

Jaguariúna, SP
Dezembro, 2006

Autor

Vera Lúcia de Castro
Veterinária,
PhD,
Embrapa Meio Ambiente
Rod. SP 340, km 127,5
13.820-000
Jaguariúna/SP
castro@cnpma.embrapa.br

Estudo Experimental em Ratos da Interação Mãe-Filhote Expostos a Agroquímicos

Introdução

O estudo experimental dos efeitos tóxicos ocasionados pelos agroquímicos nas mães e em seus filhotes visando à saúde humana geralmente é realizado em animais de laboratório. Estes animais, normalmente roedores são utilizados como modelo devido a sua fácil obtenção, ciclo reprodutivo curto, custo e facilidade de criação além de possuírem uma fisiologia semelhante a do homem. Embora existam diferenças entre o cérebro humano e o de roedores, podem ser identificadas estruturas análogas. Além disso, a ontogenia de determinados comportamentos pode ser usada para construir inferências em relação a maturação de estruturas cerebrais específicas ou circuitos neuronais em roedores e primatas, incluindo o ser humano.

As avaliações sobre o desenvolvimento animal frequentemente incluem, observações quanto ao aparecimento de sinais físicos e os aspectos referentes ao desenvolvimento neurocomportamental. Ambas avaliações são freqüentemente usadas para identificar as alterações causadas por exposições pré e/ou pós-natal a compostos tóxicos. (CASTRO, 2004).

O período perinatal pode ser dividido em 4 etapas: implantação, organogênese, desenvolvimento fetal e período neonatal. O início da prenhez, da fertilização até a implantação, é um período crítico durante o qual podem ocorrer perdas gestacionais. Os processos celulares que ocorrem durante o período perifertilização (meiose, ovulação e fertilização) são similares em roedores e em humanos; daí decorrendo o uso de diferentes modelos para o estudo destas perdas.

O período neonatal, que é a fase final do período perinatal, tem seu início ao nascimento da prole, sendo finalizado com o término da lactação. Nesse período ocorrem a maturação funcional e ganho de peso corporal, peso este que pode sofrer redução com a exposição a substâncias químicas bem como desordens funcionais e carcinogênese. Por outro lado, o ambiente inicial do neonato é determinado pela mãe que é responsável pela sobrevivência do filhote. A mãe, que é a primeira fonte de conforto térmico, alimentação e limpeza, determina primariamente o desenvolvimento dos sistemas fisiológicos de modulação do comportamento no neonato; o que por sua vez influencia o desenvolvimento da arquitetura do cérebro após o nascimento. Intervenções na relação mãe-filhote podem afetar comportamentos emocionais e respostas ao estresse na vida adulta (HUOT et al., 2004). Desta forma, a interação mãe-filhote é crucial para o crescimento somático e o desenvolvimento comportamental.

A exposição de fêmeas a pesticidas durante a fase reprodutiva pode levar a alterações fetais refletidas físico e comportamentalmente, na dependência da ocorrência de períodos críticos no desenvolvimento animal, durante a prenhez e imediatamente após o nascimento. As conseqüências da exposição durante o desenvolvimento perinatal são alvo de preocupação porque os organismos jovens podem ser mais suscetíveis ao efeito desses produtos. A ocorrência de períodos críticos no desenvolvimento animal quando ocorrem significativas mudanças anatomo-fisiológicas no animal, seja durante a prenhez seja imediatamente após o nascimento; auxilia o entendimento de algumas destas modificações. Conseqüentemente, a avaliação dos possíveis efeitos decorrentes da exposição aos agroquímicos é importante de ser realizada em diferentes períodos de desenvolvimento, devido a possível influência na morfologia e conexão sináptica nos alvos neuronais. Um

importante período do desenvolvimento cerebral ocorre nas duas primeiras semanas pós-natais do rato e no terceiro trimestre da gestação e na primeira infância dos seres humanos. Contudo, diferentes suscetibilidades em relação a idade na qual ocorre a exposição, não implicam necessariamente em maiores riscos em crianças. O efeito real vai depender dos mecanismos fisiometabólicos e das características do produto em estudo.

Observação experimental

Alguns pontos devem ser observados antes do início do estudo a fim de realizar um bom planejamento experimental para a obtenção dos dados:

- a) Identificação do objetivo e da justificativa do estudo baseados em evidências anteriores (associação e consistência causa-efeito);
- b) Planejamento do estudo com ênfase na escolha criteriosa dos métodos experimentais e estatísticos visando à reprodutibilidade dos experimentos e dados obtidos;
- c) Possibilidade de infra-estrutura adequada humana e física;
- d) O número de animais a ser utilizado devido à variabilidade da população quanto a resposta observada e o significado biológico das alterações observadas;
- e) As doses a serem testadas que geralmente são estabelecidas entre aquelas que não ocasionam efeitos e aquelas que produzem o efeito tóxico estudado (dose-resposta); levando em consideração a real probabilidade de exposição no ambiente;
- f) A idade que afeta o planejamento quanto ao estágio do desenvolvimento animal, a via e a frequência de exposição.

Na maioria das vezes, a toxicidade e em especial a neurotoxicidade ocasionada pela exposição a substâncias tóxicas é avaliada de acordo com algumas baterias de testes que contam com protocolos experimentais padronizados para animais de laboratório. Os estudos destas baterias experimentais em animais incluem avaliações preliminares (*screening*), que se constituem por observação funcional (reflexos e algumas reações como salivação, piloereção), medida da atividade motora e avaliações do desenvolvimento cognitivo.

Desta forma, são apresentados a seguir alguns métodos experimentais para o estudo de possíveis efeitos de

produtos químicos durante a fase reprodutiva em ratas e conseqüências para a ninhada devido à exposição materna. As presentes observações visam à obtenção de êxito a respeito desta avaliação.

Reprodução de fêmeas

Exposição e manuseio dos animais

Para esta análise utiliza-se um número pré-determinado de animais, de acordo com o procedimento experimental estipulado pelo estudo, ao redor de 10 fêmeas por grupo experimental. Os animais são mantidos em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha autoclavada, com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de luz claro - escuro 12h/12 horas. As fêmeas são previamente examinadas e selecionadas para que estejam nas fases de proestro/estro e tenham ciclo estral regular. Para o acasalamento, cada macho é colocado em gaiolas que contenha duas fêmeas cada. A presença de espermatozoides no lavado vaginal das ratas é considerada como indicativa do 1º dia de prenhez e no 15º dia de prenhez as fêmeas são separadas em gaiolas individuais. É anotado o ganho de peso de cada fêmea durante toda a prenhez.

Parâmetros observados

a) Viabilidade ao nascimento (VA) e ao desmame (VD)
As taxas de viabilidade ao nascimento (VA) e ao desmame (VD) são observadas conforme:

$$VA = 100 \times (\text{número de filhotes natimortos} / \text{nascidos vivos})$$

$$VD = 100 \times (\text{número de filhotes desmamados} / \text{nascidos vivos})$$

b) Razão sexual

É também anotada a razão sexual entre os filhotes nascidos (número de machos e de fêmeas).

c) Avaliação física dos órgãos reprodutivos através de cesárea

Em um dia pré-determinado da prenhez pelo delineamento experimental do estudo, as ratas são submetidas à cesárea para a verificação dos seguintes parâmetros: número de fetos, peso do útero e ovário, pesos fetal e placentário, pontos de reabsorção fetal, etc.

Desenvolvimento físico dos filhotes da ninhada

Todas as observações relacionadas ao desenvolvimento físico devem ser realizadas no mesmo período do dia. As ratas são mantidas em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha até o final da lactação. Após esse período os animais são separados por sexo com base na distância anogenital e colocados em gaiolas com até 5 animais cada.

A presença ou ausência dos parâmetros relacionados na tabela abaixo é observada de acordo com a idade do filhote e por determinado número de dias consecutivos até o aparecimento do parâmetro testado em todos os filhotes avaliados (ALDER, 1983; CASTRO et al., 2000). São avaliados todos filhotes de cada ninhada das ratas utilizadas no estudo. Os filhotes são pesados individualmente e/ou por ninhada diariamente entre os dias pós-natal (PND) 1 a 23. Anota-se, por filhote, os dias respectivos em que ocorrem os parâmetros observados, segundo a tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos parâmetros físicos dos filhotes e idade respectiva de observação.

Parâmetros	Período de Observação
Descolamento de orelha	2 a 3 dias de vida
Erupção do dente incisivo (início)	4 a 8 dias de vida
Aparecimento de pêlo	5 a 8 dias de vida
Abertura de orelha	10 a 14 dias de vida
Abertura de olho	12 a 15 dias de vida
Abertura de vagina	26 a 36 dias de vida
Descida de testículo	20 a 26 dias de vida

Observação de reflexos dos filhotes da ninhada

A avaliação do desempenho dos reflexos dos filhotes de ratos é realizada conforme a idade do animal, de acordo com a tabela e descrição abaixo. Todas as observações relacionadas ao desenvolvimento físico são realizadas no mesmo período do dia. Para esta análise utiliza-se um número pré-determinado de animais, de acordo com o procedimento experimental estipulado pelo estudo. A tabela 2 que apresenta os dias de vida nos quais ocorre a observação de cada um dos reflexos está colocada a seguir:

Tabela 2. Descrição dos reflexos dos filhotes e idade respectiva de observação.

Parâmetros	Período de Observação
Reflexo de endireitamento	2 a 5 dias de vida
Resposta de agarrar	3 a 7 dias de vida
Resposta de subir	6 a 11 dias de vida
Reflexo de sobressalto	11 a 14 dias de vida
Geotaxia negativa	7 a 11 dias de vida

Os reflexos a serem observados são descritos como:

a - reflexo de endireitamento: o animal é colocado sobre a mesa, em decúbito dorsal; mede-se o tempo gasto para que volte à posição normal em até 1 minuto (decúbito ventral),

b - resposta de agarrar: o animal é colocado somente com as patas dianteiras em um cilindro de superfície lisa, de 5 (cinco) centímetros de diâmetro e de altura superior a do seu corpo (Fig. 1); verifica-se se o mesmo agarra-se ao cilindro ou se cai (na mesa),

c - resposta de subir: o animal é colocado com as quatro patas sobre uma rampa de tela de arame de 30°, com a cabeça virada para o lado mais alto desta (Fig. 2); verifica-se se o animal sobe, desce ou permanece onde foi colocado inicialmente por tempo pré-determinado de geralmente 300 segundos,

d - reflexo de sobressalto: o animal é exposto a um som estridente e súbito próximo a sua orelha, produzido por uma campainha de intensidade e duração controladas. Verifica-se se o animal responde com sobressalto a esse estímulo. A duração e intensidade do som dependerão de cada situação experimental a ser descrita no delineamento experimental do projeto de pesquisa. Geralmente é utilizado um pulso de 80 dB por 1 segundo após um período de aclimação de 5 minutos. O animal é colocado em uma superfície plana e de área não restritiva,

e - geotaxia negativa: o animal é colocado com as quatro patas sobre um plano inclinado de tela de 30°, com a cabeça virada para o lado mais baixo desta; o reflexo é considerado formado se o animal girar seu corpo a 180°, se reorientando em até 1 minuto.



Fig. 1. Reflexo de agarrar em filhote de rato Wistar



Fig. 2. Resposta de subir em filhote de rato Wistar

Comportamento maternal

Em mamíferos, é indispensável o desempenho normal das funções maternas para a saúde dos filhotes. Os cuidados parentais, em especial o maternal, são essenciais para a sobrevivência e o desenvolvimento dos filhotes já que em várias espécies o filhote ao nascer é imaturo (Figs. 3 e 4). O comportamento maternal é todo aquele comportamento direcionado a prole de forma a aumentar a sua sobrevivência. Assim, há métodos já descritos para avaliar o comportamento maternal. Os métodos comportamentais podem ser aliados a sinais tradicionalmente observados de toxicidade materna em estudos experimentais como decréscimo no ganho de peso, diminuição do consumo de água e alimento, sinais clínicos e mortalidade. Além disso, existem evidências de que a excreção do composto tóxico ou de seu metabólito pelo leite pode alterar o desenvolvimento pós-natal.

A seguir serão descritas alguns métodos para a avaliação do comportamento maternal. A escolha de cada um será estipulada no projeto de pesquisa em realização, de acordo com as características de cada substância estudada e a infra-estrutura disponível.

Foto: Maria Cristina Tordin



Fig. 3. Rata Wistar, em gaiola de polipropileno, amamentando os filhotes no ninho de maravalha.

Foto: Maria Cristina Tordin



Fig. 4. Rata recolhendo os filhotes.

1 – Escores de Södersten e Eneroth (1984)

As fêmeas são mantidas separadamente nas gaiolas-moradia com suas respectivas crias. Para esta análise utiliza-se um número pré-determinado de animais, de acordo com o procedimento experimental estipulado pelo estudo. Todas as observações são realizadas no mesmo período do dia.

A observação é realizada diariamente, do nascimento até o 23º dia, pouco antes da passagem para a fase escura do ciclo de luz. A cada fêmea é fornecido papel picado, cinco dias antes do parto previsto e durante toda a fase de lactação, para a confecção do ninho. O comportamento da fêmea em relação a seus filhotes é observado sem qualquer manipulação na gaiola, de acordo com uma escala de escores, descrita na tabela abaixo:

Tabela 3. Escala de escores do comportamento maternal (Södersten & Eneroth, 1984).

Escores	Parâmetros Observados
0	Ausência de ninho
1	Presença de ninho
2	Todos os filhotes no ninho
3	Todos os filhotes no ninho, com a mãe
4	Todos os filhotes no ninho, sendo amamentados

2 – Escores de Champagne, Francis, Mar e Meaney (2003)

O comportamento da fêmea em relação a seus filhotes é observado por 72 minutos a cada 3 minutos até os dias 6-8 de vida dos filhotes na dependência do estudo, em intervalos regulares por 3 vezes no período claro do ciclo de luz (25 observações/período), conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4. Escala de escores do comportamento maternal (Champagne et al., 2003)

Escores	Parâmetros Observados
1	Mãe sem os filhotes
2	Mãe limpando/lambendo os filhotes
3	Mãe limpando/lambendo os filhotes com postura arqueada
4	Mãe cobrindo os filhotes sem arqueamento do dorso
5	Mãe está passivamente deitada de lado com um ou mais filhotes mamando

As categorias comportamentais não são mutuamente exclusivas. Além das definições comportamentais descritas a seguir, pode ser observado o tempo gasto em cada categoria comportamental.

O comportamento da mãe é definido como média e desvio padrão dos escores atribuídos a cada uma, como:

- Mãe com muita postura arqueada / limpando filhote = frequência de escore está abaixo de 1 desvio padrão ao redor da média

- Mãe com pouca postura arqueada / limpando filhote = frequência de escore é maior que 1 desvio padrão ao redor da média

3 – Teste da retirada de Slamberová, Charousová e Pometlová (2005)

O comportamento da fêmea em relação a seus filhotes é observado diariamente nas gaiolas- moradia do 1 ao 22º. dia de vida dos filhotes, durante o período claro do ciclo de luz. Cada sessão dura 50 min, com observações por 5 segundos, com intervalos de 5 minutos. Caso o comportamento ocorra é dada nota 1 e caso contrário é dada nota 0.

São observados três posições de aleitamento e onze tipos de atitude a cada observação, como segue apresentado nas tabelas 5 e 6:

Tabela 5. Posições de aleitamento e parâmetros observados do comportamento maternal (Slamberová et al., 2005)

Mãe	Parâmetros Observados
Posição de aleitamento	
arqueada	a mãe está com o dorso arqueado sobre os filhotes com as pernas separadas e estendidas
cobertura	a mãe está sobre os filhotes mas sem o dorso arqueado e sem extensão clara das pernas
passiva	a mãe está deitada de lado com um ou mais filhotes mamando
Atitude	
1	Mãe dentro ou fora do ninho
2	Mãe em contato com qualquer de seus filhotes
3	Mãe lambendo qualquer de seus filhotes
4	Mãe carregando os filhotes
5	Mãe manipulando a maravalha ou jornal do ninho
6	Mãe descansando com os olhos fechados
7	Mãe comendo
8	Mãe bebendo
9	Mãe se limpando
10	Mãe farejando com a cabeça para cima
11	Mãe levantada nas patas traseiras

Após a sessão de observação é feita a retirada dos filhotes de junto das mães por cinco minutos. Após esse período, toda a ninhada de forma dispersa é colocada de volta com a mãe nas gaiolas-moradia. A mãe é então observada por 10 minutos, de acordo com a tabela 6:

Tabela 6. Escores de atitude maternal (Slamberová et al., 2005)

Atitude	Parâmetros Observados
1	Latência para carregar o primeiro filhote
2	Mãe carregando intensivamente seus filhotes e os colocando no ninho
3	Mãe com várias interrupções ao colocar seus filhotes no ninho

Qualquer outra atitude não usual é anotada como:

- a remoção de um filhote do ninho que já estava acomodado nele,
- a mãe carrega intensivamente um filhote ao redor da gaiola antes de colocá-lo no ninho,
- ausência de formação do ninho, etc.

4- Teste da retirada e procura de Arrati et al (2006)

O comportamento da fêmea em relação a seus filhotes é observado durante o período claro do ciclo diurno.

4.a – Retirada

No quinto dia de vida, os filhotes são separados das mães por 2 horas e o ninho é desmanchado.

Após esse período, os filhotes são colocados no canto oposto da gaiola no qual se encontra a mãe e são observadas as latências

- para que a fêmea recolha o primeiro filhote pela boca e o coloque no ninho.
- para recolher os outros filhotes também é medida.
- da ação de lambar o filhote, bem como sua frequência e duração.

São observadas as posições de aleitamento

- (1) alto: dorso arqueado em ventroflexão
- (2) baixo: dorso arqueado minimamente ou não arqueado

Também é observada a latência para a confecção de novo ninho, bem como o seu tipo:

- (0) sem ninho
- (1) ninho pobre, no qual não foi usado todo o material disponível na gaiola
- (2) ninho com paredes
- (3) ninho excelente com o uso de todo o material disponível.

4.b – Procura

No sétimo dia de vida dos filhotes, a fêmea é colocada em uma nova gaiola-moradia com um dos lados com uma extensão em forma de T (conforme desenho abaixo) com 6 filhotes por 2 dias para adaptação.

O braço da gaiola possui 60 cm de extensão, separado da gaiola moradia por uma porta.

A colocação dos filhotes nos dois lados do T é feita alternadamente nas fêmeas testadas.

Durante 60 minutos, após a abertura da porta, são avaliados a latência para a entrada no braço e o recolhimento dos filhotes para o ninho na gaiola-moradia.

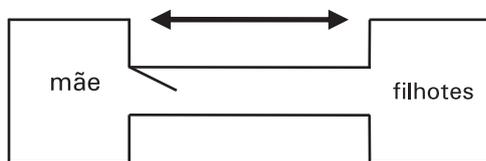


Fig. 5. Esquema de gaiola-moradia

Considerações finais

O aumento do uso de insumos agropecuários a fim de manter a produtividade e a conseqüente severidade do impacto ambiental torna necessária a aplicação de esforços para sofisticar o monitoramento e avaliar os efeitos desses produtos químicos no ambiente e na saúde humana. Nesse sentido, a evolução e a melhoria dos métodos de avaliação referentes aos testes de efeitos reprodutivos e no desenvolvimento animal em conjunto com a adequação da legislação será capaz de otimizar a detecção de possíveis efeitos sutis relacionados à exposição.

Aliado a este avanço metodológico, o melhor conhecimento a respeito dos períodos críticos do desenvolvimento do sistema nervoso e da interação mãe-

filhote pode auxiliar a identificação de períodos para avaliação da exposição, efeito dose-resposta aos agroquímicos, avaliação do significado biológico dos achados para os seres humanos e comparação dos dados entre as espécies. A obtenção de dados de alvos biológicos significativos em conseqüência poderá contribuir para o aprimoramento dos instrumentos através dos quais os riscos causados ao ser humano pelos agroquímicos possam ser minimizados.

Referências

ALDER, S. Behavioral teratology. In: ZBINDEN, Q.; RACAGNI, G.; CUOMO, V.; WEISS, B. **Application of behavioral pharmacology in toxicology**. New York: Raven Press, 1983. p. 57-66.

ARRATI, P.; CARMONA, C.; DOMINGUEZ, G.; BEYER, C.; ROSENBLATT, J. GABA receptor agonists in the medial preoptic area and maternal behavior in lactating rats. **Physiology and Behavior**, v.87, p.51- 65, 2006.

BALDUINI, W.; LOMBARDELLI, G.; PERUZZI, G.; CATTABENI, F. Treatment with methylazoxymethanol at different gestational days: physical, reflex development and spontaneous activity in the offspring. **NeuroToxicology**, v.12, p.179-188, 1991.

CASTRO, V. Aspectos da exposição ambiental aos agroquímicos e a avaliação de seus efeitos no desenvolvimento animal. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 21, n. 3, p. 469-497, set./dez. 2004.

CASTRO, V.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. **Toxicology Letters**, v.118, n.1-2, p. 93-102, 2000.

CASTRO, V.; GÓES, K.; CHIORATO, S. Developmental toxicity potential of paclobutrazol in the rat. **International Journal of Environmental Health Research**, v.14, n.5, p. 371-380, 2004.

CHAMPAGNE, F.; FRANCIS, D.; MAR, A.; MEANEY, M. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology and Behavior**, v.79, p. 359-371, 2003.

HUOT, R.; GONZALEZ, M.; LADD, C.; THRIVIKRAMAN, K.; PLOTSKY, P. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v.29, p. 279–289, 2004.

SLAMBEROVÁ, R.; CHAROUSOVÁ, P.; POMETLOVÁ, M. Maternal behavior is impaired by methamphetamine administered during pre-mating, gestation and lactation. **Reproductive Toxicology**, v. 20, p. 103–110, 2005.

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

Circular Técnica, 13

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Meio Ambiente
Endereço: Rodovia SP 340 km 127,5
Caixa Postal 69, Tanquinho Velho
13.820-000 Jaguariúna/SP
Fone: (19) 3867-8700
Fax: (19) 3867-8740
E-mail: sac@cnpmembrapa.br

1ª edição eletrônica
2006

Comitê de Publicações

Presidente: *Ladislau Araújo Skorupa*
Secretário-Executivo: *Sandro Freitas Nunes*
Bibliotecário: *Maria Amélia de Toledo Leme*
Membros: *Cláudio César de A. Buschinelli, Heloisa Ferreira Filizola, Manoel Dornelas de Souza, Maria Conceição P. Young Pessoa, Marta Camargo de Assis, Osvaldo Cabral*

Expediente

Tratamento das ilustrações: *Silvana C. Teixeira Estevão*
Editoração eletrônica: *Silvana C. Teixeira Estevão*