle (figura 16).

Figura 15 - Comportamento materno: escores para o tempo de recuperação de filhotes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 8 animais por grupo. Análise não paramétrica (Kruskal-Wallis) seguida pelo teste de Dunn's: **p<0,01 e ***p<0,001.

Figura 16 - Comportamento materno: escore do tempo para agrupamento dos 8 filhotes, escore do tempo e número de filhotes presentes no início da primeira amamentação, e escore da presença de comportamento materno total (CMT) de ratas expostas ou não (controle) a ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 8 animais por grupo. Análise de Variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) e paramétrica seguida pelo teste de Dunn's: **p<0,01 e Dunnett: **p<0,001.

Para a avaliação do comportamento agressivo materno as ratas primeiramente passaram pelo teste de campo aberto durante 3 minutos para a verificação da atividade motora. A ANOVA de uma via aplicada parâmetros avaliados no campo aberto não mostrou diferenças significantes entre os grupos (tabela 8).

Quanto aos parâmetros do comportamento materno agressivo (tabela 9), não foram observadas diferenças significantes entre os grupos para latência da 1ª luta, número de vezes (frequência) e tempo (em seg) no qual o animal intruso cheirou os filhotes, no interesse da rata sobre o intruso, na frequência (número de vezes) do boxe, tanto pélvico quanto torácico. No entanto a ANOVA mostrou diferenças significantes com relação ao número ($F(3/36) = 8,605$, $p < 0,0002$) e ao tempo de lutas ($F(3/36) = 8,199$, $p < 0,0003$). O teste de Dunnett apontou diminuição no número total de lutas em ratas dos grupos de 6 mg/kg ($p < 0,05$) e 9 mg/kg ($p < 0,001$) e também redução no tempo de luta ($p < 0,001$) em ratas do grupo experimental da maior dose *versus* o grupo controle (tabela 9).

A análise de variância ANOVA mostrou diferenças significantes quando se avaliou o número de vezes (frequência) ($F(3/34) = 4,1019$, $p < 0,01$) e o tempo (seg) ($F(3/36) = 4,84$, $p < 0,006$) em que a mãe permaneceu com os filhotes. O teste de Dunnett apontou redução significativa no número de vezes que a mãe esteve com os filhotes em ratas do grupo de 6 mg/kg ($p < 0,01$) e 9 mg/kg ($p < 0,05$) e também redução no tempo em que a mãe permaneceu com os filhotes em ratas do grupo de 6 mg/kg ($p < 0,01$) *versus* animais do grupo controle (tabela 9).

A análise de variância ANOVA mostrou diferenças significantes no tempo de perseguição da rata ao animal intruso ($F(3/35) = 7,112$, $p < 0,0007$). O teste de Dunnett mostrou aumento significativo no tempo de perseguição ao animal intruso em ratas expostas ao grupo de 9 mg/kg ($p < 0,01$) *versus* animais do grupo controle (tabela 9).

A análise de variância ANOVA mostrou diferenças significantes quando se avaliou o número de vezes (frequência) ($F(3/36) = 2,45$, $p < 0,07$) e o tempo (seg) ($F(3/36) = 3,407$ $p < 0,002$) em que o intruso perseguiu a rata. O teste de Dunnett mostrou aumento significativo na frequência de perseguição ($p < 0,05$) e também no tempo de perseguição ($p < 0,01$) em ratas do grupo de 9 mg/kg *versus* animais do grupo controle (tabela 9).

Tabela 8 - Parâmetros da atividade geral observada em campo aberto, no 6º dia pós-parto, de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = número de ratas por grupo.

Parâmetros	Controle	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
	(n= 10)	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
Locomoção	78,6 ± 6,2	74,2 ± 5,7	80,4 ± 5,6	73,8 ± 3,0
Levantar	15,3 ± 2,22	12,5 ± 1,7	15,8 ± 1,7	11,2 ± 0,84
Grooming	1,0 ± 0,30	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,4
Imobilidade (seg)	4,1 ± 1,5	3,1 ± 1,4	7,9 ± 1,6	1,3 ± 0,9
Nº bolos fecais	3,9 ± 0,8	1,7 ± 0,6	2,6 ± 0,8	1,9 ± 0,5

ANOVA $p > 0,05$.

Tabela 9 - Parâmetros do comportamento agressivo materno de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = número de ratas por grupo.

Parâmetros Comportamento Agressivo Materno	Controle (n= 10)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
		3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
Latência para a 1ª luta (seg)	230,4 ± 29,8	255,9 ± 65,6	294,7 ± 63,9	404,2 ± 65,8
Número total de lutas	4,7 ± 0,94	4,2 ± 0,91	1,5 ± 0,30*	0,6 ± 0,22***
Tempo total de luta (seg)	4,13 ± 0,83	4,21 ± 0,99	1,41 ± 0,32	0,41±0,15***
Frequência do intruso com os filhotes	3,0 ± 0,55	4,44 ± 1,09	3,1 ± 1,2	4,6 ± 1,2
Tempo do intruso com os filhotes (seg)	10,1 ± 2,0	8,74 ± 1,7	12,1 ± 4,6	17,8 ± 6,0
Frequência da mãe com os filhotes	8,9 ± 1,7	5,9 ± 1,6	2,7 ± 0,84**	3,55 ± 1,0*
Tempo da mãe com os filhotes (seg)	112,8 ± 31,2	41,6 ± 12,4	10,3 ± 3,8**	40,3 ± 14,0
Vezeas que a fêmea perseguiu o intruso	13,6 ± 2,5	14,8 ± 3,7	13,9 ± 2,7	21,2 ± 2,3
Tempo que a fêmea perseguiu o intruso (seg)	43,9 ± 7,5	42,7 ± 7,6	54,5 ± 8,4	90 ± 9,5**
Vezeas que o intruso perseguiu a fêmea	2,55 ± 0,65	5,1 ± 1,2	5,4 ± 2,0	7,9 ± 1,3*
Tempo que o intruso perseguiu a fêmea (seg)	4,8 ± 1,3	10,7 ± 13,3	14 ± 5,3	23,9 ± 5,8**
Número de boxe torácico	1,7 ± 0,5	4,3 ± 1,25	1,9 ± 0,64	0,55 ± 0,24
Número de boxe pélvico	1,9 ± 0,54	2,1 ± 0,35	1,1 ± 0,5	0,9 ± 0,4

ANOVA seguida do teste de Dunnett: *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001

4.1.4 Estudo automopatológico das ratas

A tabela 10 mostra os pesos relativos de órgãos (peso do órgão/peso corpóreo x 100) de ratas expostas via gavagem, ao *Senecio brasiliensis* (DG6 ao DG20). Vale salientar que somente oito ratas do grupo de 9 mg/kg foram avaliadas, pois duas delas vieram a óbito antes da necropsia; esses animais encontravam-se bastante debilitados, apáticos e magros.

A análise de variância ANOVA apontou diferenças significantes quando se analisou o peso relativo dos pulmões ($F(3/34) = 8,043$, $p < 0,0003$) e do rim esquerdo ($F(3/35) = 6,285$, $P < 0,001$). O teste de Bonferroni mostrou aumento significativo ($p < 0,05$) do peso relativo do rim esquerdo, em ratas do grupo de 9 mg/kg, em relação ao grupo controle; no que diz respeito aos pulmões, o teste de Dunnett apontou aumento significativo do peso relativo em ratas do grupo de 3 mg/kg ($p < 0,05$), 6 mg/kg ($p < 0,01$) e 9 mg/kg ($p < 0,001$) *versus* animais do grupo controle.

Com relação à análise histológica do fígado, não foram observadas alterações morfológicas como megalocitose, necrose ou apoptose nas ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* durante o período perinatal. Porém, a análise de variância ANOVA apontou diferenças significantes no número de células multinucleadas nos hepatócitos ($F(3/16) = 6,522$, $p < 0,004$) entre os grupos. O teste de Dunnett mostrou aumento de células multinucleadas em ratas que receberam as doses de 6 mg/kg ($p < 0,01$) e 9 mg/kg ($p < 0,05$) *versus* animais do grupo controle (figura 17).

Tabela 10 - Peso relativo dos órgãos (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = número de ratas por grupo.

Órgãos	Controle (n= 10)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
		3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=8)
Fígado	4,88 ± 0,15	5,15 ± 0,2	5,9 ± 0,14	4,64 ± 0,12
Baço	0,25± 0,01	0,27 ± 0,1	0,29 ± 0,01	0,31 ± 0,02
Rim direito	0,40 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,40 ± 0,008	0,43 ± 0,01
Rim esquerdo	0,38 ± 0,008	0,35 ± 0,01	0,39 ± 0,009	0,43 ± 0,01*
Adrenal direita	0,0157 ± 0,001	0,0152 ± 0,0004	0,0152 ± 0,001	0,0132 ± 0,0009
Adrenal esquerda	0,0165 ± 0,0008	0,01678 ± 0,0005	0,0166 ± 0,001	0,01563 ± 0,001
Pulmões	0,56 ± 0,02	0,85 ± 0,06*	0,91 ± 0,07**	1,15 ± 0,15***

ANOVA seguida do teste de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001

Figura 17 - Número de células multinucleadas de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* via gavagem, do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 5 ratas por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Dunnett: *p<0,05, **p<0,01.

4.2 Experimento 2: Efeitos da exposição ao *Senecio brasiliensis* durante a prenhez (DG6 ao DG20) no desenvolvimento físico e reflexológico da prole de ratas

A tabela 11 mostra os valores de peso de filhotes machos e fêmeas advindos de ratas expostas ao *S. brasiliensis* durante o período de gestação. A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados de peso dos filhotes machos apontou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(4/308) = 38,85$, $p < 0,0001$) e aos dias de observação ($F(6/308) = 6313,6$, $p < 0,0001$), havendo interação entre os fatores ($F(24/308) = 3,95$, $p < 0,0001$). O teste de Bonferroni mostrou diminuição significativa no 21º ($p < 0,05$), 28º ($p < 0,001$), 35º ($p < 0,001$) e 75º ($p < 0,001$) dia de vida, no peso dos filhotes machos provenientes do grupo de 9 mg/kg, em relação ao peso dos filhotes do grupo controle (figura 18).

Com relação ao peso da prole feminina, a ANOVA de duas vias, mostrou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(4/306) = 53,5$, $p < 0,0001$) e aos dias de observação ($F(6/306) = 5765,7$, $p < 0,0001$), havendo interação entre os fatores ($F(24/306) = 3,09$, $p < 0,001$). O teste de Bonferroni mostrou redução no peso da prole feminina proveniente do grupo de 9 mg/kg, no 14º dia ($p < 0,05$), 21º dia ($p < 0,001$) e também nos dias 28º, 35º e 75º dia de vida ($p < 0,001$), em relação ao peso dos filhotes do grupo controle (figura 18).

Tabela 11 - Peso (em g) dos filhotes machos e fêmeas, em diferentes dias de vida, provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo *pair feeding* recebeu durante a gestação, a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 9 e 10 animais de cada gênero por grupo.

Dias de vida		Controle (n=10)	Pair-feeding (n=9)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
				3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
2	♂	8,28 ± 0,20	8,5 ± 0,22	7,41 ± 0,2	7,04 ± 0,5	6,4 ± 0,4
	♀	8,05 ± 0,26	7,9 ± 0,20	7,21 ± 0,18	6,7 ± 0,31	5,9 ± 0,22
7	♂	16,6 ± 0,33	17,2 ± 0,53	14,8 ± 0,47	14,4 ± 0,9	11,7 ± 0,67
	♀	16,1 ± 0,35	16,1 ± 0,50	14,4 ± 0,47	13,8 ± 0,71	11,1 ± 0,62
14	♂	31 ± 0,41	32,7 ± 0,73	27,6 ± 0,96	29,6 ± 2,1	21,6 ± 0,95
	♀	30,3 ± 0,45	31,6 ± 0,83	27,9 ± 1,02	28,26 ± 2,13	20,7 ± 0,8*
21	♂	49,1 ± 1,0	52,9 ± 1,9	45,3 ± 01,23	45,06 ± 1,86	34,2 ± 1,6 **
	♀	47,1 ± 0,74	49,8 ± 1,51	45,1 ± 1,42	43,2 ± 1,71	33,2 ± 1,4***
28	♂	83 ± 1,27	81,9 ± 2,55	79,4 ± 1,56	76,7 ± 2,81	61,6 ± 2,9***
	♀	77 ± 1,73	76,7 ± 1,91	76 ± 2,0	72,5 ± 2,4	59,6 ± 2,06***
35	♂	124,9 ± 1,00	131,7 ± 1,86	119,4 ± 3,6	117,1 ± 4,03	100 ± 4,4 ***
	♀	124 ± 1,09	116,5 ± 1,91	111,3 ± 2,4	106,6 ± 2,8	92,3 ± 3,04***
75	♂	321,4 ± 4,3	328 ± 3,6	334,7 ± 8,12	321,9 ± 10,7	287,4 ± 6,6***
	♀	205 ± 4,0	207 ± 2,7	205,8 ± 4,4	204,9 ± 2,9	184,3 ± 3,9***

ANOVA seguida do teste de Bonferroni: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Figura 18 - Peso (em g) dos filhotes machos e fêmeas, em diferentes dias de vida, provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo *pair feeding* recebeu durante a gestação, a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. São apresentadas as médias e o e.p.m; n = 9 e 10 animais de cada gênero por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Bonferroni: *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001

A tabela 12 e a figura 19 apresentam os parâmetros do desenvolvimento físico de filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ao *S. brasiliensis* durante a gestação. A ANOVA de duas vias apontou diferenças significantes em todos os parâmetros analisados exceto, no andar adulto.

Com relação ao desdobramento de orelhas, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(4/88) = 7,61$, $p < 0,0001$), não havendo significância entre o gênero dos animais ($F(1/88) = 0$, $p = 0,98$) e nem interação entre os fatores ($F(4/88) = 0,10$, $p = 0,9815$). O teste de Bonferroni apontou atraso no aparecimento deste parâmetro em filhotes machos ($p < 0,05$) e fêmeas ($p < 0,05$) provenientes de ratas do grupo de 6 mg/kg e 9 mg/kg *versus* filhotes do grupo controle (figura 19).

Quando se avaliou o aparecimento de pêlos, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(4/88) = 10,8$, $p < 0,0001$), não havendo significância entre o gênero dos animais ($F(1/88) = 0,11$, $p = 0,7368$) e nem interação entre os fatores ($F(4/88) = 0,04$, $p = 0,9966$). O teste de Bonferroni apontou atraso para o início deste parâmetro em filhotes machos ($p < 0,001$) e fêmeas ($p < 0,001$) advindos de ratas do grupo de 9 mg/kg *versus* filhotes do grupo controle (figura 19).

No que diz respeito à erupção dos dentes incisivos a análise estatística mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(4/88) = 5,97$, $p < 0,0003$), não havendo significância entre o gênero dos animais ($F(1/88) = 0$, $p = 1,0$) e nem interação entre os fatores ($F(4/88) = 0,06$, $p = 0,9944$). O teste de Bonferroni apontou atraso no aparecimento deste parâmetro em filhotes machos ($p < 0,01$) e fêmeas ($p < 0,001$) provenientes de ratas do grupo de 9 mg/kg, em relação aos filhotes do grupo controle.

Quando se observou a abertura dos olhos, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(4/88) = 15,02$ $p < 0,0001$), não havendo significância entre o gênero dos animais ($F(1/88) = 0,0$, $p = 0,9862$) e nem interação entre os fatores ($F(4/88) = 0,19$, $p = 0,9435$). O teste de Bonferroni mostrou atraso significativo para o aparecimento deste parâmetro, em ambos os filhotes machos e fêmeas ($p < 0,05$) do grupo *pair feeding*, machos provenientes do grupo de 3 mg/kg ($p < 0,05$), bem como machos ($p < 0,001$) e fêmeas ($p < 0,001$) provenientes de ratas dos grupos de 6 mg/kg e 9 mg/kg em relação aos filhotes do grupo controle (figura 19).

A ANOVA de uma via aplicada ao parâmetro descida dos testículos mostrou diferenças estatisticamente significantes ($F(4/44) = 2,807$, $p < 0,036$) entre os grupos. O teste de Dunnett apontou adiantamento para descida dos testículos na prole advinda do grupo de 6 e 9 mg/kg ($p < 0,05$), em relação aos filhotes do grupo controle (figura 19).

A ANOVA de uma via aplicada ao parâmetro abertura vaginal mostrou diferença estatisticamente significativa ($F(4/44) = 7,964$, $p < 0,0265$) entre os grupos. O teste de Dunnett apontou atraso para a abertura vaginal na prole advinda do grupo de 9 mg/kg ($p < 0,01$), em relação a prole do grupo controle (figura 19).

Tabela 12 - Parâmetros do desenvolvimento físico dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo *pair feeding* recebeu durante a gestação, a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 9 e 10 animais de cada gênero por grupo.

Parâmetros		Controle (n= 10)	<i>Pair-feeding</i> (n = 9)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
				3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
DO^a	♂	2,1 ± 0,09	2,0 ± 0	2,3 ± 0,15	2,6 ± 0,21*	2,7 ± 0,21*
	♀	2,1 ± 0,09	2,1 ± 0,11	2,2 ± 0,13	2,6 ± 0,21*	2,7 ± 0,21*
AP^a	♂	7,2 ± 0,12	7,1 ± 0,11	7,5 ± 0,16	7,4 ± 0,16	8,3 ± 0,3***
	♀	7,2 ± 0,12	7,2 ± 0,14	7,5 ± 0,16	7,5 ± 0,22	8,3 ± 0,3***
ED^a	♂	10,4 ± 0,21	10,5 ± 0,24	10,8 ± 0,13	10,7 ± 0,26	11,2 ± 0,20**
	♀	10,3 ± 0,14	10,6 ± 0,23	10,8 ± 0,13	10,7 ± 0,21	11,3 ± 0,30***
AO^a	♂	12,4 ± 0,25	13,1 ± 0,20*	13,1 ± 0,18*	13,6 ± 0,16***	14 ± 0,15 ***
	♀	12,5 ± 0,25	13,2 ± 0,22*	13,1 ± 0,18	13,6 ± 0,22***	13,8 ± 0,13***
AA^a	♂	13,6 ± 0,15	13,1 ± 0,11	13,6 ± 0,16	13,9 ± 0,18	13,9 ± 0,18
	♀	13,6 ± 0,15	13,3 ± 0,16	13,6 ± 0,16	13,9 ± 0,18	13,9 ± 0,18
DT^b	♂	19,9 ± 0,23	19,9 ± 0,23	19 ± 0,30	18,7 ± 0,40*	18,8 ± 0,30*
AV^b	♀	35 ± 0,30	35 ± 0,28	35,4 ± 0,16	36 ± 0,33	37,3 ± 0,51**

DO = desobramento orelhas; AP = aparecimento pêlos; ED = erupção dos dentes; AO = abertura dos olhos; AA = andar adulto; DT = escida dos testículos; AV = abertura vaginal. ANOVA seguida do teste de Bonferroni^a e Dunnett^b: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Figura 19 - Parâmetros do desenvolvimento físico da prole de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo *pair feeding* recebeu durante a gestação, a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 9 e 10 animais de cada gênero por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Dunnett: *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

A tabela 13 e a figura 20 apresentam os parâmetros do desenvolvimento reflexológico de filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas tratadas com *S. brasiliensis* durante a gestação. A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados do reflexo de preensão palmar mostrou diferenças significantes quanto ao tratamento ($F(4/88) = 5,67$, $p < 0,0004$), não havendo diferenças entre o gênero dos animais ($F(1/88) = 0,28$, $p = 0,5989$) e nem interação entre os fatores ($F(4/88) = 0,12$, $p = 0,9736$). O teste de Bonferroni mostrou atraso para o desaparecimento deste parâmetro, em ambos os filhotes machos ($p < 0,01$) e fêmeas ($p < 0,05$) provenientes de ratas do grupo de 9 mg/kg em relação aos filhotes do grupo controle.

A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados do reflexo de endireitamento mostrou diferenças significantes quanto ao tratamento ($F(4/88) = 4,43$, $p < 0,002$), não havendo diferenças entre o gênero dos animais ($F(1/88) = 1,07$, $p = 0,3036$) e nem interação entre os fatores ($F(4/88) = 0,07$, $p = 0,9913$). O teste de Bonferroni mostrou atraso significativo para o aparecimento deste parâmetro, em filhotes fêmeas ($p < 0,05$) provenientes de ratas do grupo de 9 mg/kg em relação aos filhotes do grupo controle (figura 20).

Com relação aos resultados da geoataxia negativa a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significantes quanto ao tratamento ($F(4/88) = 5,66$, $p < 0,0004$) e ao gênero dos animais ($F(1/88) = 9,37$, $p < 0,0020$), não havendo interação entre os fatores ($F(4/88) = 0,51$, $p = 0,7252$). O teste de Bonferroni mostrou atraso significativo para o aparecimento deste parâmetro, em ambos filhotes machos ($p < 0,01$) e fêmeas ($p < 0,05$) provenientes de ratas do grupo de 9 mg/kg em relação aos filhotes do grupo controle (figura 20).

A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados do reflexo de sobressalto mostrou diferenças significantes quanto ao tratamento ($F(4/88) = 16,8$, $p < 0,0001$), não havendo diferenças entre o gênero dos animais ($F(1/88) = 0,0$, $p = 1,0$) e nem interação entre os fatores ($F(4/88) = 0,09$, $p = 0,98$). O teste de Bonferroni mostrou atraso significativo para o aparecimento deste parâmetro, em ambos machos ($p < 0,01$) filhotes fêmeas ($p < 0,05$) provenientes de ratas dos grupos de 6 e 9 mg/kg em relação aos filhotes do grupo controle (figura 20).

Tabela 13 – Parâmetros do desenvolvimento reflexológico dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo *pair feeding* recebeu durante a gestação, a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 9 e 10 animais de cada gênero por grupo.

Parâmetros		Controle (n= 10)	Pair-feeding (n = 9)	Senecio brasiliensis (mg/kg/dia)		
				3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
PP	♂	5,5 ± 0,16	5,5 ± 0,17	5,7 ± 0,21	5,5 ± 0,26	6,3 ± 0,15*
	♀	5,6 ± 0,15	5,7 ± 0,14	5,7 ± 0,21	5,5 ± 0,23	6,3 ± 0,15*
EA	♂	5,7 ± 0,44	5,6 ± 0,16	5,5 ± 1,10	5,3 ± 1,01	6 ± 0,51
	♀	5,5 ± 0,24	5,5 ± 0,16	5,4 ± 0,14	5,2 ± 1,30	6,1 ± 0,34
EP	♂	5 ± 0	5,0 ± 0	5 ± 0	5,0 ± 0	5,4 ± 0,22
	♀	5 ± 0	5,1 ± 0,11	5,1 ± 0,10	5,1 ± 0,10	5,5 ± 0,27 *
GN	♂	5,6 ± 0,15	6,11 ± 0,20	6,2 ± 0,24	5,8 ± 0,30	6,8 ± 0,24 **
	♀	6,3 ± 0,14	6,4 ± 0,17	6,4 ± 0,34	6,6 ± 0,22	7,2 ± 0,36 *
RS	♂	12,6 ± 0,15	12,9 ± 0,11	12,8 ± 0,0	13,4 ± 0,16**	13,9 ± 0,18***
	♀	12,5 ± 0,25	12,9 ± 0,11	12,8 ± 0,2	13,3 ± 0,15*	13,8 ± 0,13***

PP = preensão palmar; EA = esquiva ao abismo; EP = endireitamento postural; GN = geoataxia negativa; RS = reflexo de sobressalto.

ANOVA seguida do teste de Bonferroni: *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

Figura 20 - Parâmetros do desenvolvimento reflexológico da prole de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação. O grupo *pair feeding* recebeu durante a gestação, a mesma quantidade de ração do grupo 9 mg/Kg. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 9 e 10 animais de cada gênero por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Bonferroni: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Com relação aos parâmetros avaliados no campo aberto entre os dias 15º e 21º dias de vida, tanto na prole feminina quanto na prole masculina observaram-se poucas alterações significantes entre os grupos. Assim, nos filhotes machos quando se analisou a frequência de locomoção, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quanto ao tratamento ($F(3/252) = 9,03$, $p < 0,0001$) e aos dias de observação ($F(6/252) = 0,87$, $p = 0,5193401$), não havendo interação entre os fatores ($F(18/252) = 1,05$, $p = 0,4065$). Este mesmo parâmetro analisado na prole feminina pela ANOVA de duas vias mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quanto ao tratamento ($F(3/245) = 3,60$, $p < 0,01$) e aos dias de observação ($F(6/245) = 2,94$, $p < 0,008$), não havendo interação entre os fatores ($F(18/245) = 0,98$, $p = 0,4798$). O teste de Bonferroni aplicado à frequência de locomoção apontou redução deste parâmetro no 16º dia pós-natal de ambos os filhotes machos ($p < 0,05$) e fêmeas ($p < 0,01$) de ratas do grupo de 9 mg/kg, em relação aos filhotes do grupo controle (tabela 14).

Quanto à frequência de levantar, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças estatisticamente significantes somente na prole feminina quanto aos dias de observação ($F(6/245) = 2,85$, $p < 0,01$), havendo interação entre os fatores ($F(18/245) = 1,85$, $p < 0,02$). O teste de Bonferroni aplicado à frequência de levantar apontou diminuição deste parâmetro em filhotes fêmeas advindas de ratas dos grupos de 6 mg/kg ($p < 0,01$) e 9 mg/kg ($p < 0,01$) no 16º dia pós-natal em relação aos filhotes do grupo controle (tabela 15).

ANOVA de duas vias aplicada aos resultados de imobilidade mostrou diferenças significantes quanto ao tratamento ($F(3/242) = 3,56$, $p < 0,01$), não havendo diferença entre os dias de observação ($F(6/252) = 0,27$, $p = 0,9727$) e nem interação entre os fatores ($F(18/252) = 1,29$, $p = 0,1941$). O teste de Bonferroni aplicado ao tempo de imobilidade apontou aumento deste parâmetro em filhotes fêmeas advindas de ratas do grupo de 6 mg/kg ($p < 0,01$) no 16º dia pós-natal em relação aos filhotes do grupo controle (tabela 16).

Com relação à frequência de *grooming* a Anova de duas vias não mostrou diferenças significantes entre os grupos (tabela 17).

Tabela 14 - Frequência de locomoção dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 10 animais de cada gênero por grupo.

Dias de vida		Controle	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
		(n= 10)	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
15	♂	10,9 ± 2,3	14,4 ± 2,3	5,4 ± 2,1	4,4 ± 2,7
	♀	17,6 ± 3,4	13,5 ± 2,0	12,9 ± 6,3	7,4 ± 3,0
16	♂	14,6 ± 1,9	14,8 ± 2,5	7,6 ± 2,6	3,8 ± 1,6*
	♀	17,9 ± 5,0	9,9 ± 1,8	6,6 ± 2,9	3,5 ± 1,6*
17	♂	16,3 ± 4,0	12,5 ± 3,0	16,5 ± 4,3	7,1 ± 3,4
	♀	18,3 ± 3,1	13 ± 3,0	11,8 ± 2,0	10,4 ± 3,2
18	♂	16,8 ± 4,5	14,6 ± 3,3	12,4 ± 2,3	11,4 ± 3,7
	♀	13,5 ± 1,7	10,6 ± 3,2	9,9 ± 1,8	12 ± 4,7
19	♂	19,1 ± 4,5	18,5 ± 4,1	15,6 ± 5,3	13,4 ± 5,2
	♀	10,4 ± 1,6	5,4 ± 1,1	6,6 ± 1,4	14,5 ± 2,4
20	♂	12,4 ± 3,4	22,3 ± 5,7	20,9 ± 6,6	7,9 ± 3,0
	♀	7,9 ± 1,4	10,2 ± 1,8	7,6 ± 1,6	12,4 ± 3,2
21	♂	11,7 ± 2,4	18,5 ± 5,4	20 ± 5,4	9 ± 2,4
	♀	24,1 ± 3,2	18,4 ± 6,9	18,3 ± 4,8	11 ± 2,3

ANOVA seguida do teste de Bonferroni: *p<0,05

Tabela 15 - Frequência de levantar dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 10 animais de cada gênero por grupo.

		Controle	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
Dias de vida		(n= 10)	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
15	♂	2,4 ± 0,8	3,4 ± 0,7	4,1 ± 1,8	0,7 ± 0,4
	♀	3,6 ± 1,0	5,0 ± 1,1	1,9 ± 0,9	1,7 ± 0,5
16	♂	5,4 ± 2,0	4,0 ± 1,1	4,2 ± 1,6	2,7 ± 1,3
	♀	5,3 ± 1,0	3,8 ± 0,8	1,6 ± 0,6**	1,3 ± 0,7**
17	♂	4,4 ± 0,6	3,1 ± 0,6	5,0 ± 1,3	2,7 ± 1,2
	♀	4,0 ± 0,6	3,6 ± 1,0	4,8 ± 0,9	3,3 ± 1,0
18	♂	3,3 ± 0,6	2,4 ± 0,5	4,4 ± 1,0	4,8 ± 2,4
	♀	2,5 ± 0,5	1,8 ± 0,3	2,6 ± 0,5	3,0 ± 0,9
19	♂	2,9 ± 0,9	5,3 ± 1,8	2,2 ± 0,7	3,0 ± 0,8
	♀	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,4	2,0 ± 0,6	3,0 ± 0,8
20	♂	3,2 ± 1,5	4,3 ± 1,2	4,3 ± 1,7	1,6 ± 0,7
	♀	0,9 ± 2,2	2,4 ± 1,0	2,0 ± 0,5	2,2 ± 0,7
21	♂	2,4 ± 1,2	4,2 ± 1,1	3,3 ± 1,0	2,2 ± 0,5
	♀	3,1 ± 0,8	3,8 ± 1,9	3,7 ± 1,0	1,5 ± 0,5

ANOVA seguida do teste de Bonferroni: **p<0,01.

Tabela 16 - Imobilidade (em segundos) dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 10 animais de cada gênero por grupo.

Dias de vida		Controle	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
		(n= 10)	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
15	♂	31,5 ± 4,2	30 ± 5,0	25,5 ± 6,2	62,2 ± 9,9
	♀	31,9 ± 4,2	23,6 ± 5,2	33,8 ± 4,8	38,6 ± 5,1
16	♂	26,5 ± 6,3	30,8 ± 0,8	49,3 ± 9,1	37,2 ± 6,5
	♀	18,8 ± 3,5	28,5 ± 4,9	49,5 ± 10,1**	39,9 ± 8,5
17	♂	23,4 ± 5,3	36,4 ± 7,4	21,7 ± 5,8	34,7 ± 5,1
	♀	32,6 ± 5,5	37,7 ± 6,7	24,6 ± 3,8	35 ± 5,7
18	♂	24,8 ± 4,0	26,2 ± 3,0	27,2 ± 5,8	36,5 ± 8,5
	♀	22,1 ± 4,9	39,6 ± 5,2	34,1 ± 4,4	39,4 ± 7,2
19	♂	19,3 ± 5,2	24,6 ± 5,4	15,2 ± 5,0	17,3 ± 2,0
	♀	27,3 ± 6,4	43,8 ± 6,7	37 ± 5,9	20,1 ± 2,4
20	♂	28,8 ± 8,8	22,1 ± 9,5	15,4 ± 4,1	31,3 ± 5,9
	♀	28,9 ± 9,1	28,4 ± 7,7	35,1 ± 8,8	31 ± 6,9
21	♂	18,9 ± 5,3	20 ± 8,2	17,6 ± 6,2	25,6 ± 5,0
	♀	21,5 ± 6,0	29,9 ± 7,2	37 ± 14	35,8 ± 9,2

ANOVA seguida do teste de Bonferroni: **p<0,01.

Tabela 17 - Frequência de *grooming* dos filhotes machos e fêmeas provenientes de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 10 animais de cada gênero por grupo

Dias de vida		Controle	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
		(n= 10)	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
15	♂	2,1 ± 0,3	2,4 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,5 ± 0,4
	♀	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,3
16	♂	2,5 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,5 ± 0,4	1,8 ± 0,4
	♀	1,9 ± 0,2	2,7 ± 0,3	2,2 ± 0,3	2,5 ± 0,4
17	♂	1,9 ± 0,2	2,4 ± 0,4	2,4 ± 0,3	1,3 ± 0,3
	♀	2,1 ± 0,3	1,8 ± 0,3	2,5 ± 0,4	2,0 ± 0,4
18	♂	2,1 ± 0,3	1,8 ± 0,3	2,4 ± 0,4	2,4 ± 0,4
	♀	2,3 ± 0,3	1,6 ± 0,2	2,3 ± 0,4	2,6 ± 0,2
19	♂	1,8 ± 0,4	2,5 ± 0,5	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,4
	♀	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,3	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,2
20	♂	1,4 ± 0,4	2,2 ± 0,3	1,7 ± 0,3	1,3 ± 0,3
	♀	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,4	2,2 ± 0,2
21	♂	1,8 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,5	1,1 ± 0,2
	♀	1,6 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,6 ± 0,5	2,2 ± 0,6

ANOVA seguida do teste de Bonferroni: $p > 0,05$

4.3 Experimento 3: Efeitos da exposição ao *Senecio brasiliensis* durante a prenhez (DG6 ao DG20) na prole adulta

4.3.1 Atividade geral em campo aberto

A tabela 18 mostra os diferentes parâmetros observados no campo aberto da prole adulta proveniente de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação (DG6 ao DG20). Assim, observaram-se alterações significantes apenas no parâmetro locomoção da prole masculina entre os grupos. A ANOVA de duas vias aplicada aos resultados da locomoção apontou diferenças significantes quanto ao tratamento ($F(3/72) = 3,45$, $p < 0,02$), havendo significância entre o gênero dos animais ($F(1/72) = 9,43$, $p < 0,003$) e interação entre os fatores ($F(3/72) = 2,63$, $p < 0,05$). O teste de Bonferroni apontou aumento da frequência de locomoção na prole adulta masculina proveniente de ratas do grupo de 9 mg/kg ($p < 0,001$) em relação à prole adulta do grupo controle (figura 21).

Tabela 18 - Parâmetros da atividade geral em campo aberto da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 10 animais de cada gênero por grupo.

Parâmetros		Controle (n= 10)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
			3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
Frequência de Locomoção	♂	115,5 ± 7,6	117,2 ± 8,9	141,6 ± 10,2	161,5 ± 8,2***
	♀	152,8 ± 7,7	148,5 ± 7,6	161 ± 10,9	152,2 ± 11,5
Frequência de levantar	♂	25 ± 3,8	23 ± 3,3	24 ± 2,6	29,2 ± 2,9
	♀	31,8 ± 3,5	29,5 ± 2,8	34,3 ± 3,2	32 ± 3,3
Frequência de grooming	♂	1,1 ± 0,5	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,6 ± 0,3
	♀	0,1 ± 0,1	1 ± 0,6	0,7 ± 0,3	0,2 ± 0,2
Tempo de imobilidade (seg)	♂	9,2 ± 3,3	17,9 ± 9,8	3,6 ± 2,5	10,9 ± 4,5
	♀	7,9 ± 4,0	14,3 ± 7,8	3,9 ± 2,9	8,7 ± 3,3
Número de bolos fecais	♂	2,3 ± 0,7	4,1 ± 0,9	1,6 ± 0,6	2,3 ± 0,5
	♀	1,5 ± 0,6	0,5 ± 0,5	1,3 ± 0,5	0,9 ± 0,5

ANOVA seguida do teste de Bonferroni: *** $p < 0,001$.

Figura 21 - Locomoção da prole adulta masculina e feminina de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 10 animais de cada gênero por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Bonferroni: ***p<0,001.

4.3.2 Comportamento no labirinto em cruz elevado

A tabela 19 mostra os diferentes parâmetros observados no labirinto em cruz elevado da prole adulta proveniente de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação (DG6 ao DG20).

ANOVA de duas vias aplicada aos resultados do labirinto em cruz elevado na idade adulta apontou diferenças significantes na porcentagem de entrada nos braços abertos quanto ao tratamento ($F(3/72) = 2,64$, $p < 0,05$), havendo diferença entre os gêneros dos animais ($F(1/72) = 13,84$, $p < 0,0004$) e sem interação entre os fatores ($F(3/72) = 2,49$, $p = 0,06$). O teste de Bonferroni apontou aumento deste parâmetro ($p < 0,05$) na prole masculina proveniente de ratas do grupo de 9 mg/kg com relação à prole do grupo controle (figura 22).

Quanto a porcentagem de tempo gasto nos BA, a Anova de duas vias apontou diferenças significantes entre os grupos quanto ao tratamento ($F(3/72) = 4,34$, $p < 0,007$), não havendo diferenças entre o gênero dos animais ($F(1/72) = 1,00$, $p = 0,32$) e nem interação entre os fatores ($F(3/72) = 1,42$, $p = 0,2452$). O teste de Bonferroni mostrou aumento deste parâmetro ($p < 0,01$) na prole masculina

proveniente de ratas do grupo de 9 mg/kg, com relação à prole adulta do grupo controle (figura 22).

Nos demais parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado a ANOVA de duas vias não apontou diferenças significantes entre os grupos.

Tabela 19 - Parâmetros do comportamento no labirinto em cruz elevado da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São as médias e respectivos erros, ; n = 10 animais de cada gênero por grupo.

Parâmetros		Controle (n= 10)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
			3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
% entrada BA	♂	10,8 ± 3,3	17,5 ± 4,4	20,5 ± 3,8	24,3 ± 3,3 *
	♀	30,6 ± 1,8	20,5 ± 4,5	31,5 ± 3,8	31 ± 3,7
% tempo BA	♂	6,27 ± 1,8	11,5 ± 2,1	14,1 ± 4,0	17,6 ± 4,3 **
	♀	11,4 ± 1,8	9,4 ± 2,1	20,5 ± 2,7	14,8 ± 3,8
Nº entradas BA	♂	1,7 ± 0,6	2,4 ± 0,6	2,8 ± 0,6	3,5 ± 0,9
	♀	4,9 ± 0,4	2,4 ± 0,5	3,6 ± 0,7	3,2 ± 0,8
Nº entradas BF	♂	7,7 ± 1,1	11 ± 0,8	8,9 ± 1,1	9,2 ± 0,9
	♀	10,7 ± 1,0	8,1 ± 1,3	7,5 ± 1,0	7,1 ± 0,9
tempo BA	♂	21,6 ± 8,5	27,2 ± 6,8	33,9 ± 9,9	38,3 ± 10,7
	♀	43,4 ± 4,2	24,3 ± 5,1	49 ± 9,1	33,2 ± 9,1
tempo BF	♂	241,6 ± 10,4	241,7 ± 12,8	216,4 ± 15,8	199,7 ± 15,0
	♀	204,6 ± 10,6	241,9 ± 9,8	216,2 ± 1,90	221 ± 15
Levantar	♂	14,9 ± 1,2	17,5 ± 2,2	13,1 ± 2,1	12,7 ± 1,0
	♀	15,2 ± 1,3	15,7 ± 1,6	13 ± 0,8	14,3 ± 2,4
AR	♂	5,7 ± 0,8	6,7 ± 0,7	6,0 ± 0,9	8,5 ± 1,4
	♀	6,8 ± 0,4	7,9 ± 1,1	5,8 ± 1,4	9,0 ± 1,4
Olhar p baixo	♂	6,4 ± 1,6	8,2 ± 2,0	10,3 ± 2,0	8,0 ± 1,9
	♀	12,3 ± 1,8	6,7 ± 1,1	10 ± 1,3	7,1 ± 1,7
Grooming	♂	1,1 ± 0,3	2,3 ± 0,4	2,1 ± 0,5	1,5 ± 0,5
	♀	1,6 ± 0,4	1,2 ± 0,3	2,2 ± 0,4	0,9 ± 0,3
Locomoção	♂	9,2 ± 1,5	13,4 ± 0,9	11,7 ± 1,5	12,2 ± 1,6
	♀	15,7 ± 1,09	11,3 ± 1,3	11,1 ± 1,5	10,3 ± 1,7

AB = braços abertos; BF = braços fechados; AR = avaliação de risco.

ANOVA seguida do teste de Bonferroni: *p<0,05, **p<0,01

Figura 22 - Porcentagem de entrada e tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado da prole adulta de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 10 animais de cada gênero por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Bonferroni: *p<0,05, **p<0,01.

4.3.3 Interação social

A Anova de duas vias aplicada aos resultados do teste de interação social não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados (tabela 20).

Tabela 20 - Parâmetros do teste de interação social da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 6 pares de cada gênero por grupo.

Parâmetros (seg)		Controle (n= 6)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
			3 (n=6)	6 (n=6)	9 (n=6)
Tempo de perseguição	♂	59,7 ± 10,5	53,8 ± 9,0	52,6 ± 11,5	38,8 ± 11,1
	♀	54,6 ± 5,7	49,2 ± 9,3	62 ± 12,9	57,3 ± 13,9
Cheirar	♂	62,7 ± 13,1	79,6 ± 13,5	84 ± 16,7	84,5 ± 11,9
	♀	46,7 ± 6,4	43,6 ± 9,7	61 ± 11,8	56,5 ± 12,6
Passar sob ou sobre	♂	19,5 ± 2,6	18,7 ± 1,7	25 ± 5,2	22,9 ± 2,8
	♀	13,7 ± 1,8	23,9 ± 8,4	13 ± 1,7	26,9 ± 4,6
Tempo total de interação	♂	142 ± 20,9	152,3±15,5	161,7±20,9	158 ± 9,1
	♀	114,9 ± 7,4	119,5±12,7	143 ± 20,4	150 ± 19,6

ANOVA: $p > 0,05$.

4.3.4 Natação forçada

A tabela 21 mostra os resultados referentes à natação forçada da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis*, do 6º ao 20º dia de gestação (DG6 ao DG20). A ANOVA de duas vias não apontou diferenças significantes entre os grupos com relação ao início da flutuação e o tempo total de flutuação.

Quanto ao tempo de escalada, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significantes em relação ao tratamento ($F(3/56) = 3,21$, $p < 0,0297$), não havendo diferença entre o gênero dos animais ($F(1/56) = 1,76$, $p = 0,1895$) e nem interação entre os fatores ($F(3/56) = 1,86$, $p = 0,1470$). O teste de Bonferroni apontou aumento

deste parâmetro ($p < 0,05$) na prole feminina proveniente de ratas que receberam a dose de 9 mg/kg *versus* animais do grupo controle (figura 23).

Quando se avaliou o tempo de natação, a Anova de duas vias mostrou diferenças significantes quanto ao tratamento ($F(3/56) = 4,24$, $p < 0,009$), não havendo diferenças entre o gênero dos animais ($F(1/56) = 1,84$, $p = 0,1799$) e nem interação entre os fatores ($F(3/56) = 0,29$, $p = 0,8332$). O teste de Bonferroni apontou diminuição no tempo de natação em ratos machos provenientes de ratas dos grupos de 6 mg/kg ($p < 0,05$) e 9 mg/kg ($p < 0,05$) *versus* animais do grupo controle (figura 23).

Tabela 21 - Parâmetros do teste de natação forçada da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; $n = 8$ animais de cada gênero por grupo.

Parâmetros (seg)		Controle	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
		(n = 8)	3 (n=8)	6 (n=8)	9 (n=8)
Início flutuação	♂	5,75 ± 0,82	4,25 ± 1,4	6,8 ± 2,5	5,25 ± 1,9
	♀	5,0 ± 1,9	5,5 ± 1,4	7,7 ± 2,6	4,25 ± 1,76
Tempo flutuação	♂	19,2 ± 3,4	31,1 ± 3,3	29,7 ± 5,5	20,7 ± 2,4
	♀	27,4 ± 5,2	39,2 ± 4,9	23,6 ± 4,2	35,4 ± 8,5
Tempo de escalada	♂	15,4 ± 4,0	9,0 ± 2,7	19 ± 6,8	22,9 ± 2,8
	♀	14,7 ± 4,2	24 ± 6,2	13,2 ± 4,6	25,5 ± 6,5*
Tempo de nado	♂	262,6 ± 4,55	240,5 ± 11,3	237,4 ± 6,0*	233,5 ± 8,6*
	♀	252,1, ± 6,7	231 ± 5,0	325,2 ± 9,8	230,6 ± 9,1

ANOVA seguida do teste de Bonferroni: * $p < 0,05$

Figura 23 - Tempo de escalada e de natação da prole adulta masculina e feminina de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados expressam a média e o e.p.m; n = 8 animais de cada gênero por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Bonferroni: *p<0,05.

4.3.5 Avaliação da catatonia induzida por haloperidol

As tabelas 22 e 23 mostram os resultados observados na catatonia induzida por 1,0 mg/kg de haloperidol na prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação (DG6 ao DG20). O teste de Kruskal Wallis não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos tempos de observação, tanto na prole masculina quanto feminina.

Tabela 22 - Catatonia induzida por 1,0 mg/kg de haloperidol na prole adulta masculina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos em número de animais com catatonia em relação ao número total e a respectiva porcentagem; n = 9 animais por grupo.

Tempo (min)	Controle	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
	(n= 9)	3 (n=9)	6 (n=9)	9 (n=9)
10	2/9 (22%)	5/9 (55%)	5/9 (55%)	6/9 (66%)
20	3/9 (33%)	5/9 (55%)	5/9 (55%)	7/9 (77%)
30	5/9 (55%)	7/9 (77%)	5/9 (55%)	7/9 (77%)
40	6/9 (66%)	8/9 (88%)	6/9 (66%)	5/9 (55%)
50	6/9 (66%)	8/9 (88%)	9/9 (100%)	7/9 (77%)
60	6/9 (66%)	9/9 (100%)	8/9 (88%)	8/9 (88%)
70	6/9 (66%)	8/9 (88%)	9/9 (100%)	8/9 (88%)
80	8/9 (88%)	8/9 (88%)	9/9 (100%)	8/9 (88%)
90	6/9 (66%)	7/9 (77%)	8/9 (88%)	7/9 (77%)
100	8/9 (88%)	7/9 (77%)	8/9 (88%)	9/9 (100%)
110	5/9 (55%)	8/9 (88%)	8/9 (88%)	9/9 (100%)
120	5/9 (55%)	8/9 (88%)	8/9 (88%)	8/9 (88%)

Teste de Kruskal Wallis, $p > 0,05$.

Tabela 23 - Catatonia induzida por 1,0 mg/kg de haloperidol na prole adulta feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos em número de animais com catatonia em relação ao número total e a respectiva porcentagem; n = 8 animais por grupo.

Tempo (min)	Controle	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
	(n= 8)	3 (n=8)	6 (n=8)	9 (n=8)
10	6/8 (75%)	7/8 (87%)	7/8 (87%)	4/8 (50%)
20	6/8 (75%)	3/8 (37%)	4/8 (50%)	7/8 (87%)
30	5/8 (62%)	7/8 (87%)	7/8 (87%)	8/8 (100%)
40	7/8 (87%)	7/8 (87%)	5/8 (62%)	7/8 (87%)
50	7/8 (87%)	6/8 (75%)	6/8 (75%)	7/8 (87%)
60	6/8 (75%)	5/8 (62%)	7/8 (87%)	7/8 (87%)
70	6/8 (75%)	8/8 (100%)	7/8 (87%)	7/8 (87%)
80	8/8 (100%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	7/8 (87%)
90	7/8 (87%)	7/8 (87%)	5/8 (62%)	8/8 (100%)
100	7/8 (87%)	6/8 (75%)	7/8 (87%)	7/8 (100%)
110	6/8 (75%)	6/8 (75%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)
120	5/8 (62%)	7/8 (87%)	7/8 (87%)	6/8 (75%)

Teste de Kruskal Wallis, $p > 0,05$.

4.3.6 Avaliação da estereotipia induzida por apomorfina

As tabelas 24 e 25 mostram os resultados observados na estereotipia induzida por 0,6 mg/kg de apomorfina na prole masculina e feminina proveniente de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação (DG6 ao DG20). Na prole masculina nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos nos diferentes tempos da observação.

Quanto à prole feminina, a ANOVA de duas vias apontou diferenças significantes entre os grupos em relação ao tratamento ($F(3/217) = 4,73$, $p < 0,007$) e ao tempo de observação ($F(7/217) = 126,03$, $p < 0,0001$) não havendo interação entre os fatores ($F(21/217) = 1,38$, $p = 0,13$). O teste de Bonferroni apontou aumento ($p < 0,05$) no tempo de estereotipia na prole feminina proveniente de ratas que

receberam a dose de 9 mg/kg aos 50 e aos 60 min de observação *versus* animais do grupo controle.

Tabela 24 - Estereotipia induzida por 0,6 mg/kg de apomorfina na prole adulta masculina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos como média dos escores de esteriotipia e os respectivos erros padrão; n = 9 animais por grupo.

Tempo (min)	Controle (n= 9)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
		3 (n=9)	6 (n=9)	9 (n=9)
10	3,11 ± 0,35	3,55 ± 0,35	3,22 ± 0,23	3,66 ± 0,23
20	3,77 ± 0,27	4,44 ± 0,35	4,0 ± 0,43	4,66 ± 0,33
30	4,22 ± 0,27	4,55 ± 0,28	4,11 ± 0,33	4,44 ± 0,24
40	3,7 ± 0,57	4,0 ± 0,40	3,22 ± 0,70	4,88 ± 0,20
50	2,66 ± 0,68	3,55 ± 0,35	2,66 ± 0,61	3,22 ± 0,70
60	0,55 ± 0,44	1,55 ± 0,43	0,66 ± 0,40	1,55 ± 0,62
90	0,44 ± 0,30	0,66 ± 0,30	0,77 ± 0,28	0,55 ± 0,37
120	0,33 ± 0,16	0,11 ± 0,11	0,11 ± 0,11	0,33 ± 0,23

ANOVA: p>0,05.

Tabela 25 - Estereotipia induzida por 0,6 mg/kg de apomorfina na prole adulta feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos como média dos escores de estereotipia e erros padrão; n = 9 animais por grupo.

Tempo (min)	Controle (n= 9)	Senecio brasiliensis (mg/kg/dia)		
		3 (n=9)	6 (n=9)	9 (n=9)
10	3,44 ± 0,24	3,55 ± 0,24	3,11 ± 0,35	4,22 ± 0,27
20	4,66 ± 0,37	4,0 ± 0,28	3,77 ± 0,40	4,77 ± 0,22
30	5,0 ± 0,33	4,33 ± 0,28	4,11 ± 0,30	4,77 ± 0,22
40	4,11 ± 0,60	4,33 ± 0,23	3,66 ± 0,52	5,0 ± 0,16
50	1,88 ± 0,56	3,11 ± 0,45	2,22 ± 0,64	3,33 ± 0,28*
60	0 ± 0	1,33 ± 0,37	0,55 ± 0,37	1,55 ± 0,62*
90	0,22 ± 0,22	0 ± 0	0,33 ± 0,23	0,22 ± 0,22
120	0,22 ± 0,15	0 ± 0	0,33 ± 0,23	0,66 ± 0,28

ANOVA seguida do teste de Bonferroni: *p<0,05.

4.3.7 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos

A tabela 26 mostra os resultados referentes à avaliação dos parâmetros hematológicos da prole adulta masculina proveniente de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação (DG6 ao DG20). A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes em nenhum dos parâmetros analisados, exceto na contagem diferencial dos leucócitos, apontando diferenças significantes em relação ao número de linfócitos ($F(3/20)$, 3,323, $p<0,04$). O teste de Dunnett apontou aumento significativo ($p<0,05$) deste parâmetro na prole adulta masculina proveniente de ratas do grupo de 9 mg/kg *versus* animais do grupo controle.

A tabela 27 mostra os resultados referentes à avaliação dos parâmetros hematológicos da prole adulta feminina proveniente de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação (DG6 ao DG20). A ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes ($F(3/20)$, 9,73, $p<0,0004$) no número de leucócito. O teste de Dunnett apontou diminuição significativa ($p<0,05$) deste parâmetro na prole

adulta feminina proveniente de ratas dos grupos de 3 e 6 mg/kg *versus* animais do grupo controle.

Com relação à contagem diferencial de leucócitos na prole adulta feminina, a ANOVA de uma via apontou diferenças significantes entre os grupos ($F(93/20)$, 6,103, $p < 0,004$) no número de linfócitos. O teste de Dunnett apontou redução significativa deste parâmetro na prole adulta feminina proveniente de ratas dos grupos de 3 mg/kg ($p < 0,05$) e 6 m/kg ($p < 0,05$) *versus* animais do grupo controle. Ainda, a ANOVA de uma via mostrou haver diferenças significantes ($F(3/20)$, 13,28, $p < 0,0001$) no número de neutrófilos. O teste de Dunnett apontou aumento significativo ($p < 0,001$) deste parâmetro na prole adulta feminina proveniente de ratas do grupo de 9 mg/kg *versus* animais do grupo controle.

A ANOVA de uma via aplicada aos resultados do número de eritrócitos apontou diferenças significantes entre os grupos ($F(3/20)$, 5,118, $p < 0,0086$). O teste de Dunnet mostrou aumento significativo deste parâmetro ($p < 0,05$) na prole adulta feminina proveniente de ratas do grupo de 9 mg/kg *versus* animais do grupo controle.

Tabela 26 - Parâmetros hematológicos da prole adulta masculina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos como médias e respectivos erros padrão; n = 6 animais por grupo.

Parâmetros Hematológicos	Controle (n=6)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
		3 mg/kg (n=6)	6 mg/kg (n=6)	9 mg/kg (n=6)
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	6,35 $\pm$ 0,35	6,1 $\pm$ 0,40	7,2 $\pm$ 0,50	7,3 $\pm$ 0,80
Linfócito	4,73 $\pm$ 0,17	4,80 $\pm$ 0,30	5,37 $\pm$ 0,40	6,0 $\pm$ 0,35*
Neutrófilo	1,21 $\pm$ 0,20	1,13 $\pm$ 0,24	1,61 $\pm$ 0,23	1,77 $\pm$ 0,15
Monócito	0,32 $\pm$ 0,08	0,17 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,08
Eosinófilo	0,03 $\pm$ 0,001	0,05 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,06
Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8,2 $\pm$ 0,20	8,2 $\pm$ 0,10	8,1 $\pm$ 0,35	8,2 $\pm$ 0,26
HG (g/dL)	15,3 $\pm$ 0,25	15,2 $\pm$ 0,13	14,9 $\pm$ 0,85	15 $\pm$ 0,70
HCM (pg)	18,7 $\pm$ 0,20	18,6 $\pm$ 0,10	18,3 $\pm$ 0,55	18,3 $\pm$ 0,40
VCM (mm3)	52,2 $\pm$ 0,16	51,8 $\pm$ 0,50	49 $\pm$ 2,0	52,7 $\pm$ 0,60
CHCM (g/dL)	35,8 $\pm$ 0,33	35,9 $\pm$ 0,15	36,8 $\pm$ 1,9	34,7 $\pm$ 0,95
Ht (%)	42,8 $\pm$ 0,90	42,6 $\pm$ 0,40	42,7 $\pm$ 1,90	43,1 $\pm$ 0,10

HG = hemoglobina; HCM = hemoglobina corpuscular média; VCM = volume corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; Ht = hematócrito.
ANOVA seguida do teste de Dunnett: *p<0,05.

Tabela 27 - Parâmetros hematológicos da prole adulta feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos como médias e respectivos erros padrão, n = 6 animais por grupo.

Parâmetros	Controle	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
Hematológicos	(n= 6)	3 (n=6)	6 (n=6)	9 (n=6)
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	6,25 $\pm$ 0,50	4,2 $\pm$ 0,5*	4,1 $\pm$ 0,25*	7,4 $\pm$ 0,7
Linfócito	5,2 $\pm$ 0,60	3,1 $\pm$ 0,51*	3,3 $\pm$ 0,23*	5,2 $\pm$ 0,45
Neutrófilo	0,64 $\pm$ 0,18	0,87 $\pm$ 0,10	0,60 $\pm$ 0,08	1,78 $\pm$ 0,20***
Monócito	0,24 $\pm$ 0,08	0,13 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,08
Eosinófilo	0,03 $\pm$ 0,009	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02
Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	7,6 $\pm$ 0,12	7,7 $\pm$ 0,06	7,5 $\pm$ 0,10	8,2 $\pm$ 0,2*
HG (g/dL)	15,3 $\pm$ 0,20	15,2 $\pm$ 0,08	14,8 $\pm$ 0,25	15,7 $\pm$ 0,40
HCM (pg)	20 $\pm$ 0,25	19,5 $\pm$ 0,13	19,7 $\pm$ 0,20	19 $\pm$ 0,20
VCM (mm^3)	55,2 $\pm$ 0,16	54,4 $\pm$ 0,43	54,7 $\pm$ 0,30	53,7 $\pm$ 0,70
CHCM (g/dL)	36,4 $\pm$ 0,33	35,9 $\pm$ 0,20	36 $\pm$ 0,30	35,9 $\pm$ 0,25
Ht (%)	42 $\pm$ 0,60	42 $\pm$ 0,30	41,2 $\pm$ 0,45	43,7 $\pm$ 1,33

HG = hemoglobina; HCM = hemoglobina corpuscular média; VCM = volume corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; Ht = hematócrito.

ANOVA seguida do teste de Dunnett: * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$

A tabela 28 mostra os resultados referentes à avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos na prole adulta masculina e feminina, proveniente de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação (DG6 ao DG20). A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes em nenhum dos parâmetros analisados, exceto em relação à dosagem de ALT, apontando diferenças significantes entre os grupos ($F(3/36) = 5,27$, $p < 0,004$). O teste de Dunnett apontou aumento significativo ($p < 0,05$) deste parâmetro na prole adulta masculina proveniente de ratas do grupo de 9 mg/kg *versus* animais do grupo controle.

Tabela 28 - Parâmetros bioquímicos séricos da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. Os resultados são expressos como médias e respectivos erros padrão; n = 10 animais de cada gênero por grupo.

Parâmetros		Controle	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
Bioquímicos		(n= 10)	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
AST (U/L)	♂	192,6 ± 11,7	186,3 ± 14,4	226 ± 14,6	229,6 ± 11,7
	♀	202 ± 15,5	223 ± 32,1	207 ± 15,8	198 ± 8,5
ALT (U/L)	♂	59,3 ± 2.97	53,5 ± 4,3	69,9 ± 2,3	73,1 ± 4,4*
	♀	60,3 ± 2,68	53,5 ± 4,3	69,3 ± 4,0	62 ± 4,2
GGT (U/L)	♂	2,55 ± 0,58	2,98 ± 0,47	3,46 ± 0,23	2,60 ± 0,40
	♀	2,8 ± 0,52	2,48 ± 0,55	2,5 ± 0,46	2,8 ± 0,50
Creatinina (mg/dL)	♂	0,60 ± 0,01	0,60 ± 0,02	0,60 ± 0,04	0,65 ± 0,03
	♀	0,64 ± 0,04	0,60 ± 0,02	0,53 ± 0,03	0,61 ± 0,03
Uréia (mg/dL)	♂	55,2± 4,9	53,1 ± 4,6	56,1 ± 4,6	65,4 ± 7,2
	♀	55,3 ± 3,9	53,5 ± 2,9	50,9 ± 4,3	60,4 ± 5,0

AST = asparatato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase; GGT = gama glutamiltransferase

ANOVA seguida do teste de Dunnett: *p<0,05.

4.3.8 Estudo anatomopatológico

Durante a necropsia não foram constatadas nenhuma alteração digna de nota em nenhum dos animais dos diferentes grupos.

A tabela 29 mostra o peso relativo de órgãos da prole adulta masculina e feminina exposta durante o período perinatal ao *Senecio brasiliensis*; a análise estatística não apontou diferenças significantes em nenhum dos órgãos analisados.

Com relação à análise histológica do fígado, não foram observadas alterações morfológicas como megalocitose, necrose ou apoptose na prole adulta exposta ao *Senecio brasiliensis* durante o período perinatal. Porém, assim como na análise histológica das progenitoras, observou-se também na prole adulta aumento de células multinucleadas nos hepatócitos ($F(3/57) = 16,44$, $p < 0,0001$). O teste de Dunnett apontou aumento destas células em animais provenientes de ratas que

receberam as doses de 6 mg/kg ($p < 0,001$) e 9 mg/kg ($p < 0,001$) *versus* animais do grupo controle (tabela 30 e a figura 24).

Tabela 29 - Peso relativo dos órgãos (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) da prole adulta masculina e feminina proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = número de animais de cada gênero por grupo.

Órgãos		Controle	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
		(n= 10)	3 (n=10)	6 (n=10)	9 (n=10)
Fígado	♂	3,25 ± 0,11	3,23 ± 0,06	3,5 ± 0,11	3,22 ± 0,13
	♀	3,38 ± 0,14	3,54 ± 0,12	3,56 ± 0,08	3,57 ± 0,07
Baço	♂	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,1	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,008
	♀	0,21 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,01
Rim direito	♂	0,29 ± 0,008	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,01
	♀	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,34 ± 0,01
Rim esquerdo	♂	0,28 ± 0,009	0,32 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01
	♀	0,30 ± 0,01	0,32 ± 0,007	0,28 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Pulmões	♂	0,43 ± 0,01	0,50 ± 0,02	0,48 ± 0,03	0,48 ± 0,05
	♀	0,52 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,62 ± 0,07	0,65 ± 0,07

ANOVA: $p > 0,05$

Tabela 30 - Número de células multinucleadas do fígado da prole adulta proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = 13 e 16 animais por grupo.

Grupos	n	Nº de Células Multinucleadas
Controle	16	11,5 ± 1,04
3 mg/kg	16	9,9 ± 0,63
6 mg/kg	13	17,5±1,03***
9 mg/kg	16	16,4±0,90***

ANOVA seguida do teste de Dunnett: ***p<0,001.

Figura 24 - Número de células multinucleadas do fígado da prole adulta de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e o e.m.p; n = 13 ou 16 animais por grupo. Análise de Variância seguida pelo teste de Dunnett: ***p<0,001.

4.3.9 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos

A tabela 31 mostra os resultados referente a avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no córtex pré-frontal, estriato, hipotálamo e hipocampo da prole adulta proveniente de ratas expostas ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação (DG6 ao DG20). A ANOVA não mostrou diferenças significantes nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no córtex pré-frontal, hipocampo e no hipotálamo dos animais. No entanto, quando analisou-se o estriato, a ANOVA de uma via apontou diferenças significantes nos níveis de DA ($F(3/18) = 0,3783$, $p < 0,03$) e seus metabólitos DOPAC ($F(3/18) = 8,630$, $p < 0,034$) e HVA ($F(3/18) = 10,7$, $p < 0,01$), bem como apontou diferenças significantes nos níveis de 5HT ($F(3/18) = 19,6$, $p < 0,0001$) e do seu metabólito 5HAA ($F(3/18) = 10,7$, $p < 0,03$). O teste de Dunnett mostrou diminuição significativa dos níveis de DA ($p < 0,05$), aumento nos níveis de DOPAC ($p < 0,05$) e HVA ($p < 0,05$), e, ainda, aumento nos níveis de 5HT ($p < 0,05$) e seu metabólito 5HIAA ($p < 0,001$) em animais provenientes de ratas que receberam a dose de 6 mg/kg *versus* animais do grupo controle.

Tabela 31 - Níveis de neurotransmissores e seus metabólitos em córtex pré-frontal, estriato, hipocampo e hipotálamo da prole adulta proveniente de ratas expostas ou não (controle) ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros padrão; n = número de animais de cada gênero por grupo.

Neurotransmissor/ Metabólito		Controle (n= 7)	<i>Senecio brasiliensis</i> (mg/kg/dia)		
			3 (n=7)	6 (n=4)	9 (n=6)
Córtex	DA	107,3 ± 14,8	101 ± 20,3	143,8 ± 26,7	84,3 ± 2,9
	DOPAC	10,6 ± 2,4	18,1 ± 2,5	38,5 ± 17,8	19,8 ± 8,0
	HVA	43,1 ± 6,5	34,4 ± 2,9	86 ± 28,0	48,1 ± 11,6
	5-HT	4200 ± 205,2	3958 ± 89,4	4125 ± 184	4468 ± 346,3
	5-HIAA	703 ± 37,6	712 ± 57,1	894,5 ± 66,1	699 ± 50,4
	NOR	695,2 ± 32	669,7 ± 59	698,6 ± 32,8	730 ± 32,8
Estriato	DA	5989 ± 991	6500 ± 1143	1539 ± 72,1*	4931 ± 636
	DOPAC	654,9 ± 113,4	929,5 ± 165,1	1461 ± 50,8*	745,1 ± 211
	HVA	597,4 ± 105,5	883,1 ± 175,7	2107 ± 133,3*	761,5 ± 211,4
	5-HT	2648 ± 423,8	2713 ± 411	7426 ± 788***	2112 ± 221,6
	5-HIAA	1123 ± 176,5	1274 ± 223,1	2377 ± 532,4*	1263 ± 297,6
	NOR	138,3 ± 20,6	119,6 ± 29,8	318,3 ± 128	205 ± 49,6
Hipocampo	DA	36 ± 6,7	25 ± 7,3	25,5 ± 5,6	20,3 ± 3,0
	DOPAC	5,0 ± 0,7	4,3 ± 1,2	4,7 ± 1,4	4,0 ± 1,0
	HVA	9,4 ± 1,0	9,0 ± 2,6	7,2 ± 1,9	9,3 ± 1,8
	5-HT	3426 ± 55,1	2197 ± 169,9	2574 ± 137,4	3426 ± 551
	5-HIAA	1203 ± 58,9	1142 ± 87,1	1374 ± 131,4	1301 ± 139,1
	NOR	1194 ± 85,0	972,7 ± 139	1145 ± 36,9	1431 ± 202
Hipotálamo	DA	521,4 ± 42,5	537,7 ± 88,7	570,5 ± 41,7	402,8 ± 51,1
	DOPAC	48,4 ± 4,7	52,8 ± 6,3	40,7 ± 4,7	43 ± 2,7
	HVA	40,6 ± 3,8	52 ± 10,5	64,2 ± 15,5	31,5 ± 2,2
	5-HT	4663 ± 221	3878 ± 288,1	4694 ± 425,3	3966 ± 122,8
	5-HIAA	1524 ± 107,9	1416 ± 110,2	1393 ± 39	1302 ± 180
	NOR	2598 ± 93,0	2414 ± 153	3113 ± 71,5	2539 ± 108

DA = dopamina, DOPAC = ácido 3,4, dihidroxifenilacético, HVA = ácido homovanílico, 5-HT = serotonina, 5-HIAA = ácido 5-hidroindolacético, NOR = noradrenalina

ANOVA seguida do teste de Dunnett: *p<0,05, ***p<0,001

5 DISCUSSÃO

Atribui-se os efeitos tóxicos de *Senecio* a presença de alcalóides pirrolizidínicos. No presente estudo empregou-se o mesmo RB de *Senecio brasiliensis* que foi estudado por Elias et al (2011); esses autores constataram que esse resíduo contém 69% de integerrimina N-óxido, corroborando outro estudo que apontou ser integerrimina N-óxido o principal alcalóide presente nas folhas de *S. brasiliensis* (HIRSCHMANN et al., 1987).

As doses administradas aos animais (3, 6 e 9 mg/kg) no presente estudo foram as mesmas empregadas por Elias et al (2011) e, quando se considera o alcalóide preponderante, corresponde, respectivamente, a 2,07, 4,14 e 6,21 mg/kg de integerrimina N-óxido. Deve ser salientado que, a planta foi previamente seca e moída antes da sua preparação para administração aos animais, e sabe-se que a planta mesmo seca conserva sua toxicidade por um período de pelo menos 23 anos (SANTOS-MELLO et al., 2002).

A administração do RB de *S. brasiliensis* ocorreu do 6º ao 20º dia de gestação da rata, período em que já ocorreu a implantação embrionária no útero (BERNARDI, 2011), evitando-se, assim, a possibilidade de toxicidade pré-implantação. Desta forma, os efeitos tóxicos atribuídos à planta, tanto sobre a mãe quanto a prole são consequência da exposição durante o período de organogênese e desenvolvimento fetal.

Nossos resultados mostraram que a exposição ao *S. brasiliensis* durante a prenhez produziu toxicidade materna, caracterizada pela redução do consumo hídrico, juntamente com diminuição do consumo de ração e ganho de peso materno, de forma dose-dependente. Tanto a redução da ingestão de ração quanto à diminuição do ganho de peso foram observadas principalmente na última semana de gestação em todos os grupos experimentais. Vale destacar que a intoxicação por *Senecio spp.* em ruminantes e eqüinos causa apatia, diminuição do apetite e emagrecimento progressivo, além de lesões hepáticas (LUCENA et al., 2010) .

Em ratas expostas ao *Senecio* durante a gestação não foram observadas alterações no peso relativo do fígado, porém constatou-se a presença de células hepáticas multinucleadas, além de aumento do peso relativo dos pulmões e do rim esquerdo. Esses achados podem ser atribuídos à presença dos APs desta planta, uma vez que estes, como, em particular, a monocrotalina, apresentam efeitos tóxicos sobre os pulmões e rins (PAN et al., 1993; TOFOVIC et al., 2005; CHEN, MEI e FU, 2010). Ressaltando-se que os danos nos pulmões ocorrem devido a

presença de enzimas do sistema citocromo P450 neste órgão, as quais são responsáveis pela produção de pirróis (KIM, STERMITZ e COULOMBE, 1995).

A administração de *S. brasiliensis* nas doses investigadas não interferiu na duração da prenhez, no número total de filhotes nascidos e na proporção de filhotes macho/fêmea; porém, houve diminuição no peso total da ninhada de filhotes advindos de ratas dos grupos de 6 e 9 mg/kg.

Foi constatado canibalismo, em particular, nas ratas do grupo exposto a 9 mg/kg de *Senecio*. Esse achado poderia ser atribuído à baixa ingestão alimentar, contudo o mesmo não foi observado em ratas pertencentes ao grupo *pair feeding*, descartando-se a hipótese de deficiência alimentar. Nesse contexto, sabe-se que, em condições “normais”, a manifestação de canibalismo materno é comum em laboratórios, ainda que não seja bem compreendido (WEBER e OLSSON, 2008).

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

No presente estudo, considerando o comportamento materno, o tempo para a recuperação do 1º, 2º, 3º e 4º filhote foi maior em ratas que receberam a dose de 9 mg/kg de *S. brasiliensis*. A recuperação e o agrupamento dos filhotes é uma das mais importantes manifestações do comportamento materno, pois a mãe busca os filhotes para mantê-los unidos e aquecidos, facilitando a amamentação e a limpeza dos filhotes (MOURA *et al.*, 2010).

A amamentação é mais intensa no início do período da lactação, justamente para garantir o desenvolvimento dos filhotes, sendo este o período mais crítico da vida desses animais. Nossos resultados mostraram que não houve diferenças para o início da amamentação nos diferentes grupos estudados. No entanto, verificou-se que o número de filhotes presentes no início da amamentação foi menor em ratas que receberam a dose de 9 mg/kg de *S. brasiliensis*, ou seja, estas ratas iniciavam o processo de amamentação com menos da metade da ninhada.

O comportamento materno total (*full maternal behavior*) esteve prejudicado em ratas pertencentes ao grupo de maior dose, uma vez que a maioria das observações foram reduzidas neste grupo experimental.

Considerando o tempo para a recuperação dos filhotes, número de filhotes presentes no início da amamentação e o comportamento materno total, fica evidente que o tratamento com *S. brasiliensis* na dose de 9 mg/kg comprometeu o comportamento materno das ratas, reduzindo os cuidados da mãe em relação à prole. Estes achados podem estar relacionados com fatores hormonais, uma vez que, está comprovado que os hormônios são fundamentais para a presença do comportamento materno (RUSSEL *et al.*, 2001; NUMAM e INSEL, 2003; GIOVENARDI *et al.*, 2005) ou ainda, houve redução da responsividade materna aos estímulos provenientes dos filhotes, através de sons, sinais táteis e olfatórios (LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

Estudos sugerem que o cuidado materno contribui para a expressão da agressão materna (FERREIRA *et al.*, 2002). De fato, nossos resultados mostraram que a administração ao *S. brasiliensis*, além de afetar o comportamento materno, também causou prejuízo no comportamento materno agressivo de ratas expostas a 6 e 9 mg/kg. Ressalta-se que todas as ratas passaram pelo teste do campo aberto, antes de iniciar a avaliação do comportamento agressivo materno. Isso foi feito para avaliar emocionalidade e, ainda, sabe-se que a passagem prévia dos ratos no aparato reduz a ansiedade do animal quanto exposto a posterior análise comportamental (FLEMING e LUEBKE, 1981; PELLOW *et al.*, 1985). Assim, considerando, que não houve diferença entre os grupos no comportamento avaliado no campo aberto, pode-se concluir que não houve alteração na emocionalidade, bem como na atividade motora das ratas.

Fato curioso observado no comportamento agressivo materno, em particular, nas ratas que receberam a dose de 9 mg/kg, é que estas, gastaram mais tempo perseguindo o intruso, sendo que o contrário também foi observado, ou seja, o macho intruso apresentou maior frequência e tempo perseguindo estas ratas. Desta forma, nota-se que houve um interesse sexual de ambas as partes, especulando-se um possível cio pós-parto por parte das ratas que receberam a dose de 9 mg/kg de *S. brasiliensis*. Ainda, nesse contexto, alguns autores afirmam que a agressão materna emerge durante a gravidez, quando os filhotes não estão fisicamente presentes para prover estímulos sensoriais (MAYER e ROSENBLATT, 1987;

ALBERT *et al.*, 1988; ALBERT, JONIK e WALSH, 1992) sendo que nesse período, a influência parece ser provida por hormônios (MAYER e ROSENBLATT, 1987). Nesse sentido, novamente especula-se que o prejuízo de ambos os comportamentos, materno e materno agressivo, estejam relacionados com padrões hormonais.

Em relação à prole, no presente estudo observou-se que, ao nascer, o peso da ninhada de ratas expostas as doses de 6 e 9 mg/kg foi reduzido. Este efeito observado ao nascimento foi mantido durante a lactação e perdurou até a idade adulta, apenas em filhotes fêmeas e machos provenientes de ratas que receberam a maior dose de *S. brasiliensis*. Porém, o mesmo, não foi observado na prole de ratas que receberam a dose de 6 mg/kg, o que poderia indicar uma recuperação do dano sobre o peso dos animais.

Vários estudos mostraram que a desnutrição durante a gestação de ratas causa retardo no desenvolvimento fetal, caracterizado pelo baixo peso corpóreo ao nascimento e, em alguns casos, atraso no desenvolvimento físico (FLEEMAN *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2010). Nesse sentido, empregou-se, no presente trabalho, o grupo *pair-feeding* com o objetivo de verificar se as alterações observadas na prole foram provocadas pela administração de *S. brasiliensis* ou pela baixa ingestão alimentar. Nossos resultados mostraram que não houve alteração no peso da prole do grupo *pair-feeding*, indicando que apesar da menor ingestão alimentar, não observou-se redução do peso da prole ao nascimento, nem durante o decorrer da vida, sugerindo que a redução do peso corporal é consequência da toxicidade causada pela planta em estudo.

Estudos mostraram que a baixa ingestão calórica durante a gestação ou lactação podem acarretar atrasos ou adiantamento na manifestação de características físicas e reflexológicas da prole (CHIAVEGATTO, OLIVEIRA e BERNARDI, 1997; ZHANG *et al.*, 2010). No presente estudo, com exceção do andar adulto, todos os parâmetros do desenvolvimento físico mostraram-se prejudicados, ou seja, houve atraso destes, tanto na prole feminina quanto masculina, no que diz respeito ao desdobramento das orelhas (6 e 9 mg/kg), aparecimentos de pêlos e erupção dos dentes incisivos (9 mg/kg) e, ainda, para a abertura dos olhos em todos os grupos experimentais. Esses resultados evidenciam a toxicidade sobre esses parâmetros do desenvolvimento físico da prole exposta à planta durante a gestação,

descartando-se a hipótese de desnutrição, uma vez que os filhotes do grupo *pair-feeding* apresentaram desenvolvimento normal.

Ainda com relação a esses parâmetros do desenvolvimento físico, é importante ressaltar que o fator de crescimento epidérmico (EGF) está envolvido na manifestação desses parâmetros. De fato, estudos realizados em ratos e hamsters mostraram que a administração do EGF foi capaz de acelerar a abertura dos olhos e a erupção dos dentes incisivos, atrasar a abertura do conduto auditivo e da abertura vaginal (CALAMANDREI e ALLEVA, 1989; SMART *et al.*, 1989). Por outro lado, Hoat (1986) mostrou que o EGF em ratos foi capaz de atrasar o desdobramento das orelhas, a erupção dos dentes incisivos, bem como a abertura do canal auditivo; no entanto, neste mesmo estudo, adiantou a abertura dos olhos. Assim, pode-se especular que o *S. brasiliensis* causou algum dano direto ou indireto sobre o EGF, uma vez que este polipeptídeo pode tanto acelerar quanto atrasar o desenvolvimento físico.

No presente estudo, observou-se adiantamento da descida dos testículos (6 e 9 mg/kg) e atraso para abertura vaginal (9 mg/kg) dos animais expostos durante a gestação ao *S. brasiliensis*, sugerindo interferência na maturação sexual da prole, tanto masculina como feminina. Sabe-se que a maturação sexual em ratos machos é atingida em torno dos 18 dias de idade (portanto, ainda durante o período de lactação), enquanto a maturação sexual feminina é atingida um pouco mais tarde, em torno dos 30-37 dias de idade, havendo variação entre as diferentes linhagens.

Em relação à descida testicular, esta indica o início da puberdade em ratos machos, sendo que o adiantamento pode ser crítico para o processo normal de desenvolvimento da puberdade (SMART e DOBBING, 1971), pois a maturação sexual em ratos machos resulta de um complexo de interações entre o hipotálamo, pituitária anterior e órgãos sexuais secundários (SMITH, DAMASSA e DAVIDSON, 1977). Alterações nesse conjunto de fatores podem ter contribuído para o adiantamento da descida dos testículos da prole proveniente de ratas exposta ao *S. brasiliensis* durante a gestação.

Da mesma forma que ocorre nos machos, o desenvolvimento sexual feminino é um processo complexo e multifatorial, pois engloba uma cascata de eventos regulados pelos hormônios do eixo hipotalâmico-pituitário. Em ratas, ao redor do DPN 30 ocorre a retro-alimentação positiva do estradiol, o que estimula a liberação do hormônio luteinizante (LH), culminando na abertura da vagina e na

primeira ovulação (ANDREWS, MIZEJEWSKI e OJEDA, 1981; KAWAGOE e HIROI, 1983; GOLDMAN *et al.*, 2000). Fatores de crescimento, como o TGF- α (fator de crescimento transformador- α), EGF (fator de crescimento epidérmico) e o IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina), também parecem desempenhar importante papel na determinação da puberdade em ratas (GOLDMAN *et al.*, 2000). Além disso, sabe-se que a redução no ganho de peso corpóreo durante o desenvolvimento pós-natal causa atraso para abertura vaginal (GOLDMAN *et al.*, 2000). Assim, o atraso para abertura vaginal observado no presente estudo pode ser atribuído a um ou há mais de um desses eventos.

Nesse momento, vale a pena lembrar que o CM é crucial para modular a aprendizagem e o desenvolvimento normal do filhote, assim, no presente estudo, o prejuízo observado no comportamento materno pode ter contribuído para o atraso do desenvolvimento ponderal e físico da prole exposta prenatalmente ao *S. brasiliensis*.

O comportamento de preensão palmar em seres humanos (Reflexo de Babinski) foi descrito pela primeira vez na década de 60 (LENARD, VON BERNUTH e PRECHTL, 1968) e desde então, o ato de estimular a planta palmar de um lactente esperando que ele flexione os dedos tornou-se uma rotina comum para verificação de danos neurológicos (GLICK, 2005). Esse reflexo primitivo é originado no tronco cerebral e suprimido pelo processo de mielinização dos centros superiores do sistema nervoso central (CAPUTE e ACCARDO, 1996). A ausência de preensão, preensão insuficiente, exagerada ou persistente além dos seis meses de idade da criança, são indesejáveis e podem indicar distúrbio do desenvolvimento (BRAZELTON e NUGENT, 1984). Além disso, pode ocorrer desordens do sistema nervoso central, as quais podem se manifestar no decorrer da vida (ALLIN *et al.*, 2006). Nossos resultados mostraram preensão palmar persistente, tanto da prole masculina, quanto feminina proveniente de ratas do grupo 9 mg/kg, sugerindo que a exposição perinatal ao *S. brasiliensis* causou danos neurológicos.

Os testes reflexológicos, como o reflexo de endireitamento postural e o de geoataxia negativa, são testes que refletem a maturação do sistema vestibular e do cerebelo (CHIAVEGATTO, OLIVEIRA e BERNARDI, 1997; ZHANG *et al.*, 2010). Em particular, a regulação da postura envolve três sistemas periféricos, o sistema vestibular, o exteroceptivo e o proprioceptivo, além da participação dos estímulos do sistema visual para obtenção da postura. No presente estudo, a prole feminina

exposta pré-natalmente a maior dose de *S. brasiliensis* mostrou atraso para o aparecimento do reflexo de endireitamento postural, indicando, dessa forma, retardo para a maturação destes sistemas.

Além de avaliar a função do sistema vestibular, o teste de geoataxia negativa também é empregado principalmente para monitorar a função do sistema proprioceptivo (MOTZ e ALBERTS, 2005; SECHER *et al.*, 2006). No presente estudo, houve atraso para o início deste reflexo na prole masculina e feminina exposta pré-natalmente a maior dose de *S. brasiliensis*, evidenciando, assim, novamente retardo não só para maturação do sistema vestibular, como também do sistema proprioceptivo destes animais.

O reflexo de sobressalto ocorre concomitantemente com a abertura do conduto auditivo, parâmetro este indicativo do início da percepção de sons do ambiente. Este reflexo é uma resposta natural de defesa que ocorre em resposta a um estímulo intenso e inesperado, que pode ser auditivo, visual ou tátil (HOFFMAN e ISON, 1980). No presente estudo, observou-se atraso para o início do reflexo de sobressalto, tanto nos machos, quanto nas fêmeas provenientes de ratas que receberam as doses 6 e 9 mg/kg de *S. brasiliensis*. Mais uma vez, pode-se especular sobre a importância do EGF, que administrado a ratos recém-nascidos, atrasa a abertura do conduto auditivo (HOATH, 1986).

A avaliação neurocomportamental da prole tanto na infância como na idade adulta é importante para o estudo dos efeitos nocivos provocados por diferentes agentes tóxicos com ação no sistema nervoso central. Nesse sentido, um dos modelos comportamentais bastante utilizado em roedores, até os dias de hoje, é o teste do campo-aberto. Este aparato foi descrito originalmente na década de 30 para avaliar efeitos de ambientes não familiares sobre reações emocionais de ratos (HALL, 1936). Nos dias de hoje é considerado um indicador de exploração do animal perante o ambiente, sendo também utilizado para refletir o estado emocional do animal. Dependendo do nível de exploração, o campo aberto é um modelo exploratório no qual pode ser observado: ansiedade, quando os estímulos ansiogênicos são suficientes para indicar perigo; exploração, caso os estímulos ansiogênicos não sejam excessivos a ponto de inibir o comportamento do animal; e, por fim, atividade locomotora, quando a arena deixa de ser novidade (ARCHER, 1973; BELZUNG, 2001).

No presente estudo, foi observado aumento da atividade motora da prole masculina proveniente de ratas que receberam a maior dose de *S. brasiliensis*. Estes resultados indicam que houve aumento da atividade exploratória e, conseqüentemente, uma redução da ansiedade destes animais.

Outro modelo comportamental bastante utilizado em psicofarmacologia é o labirinto em cruz elevado. Esse modelo de comportamento tem sido utilizado para estudar o efeito ansiolítico ou ansiogênico de novos fármacos (PELLOW *et al.*, 1985; DAWSON e TRICKLEBANK, 1995). O teste surgiu de estudos realizados nos anos 50 e a proposta inicial é que ambientes novos evocam curiosidade e medo, evidenciando um conflito de aproximação/esquiva (MONTGOMERY, 1952). Mais tarde, Pelow *et al.* (1985) adaptaram o modelo para ratos, sendo este, usado até os dias de hoje. Ensaio farmacológico mostraram que a administração de agentes ansiolíticos produz aumento na exploração dos braços abertos, indicando diminuição dos níveis de ansiedade do animal (PELLOW *et al.*, 1985). No presente estudo, foi verificado na prole masculina proveniente da dose de 9 mg/kg aumento do número de entradas e do tempo gasto nos braços abertos do labirinto, indicando redução nos níveis de ansiedade e, dessa forma, corroborando com o resultado encontrado no teste do campo aberto.

O teste da interação social assume que o comportamento do rato, em situações de ansiedade, acarreta diminuição da interação com animais da mesma espécie, ou seja, é mais um modelo utilizado para avaliar o estado emocional do animal (FILE, ZANGROSSI JR e ANDREWS, 1993; FILE e SETH, 2003). No presente estudo, esse teste não foi capaz de mostrar diferenças entre os grupos.

O teste da natação forçada, também conhecido como desespero comportamental prediz que no início do teste, o rato tenta escapar do cilindro com água (nado ou escalada), mas após um certo tempo, o animal desenvolve uma postura quase imóvel. Esse comportamento de imobilidade refletiria um fracasso na tentativa de escapar do estímulo estressante, equivalendo ao retardo psicomotor observado em muitos seres humanos deprimidos (WILLNER, 1984).

No presente estudo, no teste de natação forçada, observou-se diminuição significativa no tempo de natação da prole masculina advinda das doses de 6 e 9 mg/kg, porém sem alteração no tempo de imobilidade. Além disso, houve aumento no tempo de escalada da prole feminina advinda da maior dose. Esses achados podem estar relacionados com a participação dos sistemas serotoninérgicos e

noradrenérgicos centrais, uma vez que estudos mostraram que esse modelo permite a diferenciação entre drogas que atuam nos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico (DETKE, RICKELS e LUCKI, 1995; LUCKI, 1997; CRYAN, PAGE e LUCKI, 2002). De fato, sabe-se que tanto as drogas noradrenérgicas como as dopaminérgicas diminuem o tempo de imobilidade, aumentando o comportamento de escalada, enquanto as drogas serotoninérgicas diminuem a imobilidade, aumentando o comportamento de natação (DETKE, RICKELS e LUCKI, 1995; LUCKI, 1997; PAGE *et al.*, 1999). Nesse sentido é possível especular que a exposição pré-natal a planta possa ter provocado alguma alteração nos sistemas noradrenérgico e/ou dopaminérgico centrais da prole adulta adulta.

A catatonia promovida pela administração de haloperidol tem sido utilizada como modelo para avaliar as alterações psicomotoras que ocorrem na doença de Parkinson e na esquizofrenia, revelando a participação de sistemas dopaminérgicos centrais (HOFFMAN e DONOVAN, 1995; FIELD, WHISHAW e PELLIS, 2000; BANASIKOWSKI e BENINGER, 2012). No presente estudo, o ensaio da catatonia induzido pelo haloperidol, um bloqueador dopaminérgico, não mostrou diferença significativa entre diferentes os grupos analisados.

O comportamento estereotipado consiste em movimentos repetidos, sem variações e aparentemente sem objetivo. A apomorfina, um agonista dopaminérgico, é utilizada como modelo de indução do comportamento estereotipado (ESTRELLA, BREGONZIO e CABRERA, 2002; MOORE e GRACE, 2002). Logo, este modelo comportamental é utilizado para avaliar a integridade do sistema dopaminérgico, em particular, o nigro-estriatal. Os resultados obtidos mostraram aumento no tempo de estereotipia na prole feminina proveniente de ratas que receberam a maior dose de *S. brasiliensis*, corroborando com os achados do teste de natação forçada, que sugere o envolvimento do sistema dopaminérgico.

Com relação aos achados hematológicos encontrados no presente estudo, embora a análise estatística tenha apontado diferenças significantes entre os grupos, estes valores encontram-se dentro da variação fisiológica da espécie (SHARP e LAREGINA, 1998). Além disso, um estudo realizado com o objetivo de comparar achados hematológicos de diferentes centros de pesquisa, mostrou o quão grande é a variação destes parâmetros em ratos wistar (CARVALHO *et al.*, 2008), o que dificulta maiores especulações deste achado.

No estudo bioquímico, notou-se aumento significativo da enzima ALT em ratos machos provenientes da dose de 9 mg/kg. É importante salientar que a ALT é uma enzima específica para dosar dano hepático em ratos, enquanto a AST não é específica e apresenta pouco valor diagnóstico nesta espécie (SHARP e LAREGINA, 1998). Com relação aos demais parâmetros bioquímicos analisados, não foram encontradas diferenças significantes, ressaltando que os achados em relação a ALT estão dentro da variação fisiológica para esta enzima em ratos (SHARP e LAREGINA, 1998), descartando, assim, a hipótese de ocorrência de lesão hepática característica da intoxicação por APs.

Na avaliação histológica do fígado da prole adulta não foram observadas alterações características da intoxicação por APs. Por outro lado, observou-se no fígado aumento de células multinucleadas em ratos provenientes dos grupos de 6 e 9 mg/kg. Esse achado, pode ser explicado, em parte, devido a alta reatividade nucleofílica dos pirróis com o DNA, o que resulta numa ligação com o DNA e/ou ligação cruzada (DNA-DNA e DNA-proteína) (KIM *et al.*, 1993; FU *et al.*, 2002; CHEN, MEI e FU, 2010; 2012); isto pode facilmente levar uma célula a atingir um estado anti-mitótico. Além disso, já foi demonstrado que a administração *in vivo* de integerrimina induziu efeito antimitótico em hepatócitos (NARDI, GIMMLER e LEITE, 1980), enquanto a análise do ciclo celular de linfócitos *in vitro* com integerrimina N-óxido causou parada em G1 e, conseqüentemente, redução no percentual da células na fase S (ELIAS *et al.*, 2011). Dessa forma, fica evidente que a integerrimina interfere no ciclo celular, gerando uma disfunção na divisão celular, fato este, que pode ter culminado no aumento de células multinucleadas observadas na prole adulta de ratas que receberam *S. brasiliensis* durante a gestação.

A análise dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no cérebro da prole adulta mostrou alterações apenas no estriato, não havendo relação dose-efeito. De fato, observou-se decréscimo dos níveis de DA, seguido de aumento de seus metabólitos (DOPAC e HVA), com aumento dos níveis de 5-HT e seu metabólito (5-HIAA) estriatal em ratos provenientes da dose de 6 mg/kg. Com relação a dopamina, sabe-se que esse neurotransmissor é metabolizado pela monoaminoxidase (MAO) e pela catecolamina O-metiltransferase (COMT), tendo como principais produtos de degradação o ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA) (RANG *et al.*, 2004). A redução dos níveis de DA e o aumento dos seus metabólitos pode sugerir aumento da atividade do sistema

dopaminérgico estriatal. Esses dados podem indicar interferência na integridade desse sistema em animais expostos durante a gestação ao *S. brasiliensis*, um vez que, houve alterações no comportamento estereotipado. Com relação a serotonina, vale lembrar, que este neurotransmissor está relacionado com a ansiedade e a depressão (GRAEFF *et al.*, 1996; BARNES e SHARP, 1999; CANNIZZARO *et al.*, 2008; SOLATI, SALARI e BAKHTIARI, 2011). No presente estudo, animais do grupo de 9 mg/kg mostraram-se menos ansiosos no teste do campo aberto e do labirinto em cruz elevado, no entanto, sem alterações nos níveis de serotonina nesta dose. Assim, a avaliação dos níveis dos neurotransmissores e seus respectivos metabólitos nas diferentes áreas estudadas do sistema nervoso central da prole adulta exposta prenatalmente ao *S. brasiliensis* indicam algum comprometimento dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico estriatais em animais pertencentes ao grupo da dose de 6 mg/kg.

Finalmente, tomando-se os resultados em conjunto, observou-se que a administração de diferentes doses de *S. brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação, provocou toxicidade materna e danos na prole desde o nascimento até a idade adulta.

6 CONCLUSÕES

Os estudos realizados mostraram que:

- A administração de diferentes doses de *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação, provocou toxicidade materna dose-dependente, avaliada pelas alterações do ganho de peso, consumo hídrico e de ração, bem como, pela alteração do peso dos pulmões e rins e aumento de células multinucleadas nos hepatócitos,
- A exposição materna ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação, causou prejuízo no comportamento materno e materno agressivo;
- A exposição ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação, promoveu dano no desenvolvimento ponderal da prole, através da redução do peso corpóreo até a idade adulta, tanto da prole feminina quanto masculina proveniente da dose de 9 mg/kg;
- A exposição ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação, causou danos no desenvolvimento físico evidenciado principalmente na prole (masculina e feminina) advinda da dose de 9 mg/kg através do atraso para o desdobramento das orelhas, para o aparecimento de pêlos, para a erupção dos dentes incisivos, para a abertura dos olhos e abertura vaginal, além do adiantamento da descida dos testículos; além disso, nos parâmetros do desenvolvimento reflexológico promoveu atraso para a perda da preensão palmar, para o início do endireitamento postural, geoataxia negativa e do reflexo de sobressalto;
- A avaliação comportamental da prole adulta de ratos provenientes de mães expostas ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação, mostrou aumento da atividade motora no campo aberto, aumento na frequência de entrada e no tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado na prole masculina advinda da dose de 9 mg/kg; no teste de natação forçada observou-se aumento no tempo de escalada (prole feminina advinda da dose de 9 mg/kg) e diminuição no tempo de natação (prole masculina advinda das doses de 6mg/kg e 9 mg/kg); ainda

no comportamento estereotipado notou-se aumento deste parâmetro na prole feminina pertencente ao maior dose;

- A exposição materna ao *Senecio brasiliensis* do 6º ao 20º dia de gestação, causou alteração bioquímica (prole masculina advinda da dose de 9 mg/kg) e hematológica (na prole feminina nas 3 doses estudadas e masculina na maior dose) porém, estes achados estão dentro da variabilidade da espécie em estudo, além disso, provocou alterações nos níveis de neurotransmissores no estriato (dose de 6 mg/kg) e aumento de células multinucleadas no fígado (doses de 6mg/kg e 9mg/kg).

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, J.J. Prenatal exposure to teratogenic agents and neurodevelopmental outcome. **Birth Defects Original Article Series**, v.25, p.63-72, 1989.

ALBERT, D.J.; DYSON, E.M.; PETROVIC, D.M. e WALSH, M.L. Activation of aggression in female rats by normal males and by castrated males with testosterone implants. **Physiology & Behavior**, v.44, p.9-13, 1988.

ALBERT, D.J.; JONIK, R.H. e WALSH, M.L. Hormone-dependent aggression in male and female rats: Experiential, hormonal, and neural foundations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.16, p.177-192, 1992.

ALLIN, M.; ROONEY, M.; GRIFFITHS, T.; CUDDY, M.; WYATT, J.; RIFKIN, L. e MURRAY, R. Neurological abnormalities in young adults born preterm. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v.77, p.495-499, 2006.

ANDREWS, W.W.; MIZEJEWSKI, G. J. e OJEDA, S.R. Development of Estradiol-Positive Feedback on Luteinizing Hormone Release in the Female Rat: A Quantitative Study. **Endocrinology**, v.109, p.1404-1413, 1981.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v.21, p.205-235, 1973.

BANASIKOWSKI, T.J. e BENINGER, R.J. Haloperidol conditioned catalepsy in rats: a possible role for D1-like receptors. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.1, p.1-10, 2012.

BARNES, N.M. e SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v.38, p.1083-1152, 1999.

BARROS, C.L.S.; CASTILHOS, L.M.L.; RISSI, D.R.; KOMMERS, G.D. e RECH, R.R. Biópsia hepática no diagnóstico da intoxicação por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.53-60, 2007.

BARROS, C.L.S.; METZDORF, L.L. e PEIXOTO, P.V. Ocorrência de surtos de Intoxicação por *Senecio* spp (compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. . **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, p.101 - 107, 1987.

BARROS, C.S.L.; METZDORF, L.L.; SANTOS, M.N.; BARROS, S.S. e PEIXOTO, P.V. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.4, p.55 - 67., 1989.

BARROS, S.B.M. e SOLANGE, C.M. Avaliação da Toxicidade. . In: Atheneu, E. S. P. L. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo, 1996. p.59 -70.

BASILE, R.J.; DINIZ, F.M.J.; OKANO, W.; CIRIO, M.S. e LEITE, C.L. Intoxicação por *Senecio* spp. (Compositae) em bovinos no sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.63 - 68, 2005.

BELZUNG, C. Rodent models of anxiety-like behaviors: are they predictive for compounds acting via non-benzodiazepine mechanisms? **Current Opinion in Investigational Drugs** v.2, p.1108-1111, 2001.

BELZUNG, C.; W. E. CRUSIO e R. T. GERLAI. Chapter 4.11 Measuring rodent exploratory behavior. In: **Techniques in the Behavioral and Neural Sciences**. Elsevier, 1999. v.13, p.738-749.

BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: Spinosa, H. S., Górnaiak, S.L., Bernardi, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.781-788.

BRAZELTON, T.B. e NUGENT, J.K. **Neonatal Behavior Assessment Scale**. London: Cambridge University Press, 1984.

CABRERA, A.L. e KLEIN, R.M. **Compostas 2, tribo: Senecioneae**. Itajaí: 1975.

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

CANNIZZARO, C.; PLESCIA, F.; GAGLIANO, M.; CANNIZZARO, G.; MANTIA, G.; LA BARBERA, M.; PROVENZANO, G. e CANNIZZARO, E. Perinatal exposure to 5-metoxtryptamine, behavioural-stress reactivity and functional response of 5-HT1A receptors in the adolescent rat. **Behavioural Brain Research**, v.186, p.98-106, 2008.

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

CARLINI, A.L. **Farmacologia prática sem aparelhagem**. São Paulo: Sarvier, 1973. p.167-172

CARVALHO, G.D.; MASSENO-BATISTA, A.P.; ZANINI, M.S.; PORFÍRIO, L.C.; MACHADO, J.P. e MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, 2008.

CARVALHO, G.S.T. e MAUGÉ, G.C. Ação tóxica de *Senecio brasiliensis* Lessing, fam. Compositae. . **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo**, v.3, p.131 - 136, 1946.

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

CHEEKE, P.R. Toxicity an metabolism of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Animal Science**, v.66, p.2343 - 2350, 1988.

CHEEKE, P.R. A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxication os poisonous plants, with special reference to pirrolizidine alkaloids. **Veterinary and Human Toxicology** v.36, p.240 - 247, 1994.

CHEN, T.; MEI, N. e FU, P.P. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Applied Toxicology**, v.30, p.183-196, 2010.

CHEN, T.; MEI, N. e FU, P.P. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Applied Toxicology**, v.30, p.183-196, 2012.

CHIAVEGATTO, S.; OLIVEIRA, C.A. e BERNARDI, M.M. Prenatal Exposure of Rats to Diphenhydramine: Effects on Physical Development, Open Field, and Gonadal Hormone Levels in Adults. **Neurotoxicology and Teratology**, v.19, p.511-516, 1997.

CORRÊA, P. Dicionário das Plantas do Brasil e das Exóticas Cultivadas. **Ministério da Agricultura**, v.1, p.95-96, 1984.

CRAIG, A.M.; LATHAM, C.J.; BLYTHE, L.L.; SCHMOTZER, W.B. e O`CONNOR, O.O. Metabolism of toxic pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) in ovine ruminal fluid under anaerobic conditions. **Applied and Environemtal Microbiology**, v.58, p.2730 - 2736, 1992.

CRAIG, A.M.; PEARSON, E.G.; MEYER, C. e SCHMIT, J.A. Serum liver enzyme and histopathologic changes in calves with chronic and chronic-delayed *Senecio jacobaea* toxicosis. . **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.1969 - 1978, 1991.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A. e LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.23, p.238-245, 2002.

CRYAN, J.F.; PAGE, M.E. e LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. **European Journal of Pharmacology**, v.436, p.197-205, 2002.

CURIAL, O. e GUIMARÃES, J.P. Cirrose hepática enzoótica no cavalo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.56, p.635-643, 1958.

DAVIES, J.A.; JACKSON, B. e REDFERN, P.H. The effect of amantadine, L-DOPA, (+)-amphetamine and apomorphine on the acquisition of the conditioned avoidance response. **Neuropharmacology**, v.13, p.199-204, 1974.

DAWSON, G.R. e TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.16, p.33-36, 1995.

DETKE, M.; RICKELS, M. e LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v.121, p.66-72, 1995.

DICKINSON, J.O.; COOKE, M.P. e MOHAMED, P.A. Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.169, p.1192 - 1196, 1976.

ELIAS, F.; LATORRE, A.O.; PĂPOLE, F.; HARAGUCHI, M.; GĂRNIAC, S.L. e HUEZA, I.M. Haematological and immunological effects of repeated dose exposure of rats to integerrimine N-oxide from *Senecio brasiliensis*. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.2313-2319, 2011.

EMA, M.; ISE, R.; KATO, H.; ONEDA, S.; HIROSE, A.; HIRATA-KOIZUMI, M.; SINGH, A.V.; KNUDSEN, T.B. e IHARA, T. Fetal malformations and early embryonic gene expression response in cynomolgus monkeys maternally exposed to thalidomide. **Reproductive Toxicology**, v.29, p.49-56, 2010.

EPA, U.S. Guideline for Reproductive Toxicity Risk Assessment. U.S Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum. Washington, DC. EPA/630/R-96/009 1996.

ESTRELLA, C.R.; BREGONZIO, C. e CABRERA, R.J. Differential responses in central dopaminergic activity induced by apomorphine in IPL nude rat. **Behavioural Brain Research**, v.133, p.143-148, 2002.

FELICIO, L.F.; FLORIO, J.C.; SIDER, L.H.; CRUZ-CASALLAS, P.E. e BRIDGES, R.S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Research Bulletin**, v.40, p.253-256, 1996.

FERREIRA, A.; PEREIRA, M.; AGRATI, D.; URIARTE, N. e FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiology and Behavior**, v.77, p.197-204, 2002.

FIELD, E.F.; WHISHAW, I.Q. e PELLIS, S.M. Sex differences in catalepsy: evidence for hormone-dependent postural mechanisms in haloperidol-treated rats. **Behavioural Brain Research**, v.109, p.207-212, 2000.

FILE, S.E. e PELOW, S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. **British Journal of Pharmacology**, v.86, p.729-735, 1985.

FILE, S.E. e SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p.35-53, 2003.

FILE, S.E.; ZANGROSSI JR, H. e ANDREWS, N. Social interaction and elevated plus-maze tests: Changes in release and uptake of 5-HT and GABA. **Neuropharmacology**, v.32, p.217-221, 1993.

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

FLEMING, A.S. e LUEBKE, C. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: Emotionality differences between nulliparous and parturient females. **Physiology and Behavior**, v.27, p.863-868, 1981.

FU, P.P.; XIA, Q.; LIN, G. e CHOU, W.M. Genotoxic Pyrrolizidine Alkaloids - Mechanisms Leading to DNA Adduct Formation and Tumorigenicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v.3, p.948 - 964, 2002.

GAMMIE, S.C. Current Models and Future Directions for Understanding the Neural Circuitries of Maternal Behaviors in Rodents. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, v.4, p.119-135, 2005.

GAVA, A. e BARROS, S.L.C. Senecio spp. Poisoning of horses in south Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, p.36 - 40, 1997.

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

GLICK, T.H. Toward a more efficient and effective neurologic examination for the 21st century*. **European Journal of Neurology**, v.12, p.994-997, 2005.

GOLDMAN, J.M.; LAWS, S.C.; BALCHAK, S.K.; COOPER, R.L. e KAVLOCK, R.J. Endocrine-Disrupting Chemicals: Prepubertal Exposures and Effects on Sexual Maturation and Thyroid Activity in the Female Rat. A Focus on the EDSTAC Recommendations. **Critical Reviews in Toxicology**, v.30, p.135-196, 2000.

GOLDMAN, W.P.; BATY, J.D.; BUCKLES, V.D.; SAHRMANN, S. e MORRIS, J.C. Cognitive and motor functioning in parkinson disease: Subjects with and without questionable dementia. **Archives of Neurology**, v.55, p.674-680, 1998.

GÓRNIK, S.L.; SPINOSA, H.S. e BERNARDI, M.M. Toxicologia do desenvolvimento. In: Spinosa, H. S., Górnika, S.L., Palermo-Neto, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. Barueri: Manole, 2008. p.701-731.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S.; DE ANDRADE, T.G.C.S. e DEAKIN, J.F.W. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.54, p.129-141, 1996.

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

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

HANSEN, W.F. e YANKOWITZ, J. Pharmacologic Therapy for Medical Disorders During Pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.45, p.136-152, 2002.

HIND, D.J.N. A checklist of the Brazilian Senecioneae (Compositae). **Kew Bulletin**, v.48, 1993.

HIRSCHMANN, G.S.; FERRO, E.A.; FRANCO, L.; RECALDE, L. e THEODULOZ, C. Pyrrolizidine Alkaloids from *Senecio brasiliensis* Populations. **Journal of Natural Products**, v.50, p.770-772, 1987.

HOATH, S.B. Treatment of the Neonatal Rat with Epidermal Growth Factor: Differences in Time and Organ Response. **Pediatric Research**, v.20, p.468-472, 1986.

HOFFMAN, D. e DONOVAN, H. Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability. **Psychopharmacology**, v.120, p.128-133, 1995.

HOFFMAN, H.S. e ISON, J.R. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychological Review**, v.87, p.175-89, 1980.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.54, p.21-30, 1996.

HOLLIDAY, R. The possibility of epigenetic transmission of defects induced by teratogens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.422, p.203-205, 1998.

HOOGENBOOM, L.A.P.; MULDER, P.P.J.; ZEILMAKER, M.J.; VAN DEN TOP, H.J.; REMMELINK, G.J.; BRANDON, E.F.A.; KLIJNSTRA, M.; MEIJER, G.A.L.; SCHOTHORST, R. e VAN EGMOND, H.P. Carry-over of pyrrolizidine alkaloids from feed to milk in dairy cows. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.28, p.359-372, 2011.

HUAN, J.-Y.; MIRANDA, C.L.; BUHLER, D.R. e CHEEKE, P.R. Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. **Toxicology Letters**, v.99, p.127-137, 1998.

HUNTINGFORD, F.A. Animals fight but do not make war. In: In: Groebel J, H. R. A. **Aggression and war – their biological and social bases**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

HUXTABLE, R.J. Human embryotoxicity of pyrrolizidine-containing drugs. **Hepatology**, v.9, p.510-511, 1989.

ICHIHARA, K.; NABESHIMA, T. e KAMEYAMA, T. Opposite effects induced by low and high doses of apomorphine on single-trial passive avoidance learning in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.30, p.107-113, 1988.

ILHA, M.R.S.; LORETTI, A.P.; BARROS, S.S. e BARROS, C.S.L. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.123-138, 2001.

KARAM, F.S.C.; CARMEN MÉNDEZ, M.D.; JARENKOW, J.A. e RIET-CORREA, F. Fenologia de quatro espécies tóxicas de *Senecio* (Asteraceae) na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.33-39, 2002.

KARAM, F.S.C. e MOTTA, A.C. Pyrrolizidine alkaloid poisoning in cattle in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. In: **Poisoning by plants, mycotoxins and related toxins**. Wallingford: CAB, 2011. p.175-178.

KARAM, F.S.C.; SOARES, M.P.; HARAGUCHI, M.; RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M.D.C. e JARENKOW, J.A. Aspectos epidemiológicos da seneciose na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, p.191-198, 2004.

KAWAGOE, S. e HIROI, M. Maturation of Negative and Positive Estrogen Feedback in the Prepubertal Female Rat. **Endocrinologia Japonica**, v.30, p.435-441, 1983.

KIM, H.-Y.; STERMITZ, F.R. e COULOMBE, R.A. Pyrrolizidine alkaloid-induced DNA-protein cross-links. **Carcinogenesis**, v.16, p.2691-2697, 1995.

KIM, H.Y.; STERMITZ, F.R.; MOLYNEUX, R.J.; WILSON, D.W.; TAYLOR, D. e COULOMBE, R.A. Structural Influences on Pyrrolizidine Alkaloid-Induced Cytopathology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.122, p.61-69, 1993.

LEMONICA, I.P. Toxicologia da reprodução. In: Oga. S., C., M.M.A., Batistuzzo, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. p.101-113.

LENARD, H.G.; VON BERNUTH, H. e PRECHTL, H.F.R. REFLEXES AND THEIR RELATIONSHIP TO BEHAVIOURAL STATE IN THE NEWBORN. **Acta Paediatrica**, v.57, p.177-185, 1968.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v.92, p.180-185, 1987.

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

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

LUCENA, R.B.; PIEREZAN, F.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; FIGHERA, R.A. e BARROS, C.L.S. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos¹. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.428-434, 2010.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioural Pharmacology**, v.8, p.523-532, 1997.

MACEL, M.; VRIELING, K. e KLINKHAMER, P.G.L. Variation in pyrrolizidine alkaloid patterns of *Senecio jacobaea*. **Phytochemistry**, v.65, p.865-873, 2004.

MACLACHLAN, N.J. e CULLEN, J.M. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: Carlton, W. W. e M. D. E. McGavin **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. Porto Alegre, 1998. p.95 - 131.

MANN, P.E. Finasteride delays the onset of maternal behavior in primigravid rats. **Physiology & Behavior**, v.88, p.333-338, 2006.

MATTOCKS, A.R. Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids. **Nature**, v.217, p.723-728, 1968.

MATTOCKS, A.R.; DRIVER, H.E.; BARBOUR, R.H. e ROBINS, D.J. Metabolism and toxicity of synthetic analogues of macrocyclic diester pyrrolizidine alkaloids. **Chemico-Biological Interactions**, v.58, p.95-108, 1986.

MAYER, A.D. e ROSENBLATT, J.S. Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. **Hormones and Behavior**, v.21, p.253-267, 1987.

MEDEIROS, R.M.T.D.; GÓRNIK, S.L. e GUERRA, J.L. Effects of milk from goat fed *Crotalaria spectabilis* seeds on growing rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, p.97-100, 1999.

MÉNDEZ, M.C. Intoxicação por *Senecio* spp. In: Riet-Correa, F., M. C. Méndez, *et al* **Intoxicações por Plantas e Micotoxinas em Animais Domésticos**. Pelotas: Editora Hemisfério Sul do Brasil, 1993. p.340.

MÉNDEZ, M.C. e RIET-CORREA, F. Plantas hepatotóxicas. In: Méndez, M. C. e F. Riet-Correa **Plantas Tóxicas e Micotoxinas**. Pelotas, 2000.

MÉNDEZ, M.C. e RIET-CORREA, F. **Plantas tóxicas e micotoxinas**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 2008. p.298

MENDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. e MARTZ, W. Intoxicação experimental por cinco espécies de *Senecio* em bovinos e aves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.10, p.63-69, 1990.

MOLYNEUX, R.J. e JAMES, L.F. Pyrrolizidine alkaloids in milk: thresholds of intoxication. **Veterinary and Human Toxicology**, v.32, p.94-110, 1990.

MONTGOMERY, K.C. Exploratory behavior and its relation to spontaneous alternation in a series of maze exposures. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.45, p.50-57, 1952.

MONTIDOME, M. e FERREIRA, P.C. Alcaloides do genus *Senecio*. **Revista Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.4, 1966.

MOORE, H. e GRACE, A.A. A role for electronic coupling in the striatum in the expression of dopamine receptor-mediated stereotypies. **Neuropsychopharmacology**, v.27, p.980-992, 2002.

MOTZ, B.A. e ALBERTS, J.R. The validity and utility of geotaxis in young rodents. **Neurotoxicology and Teratology**, v.27, p.529-533, 2005.

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

NARDI, N.B.; GIMMLER, M.C. e LEITE, B.G. Antimitotic action of integerrimine in rats. **Brazilian Journal of Genetics**, v.3, p.387-393, 1980.

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

OTTONI, E. EthoLog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, v.32, p.446-449, 2000.

PAGE, M.E.; DETKE, M.J.; DALVI, A.; KIRBY, L.G. e LUCKI, I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology**, v.147, p.162-167, 1999.

PAN, L.C.; WILSON, D.W.; LAME, M.W.; JONES, A.D. e SEGALL, H.J. COR Pulmonale Is Caused by Monocrotaline and Dehydromonocrotaline, but Not by Glutathione or Cysteine Conjugates of Dihydropyrrolizine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.118, p.87-97, 1993.

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

PILATI, C. e BARROS, C.S.L. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Asteracea) em eqüinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.287-296, 2007.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M. e JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v.266, p.730-732, 1977.

PRAKASH, A.S.; PEREIRA, T.N.; REILLY, P.E.B. e SEAWRIGHT, A.A. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.443, p.53-67, 1999.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. e HINCHCLIFF, K.W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças de bovinos,ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. . Rio de Janeiro: 2002.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. e MOORE, P.K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p.904

RASENACK, R.; MÜLLER, C.P.; KLEINSCHMIDT, M.; RASENACK, J. e WIEDENFELD, H. Veno-occlusive disease in a fetus caused by pyrrolizidine alkaloids of food origin. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v.18, p.223-225, 2003.

RIET-CORREA, F. e MEDEIROS, R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.38-42, 2001.

RISSI, D.R.; RECH, R.R.; PIEREZAN, F.; GABRIEL, A.L.; TROST, M.E.; BRUM, J.S.; KOMMERS, G.D. e BARROS, C.S.L. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.261-268, 2007.

ROGERS, J.F.; THOMPSON, S.J.; ADDY, C.L.; MCKEOWN, R.E.; COWEN, D.J. e DECOUFLAË, P. Association of Very Low Birth Weight with Exposures to Environmental Sulfur Dioxide and Total Suspended Particulates. **American Journal of Epidemiology**, v.151, p.602-613, 2000.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrônicos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantã**, v.20, p.315-328, 1947.

ROULET, M.; LAURINI, R.; RIVIER, R. e CALAME, A. Hepatic veno-occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. **Journal of Pediatrics**, v.112, p.433 - 436, 1988.

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

RUTLEDGE, J.C. Developmental toxicity induced during early stages of mammalian embryogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.396, p.113-127, 1997.

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

SANBERG, P.R.; BUNSEY, M.D.; GIORDANO, M. e NORMAN, A.B. The catalepsy test: Its ups and downs. **Behavioral Neuroscience**, v.102, p.748-759, 1988.

SANTOS-MELLO, R.; DEIMLING, L.I.; LAUER JÚNIOR, C.M. e ALMEIDA, A. Induction of micronuclei by alkaloids extracted from *Senecio brasiliensis* and stored for 23 years. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.516, p.23-28, 2002.

SANTOS, J.C.A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S.V.D. e BARROS, C.S.L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas

hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.1-14, 2008.

SECHER, T.; NOVITSKAIA, V.; BEREZIN, V.; BOCK, E.; GLENTHÄ, J. B. e KLEMENTIEV, B. A neural cell adhesion molecule derived fibroblast growth factor receptor agonist, the FGL-peptide, promotes early postnatal sensorimotor development and enhances social memory retention. **Neuroscience**, v.141, p.1289-1299, 2006.

SETLER, P.; SARAU, H. e MCKENZIE, G. Differential attenuation of some effects of haloperidol in rats given scopolamine. **European Journal of Pharmacology**, v.39, p.117-126, 1976.

SHARP, P.E. e LAREGINA, M.C. **The laboratory Rat**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1998. p.204

SHIRATORI, Y.; TANANKA, M.; KAWASE, T.; SHIINA, S.; KOMATSU, Y. e OMATA, M. Quantification of Sinusoidal Cell Function in Vivo. **Seminars in Liver Disease**, v.13, p.39-49, 1993.

SILVA, C.D.M.D.; BOLZAN, A.A. e HEINZMANN, B.M. Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero Senecio. **Química Nova**, v.29, p.1047-1053, 2006.

SMART, J.L. e DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Research**, v.28, p.85-95, 1971.

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

SMITH, E.R.; DAMASSA, D.A. e DAVIDSON, J.M. Feedback Regulation and Male Puberty: Testosterone-Luteinizing Hormone Relationships in the Developing Rat. **Endocrinology**, v.101, p.173-180, 1977.

SOLATI, J.; SALARI, A.-A. e BAKHTIARI, A. 5HT1A and 5HT1B receptors of medial prefrontal cortex modulate anxiogenic-like behaviors in rats. **Neuroscience Letters**, v.504, p.325-329, 2011.

STEPHENS, D.N.; MELDRUM, B.S.; WEIDMANN, R.; SCHNEIDER, C. e GRÜTZNER, M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology**, v.90, p.166-169, 1986.

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

TOFOVIC, S.P.; SALAH, E.M.; MADY, H.H.; JACKSON, E.K. e MELHEM, M.F. Estradiol Metabolites Attenuate Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.46, p.430-437, 2005.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. e PEIXOTO, P.V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Editora Helianthus. Rio de Janeiro: 2000. p.310

TORRES, M.B.A.M. e COELHO, K.I.R. Experimental poisoning by *Senecio brasiliensis* in calves: quantitative and semi-quantitative study on changes in the hepatic extracellular matrix and sinusoidal cells **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.43 - 50, 2008.

TORRES, M.B.A.M.; SALLES, M.W.S.; HEADLEY, A.S. e BARROS, C.S.L. Intoxicação experimental por sementes de *Crotalaria spectabilis* (Leguminosae) em suínos. **Ciência Rural**, v.27, p.307-312, 1997.

TREMML, P.; LIPP, H.-P.; MÜLLER, U.; RICCERI, L. e P. WOLFER, D. Neurobehavioral development, adult openfield exploration and swimming navigation learning in mice with a modified β 2-amyloid precursor protein gene. **Behavioural Brain Research**, v.95, p.65-76, 1998.

TRIGO, J.R.; LEAL, I.R.; MATZENBACHER, N.I. e LEWINSOHN, T.M. Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (Senecioneae: Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, p.1011-1022, 2003.

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

WELSCH, F. In vitro approaches to the elucidation mechanisms of chemical teratogenesis. **Teratology**, v.46, p.3-14, 1992.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v.83, p.1-16, 1984.

WILSON, R.D.; JOHNSON, J.A.; SUMMERS, A.; WYATT, P.; ALLEN, V.; GAGNON, A.; LANGLOIS, S.; BLIGHT, C.; MONEY, D.M.; BOUCHER, M.; GRUSLIN, A.; MACKINNON, C.J.; PAQUET, C.; VAN SCHALKWYK, J.; COHEN, H.R.; STEBEN, M.; WONG, T.; YUDIN, M.H.; SOCIETY OF, O. e GYNECOLOGISTS OF, C. Principles of human teratology: drug, chemical, and infectious exposure. **Journal of Obstetrics Gynaecology Canada**, v.29, p.911-26, 2007.

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

8 Anexos

8.1 Aprovação Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/65/2012

Recebemos o certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, referente ao projeto "Estudos comportamentais e bioquímicos da exposição perinatal ao extrato de 'Senecio brasiliensis' na prole de ratos", de responsabilidade da Profa. Dra. Helenice de Souza Spínosa e se encontra arquivado nesta secretaria.

São Paulo, 02 de agosto de 2012.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

8.1 Aprovação Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudos Comportamentais e Bioquímicos da exposição perinatal ao extrato de *Senecio brasiliensis* na prole de ratos", protocolado sob o nº 1905/2010, utilizando 50 (cinquenta) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/05/2010.

We certify that the Research "Behavioral and biochemical studies of perinatal exposure to the extract from *Senecio brasiliensis* in offspring of rats", protocol number 1905/2010, utilizing 50 (fifty) rats, under the responsibility Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/26/2010.

São Paulo, 27 de maio de 2010

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

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

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