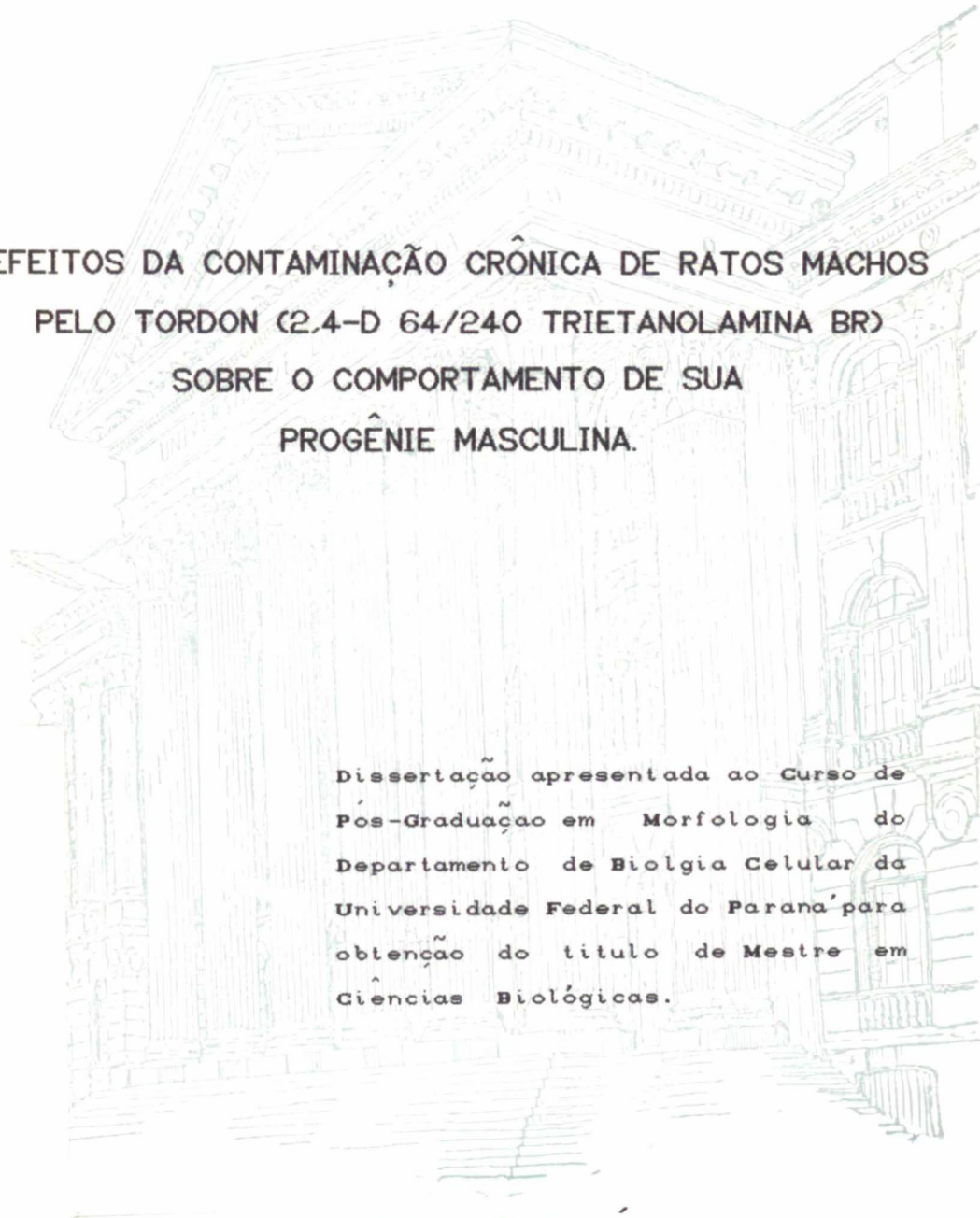


HAMILTON LEITE RIBEIRO



EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO CRÔNICA DE RATOS MACHOS  
PELO TORDON (2,4-D 64/240 TRIETANOLAMINA BR)  
SOBRE O COMPORTAMENTO DE SUA  
PROGÊNIE MASCULINA.

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Morfologia do  
Departamento de Biologia Celular da  
Universidade Federal do Paraná para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas.

CURITIBA - PARANÁ

1994

ORIENTADOR :  
PROF. DR. ROMEU AFONSO SCHÜTZ

HAMILTON LEITE RIBEIRO

EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO CRÔNICA DE RATOS MACHOS  
PELO TORDON (2, 4-D 64/240 TRIETANOLAMINA BR)  
SOBRE O COMPORTAMENTO DE SUA  
PROGÊNIE MASCULINA.

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Morfologia do  
Departamento de Biologia Celular da  
Universidade Federal do Paraná para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas.

CURITIBA - PARANA

1994

BC/MUFPR  
DOAÇÃO: auto  
R\$ 5.00  
22/02/95

BC/MUFPR - MEMORIA DA UNIVERSIDADE F. DO PARANA  
AUTOR  
R\$ 5.00 - Doacao  
Termo No. 131/95 Registro:229,745  
02/03/95

PR-00007177-1

UFPR - Sistema de Bibliotecas

Aos meus pais :Décio Nogueira Ribeiro (in memoriam) e Edith Leite Ribeiro como retribuição ao seu amor no trabalho de educação dos filhos.

À minha esposa Rosa Yuko Ribeiro e minha filha Gisele Yumi pelo seu amor e companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Romeu Afonso Schütz pela orientação nesta dissertação e por sua amizade.

À Profa. Dra. Maria Teresa Barros Schütz pela co-orientação, auxílio nos trabalhos experimentais e por sua amizade.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski pela amizade e pelo incentivo que continuamente empresta aos pós-graduandos.

À Profa. Dra. Edith Fanta pelas sugestões.

À Profa. Dra. Márcia Helena Mendonça pelas orientações em pesquisa bibliográfica durante o curso de Bioquímica Celular.

Ao técnico em histologia Rubens Simões Gaier, pelas orientações no processamento histológico.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e do Departamento de Morfologia pela colaboração e amizade.

Ao Prof. Dr. Cláudio da Cunha e ao Prof. Dr. Joaquim Senna Maia pelo auxílio nos programas computacionais.

A todos os funcionários do biotério do Setor de Ciências Biológicas, pelo espírito de bem servir ao próximo.

À Dra. Sandra Sella e ao Dr. João Carlos Mioso, do CPPI, pelo auxílio nos trabalhos de microscopia óptica.

À minha irmã Maria Lúcia Leite Ribeiro Okimoto e meu cunhado Paulo César Okimoto pelo incentivo.

À bióloga Ana Cristina Vianna pelo auxílio com as fotomicrografias.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em

Morfologia, pelo convívio amistoso.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	10
3 MATERIAIS E METODOLOGIA.....	11
3.1 Animais.....	11
3.2 Tratamento.....	12
3.3 Técnicas Comportamentais.....	16
3.3.1 Abertura Palpebral.....	17
3.3.2 Reflexo de Endireitamento.....	18
3.3.3 Peso Corporal.....	19
3.3.4 "Rota-Rod".....	21
3.3.5 Movimentação Espontânea.....	23
3.3.6 "Open-Field".....	25
3.3.7 "Plus-Maze".....	29
3.3.8 Esquiva Ativa.....	31
3.4. Avaliação Histológica.....	34
3.5. Tratamento Estatístico.....	36
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Abertura Palpebral.....	37
4.2 Reflexo de Endireitamento.....	39
4.3 Peso corporal.....	41
4.4 "Rota-Rod".....	43
4.5 Movimentação Espontânea.....	46
4.6 "Open-Field".....	49
4.7 "Plus-Maze".....	55



4.8	Esquiva Ativa.....	56
4.9	Avaliação Histológica.....	60
5	DISCUSSÃO.....	65
6	CONCLUSÕES.....	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
8	BIBLIOGRAFIA.....	76

## RESUMO

A exata extensão da contribuição paterna às alterações morfológicas e funcionais na prole é assunto controverso e indefinido, tanto no homem como nos animais.

A abordagem via avaliação comportamental em animais de laboratório sobressai-se cada vez mais como um método sensível, passível de detectar alterações sutis, subclínicas, em animais contaminados e em sua descendência.

O Tordon, composto do 2,4-D e picloram, é um herbicida largamente utilizado em vários países. O nosso objetivo foi o de investigar as alterações comportamentais e de habilidade de aprendizagem-memória em ratos machos adultos da linhagem Wistar, nascidos de ratos machos contaminados cronicamente pelo Tordon no período pré-concepcional.

A geração F1 estudada evidenciou nas provas de "Open-Field", movimentação espontânea e "Rota-Rod" resultados compatíveis com uma menor atividade motora geral.

A prova de esquiwa ativa demonstrou no grupo experimental uma discreta melhora na aprendizagem-memória, embora não estatisticamente significativa. Por outro lado mostrou não ter havido qualquer alteração no reflexo de orientação por parte da prole de ratos contaminados pelo Tordon.

A avaliação do peso corporal, abertura palpebral e reflexo de endireitamento evidenciaram não ter havido alterações significantes na prole experimental.

Não se observaram, com a técnica da hemotoxilina-eosina, alterações morfológicas em cérebros e

testículos de animais F1 nos espécimes examinados.

Estes resultados evidenciaram a necessidade de um melhor conhecimento e controle dos agentes tóxicos ambientais aos quais o ser humano e animais possam estar expostos.

## ABSTRACT

The exact role of paternal contribution to the morphological and functional alterations in the progeny, both in humans and animals, is still controversial and remains undetermined.

The behavioural evaluation approach comes up more and more as a sensible method to detect subtle alterations in intoxicated animals and its offspring.

Tordon, a trade name for a 2,4-D and picloram compound, it is an herbicide largely employed in many countries. Our goal was to investigate the behavioural alterations and the learning-memory ability in wistar adult male rats born from male chronically intoxicated rats during the preconceptional stage.

The F1 generation on focus showed behavioural alterations compatible with a lowered general motor activity evidenced in the open-field, spontaneous activity and rota-rod tests.

The active avoidance learning test demonstrated a slight improvement in the performance of the experimental group, though not statistically significant. It also showed no alteration in the orientation reflex.

The evaluation of body weight, palpebral opening and surface righting did not reveal any developmental alteration in the experimental group.

No morphological alterations were observed through hematoxylin-eosin technique in the examined specimens.

These results evidence the need for a better knowledge and control of toxicant agents to which the human being and animals may be exposed.

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

A questão central em neurotoxicologia do desenvolvimento é o estabelecimento de causas pré-natais das desordens do desenvolvimento do comportamento. (22).

Apesar do fato dos defeitos congênitos e desordens funcionais afetarem uma significativa parcela da população humana, nem todas as razões destes problemas estão bem estabelecidas. O período entre a exposição a um agente causal e a detecção da patologia funcional resultante interpõe numerosos fatores a confundir e mascarar o agente etiológico. Apesar das dificuldades inerentes em se detectar teratógenos comportamentais, vários de tais agentes têm sido identificados frequentemente porque os efeitos comportamentais acompanham-se de má-formações, pelo menos em altos níveis de exposição. (22).

Crianças que demonstram evidência de retardo do crescimento tem até cinquenta por cento de possibilidade de apresentar dificuldade de aprendizagem e até sessenta e um por cento das crianças com retardo mental têm anomalia congênita associada. Como exemplo, retardo mental resultante do abuso pré-natal do etanol está associado com aparência anormal da criança, geralmente por microcefalia. (22).

A ligação entre exposição pré-natal e resultado pós-natal adverso para uma série de drogas e produtos químicos industriais, tanto em animais como no homem, é crucial para o desenvolvimento científico da teratologia comportamental e tem também importantes implicações para o apoio da pesquisa nesta

área. (22).

O relacionamento da administração de drogas durante o período gestacional com alterações na prole apresenta-se como um binômio lógico até mesmo para o leigo. Esta correlação tornou-se famosa no início da década de 1960 quando a talidomida causou na Alemanha e em outros países uma verdadeira epidemia da "Síndrome Teratogénica da Talidomida" ao ser administrada a gestantes à guisa de sedativo e anti-emético. O mesmo não ocorre com a possibilidade de transmissão paternalmente mediada. Via de consequência, enquanto já é bem aceito atualmente que drogas administradas na prenhez podem afetar a progénie, são relativamente escassos os estudos a apontar os efeitos da intoxicação masculina (15;22;27).

Estudiosos da biologia do desenvolvimento entendem que não há nada igual a respeito das contribuições materna e paterna ao desenvolvimento. As mulheres podem expor os conceptos a tóxicos de uma tal maneira que não é possível ao homem. Há muitos exemplos inequívocos de crianças prejudicadas por exposição intra-uterina a substâncias com as quais a mãe manteve contato durante a gestação. Não há exemplos inequívocos para a exposição paterna. (29).

No entanto já existe preponderante evidência demonstrando que a exposição paterna a agentes terapêuticos ou ambientais específicos pode resultar em uma prole adversamente afetada. A própria talidomida quando administrada a coelhos machos exerceu uma influência desfavorável no seu desempenho reprodutivo subsequente e apresentou-se, bem como seus metabólitos, em quantidades apreciáveis no sêmen. As



influências desfavoráveis relatadas compreendem a falha de gestação, diminuição do número de filhotes, perimortalidade aumentada, baixo peso ao nascimento e má-formações, tais como espinha bifida, ausência de cauda, agenesia dos rins, paralisia do trem posterior e hemangiomas dos membros anteriores. (15;21).

Cordier e colaboradores obtiveram resultados que comportam um aumento de risco de aborto espontâneo com a exposição paterna ao mercúrio industrial. (10).

A possibilidade de uma intoxicação paterna na etiologia dos abortamentos espontâneos, infertilidade e defeitos congênitos provenientes da exposição ao Agente Laranja (2,3,7,8-tetraclorodibenzenodioxina) foi sugerida, mas também continua a ser uma questão controversa. (20).

O potencial em causar efeitos adversos na reprodução masculina sugerem a necessidade de uma mais acurada investigação dos produtos químicos aos quais o homem possa estar exposto. (15;25).

Drogas ou produtos químicos ambientais aos quais o componente paterno esteja exposto podem estar presentes em seu fluido seminal e deste modo diretamente afetar o óvulo, a fertilização e o desenvolvimento embrionário. Diferentemente poderiam atuar afetando a linhagem de células sexuais masculinas, em qualquer de seus estágios, de espermatogônia até espermatozóide. Mecanismos epigenéticos podem também estar envolvidos, pois alguns produtos químicos considerados usualmente como agnotóxicos parecem também afetar a descendência após tratamento paterno. Entende-se por mecanismos de alterações epigenéticas as lesões nas células

sexuais sem que haja comprometimento direto do DNA. A alquilação ou outro dano do componente protamina da cromatina pode ser um mediador de importância na toxicidade paternalmente mediada. O papel das protaminas e outros mecanismos epigenéticos é uma direção nova e fascinante neste campo de investigação. (05;08;24;25).

Contudo, há pouca evidência mecanística a apoiar defeitos congênitos paternalmente induzidos por eventos epigenéticos. Parece improvável que danos aos componentes não-genéticos do espermatozóide resultem em má-formações, visto que experimentos de micromanipulação sugerem que o citoplasma do espermatozóide não é essencial para a embriogênese normal. (08).

Entre os efeitos adversos da exposição paterna no homem a xenobióticos estão relacionados o abortamento, a natimortalidade, o parto pré-termo, o neonato pequeno para a idade gestacional, as má-formações evidentes ao nascimento e anormalidades que somente podem ser detectadas na vida adulta como o câncer e alterações comportamentais. (25).

Já várias ocupações paternas foram associadas com estes resultados adversos no homem. Em parceiras de mecânicos de veículos detectou-se aumento da incidência de abortamento espontâneo. A anencefalia já foi correlacionada com a exposição a solventes, com os pintores atingindo o maior risco. Profissões como bombeiro, zelador, trabalhos de serraria e silvicultura, gráficos e trabalhadores em fábricas de compensados têm sido associadas com má-formações fetais. Um aumento de risco para natimortalidade, parto pré-termo ou neonato pequeno para a idade gestacional foi correlacionado

com o emprego paterno em indústrias têxteis e em artistas. (25).

Por outro lado o uso de álcool e fumo por parte do pai tem sido ligado com baixo peso ao nascimento e acréscimo de mortalidade perinatal, embora não tenham sido evidenciadas má-formações. (25).

Os efeitos da exposição paterna a radiações também é objeto crescente na literatura, e as dissenções neste aspecto são atuais. Reforça assim o elevado interesse por um campo até pouco tempo atrás inexplorado. (11;25).

As limitações inerentes à maioria dos estudos clínicos e epidemiológicos incluem a incapacidade de identificar os produtos químicos específicos implicados, bem como controlar as múltiplas exposições e o tempo de exposição. Por outro lado, estudos animais bem controlados evitam este inconveniente. (25).

Ao assim proceder observou-se em roedores machos expostos ao chumbo, etanol, metadona, morfina e ciclofosfamida, uma redução do peso ao nascimento, diminuição do número de filhotes e aumento da mortalidade perinatal. (05;15;30).

E.L. Abel refere discrepâncias na literatura em relação ao consumo paterno de álcool em ratos e camundongos em relação ao decréscimo no número de filhotes e aumento da mortalidade perinatal. Aventa o autor com a possibilidade das diferenças serem devidas a variações da susceptibilidade ao álcool por parte das várias espécies e linhagens. (02).

Adams e colaboradores relataram evidências de aberrações comportamentais na geração F1 de ratos machos

tratados com ciclofosfamida, uma droga comumente usada no tratamento do câncer e como imunodepressora. Note-se que a ciclofosfamida é assim administrada crônica e agudamente a homens em idade reprodutiva. (03;15).

As alterações referidas por Adams e colaboradores incluíram o retardo no teste de fuga de despenhadeiro e na prova de natação por parte da geração F1 de ratos machos tratados com ciclofosfamida. Concluem no entanto os autores que os resultados não são consequência de uma inabilidade motora geral, pois os mesmos animais que apresentaram atraso, posteriormente na prova do "Open-Field" foram significativamente mais ativos em relação aos controles. Para detalhes da prova do "Open-Field" reporte-se ao item 3.3.6, seção Materiais e Metodologia. (03).

Levando-se em consideração a meia-vida da ciclofosfamida, que é de poucas horas, e o tempo de latência de quatorze dias entre a cessação da intoxicação e a concepção, imputam os autores à alteração genética os resultados obtidos. (03).

Trasler e colaboradores administrando cronicamente baixas doses de ciclofosfamida a ratos machos obtiveram mínimos efeitos sobre o aparelho reprodutor e a fertilidade, mas que ainda assim resultaram em alta frequência de morte fetal e os filhotes sobreviventes apresentaram retardo de crescimento e má-formações. (33).

Joffe e colaboradores trabalhando com ratos machos tratados com metadona obtiveram na progênie um ganho de peso menor após o desmame e alterações significantes em todos os testes comportamentais utilizados ( "Open-Field",

movimentação espontânea, esquiva passiva, esquiva ativa e "Rota-Rod" ). Para maiores detalhes destas provas reporte-se à seção de Materiais e Metodologia. (18).

E.L. Abel relata que filhotes de ambos os sexos de ratos machos que consumiram álcool apresentaram considerável diminuição do tempo de "grooming" em relação aos controles. O "grooming" consiste na atividade de se coçar. (01).

Estes resultados sugerem que os sistemas de testes comportamentais compreendem um método sensível para detectar ou avaliar compostos geneticamente tóxicos, pois estas alterações tem sido observadas mesmo na ausência de deformidades físicas. O reconhecimento de tais alterações no desenvolvimento comportamental podem, portanto, ser um indicador sensível da ação tóxica e mesmo de sutis distúrbios no comportamento, podendo fornecer indicações dos mecanismos nos quais o sistema nervoso tenha sido afetado. (03;20).

Entre os produtos químicos ambientais, os agrotóxicos, eufemisticamente denominados defensivos agrícolas tem merecido muita atenção da pesquisa científica e preocupação por parte da imprensa leiga. Por outro lado a necessidade crescente do uso de herbicidas na produção de alimentos em larga escala impõem-se sobremaneira em função do crescimento demográfico. (31).

Hoar e colaboradores confirmaram um significativo acréscimo de risco no tocante a Linfoma Não-Hodgkin entre trabalhadores rurais do estado do Kansas, Estados Unidos. Em homens com exposição a herbicidas superior a 20 anos encontraram um aumento de mais de seis vezes em

relação a controles. Esses excessos foram associados com o uso de herbicidas do grupo do ácido fenoxiacético, especialmente o 2,4-D. (16).

Hoar e colaboradores creem que estes efeitos carcinogênicos têm importantes implicações em relação à saúde pública, quando consideram que somente em 1976, ano de início de sua coleta de dados deste estudo, os agricultores americanos aplicaram mais de quinze mil toneladas de herbicidas do grupo do ácido fenoxiacético. (16).

Além de sua ação deletéria direta à saúde dos contactantes com herbicidas, deve-se considerar os riscos permanentes que podem determinar nas gerações subsequentes, ao haver alterações das células da linha germinativa.

Boyd e colaboradores, trabalhando com exposição crônica de ratos a baixas concentrações de pesticidas, detectaram alterações comportamentais e neuroquímicas. Utilizando misturas dos inseticidas aldicarb e metomil e do herbicida metribuzim os animais apresentaram menor velocidade ao percorrer um labirinto e também tinham níveis alterados de colina no neo-estriado. Os ratos tratados com o herbicida metribuzim demoraram mais para aprender a inversão do sentido do labirinto e também apresentavam significativa diminuição da proporção acetilcolina/colina no hipocampo. (07).

Em nossos trabalhos de investigação de alterações paternalmente dependentes utilizamos o Tordon 2,4-D 64/240 trietanolamina BR. Trata-se de herbicida pós-emergente amplamente utilizado no controle de uma grande variedade de ervas daninhas à agricultura, tanto perenes como sazonais. O Tordon é nome comercial de Dow Produtos Químicos Ltda. e

trata-se de uma associação do picloram com o ácido 2,4-Diclorofenoxiacético também conhecido como 2,4-D. (05;06).

Duffard e colaboradores demonstraram que o 2,4-D é fetotóxico e resultou em hipomielinização no cérebro de galinha quando os ovos fertilizados sofreram tratamento externo prévio ao período de incubação. (13).

Lerda e Rizzi encontraram significantes níveis de astenospermia, necrospermia e teratospermia em trabalhadores expostos ao 2,4-D em comparação com trabalhadores não expostos. Na continuidade a astenospermia e a necrospermia diminuíram mas a teratospermia persistiu. (19).

Tripathy e colaboradores, trabalhando com a *Drosophila*, obtiveram resultados que indicam ser o 2,4-D genotóxico para as células somáticas e da linhagem germinativa deste inseto. (32).

Trabalhos levados a cabo por Blakley e colaboradores utilizando Tordon 202c em camundongos apresentaram resultados que sugerem toxicidade reprodutiva paternalmente mediada. Entre as alterações encontradas na prole citam a redução do peso fetal, redução do comprimento cabeça-cauda, aumento da incidência de fetos mal-formados, aumento da incidência de fetos com variantes da normalidade e aumento da frequência de não-ocorrência de gravidez. (05;06).

A presente dissertação objetiva os aspectos de alterações ao nível comportamental da geração F1 de ratos machos contaminados pelo Tordon realizada em moldes semelhantes aos de Blakley e colaboradores no tocante à contaminação e semelhante ao trabalho de Sallai, C.M. no tocante às técnicas comportamentais. (05;26).

## **2 OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

Tendo em vista:

a) A aceitação cada vez maior da metodologia comportamental como técnica sensível de detecção de alterações sutis subclínicas, em animais de laboratório e sua prole, a agentes ambientais potencialmente tóxicos;

b) A importância de estudos com o fito de bem se estabelecer o papel da contribuição paterna nas alterações morfológicas e funcionais na progénie;

c) O papel relevante dos tóxicos ambientais em geral, e dos herbicidas em particular, na génese de alterações transmissíveis à descendência no ser humano e nos animais;

Nossos objetivos em relação à prole de machos de ratos machos intoxicados cronicamente com o herbicida Tordon no período pré-concepcional foram:

1) Avaliação de parâmetros expressivos do desenvolvimento: abertura palpebral, reflexo de endireitamento e peso corporal.

2) Avaliação do desempenho em provas comportamentais expressivas da atividade motora (movimentação espontânea, "Open-Field"), do equilíbrio ("Rota-Rod") e do estado emocional ("Plus-Maze").

3) Avaliação do desempenho na prova comportamental de esquiva ativa, expressiva da habilidade de aprendizagem-memória e reflexo de orientação.

4) Avaliação de possíveis alterações histológicas em microscopia óptica, pela técnica H.E., de cérebro e testículos.

### **3 MATERIAIS E METODOLOGIA**

### 3 MATERIAIS E METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Foram utilizados inicialmente quatorze ratos brancos da linhagem wistar, sendo quatro machos e dez fêmeas.

Os animais provieram do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, ocasião em que tinham trinta e seis dias de vida.

### 3.2 Tratamento dos Animais

O trabalho no tocante à criação dos animais de experimentação e realização das provas comportamentais foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia do Sistema Nervoso Central, do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

O laboratório apresenta condições adequadas para manter constantemente a temperatura em torno de  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por meio de sistema de ar condicionado frio e quente. Foi respeitado o ciclo natural claro-escuro por intermédio de ampla janela sem cortinado ( ver fotografia 1 ).

Os animais de experimentação foram mantidos em gaiolas plásticas de 40 cm. x 34 cm. x 17 cm. com cobertura em grade por onde se depunha a ração e o líquido de beber, ambos administrados "ad libitum". O sepilho de madeira foi utilizado como forração do fundo da gaiola. Utilizou-se ração para ratos e camundongos de laboratório Nuvilab CR1 e água de torneira filtrada como líquido de beber, exceto no grupo experimental pelo período especificado na seqüência.

Os machos permaneceram em uma gaiola e as fêmeas em duas outras com cinco animais em cada, para um período de adaptação de dez dias antes do início dos experimentos.

Após o período de adaptação os machos foram divididos em duas gaiolas com dois animais cada. Iniciou-se então a fase de intoxicação.

O primeiro agrupamento recebeu solução de Tordon a um por mil v/v por um lapso de sessenta dias como líquido de beber e passamos a denominá-lo grupo Tordon ou abreviadamente

grupo T. O segundo agrupamento, à guisa de controle, continuou com água filtrada como líquido de beber e passamos a denominá-lo grupo Controle ou abreviadamente grupo C.

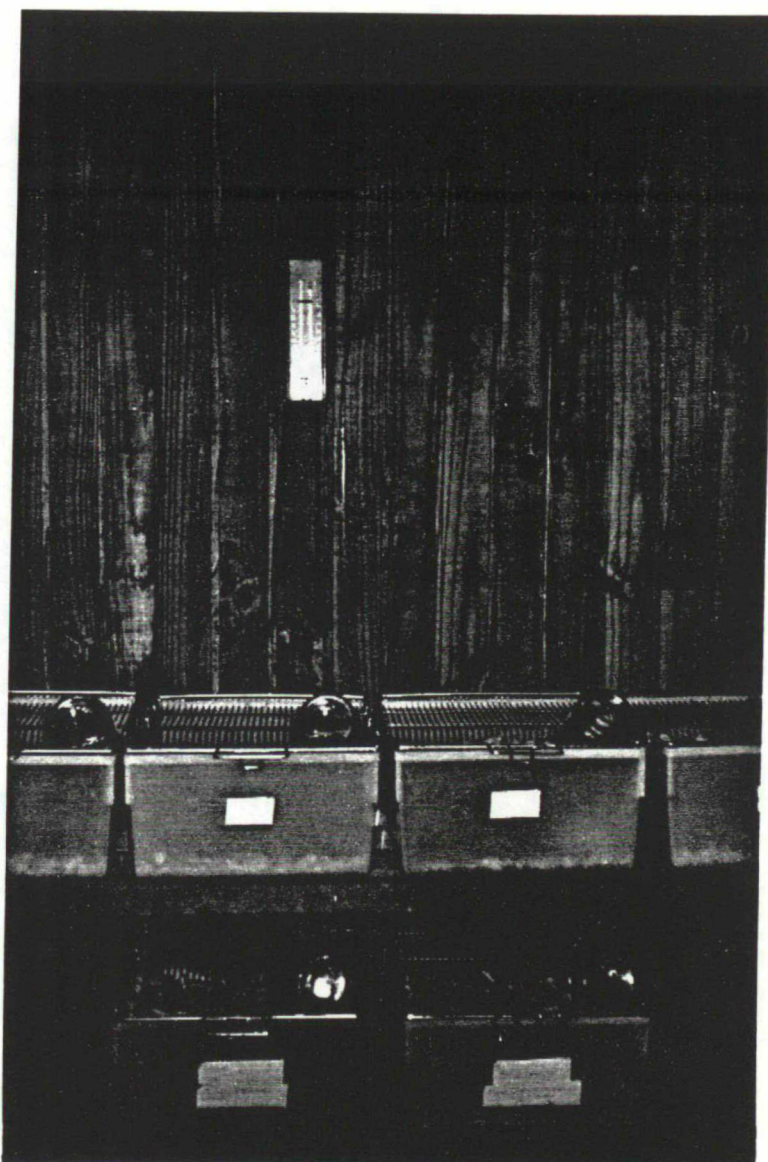
Findo o período de contaminação, passamos à etapa de acasalamento. Consistiu este passo de um período de quinze dias em que o grupo T coabitou na mesma gaiola com um dos grupos de cinco fêmeas, enquanto o grupo C coabitou com as outras cinco restantes. Desde este ponto as fêmeas passaram a ser parte integrante dos grupos T e C conforme a coabitação. Note-se que em momento algum as fêmeas de qualquer dos grupos toma contato com o líquido de beber contendo Tordon.

Passo seguinte, os machos foram sacrificados e as fêmeas passaram para gaiolas individuais para o término de gestação e parto. Após o parto realizou-se a sexagem dos filhotes, sendo desprezadas as fêmeas e preservada apenas a prole de machos. Assim as observações comportamentais das proles restringiram-se aos machos, excluindo-se possíveis interferências hormonais do ciclo estral. Quando necessário os filhotes foram redistribuídos entre as mães do mesmo grupo de tal sorte que a nenhuma nutriz foi dado o encargo de mais de seis filhotes. Tentou-se evitar assim, tanto quanto possível, alterações de desenvolvimento devidas à maior ou menor disponibilidade de leite materno.

O período de amamentação estendeu-se por vinte e cinco dias. Findo este prazo os filhotes foram apartados das mães e estas foram sacrificadas. Os filhotes foram mantidos deste ponto em diante apenas com ração como fonte alimentar.

Desde o período de nascimento até cerca de cem

dias de vida os filhotes foram observados em parâmetros fisiológicos e provados em testes comportamentais descritos no item seguinte. Findas estas observações e testes comportamentais os animais de experimentação foram sacrificados e deles coletados encéfalo e gônadas para observação histológica.



Fotografia 01. Aspecto do Laboratório de Fisiologia do Sistema Nervoso Central, mostrando o biotério aonde são mantidos os animais durante todo o tempo.

### 3.3 Técnicas Comportamentais

Foram observados os seguintes parâmetros fisiológicos : abertura palpebral, reflexo de endireitamento e peso corporal.

Foram aplicadas as provas comportamentais de movimentação espontânea, "Rota-Rod", "Open-Field", "Plus-Maze", e esquiva ativa.



### 3.3.1 Abertura Palpebral

A presença de abertura palpebral consiste no completo abrir das pálpebras. Não foi considerada a presença de fenda palpebral como preenchendo o critério de abertura palpebral.

Foi considerado que ocorreu a abertura palpebral quando as duas pálpebras foram encontradas abertas.

Foram realizadas duas observações diárias, pela manhã e tarde a partir do quinto dia de vida, até ocorrer a presença do fenômeno.

### 3.3.2 Reflexo de Endireitamento

Consiste o reflexo de endireitamento na pronta tomada de posição sobre as quatro patas quando o animal é colocado em decúbito dorsal em uma superfície plana.

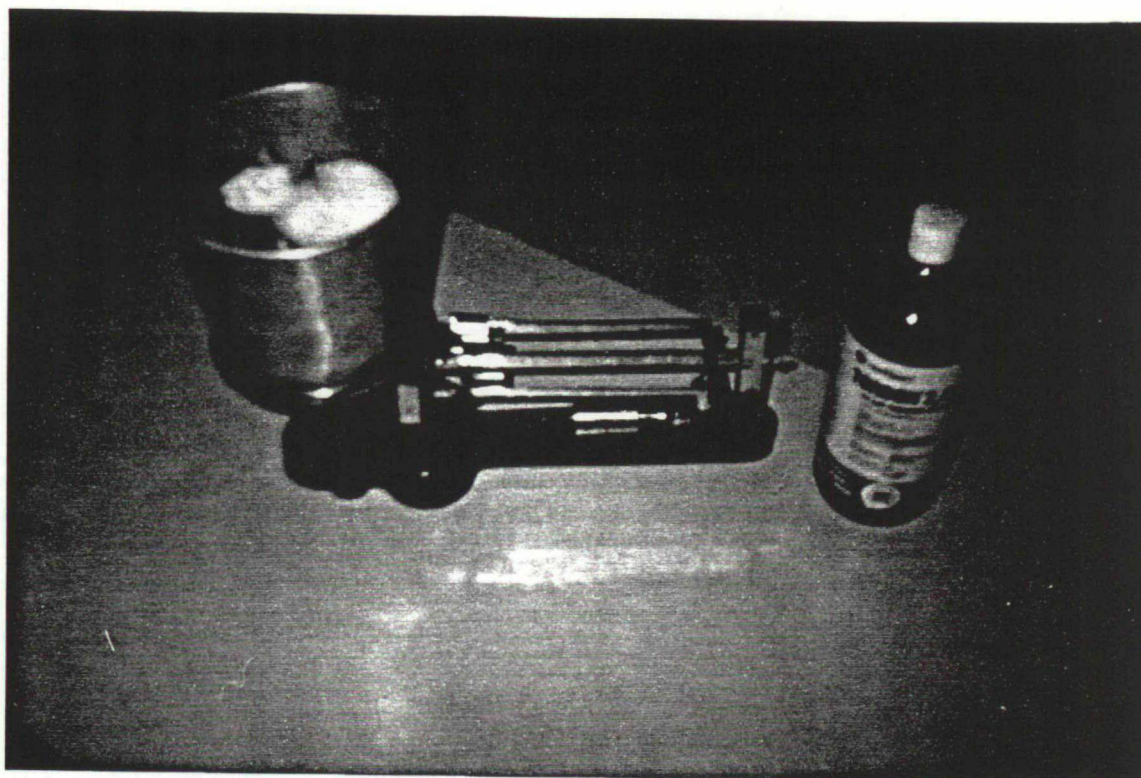
Antes do reflexo estar completamente desenvolvido o animal se debate por algum tempo antes de postar-se sobre sua posição normal de deambulação. Este tempo é então cronometrado.

A pesquisa do reflexo iniciou-se no terceiro dia e a seguir diariamente até ser imediata. O tempo máximo de cronometragem foi estabelecido em cinco minutos e o segundo foi a unidade empregada para anotação dos resultados.

### 3.3.3 Peso Corporal

O peso corporal foi anotado de oito em oito dias a partir do terceiro dia até os noventa e um dias de vida. Foi utilizada uma balança com precisão de décimos de grama (ver Fotografia 02).

Cada animal foi pesado individualmente e marcado com solução de ácido pícrico e/ou azul de metileno, para sua exata identificação.



Fotografia 02. Aspecto do Laboratório de Fisiologia do Sistema Nervoso Central, mostrando a balança mecânica de pesagem dos animais. Aparece também na cena o frasco da apresentação comercial do Tordon.

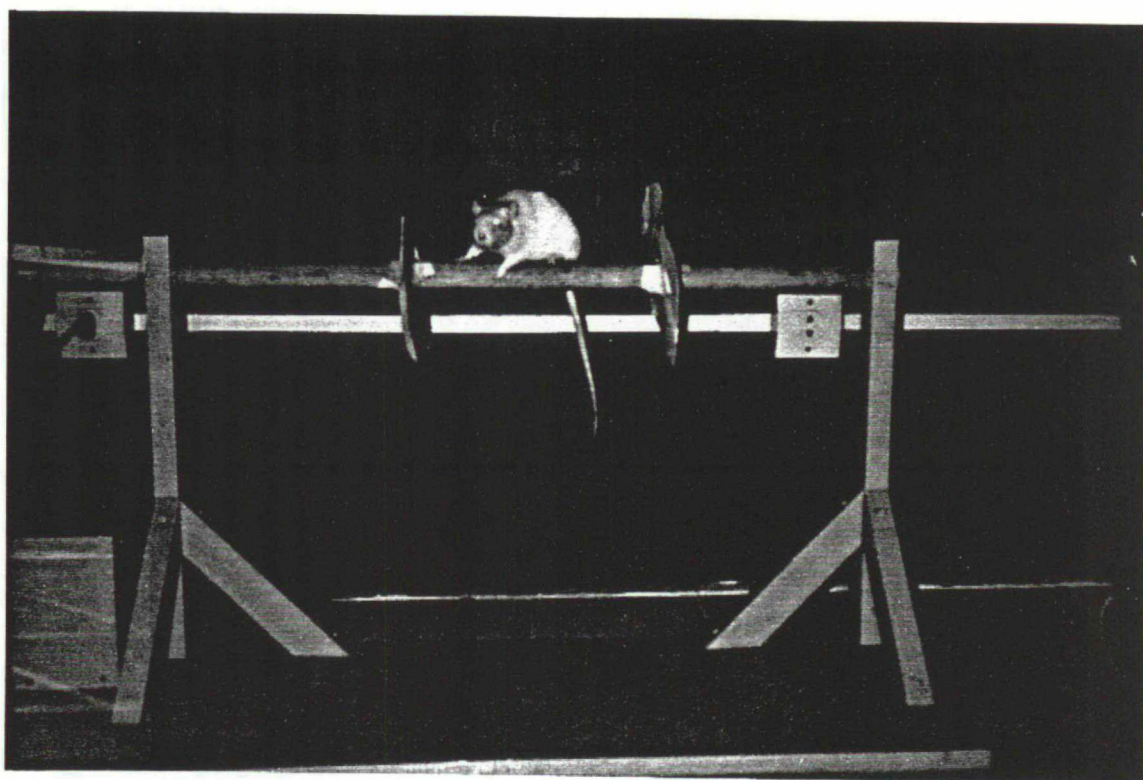
### 3.3.4 "Rota-Rod"

O "Rota-Rod" compõe-se essencialmente de uma haste de madeira suspensa horizontalmente, posta a girar em velocidade constante por intermédio de um motor elétrico.

Nosso aparelho era constituído de uma haste de 3 cm. de diâmetro e 75 cm. de comprimento, com um compartimento central de 30 cm. delimitado por discos de papelão. A velocidade da haste era de 14 rpm. e estava suspensa a 40 cm. da base (ver fotografia 03).

O animal de experimentação era colocado sobre a haste já em movimento. Anotou-se a soma do tempo de equilíbrio em quatro oportunidades sucessivas sem tempo de repouso após a queda do animal do aparelho. Adotou-se o segundo como unidade.

O tempo no "Rota-Rod" foi tomado aos quarenta e dois e noventa e dois dias de vida.



Fotografia 03. Laboratório de Fisiologia do Sistema Nervoso Central, mostrando o aparelho de "Rota-Rod" utilizado.

### 3.3.5 Movimentação Espontânea

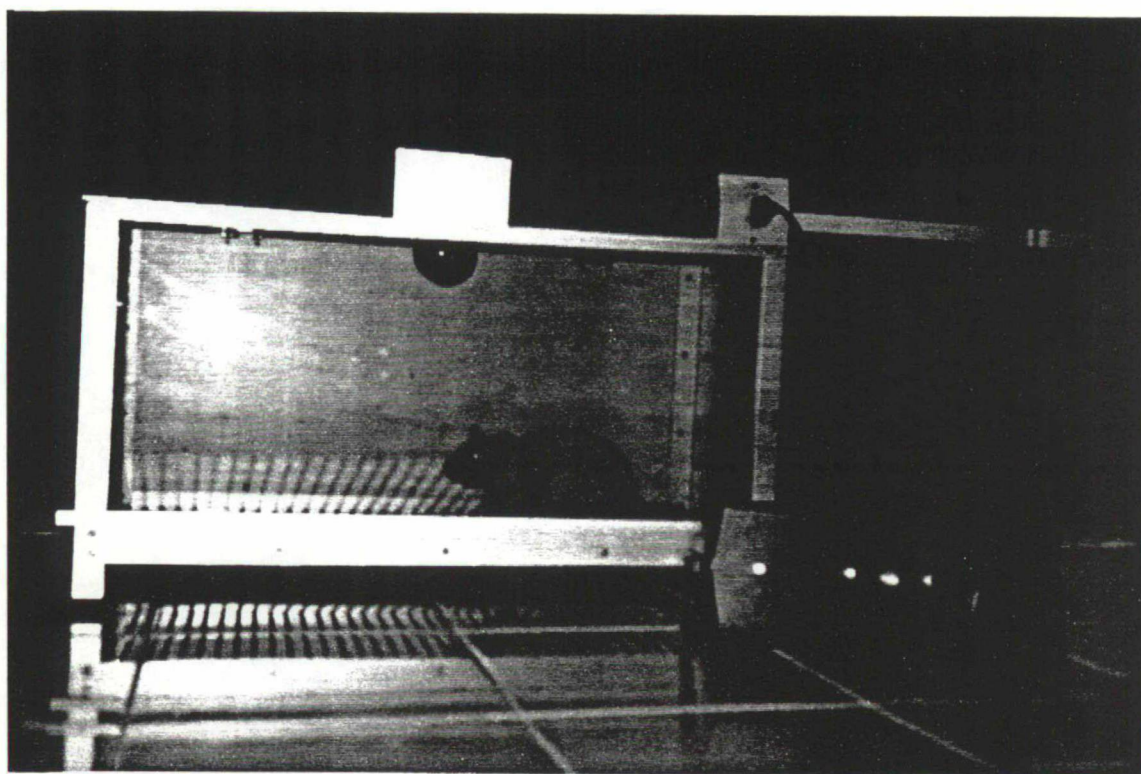
A movimentação espontânea consiste na observação do animal em uma gaiola especialmente construída para esta finalidade. A gaiola media 50 cm. x 20 cm. x 25 cm., sendo fabricada em alumínio, exceto em sua parte anterior, que era de vidro transparente para a observação do animal durante o experimento.

A gaiola é dotada de três células fotoelétricas acopladas a um contador eletrônico digital. Assim sendo, toda vez que o animal passar em frente a uma das células o contador adirá uma unidade de movimentação.

Durante as observações experimentais o laboratório era mantido com a luz natural das janelas, observando-se também o máximo de silêncio durante todo o período de teste.

O animal de experimentação era introduzido na gaiola de teste, onde permanecia durante um minuto. Findo este período de ambientação, começava efetivamente a observação por um período de cinco minutos.

Foram realizadas duas amostragens da movimentação espontânea para cada animal, sendo a primeira aos quarenta e dois e a secundam aos noventa e dois dias de vida.



Fotografia 04. Laboratório de Fisiologia do Sistema Nervoso Central, mostrando a gaiola de movimentação espontânea utilizada.



### 3.3.6 "Open-Field"

O "Open-Field" ou arena de campo aberto é um dispositivo em círculo de 1 m de diâmetro, fechado por paredes de 40 cm de altura e com teto de 1 m de altura dotado de sistema sonoro e iluminado por quatro lâmpadas de 100 w. É fabricado em alumínio e o fundo dividido em dezenove casas por meio de linhas radiais e de dois círculos concêntricos. Um cortinado de filó completa as paredes laterais até o teto e serve para dissimular a presença dos observadores. (ver fotografias 05 e 06).

O animal de experimentação era submetido à observação imediatamente após ser colocado no centro do aparelho. Entre cada experimentação o aparelho foi higienizado com solução de álcool 30%, sendo eliminados os excrementos para que os resíduos e os cheiros do animal precedente não tivessem influência sobre o comportamento durante a experimentação.

As observações foram realizadas por duas pessoas, sendo cada animal observado por cinco minutos e tendo sido colhidos dados referentes à deambulação, "rearing", "grooming", tempo parado, defecção e micção.

Para o parâmetro de deambulação foi contada uma unidade toda vez que o animal cruzava uma das linhas demarcatórias das casas do assoalho.

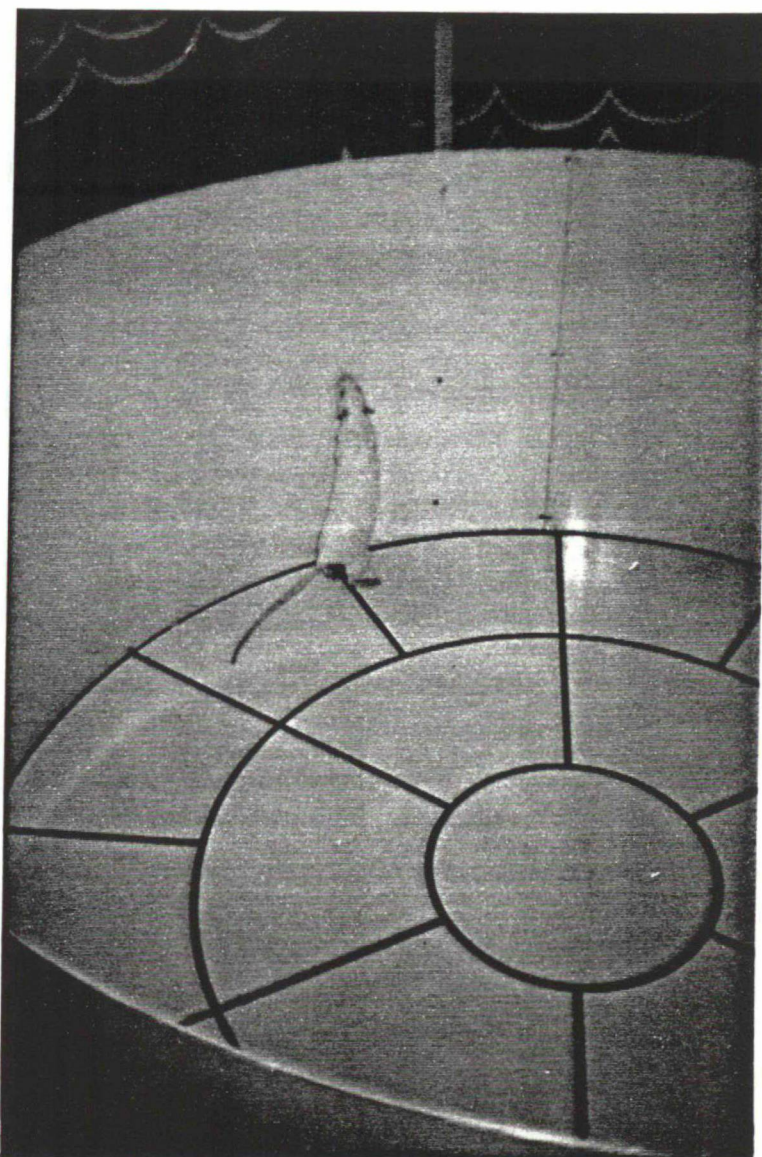
O "rearing" ou posição de investigação do ambiente em atitude ereta apoiada sobre o trem posterior, foi avaliado no número absoluto de vezes da ocorrência do fenômeno no intervalo de observação. (ver fotografia 05).

O fenômeno de "grooming" consiste basicamente na higienização da pelagem e das patas dianteiras e coçar o focinho. Foi anotado o tempo total de realização desta atividade em segundos.

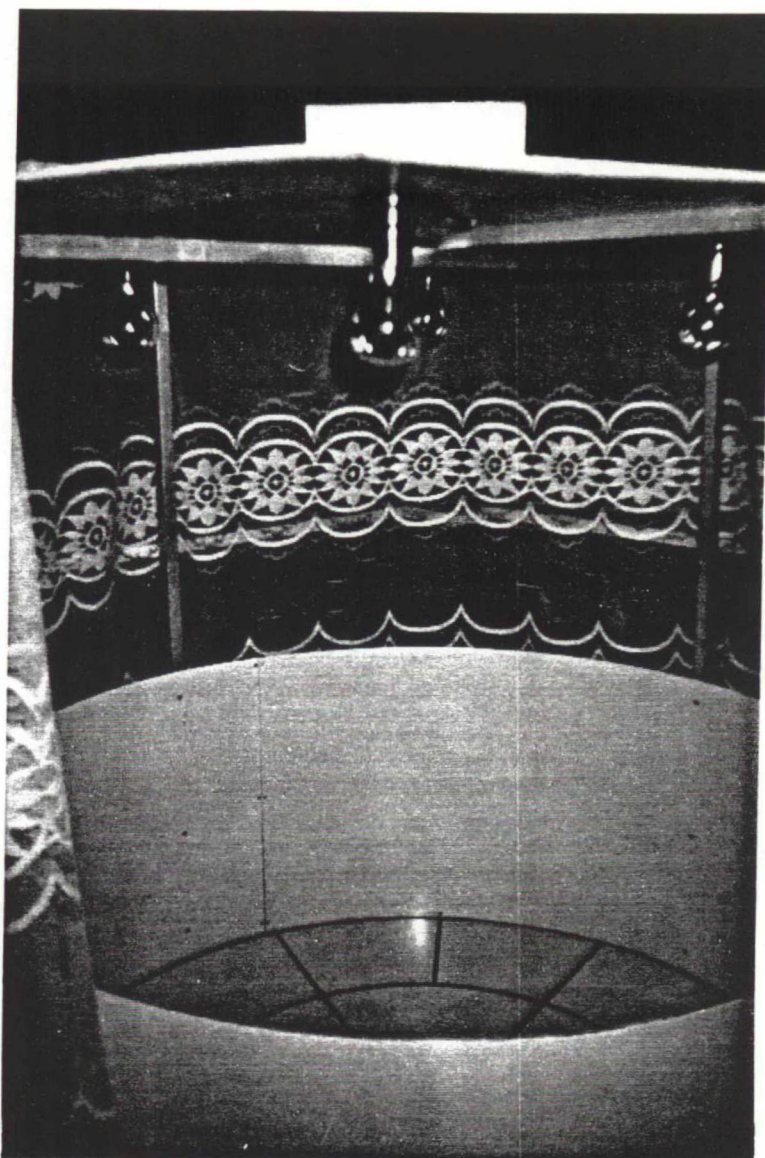
O tempo de inatividade motora foi determinado também em segundos e denominado tempo parado.

Na defecação foi considerado o número de bolos fecais, enquanto a micção foi anotada como presente ou ausente.

O teste no "Open-Field" foi realizado após noventa e cinco dias de vida.



Fotografia 05. Laboratório de Fisiologia do Sistema Nervoso Central, mostrando parte do aparelho do "Open-Field", com animal em posição de "rearing".

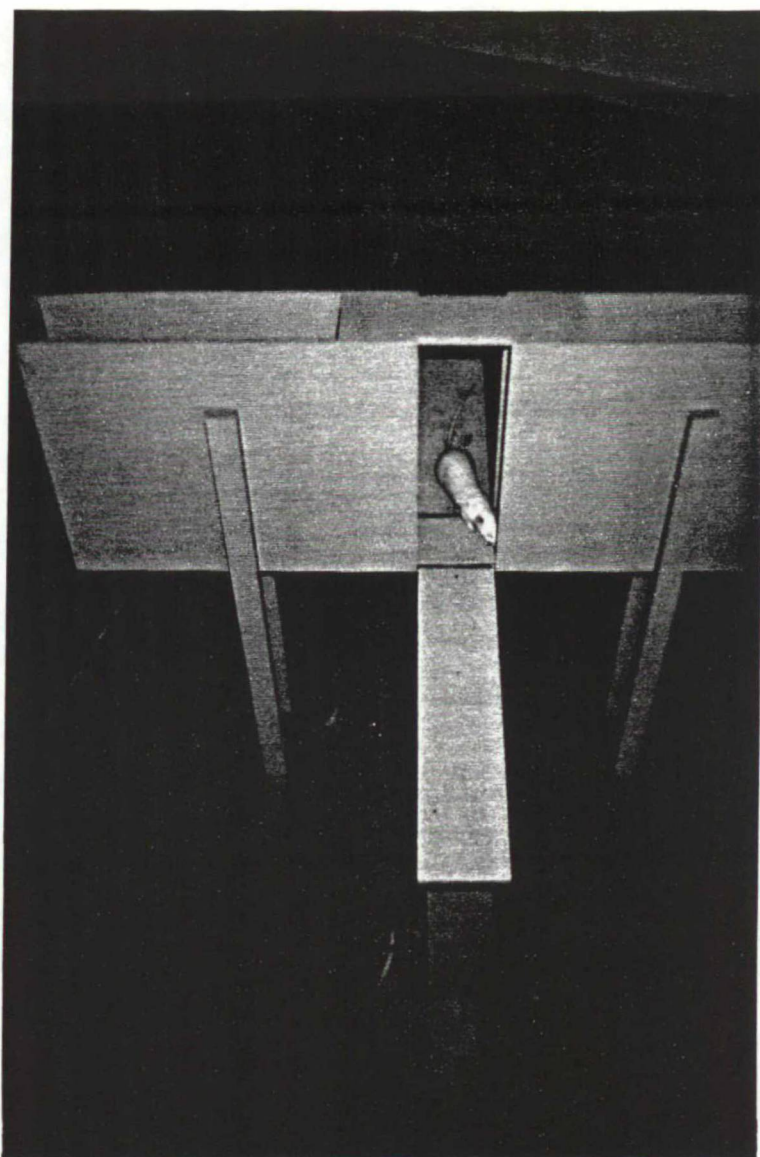


Fotografia 08. Laboratório de Fisiologia do Sistema Nervoso Central, mostrando a parte superior do "Open-Field".

### 3.3.7 "Plus-Maze"

Todas as observações experimentais foram realizadas em um "Plus-Maze" ou labirinto em cruz elevado construído em madeira, que constava de braços simétricos dispostos em cruz. Os braços dito fechados apresentavam paredes laterais e também estavam fechados em suas extremidades distais. Os dois outros braços, denominados de braços abertos, não apresentavam as paredes laterais. As dimensões de cada braço do "Plus-Maze" eram de 50 cm de comprimento por 10 cm de largura e 40 cm de altura das paredes. O aparelho estava elevado meio metro do solo e os experimentos foram realizados por dois observadores em penumbra de uma lâmpada vermelha em uma sala isolada de estímulos ambientais. (ver fotografia 07).

O teste do "Plus-Maze" foi realizado sempre após o animal ser testado no "Open-Field" e repetido 24 horas depois. Cada animal de experimentação foi colocado inicialmente no centro do cruzamento dos braços e a seguir cronometrado o tempo de permanência no braço aberto e o tempo na porção fechada do labirinto. Foram registrados também o número de entradas nos braços abertos e fechados. Cada animal ficou cinco minutos em observação. Entre a observação de cada animal o aparelho foi higienizado nos moldes descritos anteriormente para o teste do "Open-Field".



Fotografia 07. Laboratório de Fisiologia do Sistema Nervoso Central, mostrando o labirinto em cruz elevado.

### 3.3.8 Esquiva Ativa

As observações comportamentais para avaliação do desempenho na prova de esquiva ativa foram realizadas em uma gaiola medindo 60 cm x 25 cm x 30 cm, fabricada em chapas de alumínio exceto na parte anterior que era de vidro transparente para a observação do animal durante o experimento. Acolada à parede oposta à de vidro havia uma lâmpada de 10 w em um dos cantos na porção superior e na outra extremidade na mesma parede, em situação oposta, situava-se uma campainha. O assoalho da caixa era formado por uma grelha metálica constituída por barras de cerca de 3 mm de diâmetro, separadas entre si por uma distância de 1 cm. A caixa era parcialmente dividida em sua porção mediana. Esta gaiola foi mantida isolada do meio ambiente. (ver fotografia 08).

Em nosso experimento foi permitido um tempo de ambientação de cinco minutos na gaiola da Esquiva Ativa antes do início da situação experimental propriamente dita.

O teste de Esquiva Ativa consistia no acionamento da campainha sonora por um máximo de cinco segundos, findos os quais não se dando o deslocamento do animal de uma metade da gaiola para a outra, o mesmo era penalizado com rápido estímulo nociceptivo elétrico de 1mA nas patas, repetido até que ocorresse o cruzamento. Havendo o cruzamento do rato durante o período de emissão do estímulo sonoro o mesmo é interrompido imediatamente, não cabendo punição.

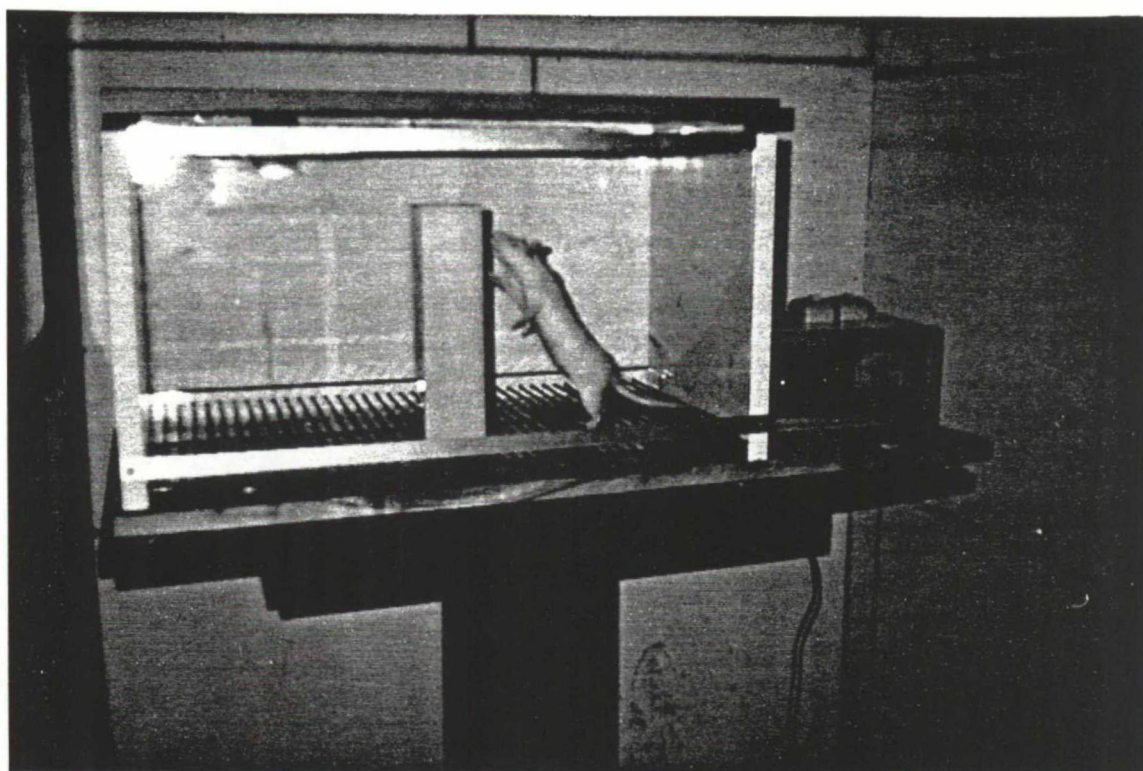
Um intervalo aleatório entre dez e quarenta segundos entre cada sonorização foi a regra.

Foram registradas as respostas de cruzamento ou não a cinquenta estímulos sonoros. Outros fenômenos como a ocorrência de saltos ("jumping"), cruzamentos inter-provas e resposta de orientação também foram registrados.

Os cruzamentos inter-provas consistem no cruzamento da linha média fora do período de estímulo sonoro.

A resposta de orientação é um estado de alerta a cada estímulo sonoro da campainha e caracterizado principalmente por levantamento da cabeça e orelhas no intento de localizar a fonte sonora.





Fotografia 08. Aspecto do Laboratório de Fisiologia do Sistema Nervoso Central, mostrando a gaiola de esquiwa ativa.

### 3.4 Avaliação Histológica

Ao final dos testes comportamentais foram coletados cérebro e testículos dos animais para que pudessem ser analisados através de um estudo histológico.

Os animais foram anestesiados inalatoriamente com eter sulfúrico embebido em algodão em câmara fechada. Uma vez anestesiado, se procedia ao sacrifício do animal abrindo-se a cavidade abdominal e torácica em incisão mediana anterior e realizando-se a cardiectomia no ventrículo direito. Realizava-se então a perfusão do ventrículo esquerdo com solução salina isotônica seguida por uma solução fixadora de formalina a 10%. (17).

Retirou-se na sequência os testículos e cérebro, sendo guardados por vinte e quatro horas na mesma solução de formalina. Após este período as peças foram submetidas aos processos de desidratação, diafanização e emblocamento de acordo com o seguinte protocolo:

- Alcool 80%..... = 2 horas.
- Alcool 90%..... = 30 min.
- Alcool 90%..... = 30 min.
- Alcool 100%..... = 30 min.
- Alcool 100%..... = 1 hora.
- Xilol I..... = 1 hora.
- Xilol II..... = 1 hora.
- Parafina I..... = 30 min a 60 C.
- Parafina II..... = 16 horas a 60 C.
- Emblocamento em parafina.

Após este passo, foram obtidos cortes de 5  $\mu$ m. de espessura por meio de micrótomo, sendo os cortes distendidos em placa aquecedora sobre lâmina de vidro.

Para coloração foi utilizado o método da hematoxilina-eosina, de acordo com o seguinte protocolo:

- Xilol I..... = 3 min.
- Xilol II..... = 3 min.
- Alcool 100% ..... = 3 min.
- Alcool 90% ..... = 3 min.
- Alcool 70% ..... = 3 min.
- Lavagem com água filtrada em Becker.
- Lavagem com água filtrada com almotolia.
- Hematoxilina de Harris..... = 3 a 5 min.
- Lavagem com água filtrada em Becker.
- Lavagem com água filtrada com almotolia.
- Eosina..... = 3 a 5 min.
- Alcool 90% ..... = 3 min.
- Alcool 100% ..... = rápido.
- Alcool 100% ..... = 3 min.
- Alcool 100% + Xilol (1:1) = 3 min.
- Xilol III ..... = 3 min.
- Xilol IV ..... = 3 min.
- Montagem em Bálsamo-do-Canadá.

Maiores detalhes da técnica histológica podem ser obtidos consultando-se a referência: Beçak, W. e Paulete, J. Técnicas de Citologia e Histologia, no capítulo 7.

Após a análise microscópica das lâminas histológicas foram registrados em fotomicroscópio alguns aspectos das mesmas.

### 3.5 Tratamento Estatístico

Para cada parâmetro estudado, a comparação entre os valores médios representativos do grupo experimental e do grupo controle, foi determinada pelo teste "t" de Student sempre que cabível.

Foi estabelecido para todos os parâmetros o nível de significância em  $p < 0.05$ .

## **4 RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Abertura Palpebral

Os resultados de abertura palpebral (percentagem dos animais que preenchiam os critérios previamente estabelecidos) estão representados na tabela 01 e na figura 01, aonde pode ser observado que os animais do grupo Tordon parecem apresentar um atraso nesta evolução quando comparados com os animais do grupo controle.

Tabela 01. Evolução da abertura palpebral onde a mesma é representada em percentagem dos animais de cada grupo que a apresentavam.

Idade (dias)	Grupo C (n=20)	Grupo T (n=27)
12	0 %	0 %
13	0 %	3,7 %
14	30 %	14,81 %
15	100 %	48,15 %
16	100 %	100 %

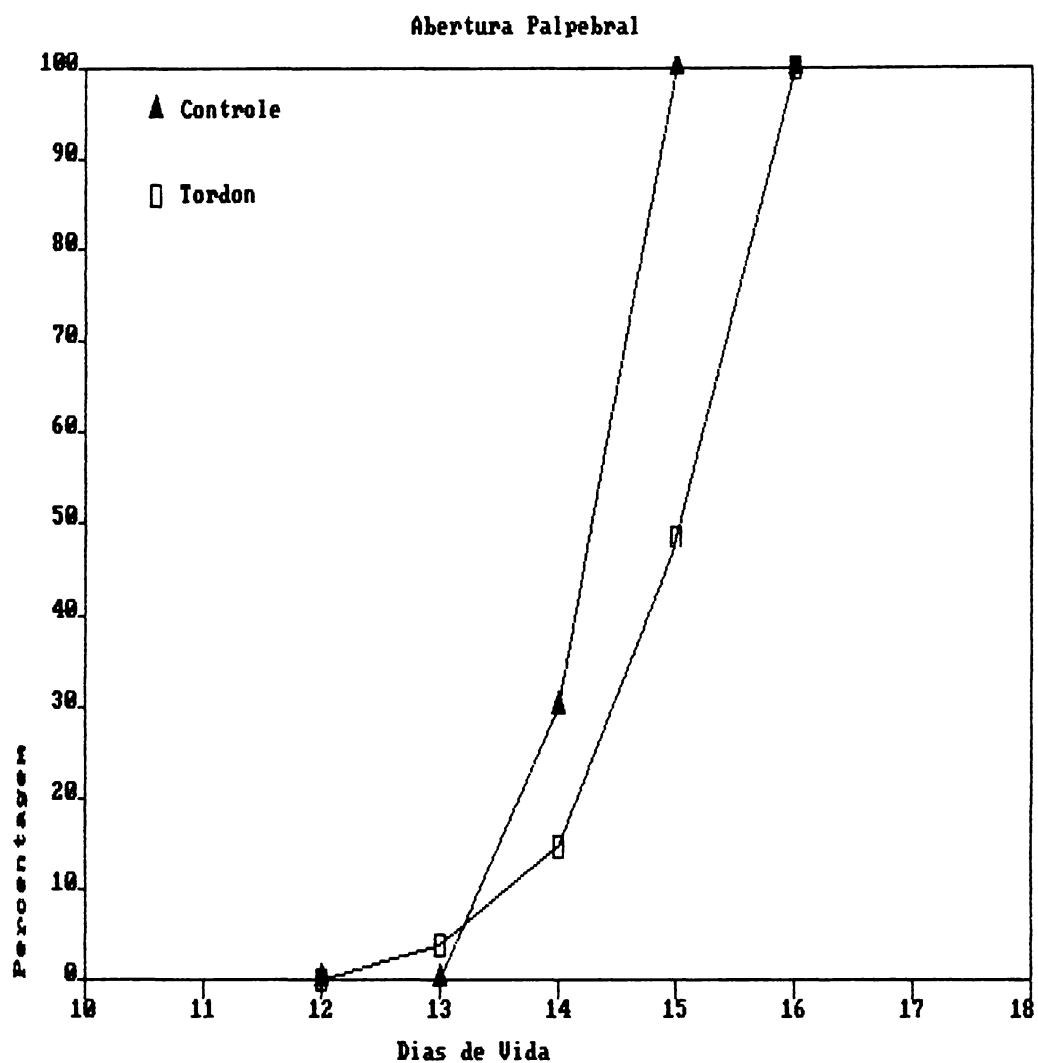


Figura 01. Evolução da abertura palpebral, onde a abertura palpebral é representada em percentagem dos animais de cada grupo que a apresentavam, segundo os critérios previamente estabelecidos.

#### 4.2 Reflexo de Endireitamento

Os resultados para o reflexo de endireitamento estão representados na tabela 02 e na figura 02, onde se observa que parece haver uma tendência dos animais do grupo Tordon apresentarem um atraso nos dias 3 e 4, embora sem diferença estatisticamente significativa, em relação aos animais do grupo controle .

Tabela 02. Evolução do tempo (em segundos) do reflexo de endireitamento dos animais dos grupos controle e Tordon, do terceiro ao sétimo dia de vida.

Idade (dias)	Grupo C (n=20)	Grupo T (n=27)
3	48,11 ± 15,40	66,29 ± 23,90
4	21,90 ± 3,91	47,85 ± 15,99
5	8,75 ± 2,14	9,89 ± 2,86
6	6,35 ± 2,06	2,52 ± 0,96
7	2,35 ± 1,20	0,00 ± 0,00



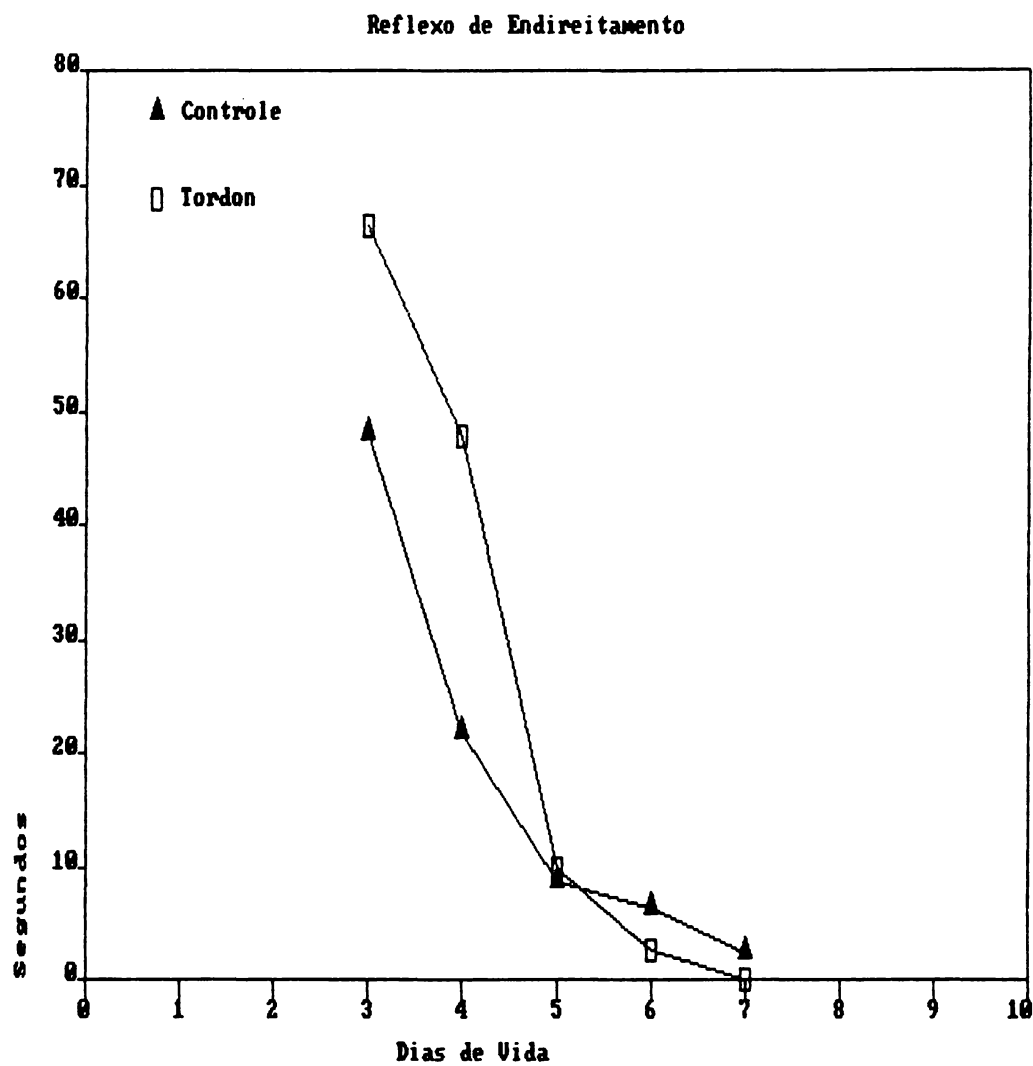


Figura 02. Evolução do reflexo de endireitamento, onde  $\blacktriangle$  representa o grupo controle e  $\square$  representa o grupo Tordon.

### 4.3 Peso Corporal

Para o peso corporal obtivemos os resultados discriminados na tabela abaixo :

Tabela 03. Evolução do peso corporal (em gramas) dos animais dos dois grupos experimentais. Nesta tabela estão representados apenas os pesos avaliados de oito em oito dias.

Idade (dias)	Grupo C (n=20)	Grupo T (n=25)
3	7,58 ± 0,37	7,83 ± 0,22
11	23,24 ± 0,46	24,01 ± 0,33
19	40,18 ± 1,03	43,16 ± 0,61
27	66,57 ± 1,16	68,65 ± 0,99
35	116,55 ± 1,66	118,52 ± 1,88
43	167,57 ± 2,67	170,89 ± 2,43
51	219,94 ± 3,22	221,75 ± 3,11
59	262,58 ± 3,43	264,49 ± 2,78
67	290,84 ± 3,86	288,02 ± 4,16
75	308,33 ± 4,41	307,44 ± 4,47
83	322,98 ± 6,93	326,31 ± 3,74
91	336,08 ± 5,50	339,45 ± 3,68

A evolução do Peso Corporal não apresenta diferença estatística significativa. (ver figura 03).

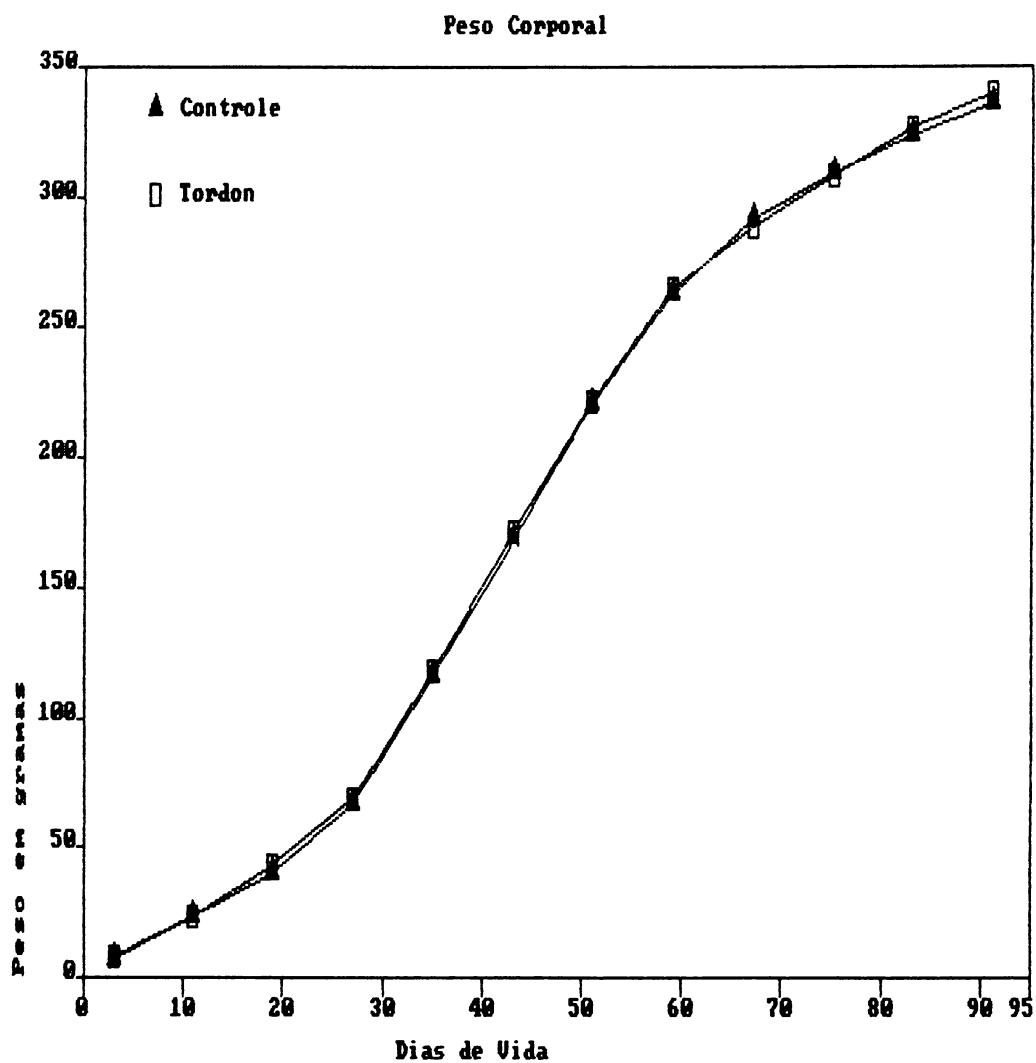


Figura 03. Evolução do peso corporal (média) em gramas, onde  $\blacktriangle$  representa o grupo controle e  $\square$  representa o grupo Tordon.

#### 4.4 "Rota-Rod"

No teste do "Rota-Rod" obtivemos os resultados apresentados na tabela 04 abaixo.

Tabela 04. Tempo de permanência (em segundos) dos animais dos dois grupos experimentais, avaliado aos 42 e 92 dias de idade, onde \* representa diferença estatística com  $p < 0.05$ .

Idade (dias)	Grupo C (n=20)	Grupo T (n=20)
42	69,10 ± 8,34	36,65 ± 3,20 *
92	75,45 ± 13,97	59,85 ± 37,79

Os resultados acima mostram que a diferença significativa verificada aos 42 dias de idade, embora persista a mesma tendência, desapareceu aos 92 dias de idade. (ver também as figuras 04 e 05).

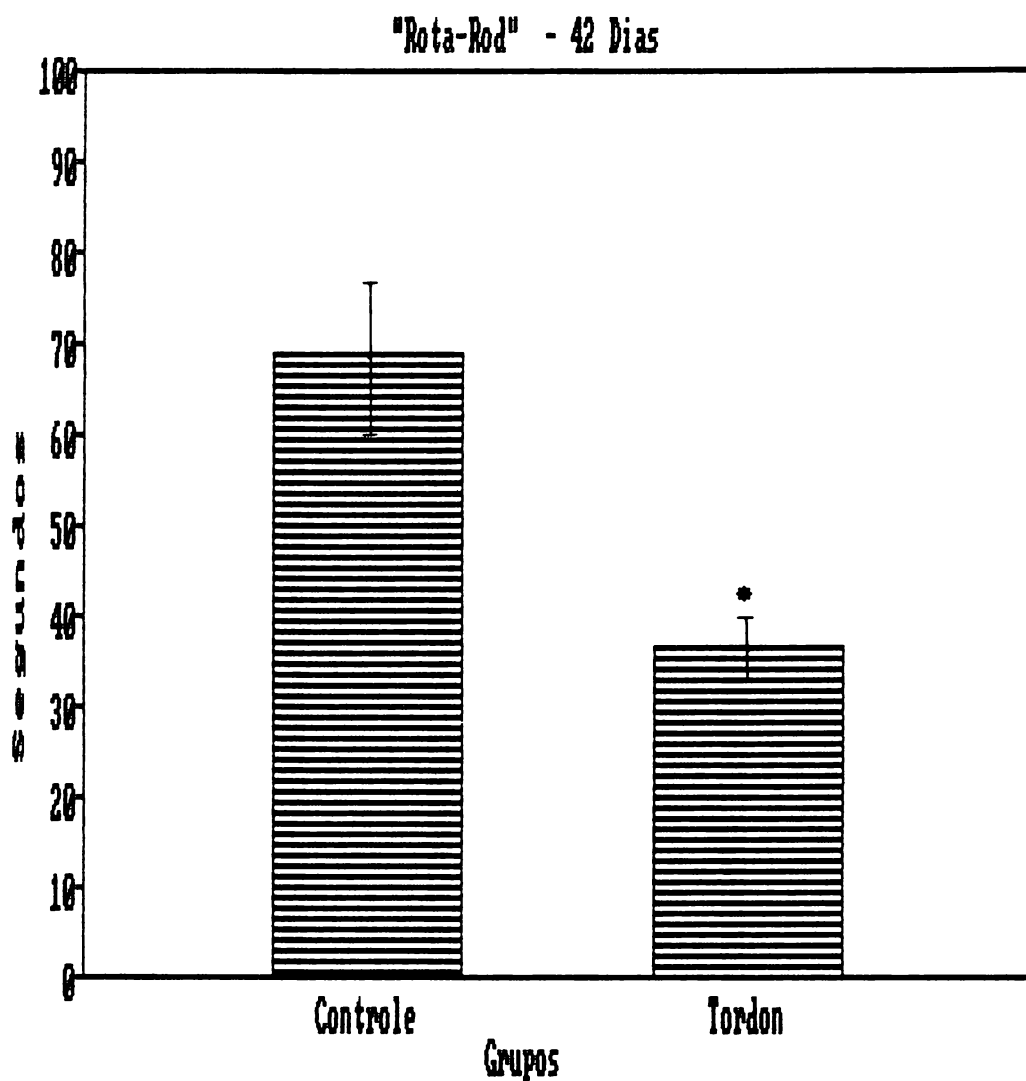


Figura 04. Tempo de permanência em segundos no "Rota-Rod", onde se observa que com 42 dias de idade os animais do grupo Tordon apresentam este tempo menor que os animais do grupo controle, diferença esta que é estatisticamente significativa com  $p < 0.05$ .

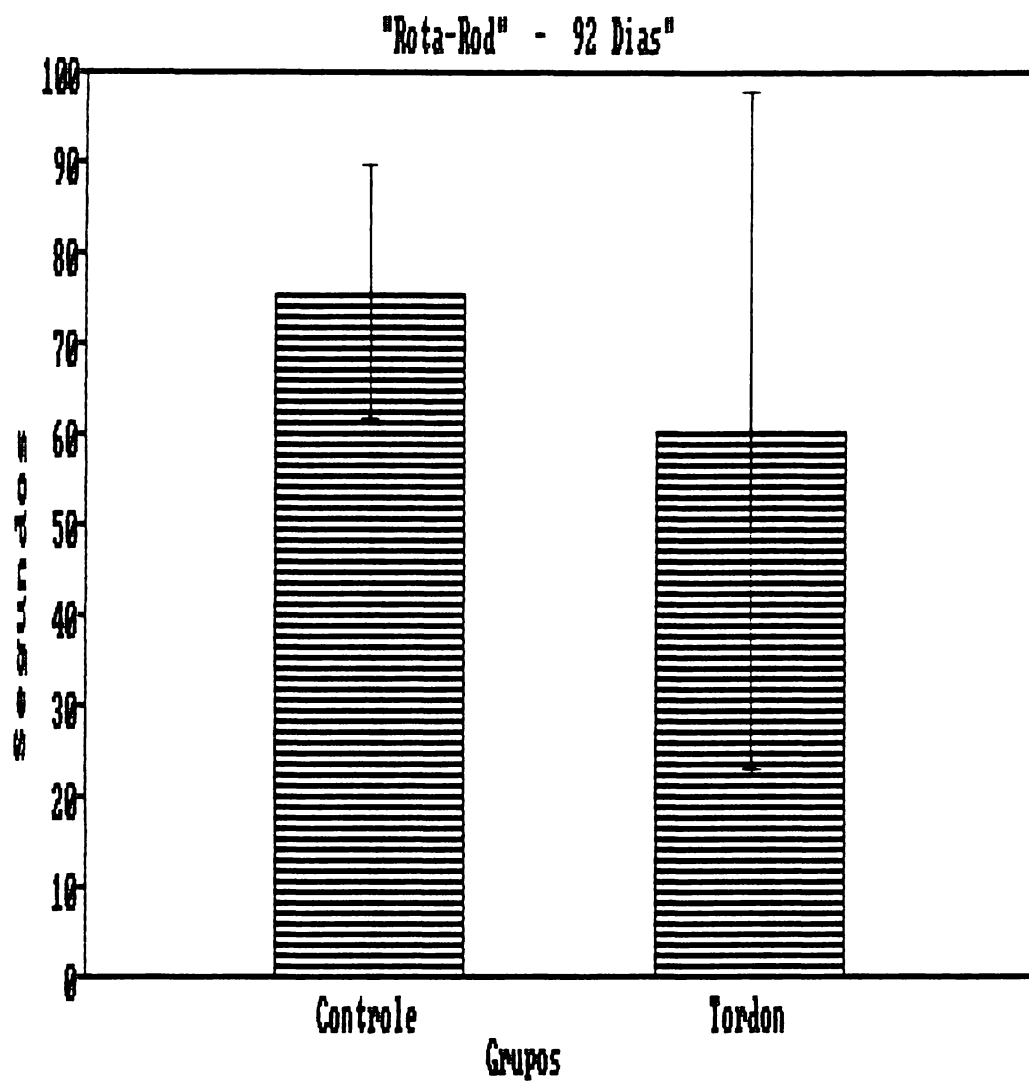


Figura 05. Tempo de permanência em segundos no "Rota-Rod" dos animais do grupo controle (C) e do grupo Tordon (T) aos 92 dias de idade.

#### 4.5 Movimentação Espontânea

Os resultados de movimentação espontânea, avaliada aos 42 e 92 dias de idade estão representados na tabela 05 abaixo e nas figuras 06 e 07.

Tabela 05. Atividade motora espontânea em número de cruzamentos dos dois grupos de animais, avaliada aos 42 e 92 dias de idade, onde \* representa diferença estatística com  $p < 0.05$ .

Idade (dias)	Grupo C (n=20)	Grupo T (n=20)
42	124,55 ± 8,01	121,30 ± 11,21
92	118,65 ± 13,29	69,55 ± 10,54 *

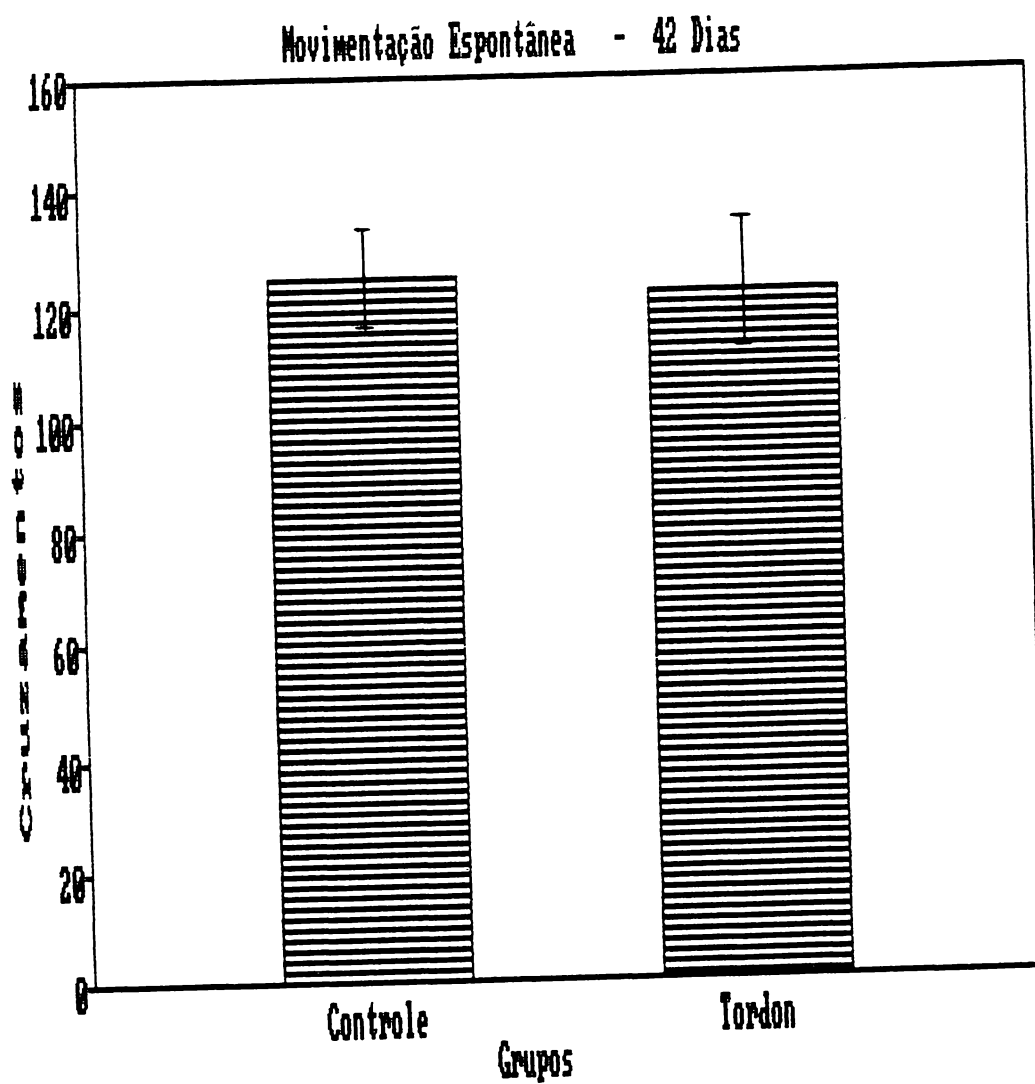


Figura 06. Desempenho dos animais na movimentação espontânea avaliada aos 42 dias de idade.



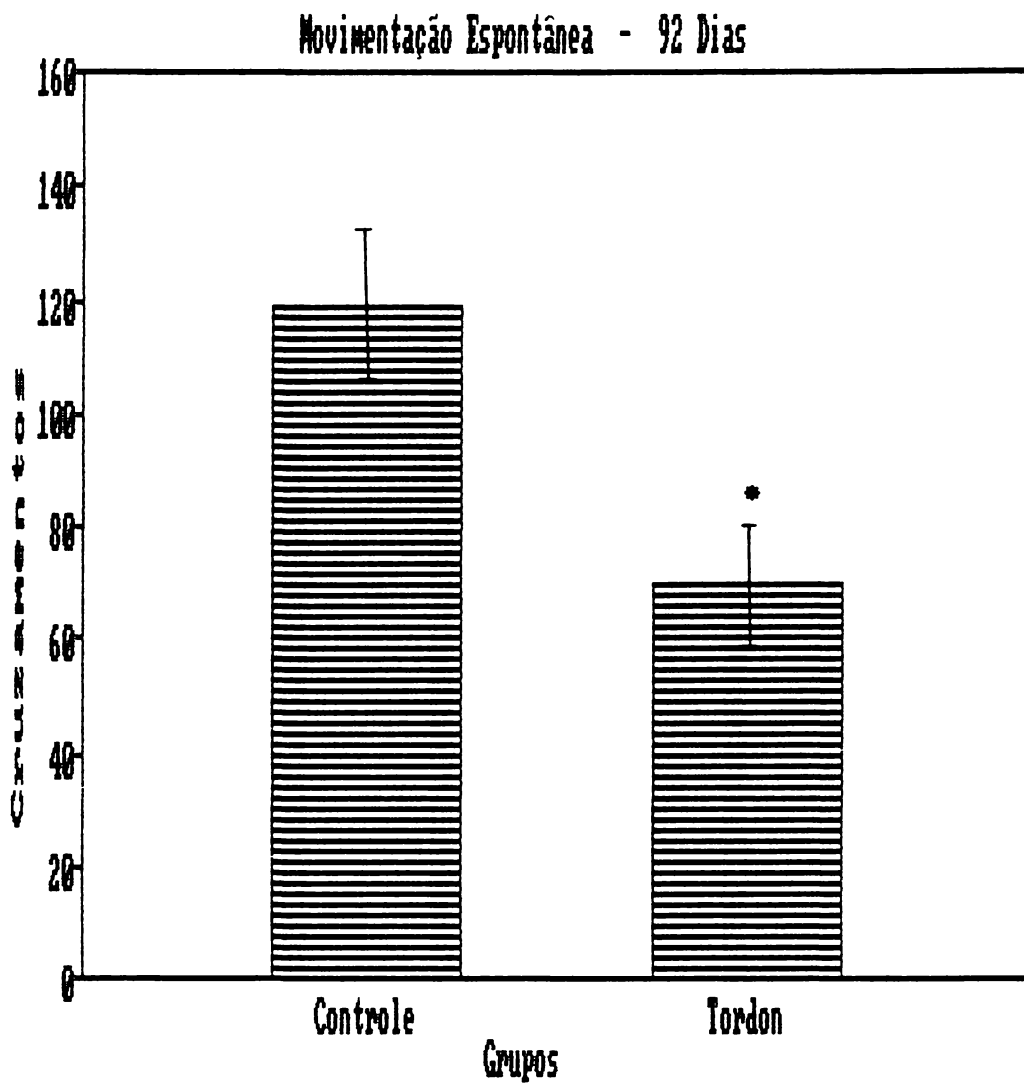


Figura 07. Desempenho na movimentação espontânea avaliada aos 92 dias de idade nos animais dos dois grupos experimentais, onde \* representa diferença estatística com  $p < 0.05$ .

## 4.6 "Open-Field"

Os resultados relativos aos diferentes parâmetros avaliados no teste do "Open-Field" estão representados na tabela 06 abaixo e nas figuras 08 a 12.

Tabela 06. Valores médios (média  $\pm$  e.p.m.) dos diferentes parâmetros observados no teste do "Open-Field", onde \* representa diferença estatística com  $p < 0.05$ .

	Grupo C (n=20)	Grupo T (n=20)
Deambulação (número)	47,95 $\pm$ 5,27	33,60 $\pm$ 4,27 *
Tempo Parado (segundos)	133,55 $\pm$ 14,76	185,05 $\pm$ 9,59 *
Tempo de "Grooming" (segundos)	19,00 $\pm$ 5,10	17,50 $\pm$ 4,07
"Rearing" (número)	12,65 $\pm$ 1,37	9,05 $\pm$ 1,37
Defecação (número)	5,70 $\pm$ 0,65	5,60 $\pm$ 0,54

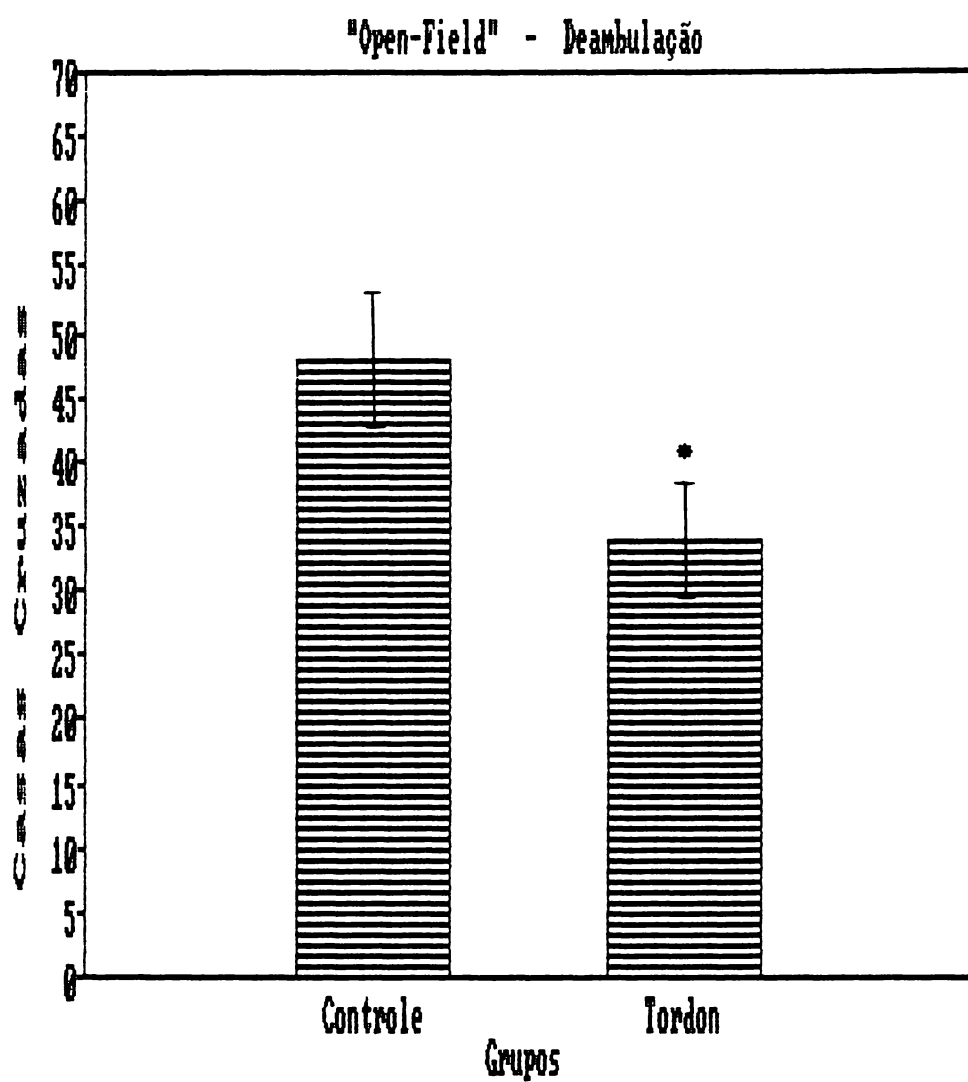


Figura 08. Deambulação no "Open-Field". Número de quadrados (média  $\pm$  e.p.m.) percorridos durante a exposição no "Open-Field", onde \* representa diferença significativa com  $p < 0.05$ .

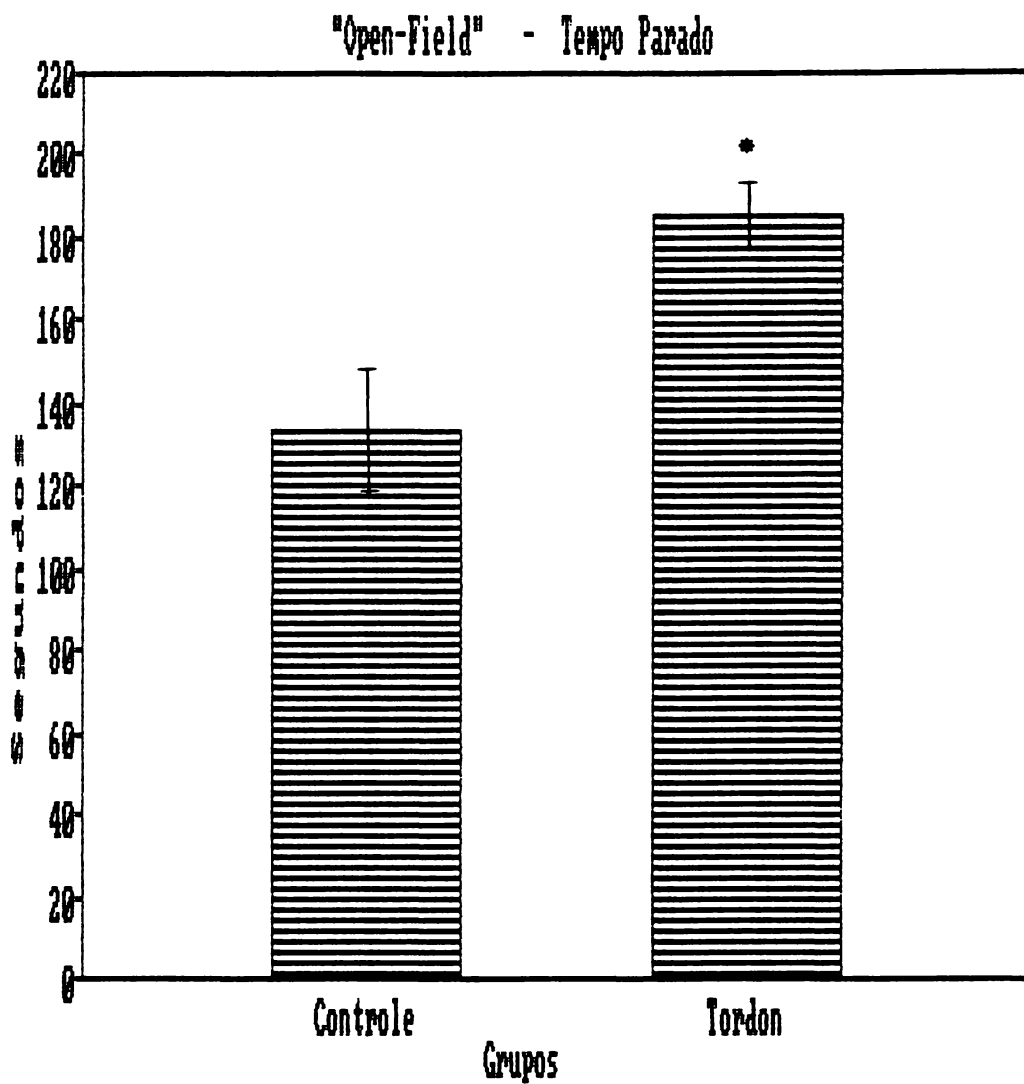


Figura 09. Tempo (em segundos) parado (média  $\pm$  e.p.m.) durante os cinco minutos de exposição ao "Open-Field", onde \* representa diferença estatística significativa com  $p < 0.05$ .

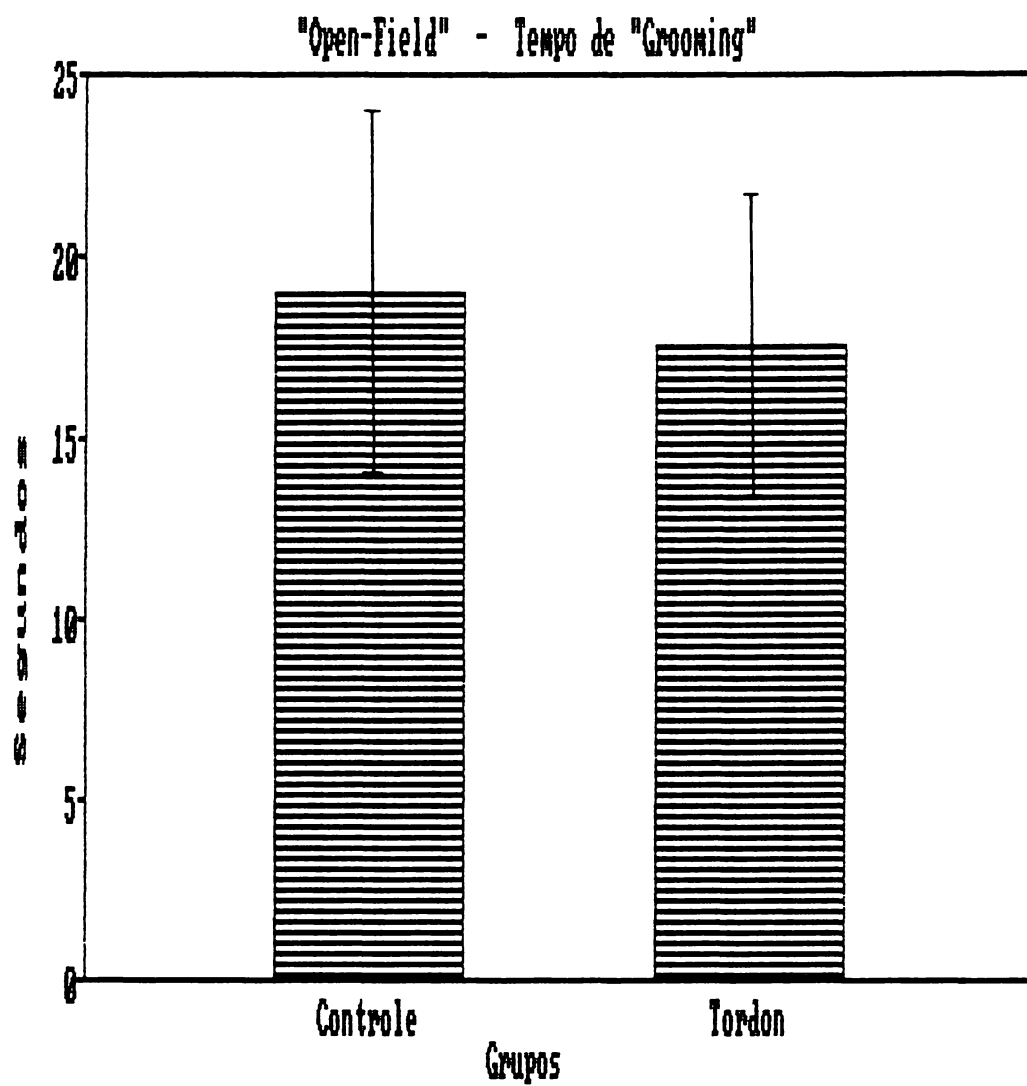


Figura 10. Tempo (em segundos) de "grooming" (média  $\pm$  e.p.m.) durante a exposição ao teste do "Open-Field".

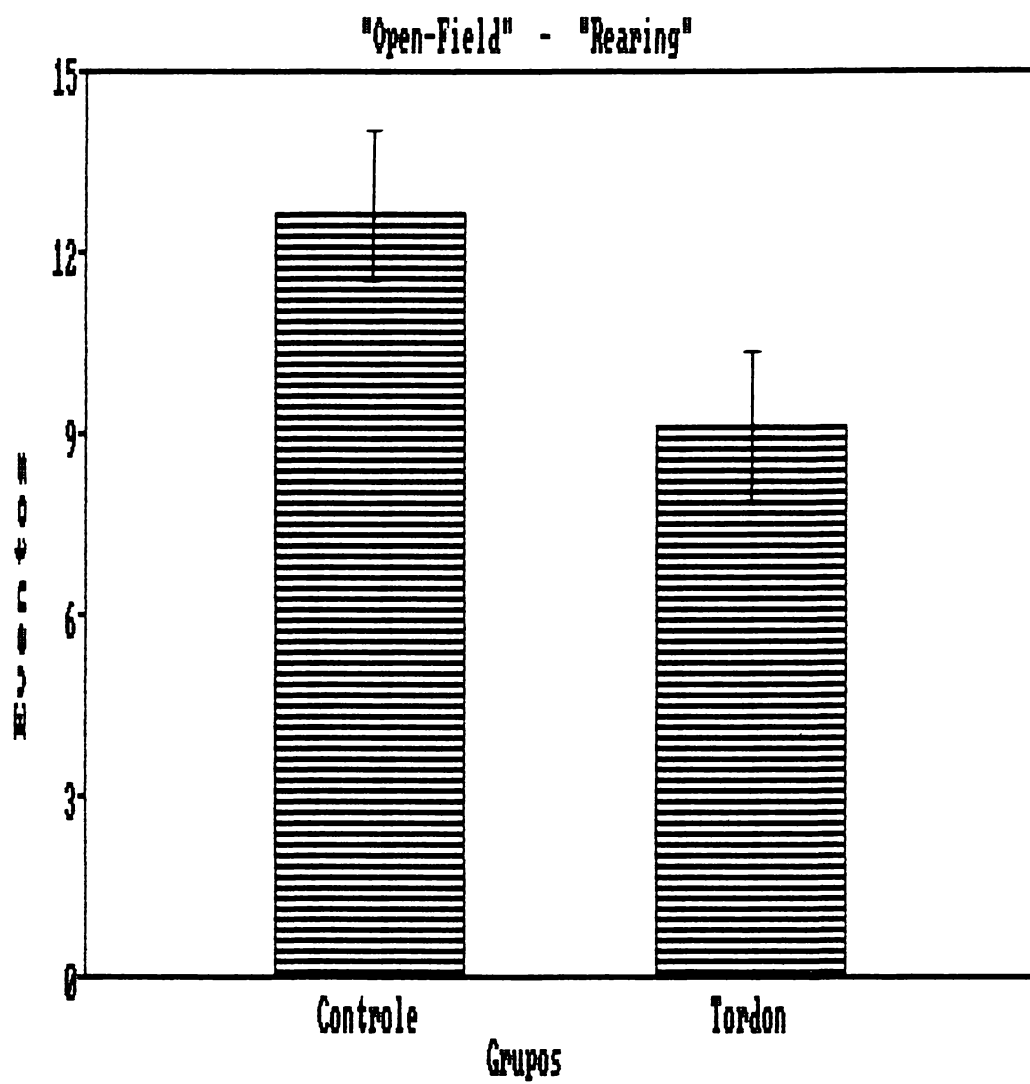


Figura 11. Número de "rearing" durante o teste do "Open-Field".

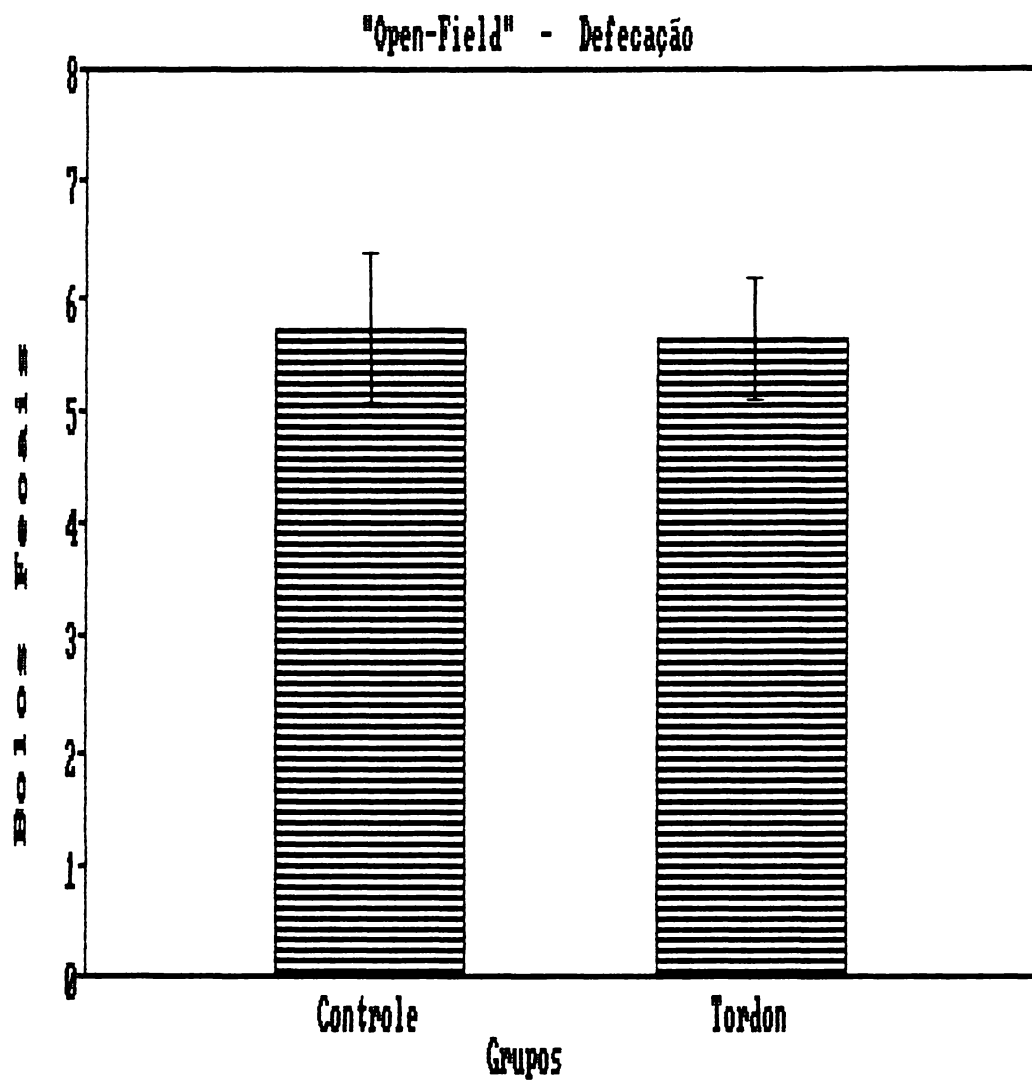


Figura 12. Número de bolos fecais dos animais dos diferentes grupos experimentais, quando submetidos ao teste do "Open-Field".

## 4.7 "Plus-Maze"

No teste do labirinto em cruz elevado foram obtidos os seguintes resultados, representados na tabela 07 abaixo.

Tabela 07. Número de entradas (média  $\pm$  e.p.m.) e tempo (em segundos) de permanência nos braços abertos e fechados durante o teste do labirinto em cruz elevado.

1º dia		Grupo C (n=20)	Grupo T (n=20)
Número de entradas	braço aberto	4,25 $\pm$ 0,59	5,70 $\pm$ 1,00
	braço fechado	8,00 $\pm$ 0,70	8,10 $\pm$ 0,61
Tempo de permanência	braço aberto	64,15 $\pm$ 14,77	85,15 $\pm$ 15,56
	braço fechado	189,15 $\pm$ 15,34	171,10 $\pm$ 15,97
2º dia		Grupo C (n=20)	Grupo T (n=20)
Número de entradas	braço aberto	8,50 $\pm$ 0,67	7,45 $\pm$ 0,76
	braço fechado	7,90 $\pm$ 0,72	7,30 $\pm$ 0,62
Tempo de permanência	braço aberto	20,25 $\pm$ 3,34	32,00 $\pm$ 7,46
	braço fechado	226,95 $\pm$ 10,06	215,10 $\pm$ 9,49

A confrontação entre os valores obtidos para os Grupos T e C do número de entradas e do tempo de permanência nos braços aberto e fechado do "plus-maze", tanto no primeiro como no segundo dia, não apresentou significância estatística



#### 4.8 Esquiva Ativa

Os resultados obtidos no teste da esquiva ativa estão resumidos na tabela 08 e nas figuras 13 a 15.

Tabela 08. Desempenho (média  $\pm$  e.p.m.) dos animais, relativo aos diferentes parâmetros avaliados no teste de esquiva ativa.

	Grupo C (n=20)	Grupo T (n=20)
Resposta de Cruzamento	29,40 $\pm$ 4,56	36,20 $\pm$ 5,05
Resposta de Salto	1,85 $\pm$ 0,66	0,60 $\pm$ 0,26
Cruzamento Inter-Prova	1,40 $\pm$ 0,44	0,85 $\pm$ 0,24

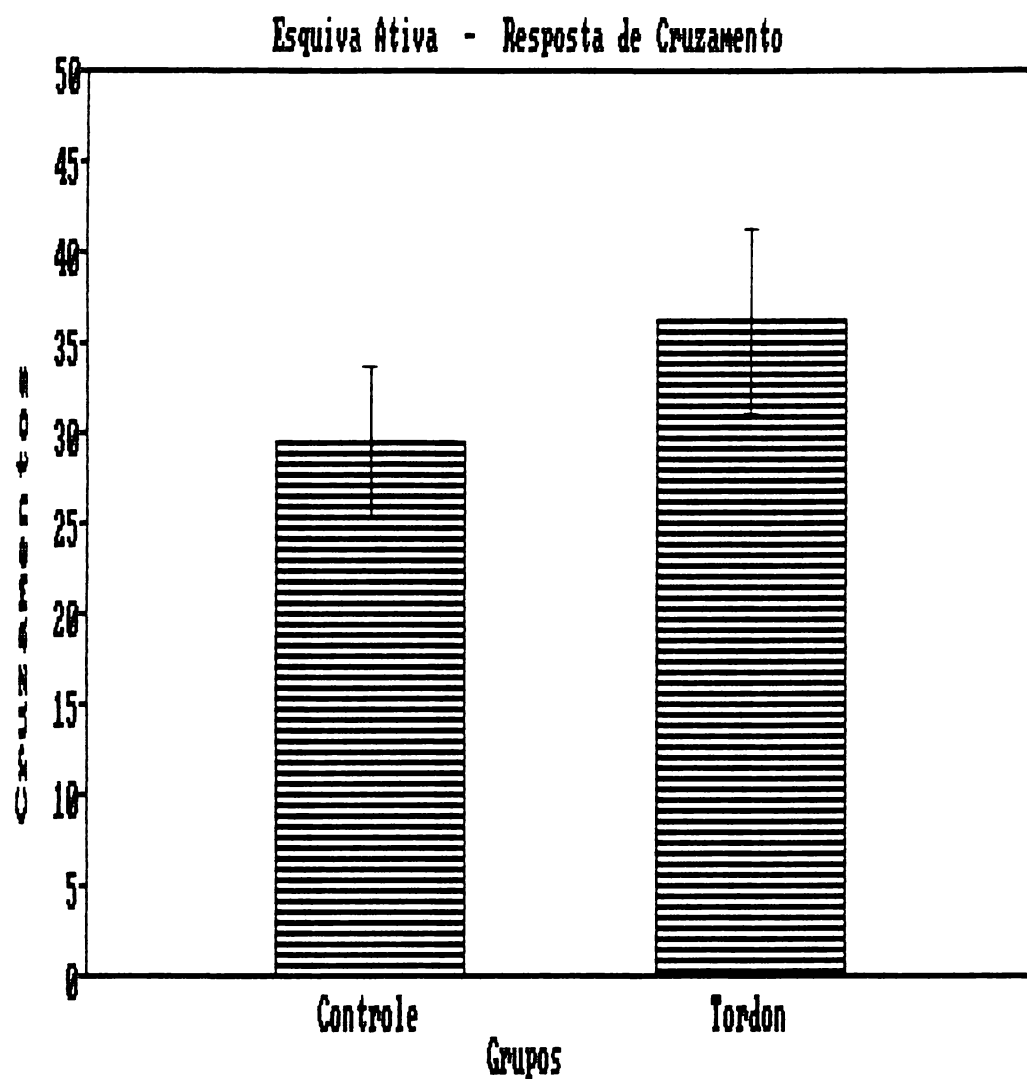


Figura 13. Porcentagem de respostas de cruzamento à campainha (média  $\pm$  e.p.m.) dos animais controles e Tordon durante o teste de esquiva ativa.

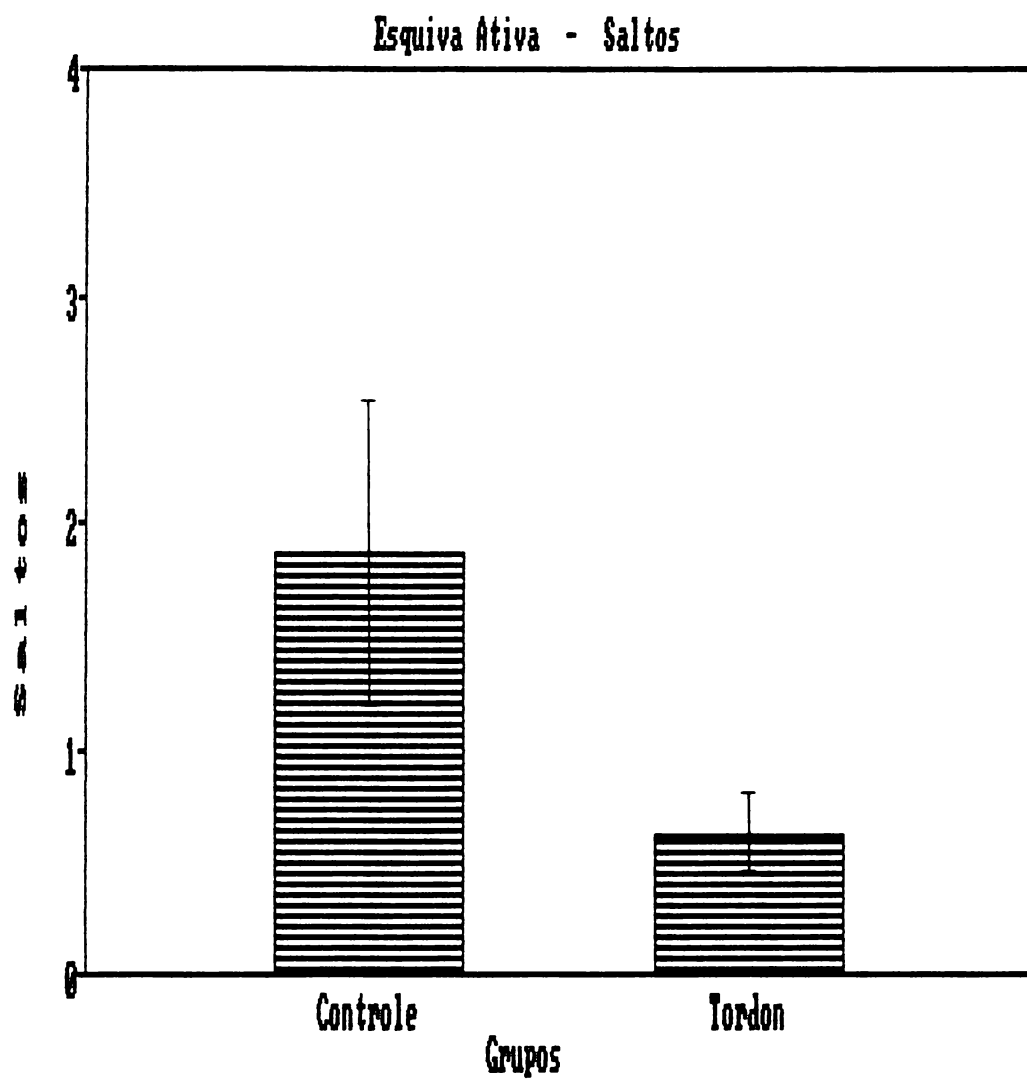


Figura 14. Porcentagem de respostas de saltos (média  $\pm$  e.p.m.) à campanha dos dois grupos de animais, durante o teste de esquiva ativa.

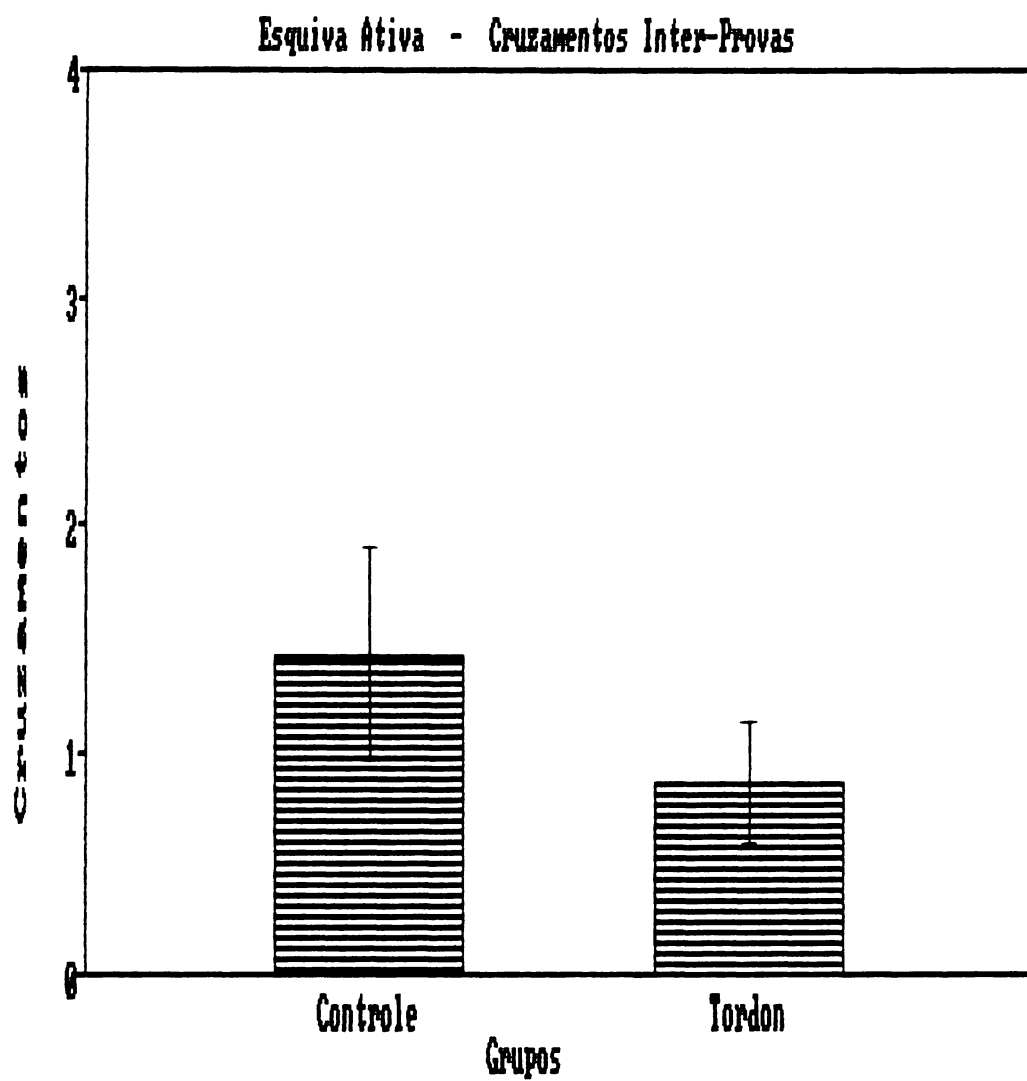


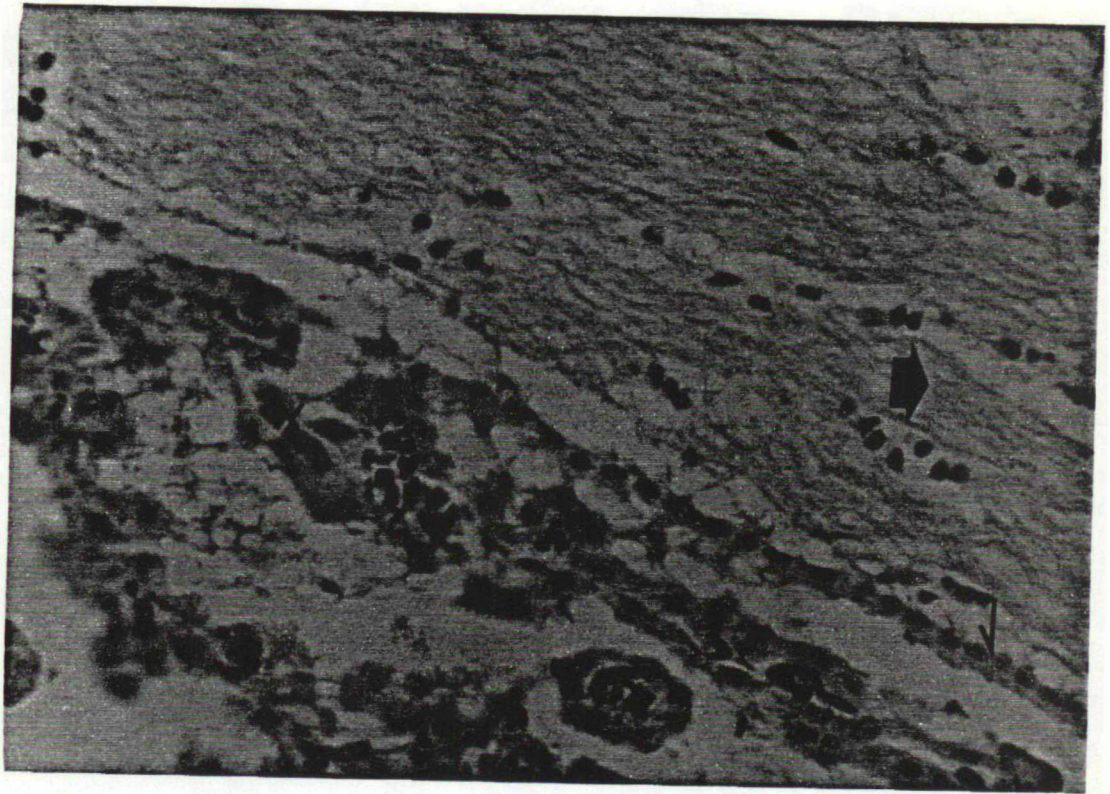
Figura 15. Respostas de cruzamentos inter-provas (média  $\pm$  e.p.m.) dos animais dos grupos controle e Tordon no teste de esquiva ativa.

#### 4.9 Avaliação Histológica

Examinando-se uma amostra de cinco animais do grupo experimental e cinco do grupo controle não se observou alterações histológicas em cérebro e testículos dos espécimes examinados.

Alguns espécimens, apesar do clareamento intravascular com solução salina e formalina, apresentaram hemácias no interior dos capilares dos plexos coróides encefálicos. (ver fotografia 09).

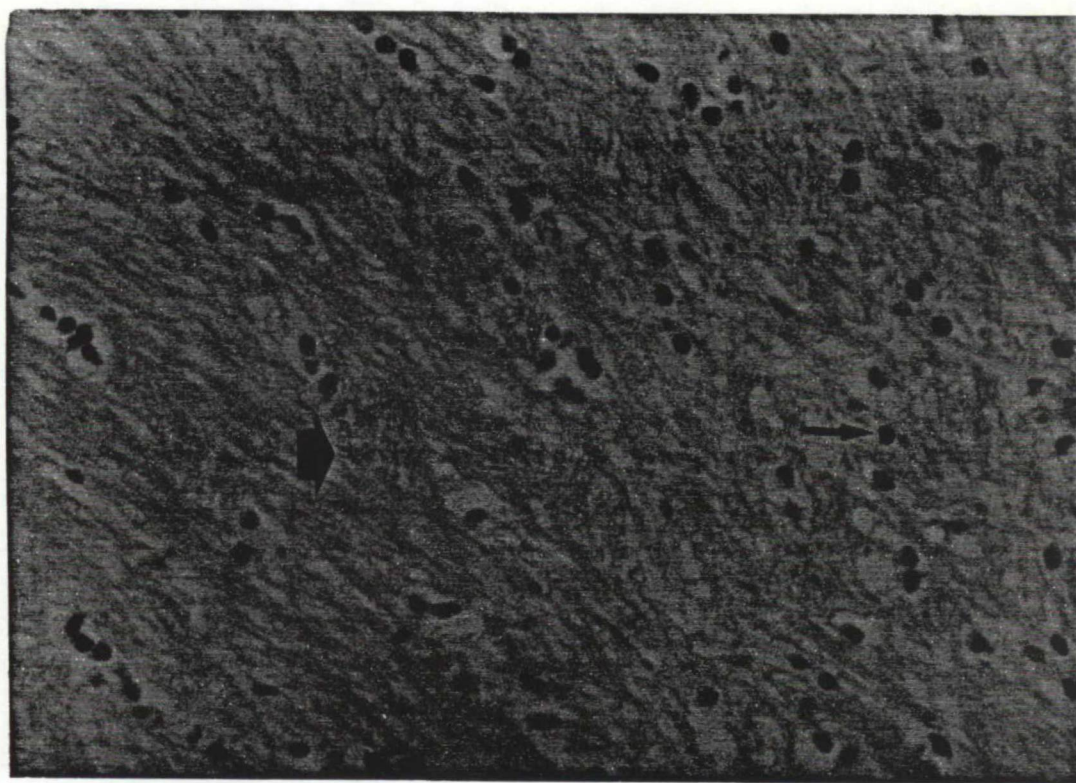
Aspectos histológicos das observações realizadas podem ser vistos nas fotografias números 09, 10, 11 e 12.





Fotografia 09. Aspecto fotomicroscópico do cérebro de animal do grupo controle.

Aspecto das fibras do corpo cal( → ) ( → ),  
 epitélio ependimário do ventrículo lateral ( → ) e capilares  
 do plexo coróide ( > ).

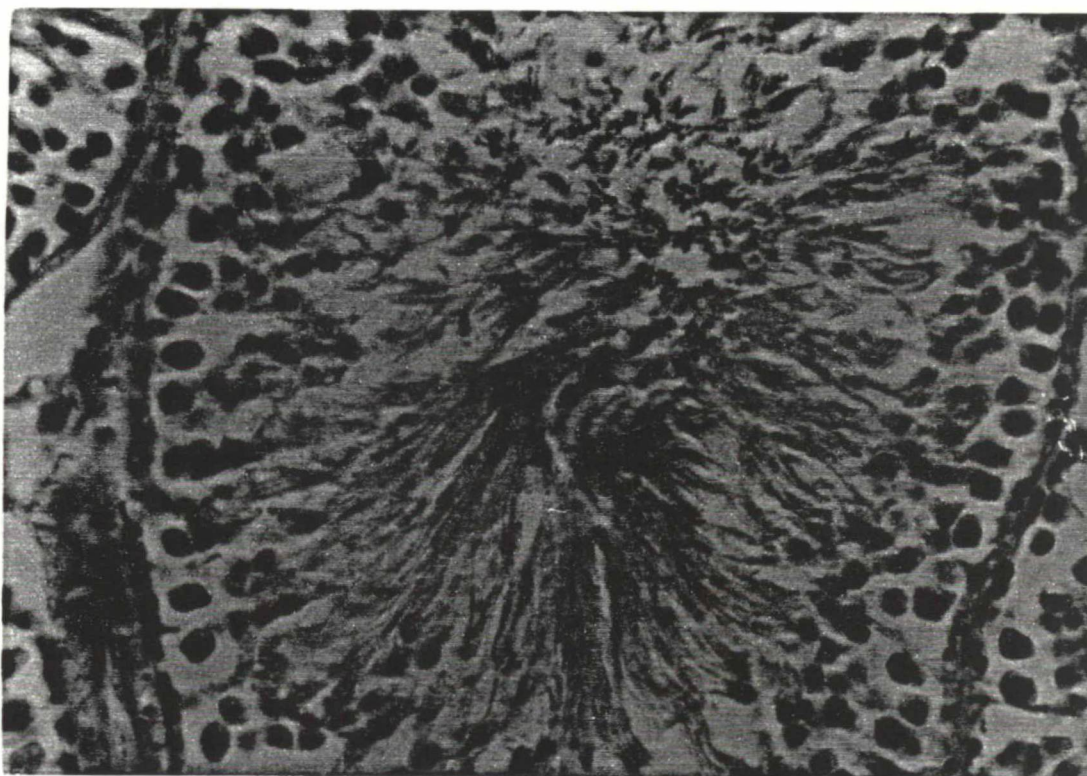
Coloração H.E. Aumento de 400 vezes.



Fotografia 10. Aspecto fotomicroscópico do cérebro de animal do grupo Tordon.

Aspecto das fibras do corpo caloso (  ) e células da neuróglia (  ).

Coloração H.E. Aumento de 400 vezes.

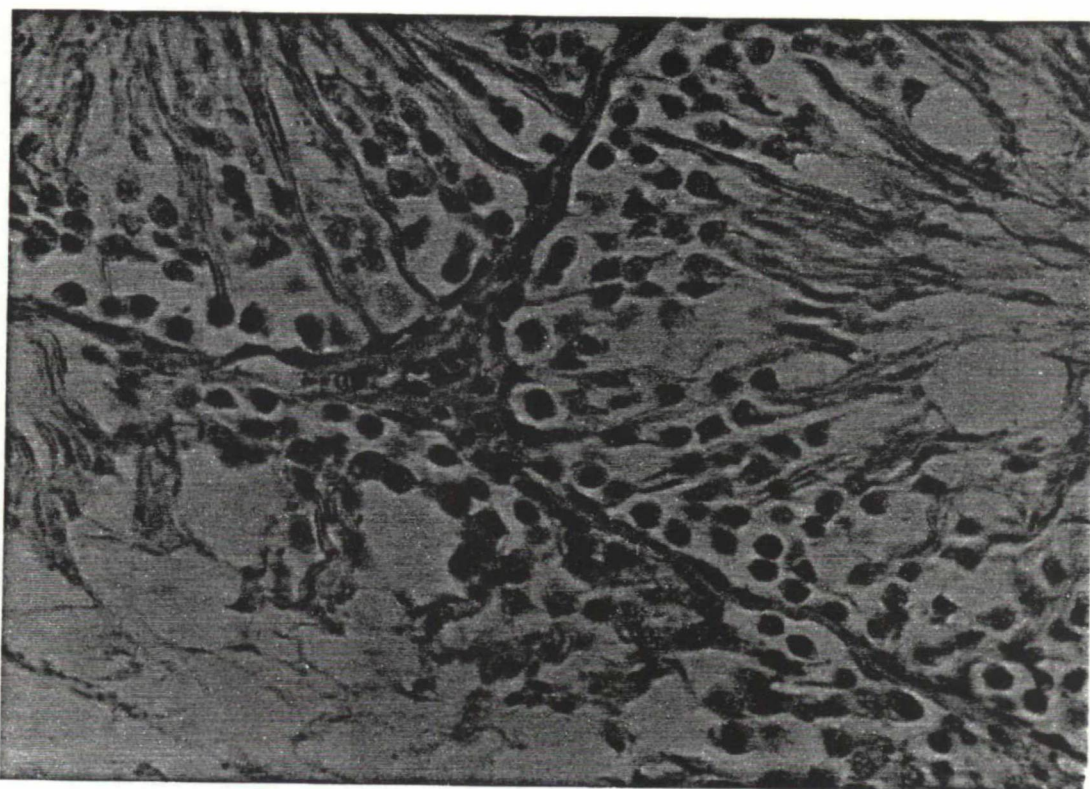


Fotografia 11. Aspecto fotomicroscópico de testículo de animal controle.

Aspecto dos túbulos seminíferos.

Coloração H.E. Aumento de 400 vezes.





Fotografia 12. Aspecto fotomicroscópico de testículo de animal do grupo Tordon.

Detalhe dos túbulos seminíferos.

Coloração H.E. Aumento de 400 vezes.

## 5 DISCUSSÃO

## 5 DISCUSSÃO

A contaminação com Tordon de ratos machos durante 60 dias antes do respectivo acasalamento com fêmeas normais não alterou a evolução do peso corporal dos filhotes machos em F1, pois, a evolução do peso corporal não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os filhotes de animais controle e animais Tordon. Estes resultados são distintos dos resultados obtidos em um esquema experimental anteriormente desenvolvido em nosso laboratório, quando ratas foram submetidas a contaminação com Tordon durante o período gestacional e de lactação. Isto demonstra claramente que em ratos machos contaminados com Tordon no período de pré-acasalamento, esta contaminação não causa alterações na evolução do peso corporal de seus filhotes.

Todavia, os resultados obtidos quanto ao reflexo de endireitamento dos filhotes cujos pais foram contaminados cronicamente antes do acasalamento, mostraram que parece haver uma certa deficiência na capacidade de recuperar a sua posição natural quando são colocados em decúbito dorsal. Em outras palavras, segundo o que pode ser observado, os filhos cujos pais foram contaminados antes do acasalamento, apresentam uma tendência do reflexo de endireitamento levemente prejudicado.

Em relação à abertura palpebral ocorreu fenômeno similar ao do reflexo de endireitamento, ou seja, os filhotes cujos pais foram contaminados cronicamente com Tordon previamente ao período de acasalamento, apresentaram um certo retardo no processo de abertura palpebral.

Estes resultados do reflexo de endireitamento e

de abertura palpebral são provavelmente decorrentes da presença do Tordon no líquido seminal, agente este que deve ter afetado diretamente o óvulo ou o desenvolvimento embrionário. (05;08;20;24;25).

Quanto à movimentação espontânea, observou-se que esta apenas se apresentou diferente estatisticamente nos filhotes aos 92 dias de idade, o que mais uma vez sugere que o Tordon, eventualmente presente no líquido seminal ou nos espermatozoides o qual, durante a embriogênese, causou alterações em estruturas neurais ou mesmo outras, relacionadas ao controle da atividade motora. (05;08;14;20;24;25).

Os animais, filhotes de pais contaminados cronicamente com Tordon previamente ao período de acasalamento, apresentaram uma capacidade reduzida ( $p < 0.05$ ) no tempo de permanência no "Rota-Rod" aos 42 dias de idade, o que pode ser interpretado como um efeito resultante da ação do herbicida Tordon durante o processo de desenvolvimento embrionário, (05;08;14;20;24;25). Embora não diferente estatisticamente, os animais Tordon mantiveram aos 92 dias de idade um tempo de permanência menor no "Rota-Rod" que os animais controles.

No teste do campo aberto ("Open-Field"), os parâmetros de deambulação e tempo parado mostraram diferenças, sendo que os animais do grupo Tordon apresentaram deambulação menor e tempo parado maior em relação aos animais do grupo controle, sendo que a deambulação no "Open-Field" foi similar ao desempenho no teste de atividade motora espontânea. Esta redução da atividade motora no teste do "Open-Field" e no teste de atividade motora espontânea, sugere que o Tordon

presente no líquido seminal ou nos espermatozoides deve ter induzido alterações durante o desenvolvimento embrionário, alterações essas que devem ter comprometido estruturas relacionadas ao controle motor. Estes resultados são semelhantes aos descritos por Goldstein *et al* em 1959, Schulze *et al* (1988) e Duffard (1990). Concomitante à redução da atividade motora no campo aberto, observou-se também uma diminuição do comportamento exploratório evidenciado pela redução do número de "rearings", do número de saltos à campainha e de cruzamentos inter-provas, no teste de esquiva ativa, o que evidencia que o Tordon produz toxicidade a nível de estruturas envolvidas com o controle comportamental (Duffard, 1990; Oliveira e Palermo-Neto, 1993).

O fato de não terem sido evidenciadas alterações nos diferentes parâmetros comportamentais avaliados durante o teste do labirinto em cruz elevado pode sugerir que as alterações induzidas não foram suficientes para provocar alterações nos parâmetros avaliados neste teste.

No teste de esquiva ativa, embora não estatisticamente significante, foi observado que os animais, filhotes de pais contaminados cronicamente com Tordon antes do acasalamento, apresentaram um desempenho melhor nas respostas de cruzamento à campainha, o que poderia sugerir que o Tordon, durante o desenvolvimento embrionário alterou estruturas do sistema nervoso em formação, estruturas essas que estariam, em condições normais, exercendo um efeito modulador inibitório sobre este comportamento.

Broxup e colaboradores referem que ao se comparar os achados neuropatológicos e comportamentais, todas

as combinações possíveis de acordo e desacordo são plausíveis. Questões que são importantes tanto para a avaliação comportamental e neuropatologia incluem a sensibilidade, especificidade, replicabilidade e validade dos métodos utilizados.

Entre os fatores que podem ser responsáveis por correlação negativa entre a neuropatologia e alterações comportamentais, estes autores citam : resposta farmacológica (transitória), dose da substância em teste, duração da aplicação da substância, espécie e idade dos animais de experimentação, o tipo de testes comportamentais escolhidos, tempo em que se procedeu a avaliação comportamental, métodos de amostragem patológica, capacidade de reserva do sistema nervoso e tolerância (ou adaptação) do sistema nervoso central.

## **6 CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através dos parâmetros comportamentais avaliados em filhotes (ratos) adultos cujos pais foram contaminados cronicamente com Tordon antes do acasalamento permitem tirar as seguintes conclusões:

1. Filhotes cujos pais foram contaminados com Tordon antes do acasalamento não apresentam alteração significativa da evolução do peso corporal em relação aos animais controles;

2. Filhotes cujos pais foram contaminados cronicamente com Tordon apresentam uma tendência de retardo no reflexo de endireitamento e na abertura palpebral;

3. A deambulação no teste do "Open-Field" bem como a atividade motora espontânea e o tempo de permanência no "Rota-Rod" é menor nos animais filhos de pais que foram contaminados, previamente ao acasalamento, com o herbicida Tordon;

4. No teste de esquiiva ativa foi observada uma tendência de desempenho melhorado nos animais cujos pais foram contaminados cronicamente com Tordon antes do acasalamento;

5. A técnica histológica por nós utilizada não se mostrou apropriada para evidenciar alterações estruturais de tecido do sistema nervoso central ou dos testículos de filhotes de pais contaminados com Tordon antes do acasalamento, sugerindo que outras metodologias morfológicas deverão ser utilizadas para esta finalidade;

6. As alterações comportamentais observadas em filhotes cujos pais foram contaminados cronicamente com Tordon



antes do acasalamento, são provavelmente decorrentes de alterações induzidas ao nível embrionário pelo Tordon presente no líquido seminal ou nos espermatozoides.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ABEL, E. L. Paternal alcohol consumption affects grooming response in rat offspring. Alcohol, 8(1) : 21-3, 1991.
02. \_\_\_\_\_. Duration of paternal alcohol consumption does not influence offspring growth and development. Growth, Development & Aging, 53 : 195-9, 1989.
03. ADAMS, P. M. et alii. Cyclophosphamide-induced spermatogenic effects detected in the F1 generation by behavioral testing. Science, 211 : 80-2, 1981.
04. BEÇAK, W. e PAULETE, J. Técnicas de Citologia e Histologia. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora S. A. , 1976. 2 Vol. , 574 p.
05. BLAKLEY, P. M. et alii. Effects of paternal subacute exposure to Tordon 202c on fetal growth and development in cd-1 mice. Teratology, 39 : 237-41, 1989.
06. \_\_\_\_\_. Effects of preconceptional and gestational exposure to Tordon 202c on fetal growth and development in cd-1 mice. Teratology, 39 : 547-53, 1989.
07. BOYD, C. A. et alii. Behavioral and neurochemical changes associated with chronic exposure to low-level concentration of pesticide mixtures. Journal of Toxicology and Environmental Health, 30 : 209-21, 1990.

08. BROWN, N. A. Are offspring at risk from their father's exposure to toxins?. Nature, 316 : 110, 1985.
09. BROXUP, B. et alii. Correlation between behavioral and pathological changes in the evaluation of neurotoxicity. Toxicology and Applied Pharmacology, 101 : 510-20, 1989.
10. CORDIER, S. et alii. Paternal exposure to mercury and spontaneous abortions. British Journal of Industrial Medicine, 48(6) : 375-81, 1991.
11. DOLL, R. et alii. Paternal exposure not to blame. Nature, 367 : 678-80, 1994.
12. DE DUFFARD, A. M. E. et alii. Behavioral changes in rats fed a diet containing 2,4-dichlorophenoxyacetic butyl ester. NeuroToxicology, 11 : 563-72, 1990.
13. DUFFARD, R. O. et alii. Vulnerability of myelin development of the chick to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic butyl ester. Neurochemical Research, 12(12) : 1077-80, 1987.
14. GOLDSTEIN, N. P. et alii. Peripheral neuropathy after exposure to an ester of dichlorophenoxyacetic acid. J. A. M. A., 171(10) : 130-3, 1959.

15. HALES, B.F. et alii. Cyclophosphamide in the seminal fluid of treated males : transmission to females by mating and effect on pregnancy outcome. Toxicology and Applied Pharmacology, 84 : 423-30, 1986.
16. HOAR, S.K. et alii. Agricultural herbicide use and risk of lymphoma and soft-tissue sarcoma. J. A. M. A., 256 : 1141-7, 1986.
17. HART, B.L. Experimental Neuropsychology. San Francisco, W.H. Freeman and Company, 1969. 102 p.
18. JOFFE, J.M. et alii. Progeny of male rats treated with methadone: physiological and behavioural effects. Mutation Research, 229 : 201-11, 1990.
19. LERDA, D. e RIZZI, R. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Mutation Research, 262 : 47-50, 1991.
20. LOWERY, M.C. et alii. Male-mediated behavioral abnormalities. Mutation Research, 229 : 213-29, 1990.
21. LUTWAK-MANN, C. et alii. Thalidomide in rabbit semen. Nature, 214 : 1018-20, 1967.

22. NELSON, B. K. Evidence for behavioral teratogenicity in humans. Journal of Applied Toxicology, 11(1) : 33-7, 1991.
23. OLIVEIRA, G. H. e PALERMO-NETO, J. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on open-field behaviour and neurochemical parameters of rats. Pharmacology & Toxicology, 73(2) : 79-85, 1993.
24. OLSHAN, A. F. e FAUSTMAN, E. M. Male-mediated developmental toxicity. Reproductive Toxicology, 7 : 191-202, 1993.
25. ROBAIRE, B. e HALES, B. F. Paternal exposure to chemicals before conception. British Medical Journal, 307 : 341-2, 1993.
26. SALLAI, C. M. Alterações Comportamentais Induzidas em Filhotes de Mães (Ratas) Tratadas com Cynomel e Tapazol Durante a Gestação e Lactação. Curitiba, 1993. 73 p. Dissertação, Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
27. SANTOS Jr., M. F. Q. dos et alli. Talidomida : uma revisão da literatura. Hansen. Internacional, 6(2) : 136-45, 1981.
28. SCHULZE, G. E. e Doucherty, J. A. Neurobehavioral toxicity and tolerance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-nbutyl ester (2,4-D\_ester). Fundamental and Applied Toxicology, 10 : 413-24, 1988.

29. SCIALLI, A. R. Paternally mediated effects and political correctness. Reproductive Toxicology, 7 : 189-90, 1993.
30. SMITH, D. J. et JOFFE, J. M. Increased neonatal mortality in offspring of male rats treated with methadone or morphine before mating. Nature, 253 : 202-3, 1975.
31. TANNE, J. H. U.S. cuts use of pesticides. British Medical Journal, 307 : 282-3, 1993.
32. TRIPATHY, N. K. et alii. Genotoxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid tested in somatic and germ-line cells of *Drosophila*. Mutation Research, 319(3) : 237-42, 1993.
33. TRASLER, J. M et alii. Paternal Cyclophosphamide treatment of rats causes fetal loss and malformations without affecting male fertility. Nature, 316 : 144-6, 1985.
34. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. Normas Para Apresentação de Trabalhos. Curitiba, Editora da Universidade Federal do Paraná, 1981. 183 p.

## **8. BIBLIOGRAFIA**



## 8 BIBLIOGRAFIA

- BERNDT, W. O. et KOSCHIER, F. In Vitro Uptake of 2,4-D and 2,4,5-T by Renal Cortical of Rabbits and Rats. Toxicology and Applied Pharmacology, 26 : 559-70, (1973).
- GOLDSTEIN, N. P. et alli. Peripheral Neuropathy After Exposure to an Ester of Dichlorophenoxyacetic Acid. J. A. M. A. 171 : 1306-9 (1959).
- GORZINSKI, S. J. et alli. Dietary Toxicity of Picloram Herbicide in Rats. Journal of Toxicology and Environmental Health, 20 : 367-77 (1987).
- HAYES, J. R. ET ALLI. Acute, 14-Day Repeated dosing, and 90-Day Subchronic Toxicity Studies of Potassium Picloram. Fundamental and Applied Toxicology, 7 : 464-70 (1986).
- HRDINA, P. V et alli. Role of Brain Acetylcholine and Dopamine in Acute Neurotoxic Effects of DDT. European Journal of Pharmacology, 15 : 379-82 (1971).
- KIM, C. S. et alli. Saturable Accumulation of the Herbicide 2,4-D by Rabbit choroid Plexus. Early Developmental Origin and Interaction With Salicylates. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 225 : 699-704 (1983).

LYNN, G. E. from THE DOW CHEMICAL COMPANY. A Review of Toxicological Information on Tordon Herbicides. Down to Earth, Spring : 6-8 (1985).

NOLAN, R. J. et alii. Pharmacokinetics of Picloram in Male Volunteers. Toxicology and Applied Pharmacology, 76 : 264-69 (1984).

REUBER, M. D. Carcinogenicity of Picloram. Journal of Toxicology and Environmental Health, 7 : 207-22 (1981).

STERLING, T. D. et ARUNDEL, A. V. Health Effects of Phenoxyherbicides. Scandinavian Journal of Work and Environmental Health, 12 : 161-173 (1986).

STOTT, W. T. et alii from THE DOW CHEMICAL COMPANY. Chronic Toxicity and Oncogenicity of Picloram in Fischer 344 Rats. Journal of Toxicology and Environmental Health, 30 : 91-104 (1990).

Endereço do autor:

Hamilton Leite Ribeiro.

Rua Professor Brandão n: 521 casa 8

Alto da Rua XV - Fone: (041)-262-4109

C.E.P.: 80.040-010

Curitiba - Paraná.