



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRÉ DEMAMBRE BACCHI

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E
REPRODUTIVOS EM RATOS EXPOSTOS À *PASSIFLORA*
INCARNATA DURANTE A GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO**

ANDRÉ DEMAMBRE BACCHI

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E
REPRODUTIVOS EM RATOS EXPOSTOS À *PASSIFLORA
INCARNATA* DURANTE A GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Estefânia Gastaldello
Moreira

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B116a Bacchi, André Demambre.

Avaliação de parâmetros comportamentais e reprodutivos em ratos expostos à *Passiflora incarnata* durante a gestação e amamentação / André Demambre Bacchi. – Londrina, 2012.
49 f. : il.

Orientador: Estefânia Gastaldello Moreira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Passiflora – Teses. 2. Fitoterapia – Gravidez – Teses. 3. Plantas medicinais – Toxicidade – Teses. 4. Toxicidade reprodutiva – Teses. 5. Toxicologia experimental – Teses. 6. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Moreira, Estefânia Gastaldello. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Sociedade Brasileira de Fisiologia. IV. Título.

CDU 615.89:612.6

ANDRÉ DEMAMBRE BACCHI

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E
REPRODUTIVOS EM RATOS EXPOSTOS À *PASSIFLORA*
INCARNATA DURANTE A GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para a obtenção do título de Mestre

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dr^a Estefânia Gastaldello Moreira
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion
UFRGS – Porto Alegre – RS

Prof^a Dr^a Daniela Cristina Ceccato Gerardin
UEL – Londrina - PR

Londrina, 2 de fevereiro de 2012.

Dedico este trabalho à minha querida esposa Bruna, por ter me acompanhado com tanta
cumplicidade em mais essa jornada.

*"And in this crazy life, and through these crazy times
It's you, it's you, you make me sing
You're every line, you're every word, you're everything"*

Michael Buble - Everything

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Agradeço de forma muito especial à minha orientadora, Professora Estefânia. Desde quando fui seu aluno de graduação, em 2006, tenho você como um exemplo a ser seguido, pois você possui a rara combinação de competência, bom senso e humildade. Obrigado pela paciência com a qual ensinou um orientando sem experiência em pesquisa. Obrigado pela grande disponibilidade com a qual esteve sempre disposta a ouvir, discutir e sanar dúvidas. Obrigado pelo suporte que ofereceu em todas as decisões que tomei. Obrigado por ter contribuído tanto para a minha formação. Se até agora conquistei algumas vitórias profissionais, você certamente é parte indissociável destas conquistas.

Agradeço também à minha família. Ao meu pai Marcelo, pelo exemplo de garra, dedicação e honestidade com as quais sempre enfrentou a vida. À minha mãe Ana Teresa por me mostrar e exercer o poderoso amor incondicional de mãe. Ao meu irmão Matheus pelo companheirismo e por me ensinar, ainda que involuntariamente, que o tempo passa depressa demais para que o desperdicemos. Aos meus avós, Virgínia e Domingos Raphael, pelo apoio e suporte incondicionais durante toda minha vida.

Agradeço à minha esposa Bruna, pelo amor, dedicação e muita compreensão nas correrias da vida. Obrigado por você ter sido minha força e minha luz nos momentos mais difíceis. Esta vitória é também sua.

Agradeço também à Professora Daniela Gerardin, por toda ajuda e disponibilidade em relação aos experimentos de reprodução e comportamento sexual, sem os quais este trabalho certamente não teria o mesmo brilho.

Agradeço ainda aos estagiários e amigos Tiago, Luiz Fernando, Bianca e Ana Paula, bem como aos estagiários do laboratório da Professora Daniela, por toda a ajuda durante o meu Mestrado.

Agradeço aos companheiros de Mestrado Andrey, Milene e José Francis, pelo apoio e por tornar as inúmeras viagens menos dolorosas.

Agradeço ao amigo e farmacêutico Gideão, pelas “consultorias” sobre fitoterápicos e pelo contato com o Laboratório Herbarium.

Agradeço também ao Laboratório Herbarium pela doação de Passiene® (*Passiflora incarnata*) e à CAPES pela concessão da minha bolsa de Mestrado.

Agradeço, finalmente, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brech

BACCHI, André Demambre. **Avaliação de parâmetros comportamentais e reprodutivos em ratos expostos à *Passiflora incarnata* durante a gestação e amamentação.** 2012. 52f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

A *Passiflora incarnata* é comercializada em muitos países como fitoterápico e é prescrita principalmente como sedativa e ansiolítica. Ainda que as diretrizes de prescrição médica para a maioria dos fitoterápicos comercializados recomendem sua utilização sob supervisão médica durante a gestação, estudos reprodutivos e de desenvolvimento são escassos e não obrigatórios para fins regulatórios. Para avaliar a toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento da *P. incarnata*, administramos, por gavagem, a ratas Wistar, 30 ou 300 mg/kg deste fitoterápico, do dia gestacional (DG) 0 ao dia pós-natal (DPN) 21. O tratamento com *P. incarnata* não influenciou o ganho de peso corpóreo e o consumo de ração, bem como não alterou o desempenho reprodutivo (perda pós-implantação, tamanho da ninhada, peso da ninhada) das mães. O desenvolvimento físico dos filhotes (ganho de peso corporal, dia da abertura vaginal ou separação prepucial), bem como o comportamento no teste de campo aberto nos DPN 22, 35 e 75 também não foram influenciados por este tratamento. A avaliação comportamental de filhotes no labirinto em cruz elevado indicou um aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos em filhotes machos expostos à dose de 30 mg/kg, mas esse efeito foi restrito ao DPN 22. O comportamento copulatório foi prejudicado nos filhotes machos adultos expostos à dose de 300 mg/kg de *P. incarnata*. Neste grupo, apenas 3 dos 11 filhotes foram considerados sexualmente competentes, ou seja, apresentaram intromissão e ejaculação quando expostos a uma fêmea em fase de estro. Este prejuízo comportamental não foi acompanhado por alterações nos níveis plasmáticos de testosterona, peso de glândulas e órgãos relacionados ao sistema reprodutor e contagem espermática e distância anogenital. A hipótese de que a alteração da aromatização durante o período perinatal e/ou de longa duração pode estar associada com o efeito observado merece investigação mais aprofundada.

Palavras-chaves: *Passiflora incarnata*. Toxicidade reprodutiva. Toxicidade do desenvolvimento. Gestação. Lactação. Campo aberto. Comportamento sexual.

BACCHI, André Demambre. **Evaluation of behavioral and reproductive parameters in rats exposed to *Passiflora incarnata* during pregnancy and lactation.** 2012. 52p. Master Thesis - State University of Londrina. 2012. Master Thesis – Londrina State University, Londrina.

ABSTRACT

Passiflora incarnata is marketed in many countries as a phytomedicine and is prescribed mainly as sedative and anxiolytic. Even though the physician prescribing directions of most marketed phytomedicines recommend them to be used under medical supervision, reproductive and developmental studies are sparse and not mandatory for regulatory purposes. To evaluate the reproductive and developmental toxicity of *P. incarnata* we gavaged Wistar female rats with 30 or 300 mg/kg of this herb from gestational day (GD) 0 to postnatal day (PND) 21. *P. incarnata* treatment did not influence dams' body weight and food intake as well as their reproductive performance (post-implantation loss, litter size, litter weight). Physical development of pups (body weight gain, day of vaginal opening or preputial separation) as well as their behavior in the open field at PND 22, 35 and 75 have also not been influenced. Behavioral evaluation of pups in the elevated plus-maze indicated an increased percentage of open arm entries in the P 30-exposed male pups but this effect was restricted to PND 22. Sexual behavior was disrupted in adult male pups exposed to 300 mg/kg of *P. incarnata*. In this group, only 3 out of 11 pups were sexually competent, i.e., presented intromission and ejaculation when exposed to a female in the estrous phase. This behavioral disruption was not accompanied by alterations in plasmatic testosterone levels, reproductive-related organs and glands weights, sperm count and anogenital distance. It is hypothesized that aromatase inhibition may be involved in the observed effect.

Keywords: *Passiflora incarnate*. Reproductive Toxicity. Developmental toxicity. Pregnancy. Lactation. Open-field. Sexual behavior.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Diagrama do desenho experimental. DG: dia gestacional; DPN: dia pós-natal; DAG: distância anogenital; OF: Campo aberto; EPM: labirinto em cruz elevado..... 17
- Figura 2** - Sítios de implantação uterinos 19
- Figura 3** - Arena do campo aberto. À esquerda, foto do modelo de aparelho utilizado. À direita, representação esquemática da vista superior da arena, com o animal posicionado ao centro 21
- Figura 4** - Labirinto em cruz elevado. À esquerda, foto do modelo de aparelho utilizado. À direita, representação esquemática da vista superior da arena, com o animal posicionado ao centro, voltado para um dos braços abertos..... 22
- Figura 5** - Representação esquemática da arena do teste de preferência sexual. F e M representam as zonas de incentivo da fêmea (sexual) e do macho (social), respectivamente 25
- Figura 6** - Ganho de peso (A) e consumo de ração (B) durante a gestação e lactação. Dados expressos como média \pm EPM de 19-22 animais em cada grupo. ANOVA fatorial indicou apenas efeito do período. Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg..... 28
- Figura 7** - Ganho de peso real das mães. Dados expressos como média \pm EPM de 19-22 animais em cada grupo. ANOVA fatorial, $p > 0,05$. Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg 29
- Figura 8** - Ganho de peso dos filhotes do nascimento até o desmame. Dados expressos como média \pm EPM de 19-22 ninhadas em cada grupo. ANOVA fatorial indicou apenas efeito da idade, refletindo o ganho de peso dos filhotes. Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg..... 30

Figura 9 - Distância anogenital dos filhotes machos nos DPN 0, 22 e 75. Dados expressos como média ± EPM de 12-13 animais em cada grupo. ANOVA fatorial indicou apenas efeito da idade. Con: água; P 30: P. <i>incarnata</i> 30 mg/kg; P 300: P. <i>incarnata</i> 300 mg/kg	31
Figura 10 - Avaliação da atividade geral de filhotes machos e fêmeas no campo aberto no DPN 22. Dados expressos como média ± EPM de 11-13 animais em cada grupo.. Anova fatorial, $p > 0,05$. Limpeza analisada por Kruskal-Wallis, $p > 0,05$. Con: água; P 30: P. <i>incarnata</i> 30 mg/kg; P 300: P. <i>incarnata</i> 300 mg/kg	33
Figura 11 - Avaliação da ansiedade de filhotes machos e fêmeas no labirinto em cruz elevado no DPN 22. Dados expressos como média ± EPM de 12-17 animais em cada grupo.. * $p < 0,05$ comparado ao Con (ANOVA fatorial complementada com o teste de Tukey). Con: água; P 30: P. <i>incarnata</i> 30 mg/kg; P 300: P. <i>incarnata</i> 300 mg/kg	34
Figura 12 - Avaliação da atividade geral de filhotes machos e fêmeas no campo aberto no DPN 35. Dados expressos como média ± EPM de 12-14 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos machos (Anova fatorial). Limpeza analisada por Kruskal-Wallis, $p > 0,05$. Con: água; P 30: P. <i>incarnata</i> 30 mg/kg; P 300: P. <i>incarnata</i> 300 mg/kg	35
Figura 13 - Avaliação da ansiedade de filhotes machos e fêmeas no labirinto em cruz elevado no DPN 35. Dados expressos como média ± EPM de 7-14 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ em relação aos machos P300 (ANOVA fatorial). Con: água; P 30: P. <i>incarnata</i> 30 mg/kg; P 300: P. <i>incarnata</i> 300 mg/kg	36
Figura 14 - Avaliação da atividade geral de filhotes machos e fêmeas no campo aberto no DPN 75. Dados expressos como média ± EPM de 11-13 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos machos (Anova fatorial). Limpeza analisada por Kruskal-Wallis, $p > 0,05$. Con: água; P 30: P. <i>incarnata</i> 30 mg/kg; P 300: P. <i>incarnata</i> 300 mg/kg	37

Figura 15 - Avaliação da ansiedade de filhotes machos e fêmeas no labirinto em cruz elevado no DPN 75. Dados expressos como média ± EPM de 5-114 animais em cada grupo. ANOVA fatorial, $p > 0,05$. (5-14 animais)	38
Figura 16 - Efeito da exposição à <i>P. incarnata</i> sobre a concentração plasmática de testosterona no DPN 90. Dados expressos como média ± EPM de 12-13 animais em cada grupo. Anova fatorial, $p > 0,05$. Con: água; P 30: <i>P. incarnata</i> 30 mg/kg; P 300: <i>P. incarnata</i> 300 mg/kg.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Desempenho reprodutivo materno	29
Tabela 2 - Avaliação da memória de habituação em filhotes machos e fêmeas (22,35 e 75 dias de idade) avaliados no campo aberto	39
Tabela 3 - Efeito da exposição à <i>P. incarnata</i> durante a gestação e lactação no peso corpóreo, peso úmido dos órgãos e contagem espermática de ratos no DPN 90.....	41
Tabela 4 - Avaliação do comportamento copulatório de filhotes machos adultos.....	42
Tabela 5 - Avaliação do comportamento de preferência sexual em filhotes machos adultos	43

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL	17
3.2	ANIMAIS E TRATAMENTO	19
3.3	TOXICIDADE GERAL E DESEMPENHO REPRODUTIVO DAS MÃES.....	19
3.4	DESENVOLVIMENTO FÍSICO DOS FILHOTES	19
3.5	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES	19
3.5.1	Atividade Geral	20
3.5.2	Memória de Habituação.....	21
3.5.3	Ansiedade.....	21
3.6	DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DOS FILHOTES MACHOS	22
3.6.1	Quantificação de Testosterona.....	22
3.6.2	Parâmetros Espermáticos.....	23
3.6.3	Comportamento Sexual Masculino	23
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	27
4	RESULTADOS	27
4.1	TOXICIDADE GERAL E DESEMPENHO REPRODUTIVO MATERNO	25
4.2	DESENVOLVIMENTO FÍSICO DOS FILHOTES	30
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL E ANSIEDADE DOS FILHOTES	31
4.4	Avaliação da Memória de Habituação dos Filhotes	38
4.5	DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO DOS FILHOTES.....	39
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	48
7	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Produtos vegetais medicinais têm sido amplamente utilizados mundialmente. Nos países em desenvolvimento, eles representam uma alternativa terapêutica economicamente viável; nos países desenvolvidos, uma alternativa terapêutica em consonância com o modismo de consumo de produtos naturais. Estima-se que 80% da população de países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, façam uso de produtos vegetais (Yunes & Calixto, 2001), número não muito distante dos 70% relatados em estudos conduzidos em países desenvolvidos (Buttar & Jones, 2003; Koren et al., 2008).

Em 2006, o governo federal brasileiro publicou o Decreto nº 5813 aprovando a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (Brasil, 2006). Desde então, vários documentos têm sido elaborados para que o objetivo deste programa seja atingido. Entre esses documentos, encontra-se a “Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde” (RENISUS), publicada em 2009 pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2009). Esta lista compreende 71 espécies ou gêneros vegetais tradicionalmente usados no Brasil com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS).

Devido à multiplicidade de moléculas presentes nos produtos vegetais (frequentemente em concentrações desconhecidas), torna-se difícil estimar o perfil farmacológico e/ou toxicológico exato desses produtos. Apesar destas incertezas, a maioria dos usuários acredita que sejam medicamentos seguros, uma vez que são substâncias naturais (Buttar e Jones, 2003). Isso torna os produtos vegetais atraentes, inclusive para populações consideradas especiais como crianças, idosos e gestantes.

Em relação a este último grupo, o uso de produtos medicinais de origem vegetal durante a gravidez tem sido relatado em cerca de 4 a 55% das gestantes, desconsiderando o uso como abortivo (Nordeng & Havnen, 2005; Refuerzo et al, 2005; Tiran, 2003). É interessante mencionar que mesmo as mulheres grávidas que não utilizam produtos vegetais medicinais enxergam o seu uso de uma forma positiva (Nordeng & Havnen, 2005). Ainda mais, além do uso intencional de produtos vegetais durante a gravidez, também devemos considerar a

probabilidade de ocorrência do uso acidental, ou seja, enquanto a mulher desconhece sua gravidez. Este uso não deve ser subestimado uma vez que pelo menos 50% das gravidezes não são planejadas (Brown & Eisenberg, 1995)

O gênero *Passiflora* é composto por, aproximadamente, 500 espécies de plantas conhecidas popularmente como maracujá. Entre elas, a *P. incarnata* possui a maior gama de aplicações clínicas. Trata-se de uma espécie depressora do sistema nervoso central (Dhawan et al, 2004.) que atua, pelo menos em parte, através do sistema gabaérgico (Zanoli et al, 2000; Grundmann et al, 2008) e que induz efeitos ansiolíticos e sedativos (Soulimani et al, 1997; Zanoli et al, 2000).

Em muitos países, incluindo o Brasil, a *P. incarnata* é comercializada como medicamento fitoterápico, sendo comumente dispensada em farmácias, drogarias e Unidades Básicas de Saúde (Diniz, 2006), além de integrar a RENISUS.

Considerando-se que a maternidade pode desencadear em muitas mulheres uma busca por hábitos mais saudáveis de vida - incluindo a preferência por medicamentos fitoterápicos a medicamentos alopáticos convencionais (Chandra et al., 2002; Nordeng & Havnen, 2005) – e sabendo-se ainda que depressão, insônia e ansiedade são distúrbios comuns de serem observados em mulheres em idade fértil (Leppée et al, 2010), é possível que mulheres utilizem, de maneira consciente ou inconsciente, produtos vegetais ansiolíticos e sedativos, como a *P. incarnata*, durante a gestação.

Tal como observado para muitas plantas utilizadas pela população (Veríssimo et al., 2011), informações a respeito da segurança do uso da *P. incarnata* durante a gravidez e/ou lactação são escassas. Na verdade, foi encontrado um único estudo *in vitro* que sugeriu ação uterotônica desta planta (Ruggy & Smith, 1940). Baseado neste estudo, a bula de fitoterápicos à base de *P. incarnata* comercializados no Brasil indica que o seu uso durante a gravidez e/ou amamentação necessita de orientação do médico ou dentista (BRASIL, 2008). Contudo, orientar sem suporte científico certamente não deve ser uma tarefa fácil para esses profissionais.

No presente estudo, foi avaliada a toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento da *P. incarnata* em ratos expostos durante a gestação e lactação. Para esta avaliação seguimos o item 4.1.2 do guia “*Detection of toxicity to reproduction for medical products & toxicity to male fertility S5 (R2)*” da *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of*

Pharmaceuticals for Human Use (ICH, 2005), uma organização que publica guias objetivando orientar e harmonizar a avaliação toxicológica de produtos farmacêuticos.

Sabe-se ainda que a *P. incarnata* possui papel inibitório sobre a aromatase, uma enzima da família das oxidases mistas microsossomais, que é responsável pela conversão de androgênios em estrogênios (Dhawan, 2002). A atividade adequada desta enzima é fundamental durante a maturação sexual hipotalâmica, uma vez que a masculinização do encéfalo não depende diretamente da testosterona, mas sim da adequada conversão de testosterona em estrógeno (Freeman & Rissman, 1996). Nos ratos, a aromatase surge entre os dias gestacionais 15 e 16 e tem seu pico entre os dias gestacionais 19 e 20 (Negri-Cesi et al., 2001). Sabe-se que a ausência de aromatização durante esse período crítico do desenvolvimento hipotalâmico pode ter efeitos duradouros no desenvolvimento e desempenho reprodutivos de machos (Gerardin et al., 2008; Bakker et al, 1993). Por este motivo, ao nosso modelo de estudo foi incorporada a avaliação do desenvolvimento sexual de filhotes machos, incluindo parâmetros de desenvolvimento, hormonais e comportamentais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Conduzir um estudo experimental para avaliação da toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento da *P. incarnata* em ratas tratadas durante a gestação e amamentação, visando detectar efeitos adversos na fêmea prenhe ou lactante e sobre o desenvolvimento do concepto e prole após a exposição dos filhotes desde a concepção até o desmame.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

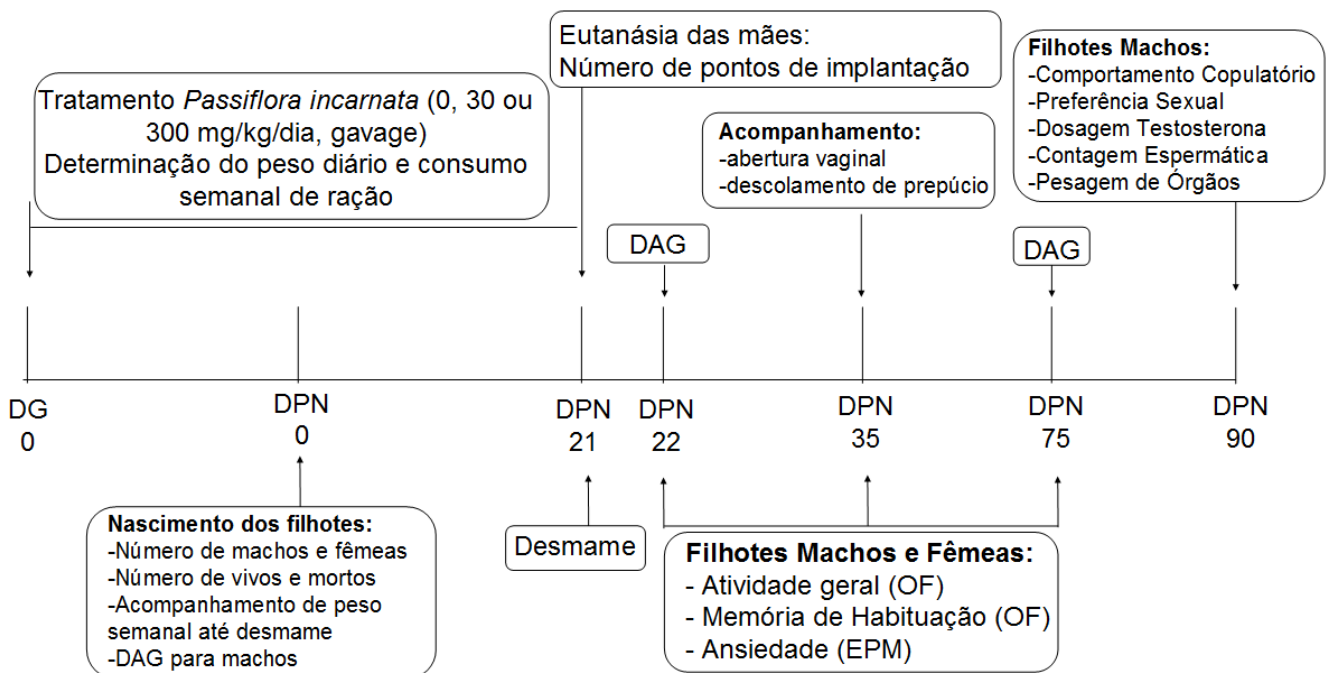
- Avaliar indicadores de toxicidade geral (ganho de peso, consumo de ração, bem-estar geral) e reprodutiva (duração da gestação, número de filhotes machos e fêmeas nascidos vivos e mortos) em ratas tratadas com *P. incarnata* durante a gestação e amamentação.
- Avaliar o comportamento (atividade geral, memória de habituação e ansiedade) dos filhotes machos e fêmeas recém-desmamados (22 dias), adolescentes (35 dias) e adultos (75 dias) expostos à *P. incarnata* durante a gestação e amamentação.
- Avaliar parâmetros de desenvolvimento sexual (distância anogenital, dia do descolamento do prepúcio, dia da abertura vaginal) nos filhotes.
- Executar a contagem espermática, registrar o peso dos órgãos relacionados à reprodução e avaliar o comportamento sexual de filhotes machos adultos (90 dias).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O diagrama abaixo resume o desenho experimental empregado nesse trabalho.

Figura 1 - Diagrama do desenho experimental. DG: dia gestacional; DPN: dia pós-natal; DAG: distância anogenital; OF: Campo aberto; EPM: labirinto em cruz elevado.



3.2 ANIMAIS E TRATAMENTO

Para a geração parental foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar, com aproximadamente 80 dias de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Para o acasalamento, ao final de cada dia foi colocado 1 macho em cada gaiola contendo 2 ou 3 fêmeas. Em cada manhã foi realizado esfregaço vaginal

e o dia gestacional (DG) 0 foi determinado quando se observou, ao microscópio óptico, a presença de células características da fase estro concomitantes com espermatozóides.

No DG 0, as ratas consideradas prenhes foram alojadas individualmente e separadas aleatoriamente em fêmeas controle (CON) ou fêmeas tratadas com *P. incarnata* (P). As fêmeas CON (n = 22 fêmeas) foram tratadas por gavagem diariamente com água, enquanto as fêmeas P receberam diariamente por gavagem 30 (P30, n = 21 fêmeas) ou 300 (P300, n = 19 fêmeas) mg/kg de *P. incarnata*. A duração do tratamento se deu do DG 0 ao dia pós-natal (DPN) 21. Como fonte de *P. incarnata*, foi utilizado um medicamento fitoterápico industrializado (Passiene[®]), na forma farmacêutica xarope, do Laboratório Herbarium. Este xarope é padronizado em 0,19% de vitexina. Em humanos, a dose de 20-30mg/kg/dia é normalmente recomendada.

Ao nascer (DPN 0), o número de filhotes foi contabilizado e as ninhadas foram pesadas. No DPN 4, as ninhadas foram reduzidas a 8 filhotes para evitar que filhotes pertencentes a ninhadas maiores recebessem menor quantidade de princípio(s) ativo(s) que filhotes de ninhadas menores. Os filhotes excedentes foram eutanasiados por decapitação. Sempre que possível foi mantido um número igual de machos e fêmeas por ninhada. Os filhotes foram desmamados no DPN 21 e alojados em grupos separados por gênero e teste a serem submetidos, até o momento das avaliações.

A unidade experimental foi a ninhada, ou seja, filhotes do mesmo gênero de uma mesma ninhada não foram utilizados para uma mesma avaliação.

Todos os animais tiveram livre acesso à água e ração (Nuvital[®]). Eles foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas a 21 ± 2 °C em um ciclo de 12:12h claro-escuro. Os animais foram aclimatizados por pelo menos 7 dias antes de iniciar os acasalamentos. Todos os procedimentos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL (CEEA 16/2010).

3.3 TOXICIDADE GERAL E DESEMPENHO REPRODUTIVO DAS MÃES

O peso corporal materno e a ingestão de ração foram registrados diária e semanalmente, respectivamente, durante todo o período de gestação e lactação. Além disso, o ganho de peso materno real foi estimado subtraindo-se o peso no DPN 0 do peso no DG 0. No DPN 0, o número de filhotes machos e fêmeas em cada ninhada foi determinado, bem como o peso total da ninhada. No DPN 21, as mães foram eutanasiadas com éter etílico e seus cornos uterinos, removidos. O número de sítios de implantação (Figura 2) foi contabilizado e a taxa de perda pós-implantação foi calculada por meio da seguinte equação:

$$\frac{(\text{número de pontos de implantação} - \text{número de filhotes nascidos vivos}) \times 100}{\text{número de pontos de implantação}}$$

Figura 2 - Sítios de implantação uterinos



3.4 DESENVOLVIMENTO FÍSICO DOS FILHOTES

O peso corporal de cada ninhada foi registrado e dividido pelo número total de filhotes nos DPN 7, 14 e 21. Dessa forma, encontrou-se o peso médio dos filhotes de cada ninhada. O dia da abertura vaginal das fêmeas e da separação prepucial dos machos foram registrados e utilizados como indicadores do início da maturidade sexual.

3.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS FILHOTES

Filhotes machos e fêmeas foram submetidos à avaliação comportamental nos DPN 22, 35 e 75. Os animais foram levados ao Laboratório de Análise de Comportamento 24 horas antes das realizações dos testes, para adaptação. O laboratório apresentava controle de temperatura, luminosidade e

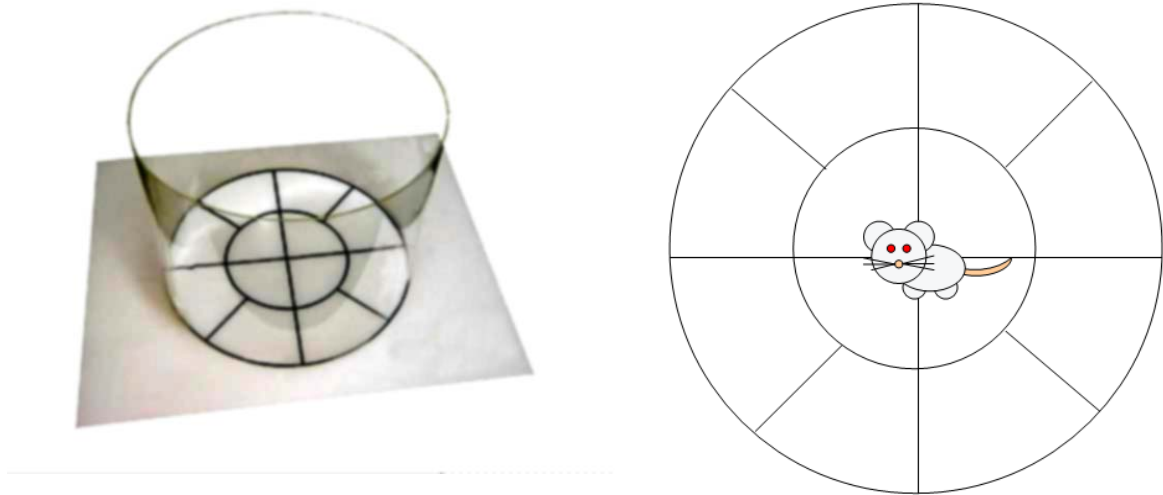
ruído. Em cada idade um filhote diferente foi avaliado. Todos os testes comportamentais foram gravados por uma câmera de vídeo ligada a um computador em uma sala adjacente. Os vídeos foram analisados de forma cega em relação ao tratamento.

3.5.1 Atividade Geral

A atividade geral foi avaliada por meio do teste de campo aberto (Broadhurst, 1960). O aparelho consistiu de uma superfície circular de madeira circundada por uma parede de acrílico. O diâmetro da arena utilizada para a avaliação de ratos recém-desmamados (DPN 22) foi de 39 cm e, para os adolescentes (DPN 35) e adultos (DPN 75), 60 cm. A superfície era branca e dividida em partes semelhantes por círculos concêntricos e segmentos de retas (Figura 3). Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e as seguintes variáveis foram observadas e registradas durante uma sessão de 3 minutos (Moreira et al, 2001;. Veenema et al, 2007):

- Locomoção: número de espaços invadidos pelo animal com as 4 patas;
- Levantar: número de vezes que o animal se apoiou sobre as patas traseiras;
- Limpeza: tempo, em segundos, que o animal gastou se limpando;
- Tempo de permanência na área periférica: tempo, em segundos, que o animal permaneceu nos espaços adjacentes à parede da arena;
- Tempo de permanência na área central.

Figura 3 - Arena do campo aberto. À esquerda, foto do modelo de aparelho utilizado. À direita, representação esquemática da vista superior da arena, com o animal posicionado ao centro.



3.5.2 Memória de Habituação

A memória de habituação foi avaliada de acordo com metodologia descrita por Barros et al. (2006), com modificações. Os animais foram recolocados no campo aberto 24 horas após a primeira sessão, descrita no item anterior, e o número de locomoções foi novamente quantificado por 3 minutos. A redução na contagem de locomoção foi interpretada como memória de habituação.

3.5.3 Ansiedade

A ansiedade foi avaliada por meio do teste de labirinto em cruz elevado (Pellow & File, 1986). O aparelho consistiu de dois braços abertos, 50 x 10 cm (comprimento x largura) e dois braços fechados, 50 x 10 x 50 cm (comprimento x largura x altura) opostos um ao outro (Figura 4). Ratos recém-desmamados (DPN 22) foram avaliados em um aparelho similar, mas as medidas foram de 30 x 5 cm para os braços abertos e 30 x 5 x 15 cm para os braços fechados. Para o teste, cada animal foi colocado no centro do labirinto, de frente para um dos braços abertos e o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados foram registrados por 5 min. A porcentagem de entradas nos braços abertos foi obtida dividindo-se o número de entradas nos braços abertos pelo número total de entradas

nos braços abertos e fechados, multiplicado por 100. A porcentagem de tempo gasto nos braços abertos foi obtida dividindo-se o tempo de permanência nos braços abertos pelo tempo total de permanência nos braços abertos e fechados, multiplicado por 100.

Figura 4 - Labirinto em cruz elevado. À esquerda, foto do modelo de aparelho utilizado. À direita, representação esquemática da vista superior da arena, com o animal posicionado ao centro, voltado para um dos braços abertos.



3.6 DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO EM FILHOTES MACHOS

Para a avaliação do desenvolvimento reprodutivo dos machos, 2 filhotes de cada ninhada foram utilizados: um para a avaliação do comportamento sexual no DPN 90-100 e outro para a determinação do dia da separação prepucial, distância anogenital (DAG) nos DPN 0, 22 e 75, níveis de testosterona plasmática, bem como o peso corpóreo, peso dos órgãos sexuais (testículo, epidídimo, próstata, vesícula seminal) e da hipófise, além da contagem espermática no DPN 90.

3.6.1 Quantificação de Testosterona

Com 90 dias, filhotes machos foram eutanasiados com éter etílico e o sangue foi coletado por punção cardíaca. O plasma foi separado por centrifugação

a 2500 rpm por 20 min. A concentração de testosterona plasmática foi quantificada por quimioluminescência (Abbott Chemiflex®, Irlanda).

3.6.2 Parâmetros Espermáticos

A contagem de espermátides nos testículos e espermatozóides no corpo/cabeça do epidídimo e cauda do epidídimo foi realizada em uma câmara de Neubauer de acordo com metodologia descrita por Robb et al. (1978), com algumas modificações. Para calcular a produção diária de espermatozóides (PDE), a média de espermátides contadas no testículo direito foi dividida por 6,1, que é o número de dias que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero. Para calcular o tempo de trânsito de espermatozóides, o número médio em cada região do epidídimo foi dividido pela PDE dos respectivos testículos.

3.6.3 Comportamento Sexual Masculino

No DPN 90, o comportamento sexual foi observado em filhotes machos sexualmente inexperientes, na fase escura de um ciclo claro/escuro invertido, sob luz vermelha fraca. Os animais foram submetidos a um período de 15 dias de adaptação ao ciclo claro/escuro invertido antes do início das avaliações. As observações sempre ocorreram 4h após o início da fase escura e foram registradas por uma câmera ligada a um monitor em uma sala adjacente.

Para a avaliação do comportamento copulatório, cada macho avaliado foi colocado em uma gaiola de acrílico e, após 5 minutos de adaptação, uma fêmea em estro foi introduzida na gaiola (Agmo, 1997). Durante um período de 30 minutos, os seguintes parâmetros foram observados e registrados:

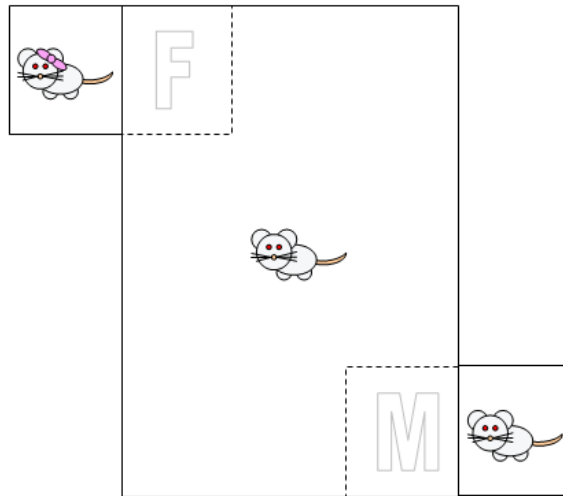
- latência para intromissão: tempo, em segundos, a partir da introdução da fêmea na gaiola até que ocorresse a primeira intromissão, ou seja, a penetração vaginal;
- latência para a primeira ejaculação: tempo, em segundos, a partir da introdução da fêmea na gaiola até a primeira ejaculação;
- número de intromissões até a primeira ejaculação;
- número de ejaculações em 30 min.

Quando um macho não apresentou sequer comportamento de monta dentro de 10 minutos de teste, a avaliação foi interrompida e repetida no dia seguinte. Se o macho novamente falhou na segunda tentativa, foi considerado sexualmente inativo. Filhotes machos foram considerados sexualmente competentes apenas quando exibiram todos os parâmetros analisados para avaliar o comportamento sexual, ou seja, monta, intromissão e ejaculação.

Os mesmos animais avaliados quanto ao comportamento copulatório foram submetidos ao teste de preferência sexual. Neste teste, foi utilizada uma arena retangular com 50 x 50 x 100 cm (altura x largura x comprimento), apresentando duas aberturas que se comunicavam com duas arenas menores, ambas com 25 cm² (Figura 5). As arenas menores posicionavam-se diagonalmente opostas uma à outra e a comunicação com a arena principal era fechada com uma tela de arame. Para o teste, uma fêmea em estro (incentivo sexual) foi colocada em uma das arenas pequenas e um macho sexualmente ativo (incentivo social) foi colocado na outra. O piso da arena principal possuía duas áreas delimitadas, de 25 cm² (zonas), em frente a cada abertura das arenas menores. Estas áreas foram chamadas de zona de incentivo sexual (zona da fêmea) e zona de incentivo social (zona do macho). O macho experimental foi posicionado no centro da arena principal e foi observado durante 20 minutos. O número de visitas e o tempo total gasto visitando cada zona de incentivo foi registrado, e um escore de preferência foi então calculado seguindo a seguinte equação (Agmo, 2003):

$$\frac{\text{tempo de permanência na zona de incentivo da fêmea} \times 100}{\text{tempo total gasto nas duas zonas de incentivo}}$$

Figura 5 - Representação esquemática da arena do teste de preferência sexual. F e M representam as zonas de incentivo da fêmea (sexual) e do macho (social), respectivamente.



3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Inicialmente, uma análise exploratória foi realizada para avaliar a distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Levene) de cada variável. Para variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, foram conduzidas análises paramétricas.

Devido ao elevado número de ninhadas empregadas neste estudo, as fêmeas prenhes não puderam ser tratadas de uma só vez e foram divididas em 3 acasalamentos, gerando 3 conjuntos de ninhadas em 3 diferentes períodos. Contudo, todos os três grupos de tratamento (CON, P30 e P300) foram distribuídos equilibradamente nos 3 acasalamentos. Para alguns parâmetros avaliados no presente estudo, nossa amostra foi composta de animais provenientes de acasalamentos diferentes e, neste caso, o acasalamento foi adicionado como um fator nas análises estatísticas paramétricas. Além disso, nos testes realizados com os filhotes de ambos os gêneros, o gênero também foi adicionado como um fator nas análises estatísticas paramétricas. Por outro lado, a idade não foi incluída como um fator na análise, ou seja, as análises comportamentais realizadas em diferentes idades foram analisadas separadamente. A razão para isso é que, uma vez que a avaliação comportamental ocorreu em momentos diferentes, outras variáveis ambientais além da idade podem ter estado presentes.

Os testes estatísticos empregados neste estudo foram:

- ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA): ganho de peso das mães e filhotes, consumo de ração, memória de habituação e distância anogenital;
- ANOVA Fatorial: ganho de peso materno real, tamanho da ninhada, peso da ninhada, perdas pós-implantação, campo aberto (locomoção, limpar, tempo de permanência na área central, tempo de permanência na área periférica), labirinto em cruz elevado; dosagem de testosterona, peso dos órgãos sexuais, contagem espermática e teste de preferência sexual;
- Kruskal-Wallis: campo aberto (limpeza);
- Teste exato de Fisher: comportamento copulatório.

Para o estabelecimento das conclusões adotou-se um $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

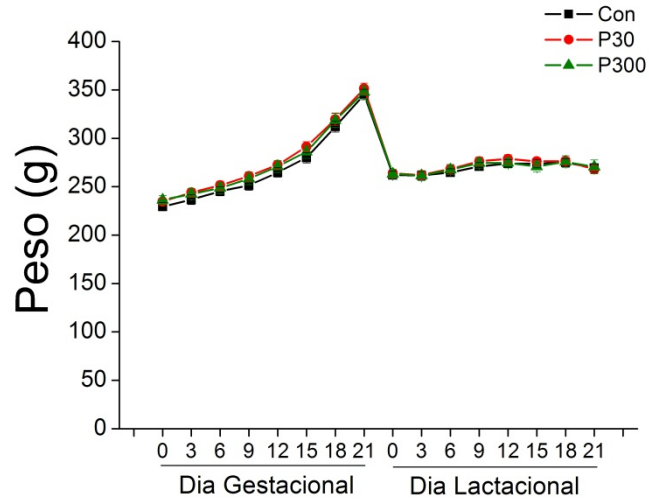
4.1 TOXICIDADE GERAL E DESEMPENHO REPRODUTIVO MATERNO

ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA) indicou um efeito do período no ganho de peso das mães [$F(15, 991) = 259,6, p < 0,0001$] e também no consumo de ração [$F(5, 371) = 653,5, p < 0,0001$], refletindo as flutuações que ocorrem durante a gravidez e lactação. O tratamento com *P. incarnata* não influenciou estas variáveis, como pode ser observado na Figura 6.

O tratamento com *P. incarnata* também não influenciou (ANOVA fatorial, $p > 0,05$) o ganho de peso real das mães (peso no DPN 0 - peso no DG 0) (Figura 7) assim como o número de perdas pós-implantação, tamanho da ninhada, peso dos filhotes ao nascer e a relações entre filhotes machos e fêmeas (Tabela 1). Filhotes natimortos foram observados em 2 ninhadas Con e em 2 ninhadas P300.

Figura 6 - Ganho de peso (A) e consumo de ração (B) durante a gestação e lactação. Dados expressos como média \pm EPM de 19-22 animais em cada grupo. ANOVA fatorial indicou apenas efeito do período. Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

A



B

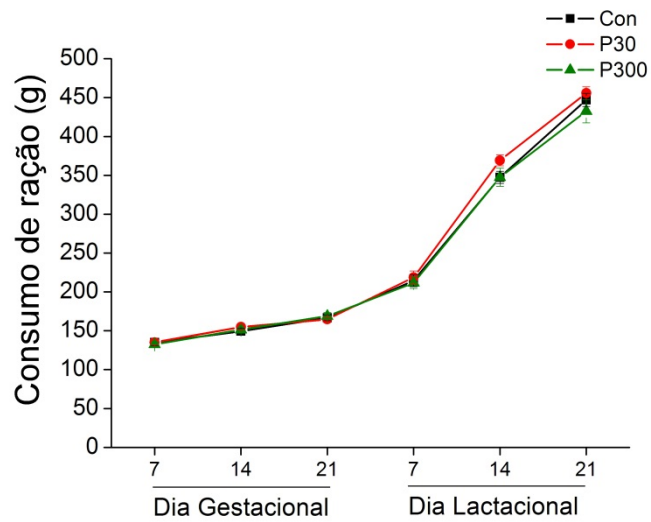


Figura 7 - Ganho de peso real das mães. Dados expressos como média \pm EPM de 19-22 animais em cada grupo. ANOVA fatorial, $p > 0,05$. Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

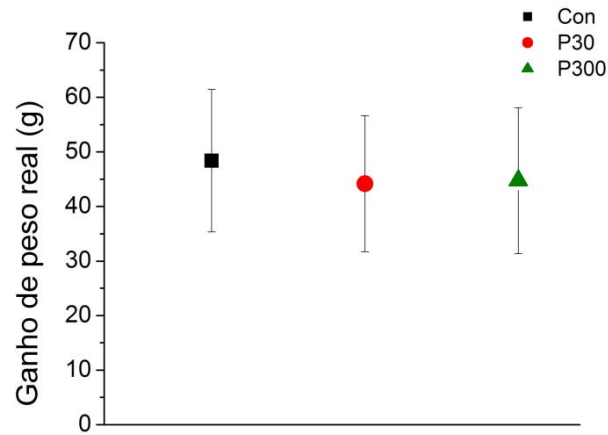


Tabela 1 - Desempenho reprodutivo materno.

	Con (n=22)	P 30 (n=21)	P 300 (n=19)
Número de implantações	12,1 \pm 0,3	12,9 \pm 0,3	12,3 \pm 0,4
Número de filhotes vivos	11,4 \pm 0,4	12,6 \pm 0,3	11,4 \pm 0,5
Perda pós-implantação (%)	5,3 \pm 1,8	3,4 \pm 1,4	4,9 \pm 1,8
Média do peso dos filhotes (g)	5,9 \pm 0,1	5,7 \pm 0,1	5,9 \pm 0,1
Relação macho/fêmea ^a	1,2 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1

Média \pm EPM. ANOVA fatorial, $p > 0,05$.

^a Número de machos vivos dividido pelo número de fêmeas vivas.

Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

4.2 DESENVOLVIMENTO FÍSICO DOS FILHOTES

O peso corporal dos filhotes durante as primeiras três semanas de idade não foi influenciado pela exposição à *P. incarnata* como indicado por RMANOVA. Houve apenas um efeito da idade [F (3, 61) = 1606,0, p <0,0001], refletindo o ganho de peso dos filhotes no decorrer do desenvolvimento (Figura 8).

Em relação à distância anogenital (Figura 9) a idade foi também o único fator significativo [F (2, 114) = 3148,3, p <0,0001].

Ainda mais, ANOVA fatorial mostrou que a exposição à *P. incarnata* não influenciou o dia da abertura vaginal de fêmeas (Con: 35,9 ± 0,3; P30: 36,0 ± 0,3 e P300: 35,8 ± 0,3) e da separação prepucial de machos (Con: 43,5 ± 1,0; P30: 43,8 ± 1,0 e P300: 43,5 ± 1,0).

Figura 8 - Ganho de peso dos filhotes do nascimento até o desmame. Dados expressos como média ± EPM de 19-22 ninhadas em cada grupo. ANOVA fatorial indicou apenas efeito da idade, refletindo o ganho de peso dos filhotes. Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

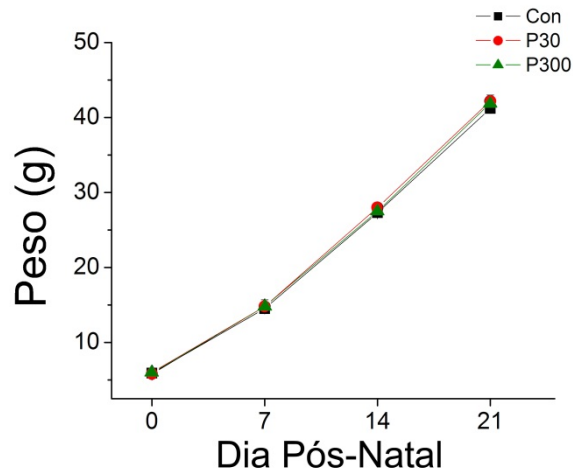
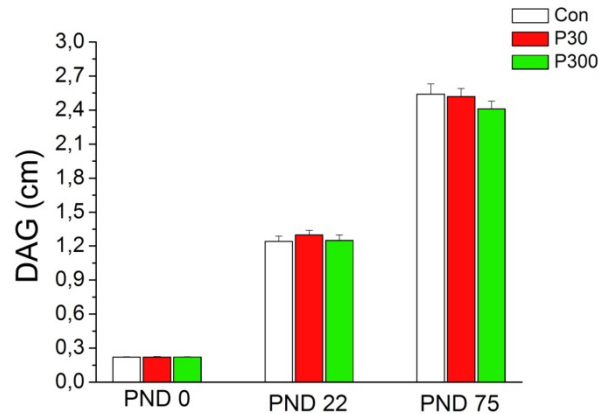


Figura 9 - Distância anogenital dos filhotes machos nos DPN 0, 22 e 75. Dados expressos como média \pm EPM de 12-13 animais em cada grupo. ANOVA fatorial indicou apenas efeito da idade. Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.



4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL E ANSIEDADE DOS FILHOTES

Os dados da avaliação comportamental de filhotes no labirinto em cruz elevado e campo aberto estão apresentados nas Figuras 10 a 15.

No DPN 22 (Figuras 10 e 11), ANOVA fatorial mostrou que nem gênero, acasalamento ou exposição à *P. incarnata* influenciaram os parâmetros avaliados no teste de campo aberto (Figura 11). Os dados do comportamento de limpeza foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e também não foi detectado efeito de tratamento. No labirinto em cruz elevado, ANOVA fatorial indicou uma interação entre tratamento e gênero na porcentagem de entradas nos braços abertos [$F(2,86) = 3,4, p < 0,05$]. O teste de Tukey revelou que filhotes machos expostos a 30 mg/kg de *P. incarnata* apresentaram maior porcentagem de entradas nos braços abertos do que os filhotes controles (Figura 12).

No DPN 35 (Figuras 12 e 13), nenhum efeito de tratamento foi significativo na ANOVA fatorial, tanto no campo aberto como no labirinto em cruz elevado. Houve, entretanto, um efeito do gênero na locomoção [$F(1,74) = 4,97, p < 0,05$] e na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos [$F(1,66) = 4,7, p < 0,05$]. Independentemente de exposição, as fêmeas foram mais ativas e permaneceram maior tempo nos braços abertos do que os machos. Na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos, houve uma interação entre gênero e tratamento [$F(2,66) = 3,4, p < 0,05$] e o teste de Tukey indicou que filhotes fêmeas expostos a 300 mg/kg apresentaram uma porcentagem superior em relação aos

seus irmãos machos expostos à mesma dose mas não houve diferença em relação ao grupo controle.

No DPN 75 (Figuras 14 e 15), ANOVA fatorial indicou efeito apenas do gênero sobre a locomoção [$F(1,72) = 14,5, p < 0,001$] e levantar [$F(1,72) = 12,0, p < 0,001$]. Como observado no DPN 35, as fêmeas foram mais ativas que os machos.

Figura 10 - Avaliação da atividade geral de filhotes machos e fêmeas no campo aberto no DPN 22. Dados expressos como média \pm EPM de 11-13 animais em cada grupo.. Anova fatorial, $p > 0,05$. Limpeza analisada por Kruskal-Wallis, $p > 0,05$. Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

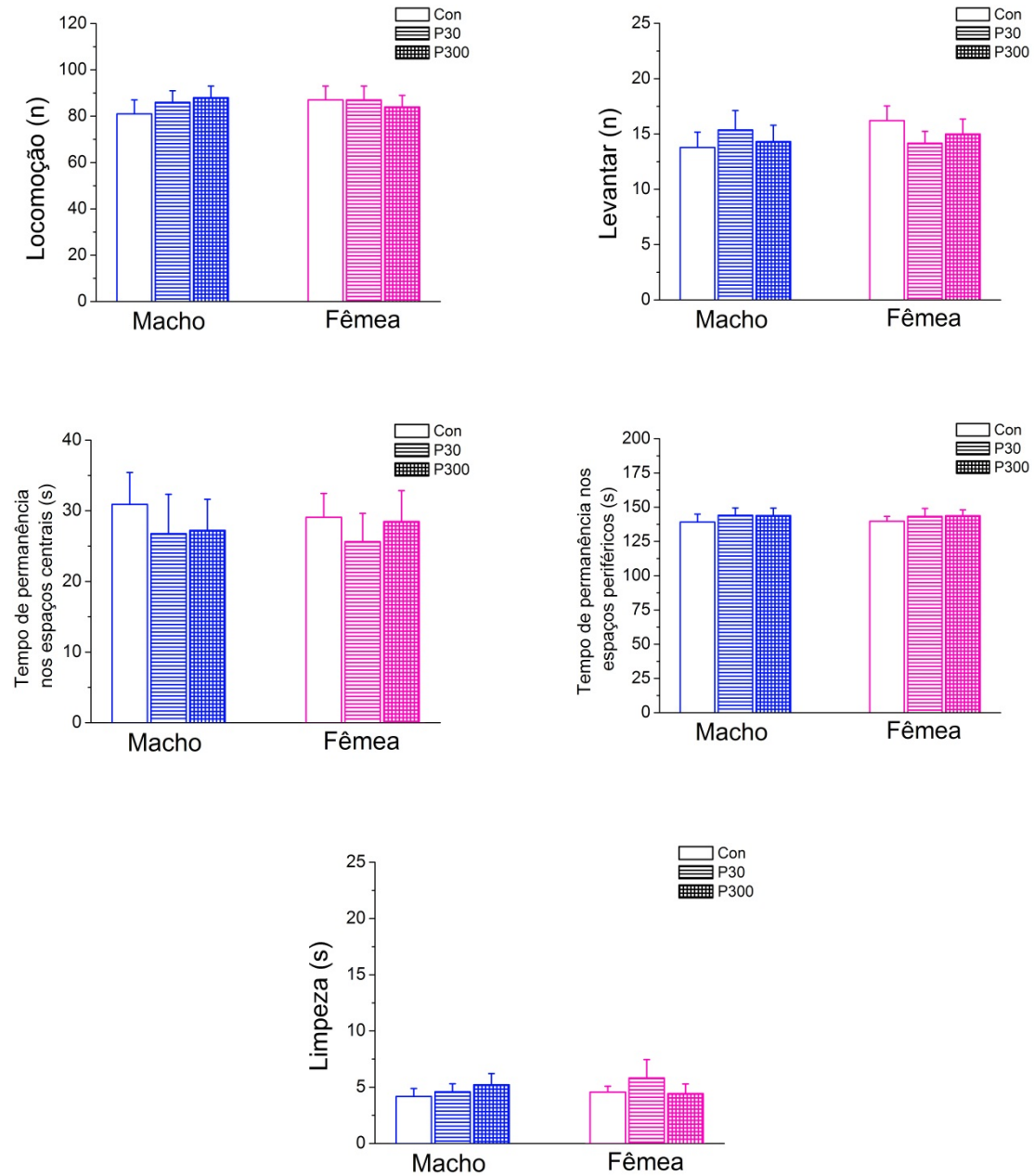


Figura 11 - Avaliação da ansiedade de filhotes machos e fêmeas no labirinto em cruz elevado no DPN 22. Dados expressos como média \pm EPM de 12-17 animais em cada grupo.. * $p < 0,05$ comparado ao Con (ANOVA fatorial complementada com o teste de Tukey). Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

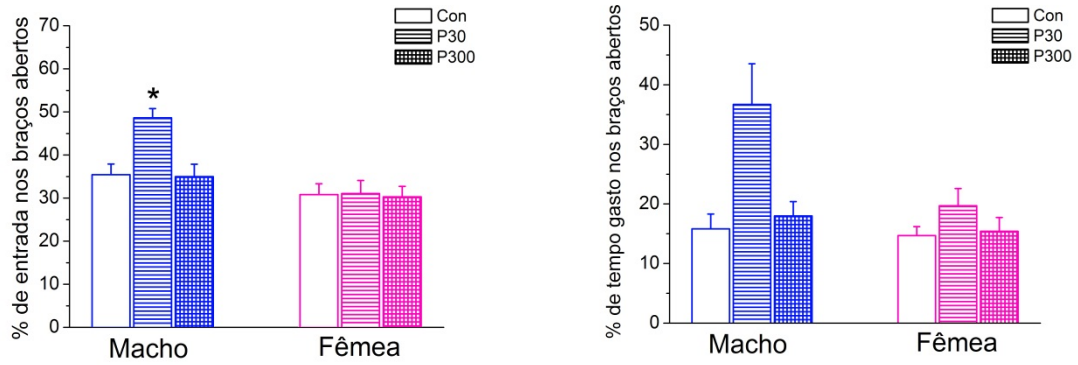


Figura 12 - Avaliação da atividade geral de filhotes machos e fêmeas no campo aberto no DPN 35. Dados expressos como média \pm EPM de 12-14 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos machos (Anova fatorial). Limpeza analisada por Kruskal-Wallis, $p > 0.05$. Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

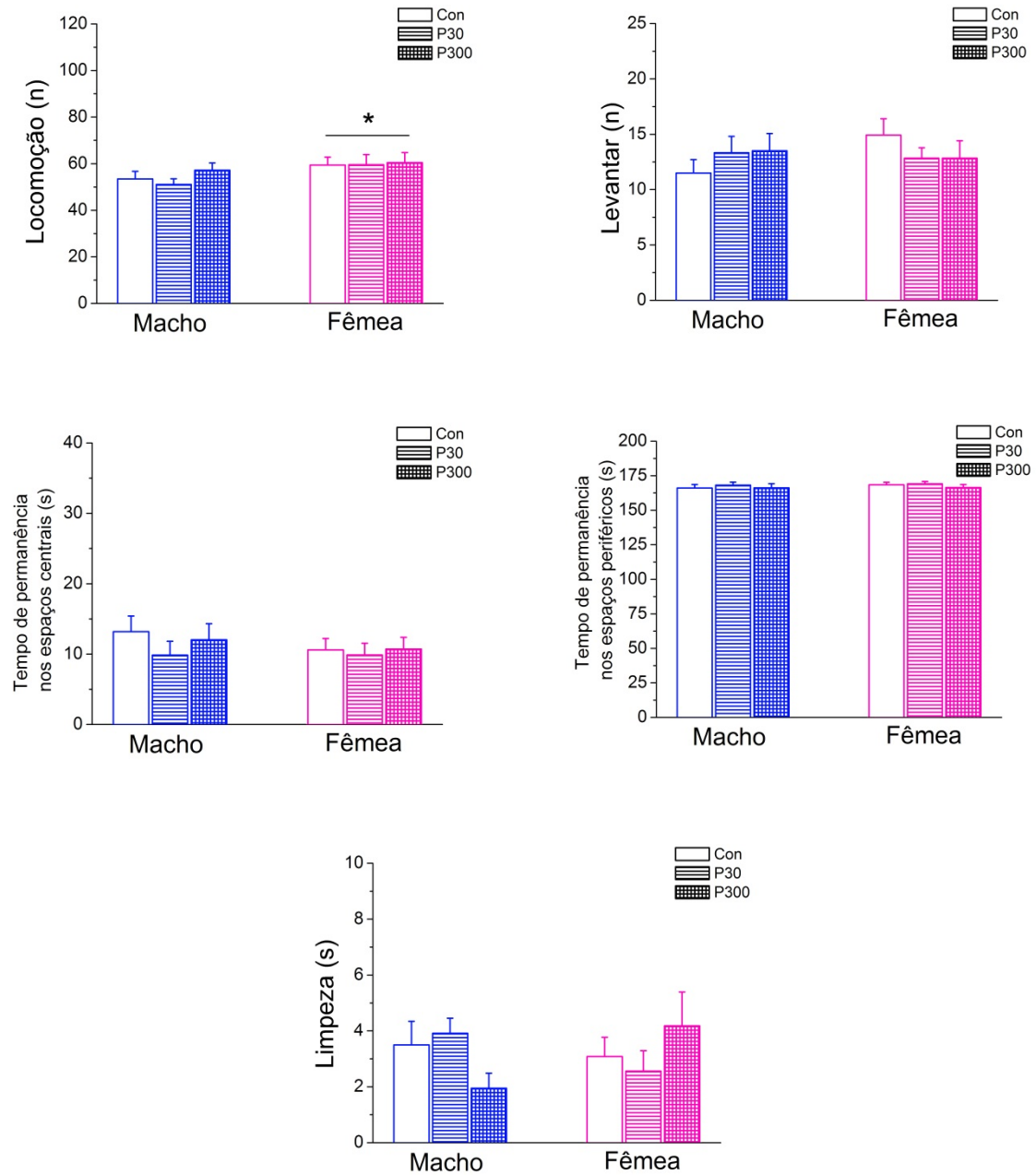


Figura 13 - Avaliação da ansiedade de filhotes machos e fêmeas no labirinto em cruz elevado no DPN 35. Dados expressos como média \pm EPM de 7-14 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ em relação aos machos P300 (ANOVA fatorial). Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

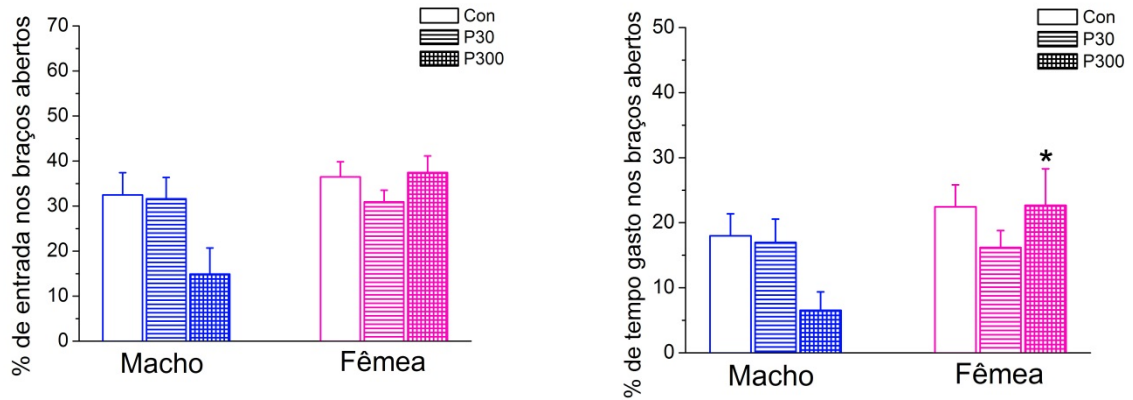


Figura 14 - Avaliação da atividade geral de filhotes machos e fêmeas no campo aberto no DPN 75. Dados expressos como média \pm EPM de 11-13 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado aos respectivos machos (Anova fatorial). Limpeza analisada por Kruskal-Wallis, $p > 0,05$. Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

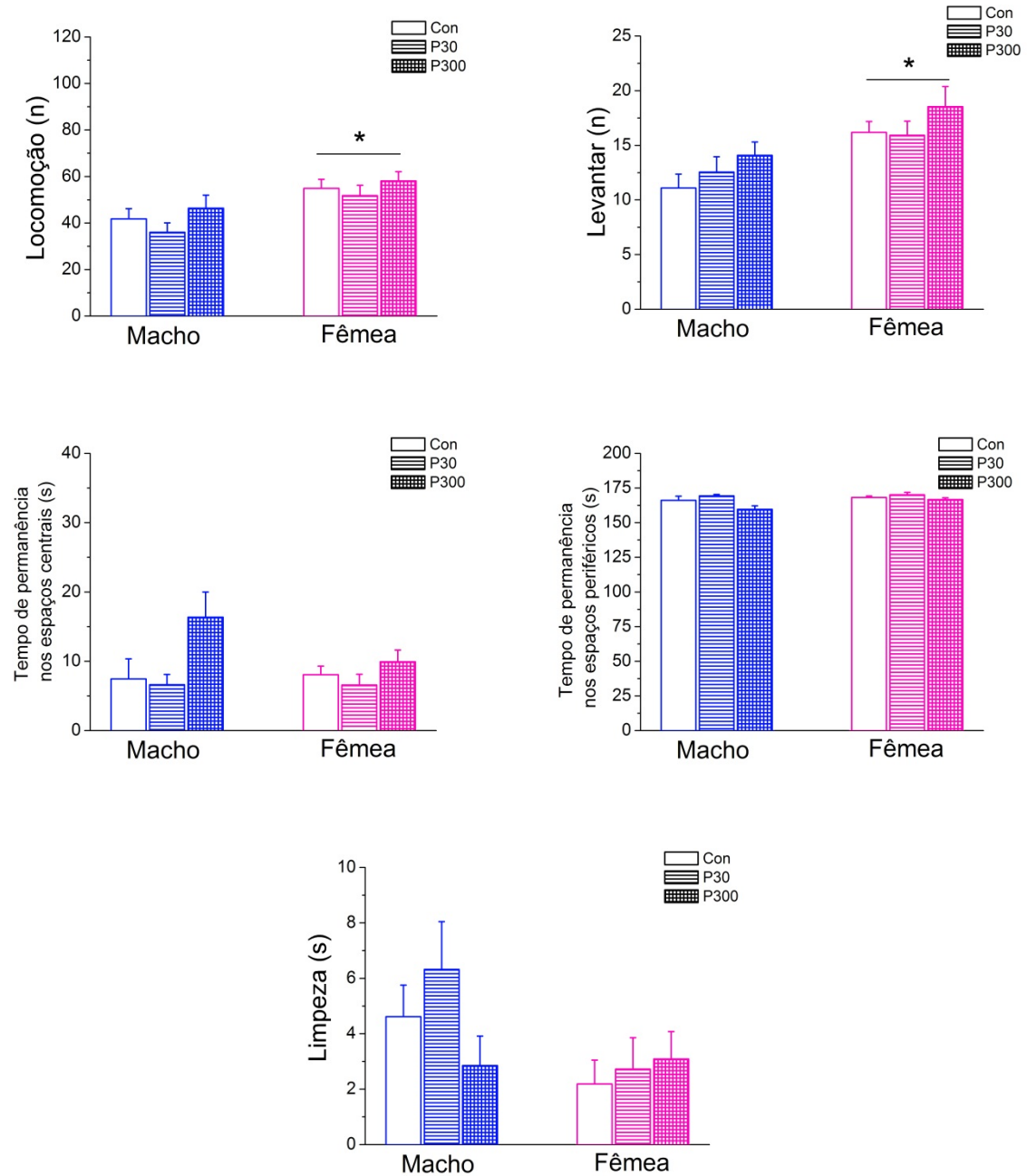
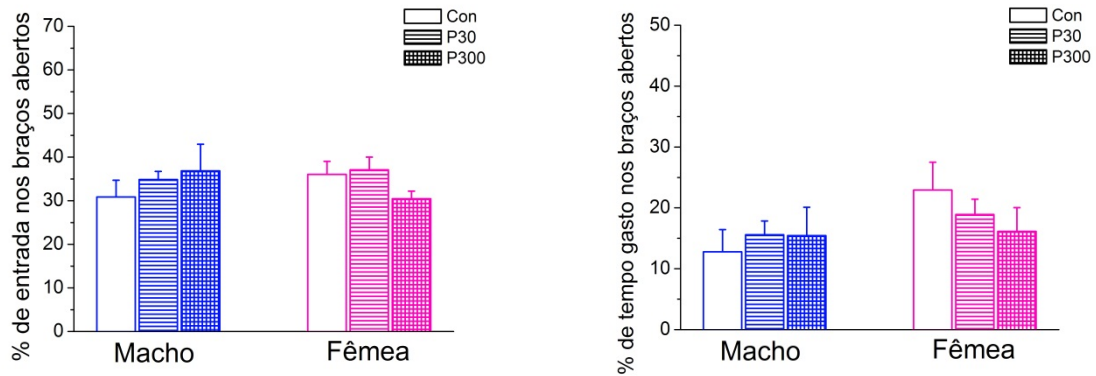


Figura 15 - Avaliação da ansiedade de filhotes machos e fêmeas no labirinto em cruz elevado no DPN 75. Dados expressos como média \pm EPM de 5-14 animais em cada grupo. ANOVA fatorial, $p > 0,05$. (5-14 animais)



4.4 AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA DE HABITUAÇÃO DOS FILHOTES

Os dados referentes à avaliação da memória de habituação estão mostrados na Tabela 2.

RMANOVA indicou que a locomoção na segunda sessão do campo aberto foi significativamente reduzida quando comparada com a primeira sessão em todos os grupos experimentais (Con, P30 e P300) tanto no DPN 22 ($[F(1,77) = 114,4, p < 0,001]$) quanto no DPN 35 ($[F(1,74) = 23,2, p < 0,001]$). No DPN 75, contudo, não houve diferença entre as sessões em quaisquer grupos de tratamento, incluindo o grupo controle, sugerindo que, para essa idade, o protocolo adotado não foi eficiente para avaliação da memória de habituação.

Tabela 2 - Avaliação da memória de habituação em filhotes machos e fêmeas (22,35 e 75 dias de idade) avaliados no campo aberto.

	Locomoção - Machos		Locomoção - Fêmea	
	1ª sessão	2ª sessão	1ª sessão	2ª sessão
DPN 22				
Con (cont.)	81,4 ± 6,1	65,1 ± 6,2*	86,9 ± 5,6	60,4 ± 5,3*
P 30 (cont.)	85,7 ± 5,1	68,3 ± 4,1*	87,4 ± 7,4	57,8 ± 3,4*
P 300 (cont.)	88,2 ± 5,3	65,0 ± 4,9*	83,6 ± 5,2	62,8 ± 5,3*
DPN 35				
Con (cont.)	53,4 ± 3,3	42,1 ± 4,8*	59,4 ± 3,4	49,6 ± 3,5*
P 30 (cont.)	51,1 ± 2,4	42,7 ± 2,9*	59,6 ± 4,3	51,4 ± 4,9*
P 300 (cont.)	57,2 ± 3,1	52,8 ± 4,6*	60,5 ± 4,3	52,2 ± 5,0*
DPN 75				
Con (cont.)	41,8 ± 4,4	33,2 ± 3,6	54,9 ± 3,9	53,4 ± 4,5
P 30 (cont.)	36,0 ± 4,0	33,2 ± 4,8	51,8 ± 4,4	57,6 ± 4,1
P 300 (cont.)	46,3 ± 5,6	35,3 ± 5,1	58,1 ± 4,0	60,2 ± 4,3

Dados expressos como média ± EPM de 12-14 filhotes em cada grupo.* p < 0,05 comparado à primeira sessão (ANOVA fatorial para medidas repetidas). Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

4.5 Desenvolvimento Reprodutivo nos Filhotes Machos

A distância anogenital e o dia da separação prepucial estão descritos no item 4.2.

A Tabela 3 apresenta os dados referentes ao peso corpóreo dos filhotes machos aos 90 dias de idade, bem como peso dos órgãos sexuais e hipófise e ainda parâmetros de contagem espermática. ANOVA indicou que a exposição à *P. incarnata* não afetou quaisquer dessas variáveis. Ainda mais, nenhuma alteração foi observada nos níveis plasmáticos de testosterona nos filhotes com 90 dias de idade (Figura 17).

A avaliação do comportamento copulatório em filhotes machos adultos está apresentada na Tabela 4. Devido ao baixo número de animais do grupo P300 que apresentaram intromissão e ejaculação, os dados foram analisados como variáveis categóricas, ou seja, os animais foram considerados sexualmente competentes (quando apresentaram intromissão e ejaculação) ou sexualmente não-competentes (quando um dos comportamentos foi ausente). O teste exato de Fisher mostrou que a frequência de animais sexualmente competentes no grupo P 300 foi significativamente menor em comparação com os grupos P30 e Con (valor teste exato de Fisher = 7,95, $p < 0,05$). Os dados de latência não estão sendo apresentados porque não foram analisados devido à categorização das variáveis.

A avaliação do comportamento de preferência sexual em filhotes machos adultos está apresentada na Tabela 5. ANOVA indicou que a exposição à *P. incarnata* não influenciou de maneira estatisticamente significativa os parâmetros avaliados neste teste.

Tabela 3 Efeito da exposição à *P. incarnata* durante a gestação e lactação no peso corpóreo, peso úmido dos órgãos e contagem espermática de ratos no DPN 90.

	Con (n=12)	P 30 (n=12)	P 300 (n=13)
Peso corpóreo (g)	342,9 ± 9,2	330,6 ± 7,7	350,0 ± 9,1
Peso úmido dos órgãos			
Testículo (g)	1,5 ± 0,05	1,5 ± 0,04	1,5 ± 0,03
Epidídimo (g)	0,49 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,01
Próstata (g)	0,35 ± 0,04	0,29 ± 0,02	0,38 ± 0,04
Vesícula seminal com secreção (g)	0,55 ± 0,03	0,54 ± 0,02	0,50 ± 0,03
Vesícula seminal sem secreção (g)	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Hipófise (mg)	8,0 ± 0,83	7,7 ± 0,84	8,2 ± 0,34
Contagem espermática			
Nº espermátides/testículo (x10 ⁶)	124,4 ± 2,8	129,1 ± 4,7	127,6 ± 2,0
PDE (x10 ⁶ /testículo/dia)	26,0 ± 1,1	27,3 ± 1,5	27,0 ± 0,8
Nº espermatozóides na cabeça/corpo do epidídimo (x10 ⁶)	399,9 ± 49,5	470,3 ± 35,4	483,0 ± 36,8
Tempo de trânsito de espermatozóides na cabeça/corpo (dias)	3,9 ± 0,4	4,3 ± 0,2	4,4 ± 0,3
Nº espermatozóides na cauda do epidídimo (x10 ⁶)	771,5 ± 51,7	810,3 ± 48,1	864,7 ± 52,8
Tempo de trânsito na cauda (dias)	6,1 ± 0,5	5,9 ± 0,3	7,0 ± 0,5

Dados expressos como média ± EPM. ANOVA fatorial, p > 0,05.

PDE: produção diária de espermatozóides; Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

Figura 16 - Efeito da exposição à *P. incarnata* sobre a concentração plasmática de testosterona no DPN 90. Dados expressos como média \pm EPM de 12-13 animais em cada grupo. Anova fatorial, $p > 0.05$. Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

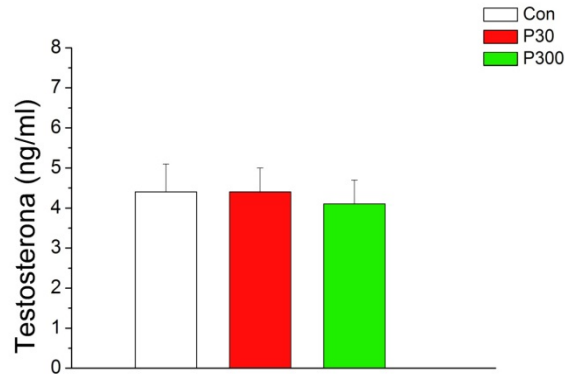


Tabela 4 - Avaliação do comportamento copulatório de filhotes machos adultos.

	Con	P 30	P 300
Número de intromissões	15,1 \pm 1,8 (9/11)	12,1 \pm 1,5 (10/12)	24,2 \pm 4,9 (5/11)
Número de ejaculações	1,9 \pm 0,2 (8/11)	2,2 \pm 0,3 (10/12)	1,3 \pm 0,3 (3/11)
Animais sexualmente competentes ^a	73% (8/11)	83% (10/12)	27% (3/11)*

Dados expressos como média \pm EPM. O número de animais que apresentaram comportamento e o número total de animais avaliados estão entre parênteses. * $p < 0.05$ comparado com controle e P30 (teste exato de Fischer).

^a Machos foram considerados sexualmente competentes na presença de intromissão e ejaculação.

Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

Tabela 5 - Avaliação do comportamento de preferência sexual em filhotes machos adultos.

	Con (n=11)	P 30 (n=12)	P 300 (n=11)
Tempo na zona do macho (s)	226,4 ± 29,8	334,8 ± 63,9	216,5 ± 23,9
Visitas à zona do macho (n ^o)	18,1 ± 2,7	16,3 ± 1,5	17,4 ± 1,4
Tempo na zona da fêmea (s)	567,9 ± 78,7	536,7 ± 54,3	533,6 ± 72,7
Visitas à zona da fêmea (n ^o)	20,5 ± 2,8	17,5 ± 1,4	20,5 ± 2,1
Escore de preferência (%) ^a	66,6 ± 6,5	62,5 ± 5,9	67,4 ± 5,6

Dados expressos como média ± EPM. ANOVA fatorial, $p > 0.05$.

^a Tempo gasto na zona da fêmea/total de tempo gasto das duas zonas de incentivo, multiplicado por 100.

Con: água; P 30: *P. incarnata* 30 mg/kg; P 300: *P. incarnata* 300 mg/kg.

5 DISCUSSÃO

Em estudos de toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, a avaliação da toxicidade materna é fundamental. Embora algum grau de toxicidade materna seja exigido em diretrizes regulatórias, não há consenso sobre qual nível de toxicidade materna é aceitável (uma revisão sobre esse tópico pode ser encontrada em Beyer et al., 2011). Os principais indicadores não-invasivos de toxicidade materna são o ganho de peso corporal e o consumo de ração. Ao avaliar o ganho de peso materno deve ser lembrado que parâmetros referentes à ninhada (peso ou tamanho) podem influenciar o peso materno. Por este motivo, o ganho de peso materno real deve ser calculado subtraindo-se o peso do útero com fetos (se foi realizada laparotomia), ou o peso da ninhada ao nascer, do peso materno. Neste trabalho, o tratamento com *P. incarnata* não influenciou a ingestão alimentar, ganho de peso materno e ganho de peso materno real, sugerindo que não ocorreu toxicidade materna geral e que não foi atingida a chamada dose máxima tolerada (DMT). O desempenho reprodutivo materno também não foi influenciado pelo regime de tratamento com *P. incarnata* adotado neste estudo, uma vez que nenhuma alteração foi observada no número de sítios de implantação uterinos, no tamanho e peso da ninhada e perdas pós-implantação.

O desenvolvimento físico dos filhotes foi avaliado por meio do ganho de peso corporal, o qual tem sido sugerido como sendo o melhor indicador deste parâmetro e altamente correlacionado com os marcos de desenvolvimento pré-desmame (piloereção, erupção de incisivo, etc) (ICH, 2005). Adicionalmente ao ganho de peso corporal, neste estudo, o dia da abertura vaginal em filhotes fêmeas e da separação prepucial em machos foram acompanhados como indicadores do início da maturidade sexual. A exposição à *P. incarnata* durante a gestação e amamentação não influenciou o desenvolvimento físico e o início da maturidade sexual em ratos.

A avaliação comportamental de ambos os filhotes machos e fêmeas em diferentes idades no campo aberto indicou ausência de efeito da *P. incarnata* sobre a atividade motora, bem como sobre a memória de habituação. Em relação a este último teste, houve um problema no protocolo experimental no DPN 75. Nesta idade, nenhum dos grupos experimentais (incluindo controle) apresentou locomoção reduzida na segunda sessão do campo aberto e, por isso, os dados sobre a

memória de habituação no DPN 75 são inconclusivos. Embora sessões de 3 minutos no campo aberto tenham sido apropriadas para induzir memória de habituação nos animais com 22 e 35 dias de idade, o mesmo não ocorreu nos animais com 75 dias de idade. Vianna et al. (2001) descreveram que, em ratos adultos, a redução de locomoção na segunda sessão de campo aberto foi mais evidente quando a primeira sessão durou 5 ou 10 minutos ao invés de 1 ou 2 minutos.

No teste de labirinto em cruz elevado foi observado aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos em filhotes com 22 dias de idade expostos à *P. incarnata*, sugerindo possível efeito ansiolítico-símile. No entanto, este efeito parece ser um fraco indicador de alteração neurológica nestes animais, uma vez que foi restrito a apenas um gênero (masculino), um nível de exposição (30 mg/kg) e uma idade (DPN 22).

O resultado mais intrigante obtido neste estudo foi a alteração do comportamento copulatório em filhotes machos expostos a 300 mg/kg de *P. incarnata* durante a gestação e lactação. Dos onze animais testados, apenas cinco apresentaram comportamento de intromissão e, destes, apenas três foram capazes de ejetar.

A benzoflavona, um dos constituintes da *P. incarnata*, tem sido descrita na literatura como inibidora da aromatase (Dhawan, 2002), uma enzima da família citocromo P450 responsável pela conversão de testosterona a estradiol, em um processo chamado de aromatização.

Durante o período perinatal, a conversão de androgênios em estrogênios é responsável pela maturação sexual do hipotálamo e para o estabelecimento e manifestação de padrões sexuais masculinos na vida adulta (Booth, 1977). Além disso, durante a idade adulta, aromatização neural é uma etapa crítica no controle do comportamento sexual masculino (Feder & Whalen, 1965). Curiosamente, o estrógeno é tão (ou até mais) eficaz quanto a testosterona no controle do comportamento sexual masculino adulto (Freeman & Rissman, 1996).

É tentador sugerir que o prejuízo do comportamento copulatório observado em filhotes machos poderia estar vinculado a uma ação da *P. incarnata* na aromatização durante o período de maturação sexual do hipotálamo. De fato, prejuízo do comportamento copulatório também tem sido descrito após a exposição pré-natal ao inibidor da aromatase letrozol (Gerardin et al., 2008) e em camundongos nocauteados para aromatase (Jones et al., 2006).

Recentemente, Buratti et al (2011) relataram que a exposição ao praguicida clorpirifós *in utero* (dias 15-18 de gestação) resultou em uma redução significativa (cerca de 50% do valor do controle) na atividade da aromatase hepática no DPN 15, mas não no DPN 150. Este resultado ilustra que a exposição a xenobióticos durante o período de desenvolvimento pode resultar em alterações da atividade da aromatase mesmo quando cessada a exposição, ou seja, mesmo quando o xenobiótico não está mais presente no organismo. Considerando que o comportamento sexual pode depender mais de uma ação estrogênica do que de uma ação androgênica (Freeman & Rissman, 1996), se a exposição durante o desenvolvimento à *P. incarnata* induziu alterações duradouras na atividade da aromatase, a falta de aromatização da testosterona em animais adultos também poderia estar envolvida no prejuízo do comportamento copulatório, ou seja, o prejuízo observado poderia não ser explicado apenas por uma alteração na maturação sexual hipotalâmica. É interessante notar que ratos machos adultos tratados com fadrozol, um outro inibidor da aromatase, exibiram prejuízo no comportamento sexual (diminuição na intromissão e ejaculação), na ausência de quaisquer alterações nos níveis plasmáticos de testosterona (Roselli et al, 2003). No entanto, para comprovar a hipótese da inibição de longa duração da aromatase, estudos futuros deverão investigar a atividade desta enzima após exposição a *P. incarnata* durante o desenvolvimento.

Diferentemente do comportamento sexual copulatório, a preferência sexual não foi alterada pela exposição à *P. incarnata*. O comportamento sexual masculino pode ser dividido em pelo menos dois componentes distintos: um mecanismo apetitivo que induz o macho a buscar e abordar uma fêmea receptiva, e um componente consumatório que envolve o contato sexual, ou seja, monta, intromissão e ejaculação (Roselli et al, 2003).

Nossos resultados sugerem um efeito negativo da exposição à *P. incarnata* sobre os comportamentos de consumação, mas não sobre a preferência sexual. Estudos realizados com furões castrados (Baum et al, 1990) e ratos (Attila et al., 2010) têm mostrado que a testosterona é o principal hormônio envolvido no controle da preferência sexual, mas que o estrogênio pode também ter alguma função (Attila et al., 2010), embora existam resultados contraditórios a esse respeito na literatura. Preferência sexual prejudicada tem sido relatada após a administração de ATD (1,4,6-androstarieno-3,17-diona), um inibidor da aromatase, a recém-

nascidos (Bakker et al, 1993). Além disso, a inibição da aromatase durante o período neonatal, seguido por castração e tratamento com estradiol na fase adulta pode reverter prejuízos observados na preferência sexual (Bakker et al, 1993, Bakker et al, 1996), sugerindo um papel para estrogênios neste comportamento. Por outro lado, em ratos nocauteados para aromatase, a preferência por odores relacionados à fêmea e ativação de *c-Fos* pelo sistema vomeronasal não dependeram de estradiol (Aste et al., 2003).

Apesar dos resultados contraditórios encontrados na literatura, é interessante salientar que os resultados observados com a *P. incarnata*, como alteração do comportamento copulatório na ausência de alteração da preferência sexual, estão em conformidade com os resultados observados em camundongos nocauteados para aromatase.

6 CONCLUSÕES

Por meio deste estudo é possível concluir que a administração de *P. incarnata* não provocou toxicidade geral e reprodutiva em ratas prenhes. Os filhotes expostos à *P. incarnata* não apresentaram alterações significativas na atividade geral, ansiedade e memória de habituação. Este estudo, entretanto, demonstrou que a exposição à *P. incarnata* durante a gestação e lactação prejudicou o comportamento copulatório de ratos machos adultos, na ausência de alteração nos níveis plasmáticos de testosterona e outros parâmetros relacionados com a testosterona, como a distância anogenital. Ainda mais, a *P. incarnata* não induziu alterações na produção de espermatozoides em machos adultos. A hipótese de que a alteração da aromatização durante o período perinatal e/ou de longa duração possa estar associada com o efeito observado merece investigação mais aprofundada.

REFERÊNCIAS

- Aste, N., Honda, S., Harada, N., (2003). Forebrain Fos responses to reproductively related chemosensory cues in aromatase knockout mice. *Brain. Res. Bull.* 60, 191–200.
- Agmo, A. (1997). Male rat sexual behavior. *Brain. Res.* 1, 203–9.
- Agmo A. (2003). Lack of opioid or dopaminergic effects on unconditioned sexual incentive motivation in male rats. *Behav. Neurosci.* 117, 55-68.
- Attila, M., Oksala, R., Agmo, A. (2010). Sexual incentive motivation in male rats requires both androgens and estrogens. *Horm. Behav.* 58, 341-51.
- Bakker, J., Brand, T., Van Ophemert, J., Slob, A.K. (1993). Hormonal regulation of adult partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats. *Behav. Neurosci.* 107, 480-7.
- Bakker, J., Van Ophemert, J., Slob, A.K. (1996). Sexual differentiation of odor and partner preference in rat. *Physiol. Behav.* 60, 489-94.
- Barros, D., Amaral, O., Izquierdo, I., Geracitano, L., Raseira, M.C.B., Henriques, A.T., Ramirez, M.R. (2006). Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. *Pharmacol., Biochem. and Behav.* 84, 229-34.
- Baum, M.J., Carroll, R.S., Tobet, S.A. (1990). Steroidal control of behavioural, neuroendocrine and brain sexual differentiation. *J. Neuroendocrinol.* 2, 401-18.
- Beyer, B.K., Chernoff, N., Danielsson, B.R., Davis-Bruno, K., Harrouk, W., Hood, R.D. (2011). ILSI/HESI maternal toxicity workshop summary: maternal toxicity and its impact on study design and data interpretation. *Birth. Defects. Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 92, 26-51.
- Booth, J.E. (1997). Sexual behavior of neonatally castrated rats injected during infancy with oestrogen and dihydrotestosterone. *J. Endocrinol.* 72, 135-42.
- Brasil. Presidência da República – Casa Civil. Decreto nº5.813, de 22 de junho de 2006. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Decreto_Fito.pdf> Acesso em Janeiro de 2011
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 95, de 11 de dezembro de 2008. Regulamenta o texto de bulas de medicamentos fitoterápicos. Disponível em:<http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao95_11_12_08.pdf>. Acesso em set. de 2011.
- Brasil. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde. Disponível em:
<<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>> Acesso em 12 de jan. de 2012.

- Broadhurst, P.L. (1960). Experiments in psychogenetics. In: Eysenk, H.J. Experiments in personality. Rutledge and Kegan Paul, London, pp. 31-61.
- Brown SS, Eisenberg L. The best intentions: unintended pregnancy and the well-being of children and families. Washington, DC: National Academy Press; 1995.
- Buratti, F.M., De Angelis, G., Ricceri, L., Venerosi, A., Calamandrei, G., Testai, E. (2011). Foetal and neonatal exposure to chlorpyrifos: biochemical and metabolic alterations in the mouse liver at different developmental stages. *Toxicology*. 280, 98-108.
- Buttar, H.S., Jones, K.L. (2003). What do we know about the reproductive and developmental risks of herbal and alternate remedies? *Birth Defects Research (PartB)*. 68, 492–3.
- Dhawan, K., Kumar, S., Sharma, A. (2002). Suppression of alcohol-cessation-oriented hyper-anxiety by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice. *J. Ethnopharmacol.* 81, 239-44.
- Dhawan, K., Dhawan, S., Sharma, A. (2004). *Passiflora*: A review update. *J. Ethnopharmacol.* 94, 1-23.
- Feder, H.H., Whalen, R.E. (1965). Feminine behavior in neonatally castrated and estrogen-treated male rats. *Science*. 147, 306-7.
- Freeman, L.M., Rissman, E.F. (1996). Neural aromatization and the control of sexual behavior. *Trends. Endocrinol. Metabol.* 7, 334–8.
- Gaitan, E., Lindsay, R.H., Richert, R.D., Ingbar, S.H., Cooksey, R.C., Legan, J. (1989). Antithyroid and Goitrogenic Effects of Millet: Role of C-Glycosylflavones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68, 707-14.
- Gaitan, E., Cooksey, R.C., Legan, J., Lindsay, R.H. (1995). Antithyroid effects in vivo and in vitro of vitexin: a C- glucosylflavone in millet. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 1144-7.
- Gerardin, D.C.C., Piffer, R.C., Garcia, P.C., Moreira, E.G., Pereira, O.C.M. (2008). Effects of maternal exposure to an aromatase inhibitor on sexual behaviour and neurochemical and endocrine aspects of adult male rat. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 557-62.
- Gray, L.E., Kavlock, R.J. (1983). The effects of the herbicide 2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether (NIT) on serum thyroid hormones in adult female mice. *Toxicol. Lett.* 15, 231-5.
- Grundmann, O., Wang, J., McGregor, G.P., Butterweck, V. (2008). Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. *Planta Med.* 74, 1769-73.
- ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5(R2) 2005.

- Jones, M.E.E., Boon, W.C., Proietto, J., Simpson, E.R. (2006). Of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 55–64.
- Koibuchi, N., Chin, W.W. (2000). Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 123-8.
- Koren, G., Dugoua, J.J., Magee, L., Vohra, S., Matsui, D., Bérard, A., Johnson, B., Moretti, M., Einarson, A. (2008). Mother Nature: establishing a Canadian research network for natural health products (NHPs) during pregnancy and lactation. *J. Altern. Complement. Med.* 14, 369–72.
- Leppée M, Culig J, Eric M, Sijanovic S (2010). The effects of benzodiazepines in pregnancy. *Acta Neurolol Belg.* 110:163-7
- Moreira, E.G., Vassilieff, I., Vassilieff, V.S. (2001). Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. *Neurotoxicol. Teratol.* 23, 489-95.
- Negri-Cesi P, Colciago A, Motta M, Martini L, Celotti F (2001). Aromatase expression and activity in male and female cultured rat hypothalamic neurons: effect of androgens. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178: 1-10.
- Nordeng, H., Havnen, G.C. (2005). Impact of socio-demographic factors, knowledge and attitude on the use of herbal drugs in pregnancy. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 84, 26-33.
- Pavan, R., Jesus, A.M.X., Maciel, L.M.Z. (2004). A amiodarona e a tireóide. *Arq. Brás. Endocrinol. Metabol.* 48, 176-82.
- Pellow, S., File, S.E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 525–29.
- Refuerzo, J.S., Blackwell, S.C., Sokol, R.J. (2005). Use of over-the counter medication and herbal remedies in pregnancy. *Am. J. Perinatol.* 22, 321-24.
- Robb, G.W., Amann, R.P., Killian, G.J. (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* 54, 103-7.
- Roselli, C.E., Cross, E., Poonyagariyagorn, H.K., Stadelman, H.L. (2003). Role of aromatization in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in male rats. *Horm. Behav.* 44, 146-51.
- Ruggy, G.H., Smith, C.S. (1940). A pharmacological study of the active principle of *Passiflora incarnata*. *J. Am. Pharm. Assoc.* 29, 245-249.
- Soulimani, R., Younos, C., Jarmouni, S., Bousta, D., Misslin, R., Mortier, F. (1997). Behavioral effects of *P. incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. *J. Ethnopharmacol.* 57, 11–20.
- Thompson, C.C., Potter, G.B. (2000). Thyroid hormone action in neural development. *Cereb. Cortex.* 10, 939-45.

Tiran, D. (2003). The use of herbs by pregnant and childbearing women: a risk–benefit assessment. *Compl. Ther. Nurs. Midwifery*. 9, 176–81.

Van Den Berg, K.J., Van Raaij, J.A., Bragt, P.C., Notten, W.R. (1991). Interactions of halogenated industrial chemicals with transthyretin and effects on thyroid hormone levels in vivo. *Arch. Toxicol.* 65, 15-19.

Veenema, A.H., Bredewold, R., Neumann, I.D. (2007). Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology*. 32, 437-50.

Veríssimo, L.F., Bacchi, A.D., Zaminelli, T., De Paula, G.H.O., Moreira, E.G. (2011). Herbs of interest to the Brazilian Federal Government: female reproductive and developmental toxicity studies. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 1163-1171.

Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Souza, M.M., Rodrigues, C., Sant'Anna, M.K., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2001). Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 233-240.

Yunes, R.A., Calixto, J.B. (2001). *Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna*. 1st ed. Argos Editora Universitária, Chapecó.

Zanoli, P., Avallone, R., Baraldi, M. (2000). Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. *Fitoterapia*. 71, 117-23.