



MILENA RODRIGUES SOARES

EFEITOS NA ESFERA REPRODUTIVA DA EXPOSIÇÃO  
PROLONGADA A *Solanum lycocarpum* DURANTE A  
PUBERDADE DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

**Departamento:**  
Patologia

**Área de Concentração:**  
Patologia Experimental e Comparada

**Orientador:**  
Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo  
2005

**MILENA RODRIGUES SOARES**

EFEITOS NA ESFERA REPRODUTIVA DA EXPOSIÇÃO  
PROLONGADA A *Solanum lycocarpum* DURANTE A  
PUBERDADE DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

**Departamento:**

Patologia

**Área de Concentração:**

Patologia Experimental e Comparada

**Orientador:**

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo  
2005

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1537 FMVZ	<p>Soares, Milena Rodrigues</p> <p>Efeitos na esfera reprodutiva da exposição prolongada a <i>Solanum lycocarpum</i> durante a puberdade de ratos / Milena Rodrigues Soares. – São Paulo : M. R. Soares, 2005. 115 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2005.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental Experimental e Comparada.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Helenica de Souza Spinosa.</p> <p>1. <i>Solanum lycocarpum</i>. 2. Toxicologia em ratos. 3. Fitoestrógenos. 4. Puberdade. 5. Frutos verdes. I. Título.</p>
----------------	---




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
*Comissão Bioética*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos na esfera reprodutiva da exposição prolongada a *Solanum lycocarpum* durante a puberdade de ratos", Protocolo nº388/2003, utilizando 110 ratos, sob a responsabilidade da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helenice de Souza Spinosa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/11/2003.

(We certify that the Research "Reproductive effects of *Solanum lycocarpum* exposition during the puberty of rats" protocol number 388/2003, utilizing 110 rats, under the responsibility of Prof. Dr. Helenice de Souza Spinosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 11/26/2003, meeting.

São Paulo, 27 de novembro de 2003

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Julia Maria Matera  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: SOARES, Milena Rodrigues


Título: Efeitos na esfera reprodutiva da exposição prolongada a *Solanum lycocarpum* durante a puberdade de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

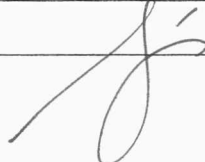
Data: 02 / 07 / 2005

### Banca Examinadora

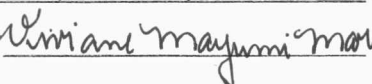
Prof. Dr: HELENICE DE S. SPINOSA Instituição: USP

Assinatura:  Julgamento: APROVADA

Prof. Dr: SILVANA LIMA GONÇALVES Instituição: USP

Assinatura:  Julgamento: APROVADA

Prof. Dr: VIVIANE MAYUMI MARUD Instituição: UFT

Assinatura:  Julgamento: aprovada

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com bolsa de mestrado concedida pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 03/03399-0.

“ O gênio consiste em um por cento de inspiração e noventa e nove por cento de transpiração”. (Thomas A. Edison)

## DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, pois, com seus ensinamentos e exemplos de vida, ajudaram integralmente na minha nova conquista. Pai e Mãe, as pessoas mais importante da minha vida, graças a vocês, sou o que sou, hoje escuto mais que falo, respeito todas as formas de vida e sei que tenho muito o que aprender e vou se Deus quiser; AMO MUITO VOCÊS. Agradecimento especial para o senhor Pai, OBRIGADA por permitir a continuidade da minha jornada profissional; com mais essa conquista, me sinto realizada e muito feliz, pois amo minha profissão.

Aos meus irmãos, meus grandes companheiros, meus melhores amigos; obrigada Xu pela amizade, compreensão e pela paciência ao me ajudar, mesmo quando atrapalho o seu trabalho; TE AMO. Ao Tielo, pelas broncas, pela amizade, pelo carinho e por incentivar a minha carreira; TE AMO.

No momento em que finalizo essa dissertação, em uma nova etapa da minha vida, longe de casa (a 3.300 Km de distância), longe dos meus pais e meus irmãos (as pessoas que mais amo nessa vida), Deus me enviou um “anjo”, um companheiro, um amigo, um amor, um grande amor, agora meu noivo, meu futuro marido. Marcio, obrigada pela ajuda na finalização desse trabalho e por tornar os meus dias mais felizes, mesmo longe da minha família que amo tanto; AMO VOCÊ.



## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Primeiramente a Deus e a Santa Rita de Cássia pela iluminação do meu caminho.

A professora Helenice Spinosa, minha segunda mãe; mãe é aquela que não escolhe seu filho ao nascer, mas sem os conhecer, ensina, guia, incentiva, exige, compreende, dá carinho e oferece uma amizade incomparável. Professora, durante quatro anos tive a oportunidade de aprender alguns dos seus grandes conhecimentos, agradeço pela sua criação científica.

A professora Maria Martha Bernardi, que durante a graduação acreditou no meu potencial; graças a sua ajuda, hoje conquisto o título de Mestrado. Professora, agradeço pelos conselhos, ajuda e amizade.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pela oportunidade recebida e por todo o auxílio oferecido.

A FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP; especialmente à Érika, agora ex-funcionária do Laboratório de dosagens Hormonais (LDH), obrigada pela ajuda nos experimentos e amizade; ao Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, por permitir as dosagens hormonais em seu laboratório.

Ao Paulo César e Éster do CEPTOX, pela amizade e grande ajuda na preparação da ração experimental.

Aos técnicos Priscila, Magali e Ricardo (Jibóia), do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pela ajuda nas realizações dos experimentos e amizade.

Ao Cláudio e Luciano, obrigada pela amizade e ajuda na preparação das lâminas de histopatologia.

Aos meus "irmãos científicos", Altamir, Evelise, Mônica, Andréia, Isis, Marcos, Breno que sempre tiveram presentes e sempre dispostos a me ajudar, obrigada por tudo.

A estagiária Camila, muito obrigada por ajudar na realização da dosagem bioquímica final.

Aos amigos Domênica, Aline, Augusto Santos; pessoas que me ajudaram muito nesse trabalho e que admiro, pois, enfrentaram com muita garra as dificuldades encontradas em suas vidas; serei sempre grata a vocês, estiveram ao meu lado em momentos de aflições e momentos de muita alegria, adoro vocês.

Ao Prof. Dr. Paulo Maiorka, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pelo carinho, amizade e inestimável colaboração no estudo histopatológico.

Ao Prof. Dr. Jorge Camilo Flório pela amizade e ajuda com as dosagens dos níveis cerebrais.

As secretárias do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Cristina, Cláudia e Silvia, pela gentileza, disposição e eficiência em nos servir.

A Cláudia, Veterinária responsável pelo biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, obrigada pelo atendimento e por fornecer todos os animais utilizados nesse experimento. Agradeço também, todos os funcionários do biotério, pois, o trabalho de vocês foi essencial para a realização desse trabalho.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, **MUITO OBRIGADA.**

## **SEJA SEMPRE VOCÊ**

Não espere um sorriso para ser gentil.

Não espere ser amado para amar.

Não espere ficar sozinho para reconhecer o valor de quem está ao seu lado.

Não espere ficar de luto, para reconhecer quem hoje é importante para você.

Não espere a queda para lembrar-se do conselho.

Não espere a enfermidade para reconhecer quão frágil é a vida.

Não espere ter dinheiro aos montes para então contribuir.

Não espere por pessoas perfeitas, para então se apaixonar.

Não espere a mágoa para pedir perdão.

Não espere a separação pra buscar a reconciliação.

Não espere elogios para acreditar em si mesmo.

Não espere a dor para acreditar em oração.

Não espere o dia de sua morte sem antes amar a vida!

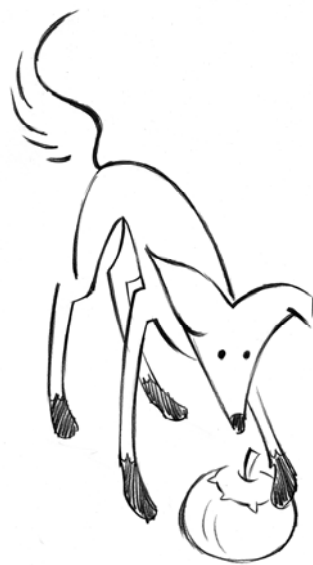
Seja sempre você, autêntico e único!

Anônimo

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT .....	2
LISTA DE FIGURAS .....	3
LISTA DE TABELAS .....	6
QUADRO.....	9
1.INTRODUÇÃO .....	10
2.OBJETIVOS .....	19
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. ANIMAIS .....	20
3.2. ADMINISTRAÇÃO DE <i>S. LYCOCARPUM</i> .....	20
3.3. EQUIPAMENTOS, APARELHOS E OUTROS .....	21
3.4. DROGAS E REAGENTES.....	23
3.5. KITS ANALÍTICOS.....	24
3.6. PROCEDIMENTO.....	25
3.6.1. Controle do ciclo estral .....	25
3.6.2. Ovariectomia das fêmeas.....	25
3.6.3. Comportamento sexual de ratos machos e fêmeas .....	26
3.6.4. Orientação sexual.....	30
3.6.5. Hemograma.....	32
3.6.6. Avaliação bioquímica do sangue.....	33
3.6.7. Dosagens hormonais.....	33
3.6.7.1. Metabólitos de hormônios sexuais .....	33
3.6.7.1.1. Processamento das amostras fecais.....	34
3.6.7.1.2. Dosagens dos metabólitos hormonais nas fezes .....	35
3.6.7.1.3. Validação.....	37
3.6.7.1.4. Cálculo das concentrações finais determinadas por RIE .....	40
3.6.7.2. Dosagens de hormônios T3 e T4 .....	40

3.6.7.2.1. Procedimento laboratorial.....	41
3.6.7.2.2. Validação.....	41
3.6.8. Coleta de material e estudo anatomopatológico .....	41
3.6.8.1. Avaliação morfométrica dos folículos ovarianos.....	42
3.7. Dosagens dos níveis cerebrais de DA, HVA, DOPAC, DHBA, VMA, 5-HT E 5-HIAA.....	42
3.7.1. Procedimentos para obtenção de amostras de homogenados cerebrais .....	43
3.7.2. Condições cromatográficas .....	43
3.7.3. Preparo das soluções padrões de monoaminas .....	44
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	45
4.1. AVALIAÇÃO DO PESO, CONSUMO DE ÁGUA E CONSUMO DE RAÇÃO .....	45
4.2. ANÁLISE DO PESO ÚMIDO, PESO RELATIVO E ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DE ÓRGÃOS.....	45
4.3. AVALIAÇÃO DA ORIENTAÇÃO SEXUAL E DO COMPORTAMENTO SEXUAL.....	46
4.4. AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SANGÜÍNEA .....	47
4.5. DOSAGEM DOS METABÓLITOS DE HORMÔNIOS SEXUAIS NAS FEZES E DE HORMÔNIOS TIREOIDEANOS NO SORO .....	47
4.6. DOSAGEM DOS NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES E SEUS METABÓLITOS NO HIPOTÁLAMO E ESTRIATO .....	47
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5. RESULTADOS .....	49
6. DISCUSSÃO .....	92
7. CONCLUSÕES .....	104
8. REFERÊNCIAS.....	106



**RESUMO**

## RESUMO

SOARES, M.R. **Efeitos na esfera reprodutiva da exposição prolongada a *Solanum lycocarpum* durante a puberdade de ratos.** [Effects on reproductive system of long-term exposition to *Solanum lycocarpum* during rats puberty]. 2005.115f. Dissertação (mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A *Solanum lycocarpum* é uma planta encontrada em quase todos os estados do Brasil, podendo ser ingerida por animais em idade fértil e em condições naturais. Os frutos desta planta possuem glicoalcalóides esteroidais com propriedades semelhantes aos esteróides. Neste estudo investigou-se os efeitos na esfera reprodutiva causados pela ingestão de *S. lycocarpum* durante a puberdade de ratos. Os frutos secos foram administrados na ração (10%) desde o desmame até a idade adulta (70 dias). Foram avaliados o peso corpóreo e de órgãos, o comportamento e a orientação sexual, os níveis de hormônios sexuais nas fezes, a bioquímica sérica, os níveis de neurotransmissores centrais e os achados anatomopatológico, tanto de ratos machos como de fêmeas. Observou-se os seguintes resultados: 1) Redução no peso corpóreo dos machos e das fêmeas; 2) Em machos, o peso relativo aumentou nos epidídimos, vesícula seminal e testículos; 3) Não houve diferenças no hemograma entre os grupos controle e experimental de ambos os sexos; 4) Alterações na bioquímica sangüínea sugerem leve toxicidade em células musculares e hepática; 5) Em fêmeas, não constatou-se nenhuma alteração no ciclo estral e no comportamento sexual; enquanto nos machos houve melhora do comportamento sexual e 6) Os níveis de neurotransmissores do estriado foi modificado mas não os do hipotálamo. Esses achados indicam que a exposição a *S. lycocarpum* durante a puberdade prejudicou parâmetros da esfera reprodutiva, em particular, dos machos.

Palavras-chave: *Solanum lycocarpum*, toxicologia em ratos, fitoestrógenos, puberdade, frutos verdes





**ABSTRACT**

## **ABSTRACT**

SOARES, M.R. **Effects on reproductive system of long-term exposition to *Solanum lycocarpum* during rats puberty.** [Efeitos na esfera reprodutiva da exposição prolongada a *Solanum lycocarpum* durante a puberdade de ratos]. 2005.115f. Dissertação (mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

*Solanum lycocarpum* St. Hil, a toxic plant common in almost all states of Brazil, may be consumed by animals in fertile age and in natural condition. The fruits of this plant contain steroidal glycoalkaloids with steroid-like properties. Presently the reproductive effects of *S. lycocarpum* fruit ingestion during puberty were investigated. The dried fruits were administered in the diet (10%) from the weaning up to adult age (70 days). The body and organs weights, sexual behavior as well as sexual orientation, the feces hormonal levels, hemogram and biochemical blood evaluations, hypothalamic and striatal neurotransmitter levels, and anatomopathological studies of male and female rats were performed. The results showed: 1) a reduced body weight in male and female; 2) in male, an increased epididymis, seminal vesicle and testis relative weights; 3) no differences of controls and experimental groups of both sex in the hemogram; 4) blood biochemical alterations meaning slight toxicity in muscular and hepatic cells; 5) in female, no interference was detected in estrous cycle and sexual behavior; an improvement of male sexual behavior was observed; 6) that striatal neurotransmitter levels were modified but not in the hypothalamus. These results indicate that exposure to *S. lycocarpum* during puberty prejudiced the reproductive system, particularly in male rats.

Key words: *Solanum lycocarpum*, toxicology in rats, phytoestrogens, puberty, immature fruits.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fruto da *Solanum lycocarpum*. ..... 11
- Figura 2. Desenho esquemático da caixa para observação do comportamento sexual. .... 27
- Figura 3. Desenho esquemático do aparelho empregado para avaliação da orientação sexual. .... 31
- Figura 4. Fotografia ilustrativa da arena circular utilizada para a avaliação da orientação sexual dos ratos machos. .... 32
- Figura 5. Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para os metabólitos de estradiol nas fezes. São Paulo, 2004. .... 38
- Figura 6. Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para os metabólitos de progesterona nas fezes. São Paulo, 2004. .... 39
- Figura 7. Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para os metabólitos de testosterona nas fezes. São Paulo, 2004. .... 39
- Figura 8. Peso corpóreo (g) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \*  $p < 0,05$ , teste t. .... 51
- Figura 9. Peso corpóreo (g) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão;  $p < 0,05^*$  e  $p < 0,01^{**}$ , teste t. .... 54
- Figura 10. Consumo de ração (g) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \*  $p < 0,05$  e  $p < 0,01^{**}$ , teste t. .... 57
- Figura 11. Consumo de ração (g) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*  $p < 0,05$  e  $p < 0,01^{**}$ , teste t. .... 59
- Figura 12. Consumo de água (ml) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*  $p < 0,05$  e  $p < 0,01^{**}$ , teste t. .... 62

- Figura 13. Consumo de água (ml) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t. .... 65
- Figura 14. Peso (g) do órgão e peso relativo (peso do órgão ÷ peso corpóreo x 100) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* p<0,05, teste t..... 67
- Figura 15. Peso (g) do órgão e peso relativo (peso do órgão ÷ peso corpóreo x 100) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*p<0,05 e \*\*p<0,01, teste t..... 70
- Figura 16. Níveis séricos de Triglicerídeos (mg/dl) de fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*\*p<0,01 teste t. .... 75
- Figura 17. Níveis séricos de Albumina (g/dl), AST (U/L), Proteínas Totais (g/dl) e Triglicerídeos de machos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*p<0,05 e \*\*p<0,01, teste t. .... 76
- Figura 18. Comportamento sexual, avaliado pelo número de lordoses, em ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; p>0,05, teste t..... 78
- Figura 19. Níveis séricos dos hormônios tireoideanos T3 (triiodotironina - ng/ml) de ratos machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão. p>0,05, teste t..... 83
- Figura 20. Níveis séricos dos hormônios tireoideanos T4 (tiroxina - µg/ml) de ratos machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão. p>0,05, teste t..... 84

- Figura 21. Níveis estriatais (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , teste t. .... 86
- Figura 22. Níveis estriatais (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em machos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , teste t. .... 87
- Figura 23. Níveis hipotalâmicos (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em ratos fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , teste t. .... 89
- Figura 24. Níveis hipotalâmicos (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em ratos machos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , teste t. .... 90
- Figura 25. Fotomicrografia dos ovários de fêmeas adultas controle (A) e experimental (B) mostrando cisto folicular com aumento do colóide (HE, 10x). .... 91

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Peso corpóreo (g) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \*  $p < 0,05$ , teste t. .... 49
- Tabela 2. Peso corpóreo (g) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , teste t. .... 52
- Tabela 3. Consumo de ração (g) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , teste t. .... 55
- Tabela 4. Consumo de ração (g) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , teste t. ... 58
- Tabela 5. Consumo de água (ml) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , teste t. .... 60
- Tabela 6. Consumo de água (ml) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , teste t. .... 63
- Tabela 7. Peso (g) do órgão e peso relativo (peso do órgão  $\square$  peso corpóreo  $\times 100$ ) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* (E) a 10% ou apenas ração (C). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*  $p < 0,05$ , teste t. .... 66
- Tabela 8. Peso (g) do órgão e peso relativo (peso do órgão  $\square$  peso corpóreo  $\times 100$ ) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ) ração contendo *Solanum lycocarpum* (E) a 10% ou apenas ração (C). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , teste t. .... 69
- Tabela 9. Valores das médias e erros-padrão da contagem total de hemácias, de leucócitos, da concentração de hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da

concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o hematócrito (HCT) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle).  $p > 0,05$ , teste t. .... 71

Tabela 10. Valores das médias e erros-padrão da contagem total de hemácias, de leucócitos, da concentração de hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o hematócrito (HCT) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). \*  $p < 0,05$ , teste t. .... 72

Tabela 11. Níveis séricos de albumina (g/dl); ALT (alanina amino transferase -U/L); AST (aspartato amino transferase - U/L); colesterol (mg/dl); creatinina (mg/dl); glicose (mg/dl); proteínas totais (g/dl) e triglicérides (mg/dl) de ratos machos e fêmeas, que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ , teste t. .... 74

Tabela 12. Número de dias em cada fase do ciclo estral e intervalo entre ciclos, avaliados durante 15 dias, em ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão;  $p > 0,05$ , teste t. .... 77

Tabela 13. Comportamento sexual de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão;  $p < 0,05$  teste t. .... 79

Tabela 14. Orientação sexual de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e respectivos erros padrão do tempo (s) de permanência em cada área da caixa de observação;  $p > 0,05$ , teste t. .... 80

Tabela 15. Concentração média dos metabólitos de estrógeno, progesterona e testosterona fecais (ng/g de fezes) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* $p < 0,05$ , teste t. .... 81

Tabela 16. Concentração média dos metabólitos de estrógeno, progesterona e testosterona fecais (ng/g de fezes secas) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração

contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* $p < 0.05$ , teste t.  
..... 82

Tabela 17. Níveis séricos dos hormônios tireoideanos T3 (triiodotironina - ng/ml) e T4 (tiroxina -  $\mu\text{g/ml}$ ) de ratos machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão.  $P > 0,05$ , teste t.  
..... 83

Tabela 18. Níveis estriatais (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , teste t..... 85

Tabela 19. Níveis hipotalâmicos (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.  $P > 0,05$ , teste t..... 88

Tabela 20. Avaliação morfométrica dos folículos ovarianos ( $\mu\text{mm}$ ) de fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão (n=05/grupo).  $p > 0,05$ , teste t..... 91



## QUADRO

Quadro 1. Parâmetros de controle de qualidade analisados nos kits de hormônios tireoideanos e sexuais.....	36
--	----



## INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

A *Solanum lycocarpum* St. Hil (do grego “lycos” = lobo e “karpos” = fruto), pois os frutos são apreciados pelo lobo-guará (Figura 1), *Chrysocyon brachyurus* – KISSMANN e DORIS, 1995) é uma planta nativa no Brasil, da família *Solanaceae*, conhecida vulgarmente por fruta-do-lobo, lobeira, capoeira-branca, beringela, jurubebão, baba-de-boi, jurubeba de boi, entre outras denominações. Esta planta costuma ser confundida com a *Solanum grandiflorum* Ruiz et Pav., que possui flores maiores e frutos menores, além das características apresentadas por suas quatro variedades (para detalhes, ver KISSMANN e DORIS, 1995)

A *S. lycocarpum* tem ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Amazonas e Pará (LORENZI, 1991; KISSMANN e DORIS, 1995). É uma planta perene, arbustiva ou arbórea, medindo de 2,0 a 3,5 metros de altura, com ramos tortuosos e formações espinhosas. Suas folhas são pecioladas, alternadas, sinuosas, com acúleos amarelo-avermelhados e levemente curvos na nervura mediana central, as flores são violáceas de corola rotada, dispostas laterais e subterminais. Produz frutos, bagas globosas de 8 a 15 centímetros de diâmetro. A reprodução é realizada pelas sementes, que são numerosas, achatadas e reniformes (SCAVONE e PANIZZA, 1981; LORENZI, 1991; KISSMANN e DORIS, 1995).



Figura 1. Fruto da *Solanum lycocarpum*.

Esta planta é muito freqüente em pastagens ocorrendo também em beira de estradas e terrenos baldios, tendo preferência por solos arenosos. Floresce mais intensamente durante os meses de maio a julho. Os frutos são comestíveis, sendo usado no preparo de doces, que tem sabor e aspecto semelhante à goiabada (CRUZ, 1985).

Em medicina popular, atribui-se a esta planta propriedades terapêuticas (CRUZ, 1985; LORENZI, 1991; DALL'AGNOL e VON POSER, 2000). As folhas são recomendadas para o tratamento da epilepsia, espasmos, dor renal e abdominal. As flores são empregadas para o tratamento de hemorróidas e a preparação de um xarope caseiro para resfriados e como expectorante. As raízes são usadas na hepatite. Os frutos são empregados para o controle da diabetes e obesidade e, topicamente, assados e quentes teriam efeito benéfico quando colocado sobre partes atrofiadas restaurando o estado normal do tecido, além de ser usado para mordedura de cobras. Uma preparação medicinal feita com os frutos verdes em solução aquosa que é filtrada e seca obtendo-se o polvilho-de-lobeira, é comercializada em cápsulas como fitoterápico no Brasil e em outros países, sendo recomendada para o controle da diabetes, obesidade e para baixar os níveis de colesterol (DALL'AGNOL e VON POSER, 2000).

Em recente trabalho, foram apresentados resultados que negam a produção de um efeito hipoglicêmico associado com a fração de polissacarídeos da *Solanum lycocarpum* em ratos normais ou hipoglicêmicos (OLIVEIRA et al., 2003).

A família *Solanaceae*, além do gênero *Solanum* (do qual faz parte também a batata, berinjela, jiló), possui outros 84 gêneros com mais de mil espécies. Em particular, várias espécies do gênero *Solanum*, inclusive a batata (*S. tuberosum* L.) podem ser tóxicas. Os efeitos tóxicos parecem ser, em parte, resultado da ação de alcalóides esteroidais, como a solanina e a solanidina. Estes alcalóides, em sua forma natural, não são bem absorvidos, porém após a ingestão sofrem hidrólise no trato gastrointestinal, dando origem à “alcaminas” que são absorvidas e produzem efeitos tóxicos (NISHIE et al., 1971; BRUNETON, 2001).

Os sinais de toxicidade por glicoalcalóides em animais e humanos incluem cólicas no abdômen e no estômago, gastroenterites, diarreia, vômitos, sensação de queimação nos lábios e na boca, pele quente, febre, pulso rápido e cefaléia (VAN GELDER, 1990). A toxicidade destes glicoalcalóides pode ser causada por efeitos adversos, tais como: indução da ornitina descarboxilase hepática, uma enzima marcadora da proliferação celular (CALDWELL et al., 1991); rompimento das membranas celulares afetando o sistema digestivo (BLANKEMEYER et al., 1992; RODDICK et al., 1992) e efeitos anticolinesterásicos no Sistema Nervoso Central (RODDICK, 1989). Há inclusive trabalhos mostrando que a solanina possui efeito inibidor da colinesterase *in vitro* (ORGELL, 1963; HAYES e CAMPBELL, 1986; BRUNETON, 2001). Estudos recentes utilizando solamargina purificada da planta chinesa *S. incanum* dão conta de que esta substância é citotóxica provavelmente por aumentar a expressão gênica de receptores TNF (Fator

de Necrose Tumoral) tipo I, que tem sido envolvidos na apoptose (morte celular programada) (HSU et al., 1996).

Há vários relatos a respeito de intoxicações provocadas pela presença de glicoalcalóides como a solanina em batatas (principalmente nas partes aéreas, tubérculos verdes, germinados ou apodrecidos), causando no homem e em animais sintomatologia que envolve distúrbios gastrointestinais (necrose gástrica e intestinal), desordens de natureza neurológica como esturpor, depressão do Sistema Nervoso Central e morte por parada respiratória (NISHIE et al.; 1971, MATOS, 1989; BRUNETON, 2001).

Assim como outras plantas do gênero *Solanum*, a *S. lycocarpum* também possui glicoalcalóides esteroidais, que foram caracterizados como sendo a solamargina e a solasonina, cuja aglicona corresponde ao composto solasodina (MOTIDOME et al., 1970), e de onde um 3 $\beta$ -acetoxipregno-5,16-dien-20-ona é obtido (HARAGUCHI et al., 1978), assim como um alcalóide com configuração estereoespecífica para a síntese de hormônios esteróides (KERBER et al., 1993).

Há alguns estudos mostrando os efeitos da *S. lycocarpum* na reprodução, porém empregando-se uma solução aquosa do polvilho do fruto. Assim, SÁ et al. (2000), administrando a suspensão aquosa do polvilho por 5 dias a ratos e camundongos, não observaram nenhuma alteração no peso dos órgãos sexuais e na concentração de esperma dos machos tratados, exceto redução do peso da próstata de camundongos; estes autores concluíram que neste protocolo empregado, a planta não produziu toxicidade no sistema reprodutor dos machos. Este trabalho acima citado

empregou o polvilho-de-lobeira, uma preparação de uso humano como fitoterápico, visando aprofundar os conhecimentos dos efeitos desta planta em medicina humana, avaliando-se o seu potencial tóxico sobre a reprodução de mamíferos.

Recentemente, em nossos laboratórios foram realizados experimentos com os frutos da *S. lycocarpum* administrados a ratos durante o período perinatal. Optou-se por usar os frutos da planta, uma vez estes são freqüentes em pastagens, podendo ser ingeridos, em condições naturais, por animais de produção em idade fértil, fato que poderia causar transtornos na esfera reprodutiva destes animais e os roedores poderiam ser modelos experimentais para este tipo de avaliação. Assim, MARUO et al. (2003a), num primeiro estudo, empregando ratos machos tratados por 60 dias e fêmeas tratadas por 37 dias com ração contendo 3% de frutos verdes e moídos, observaram poucas alterações, entre elas redução do peso do útero e fígado de fêmeas, que se mostraram mais susceptíveis que machos. Num segundo estudo, ratas prenhes foram tratadas com ração contendo 3% de frutos verdes moídos durante a pré-implantação (dia 1 ao dia 6 da gestação) ou organogênese (dia 6 ao dia 16 da gestação), sendo observados leves efeitos tóxicos, entre eles menor peso da placenta na mães tratadas durante a organogênese, hemorragia no bulbo olfatório de fetos expostos durante a pré-implantação e anormalidades ósseas aumentadas em fetos expostos durante a organogênese (MARUO et al., 2003b).



SOARES et al. (2002), num experimento no qual os frutos da *S. lycocarpum* foram administrados a 10% na ração de ratos durante os períodos de pré-implantação (D1 – D5) e organogênese (D5 – D15), mostraram que nesta concentração a planta causou leve toxicidade materna e efeitos teratogênicos na prole, principalmente quando exposta durante o período de organogênese.

O período de pré-implantação é aquele que se inicia a partir da fertilização (penetração do ovócito pelo gameta masculino); o zigoto começa a segmentar-se e a migrar através da tuba uterina até atingir o útero, onde se implantará. O tempo de transporte do pré-embrião pelo oviduto é, em média, de 3 a 4 dias para a maioria das espécies. A migração do pré-embrião pelo oviduto e sua transferência para o útero é um processo que depende da contratilidade das fibras musculares lisas, além das células secretoras e ciliadas do oviduto. Depende também de uma intensa interação embrião-mãe, um “diálogo” mediado por hormônios, substâncias parácrinas e outros, que permite uma coordenação perfeita entre o amadurecimento do concepto e condições ideais do ambiente que lhe assegurem, ao chegar ao útero, a perfeita sincronização que determina a sua implantação e posterior desenvolvimento (organogênese) (GUERRA e PETERS, 1999). Os hormônios têm importância no transporte de pré-embriões. Em ratos, o estrogênio acelera o transporte, enquanto a progesterona retarda. Na rata, se o blastocisto não chegar ao útero em fase de desenvolvimento adequado ocorre a sua expulsão. Nesta espécie o pré-embrião em fase de pré-

implantação produz alguma forma de sinalização que faz com que seu transporte para o útero seja feito na ocasião precisa.

Depois do nascimento, a secreção de andrógenos pelas células de Leydig nos fetos se encontra inativa (PLANETA e MARIN, 2002). Nos mamíferos, nesse ponto segue um período em que as gônadas de ambos sexos permanecem inativas, até a ativação pelas gonadotropinas originadas da hipófise para produzir, pouco a pouco, o final da maturação do sistema reprodutivo. A puberdade, exatamente definida, é o período em que a função endócrina e gametogênica das gônadas sofrem o primeiro desenvolvimento para o ponto onde a reprodução é possível. A puberdade inicia-se quando o cérebro começa a secretar o hormônio GnRH (hormônio estimulante das gonadotrofinas). O GnRH estimula a hipófise que libera as gonadotrofinas; assim estimulando a esteroidogênese das gônadas, que causa a maturação sexual. A velocidade em que o cérebro libera GnRH é crucial para o desenvolvimento sexual. Sabe-se que a exposição a hormônios gonadais neste período pode alterar o curso do processo da puberdade.

A primeira ovulação das ratas ocorre aos 35 a 45 dias após o nascimento. Nos machos os primeiros espermatozóides são observados no lúmen dos túbulos seminíferos aos 45 dias de idade, e eles alcançam o ducto deferente 13 a 14 dias depois. A descida do testículo ocorre depois de 15 dias. Externamente, a progressão da puberdade em ratos machos pode ser observada pelo crescimento do testículo e, mais precisamente definida, pela separação do prepúcio da glândula, conhecida como separação balano-prepucial. Em fêmeas o sinal da puberdade ocorre somente pela

canalização da vagina (abertura vaginal), que indica a estimulação estrogênica. A abertura vaginal usualmente ocorre um dia depois da 1º onda pré-ovulatória de gonadotrofinas no local (KNOBIL e NEILL, 1994).

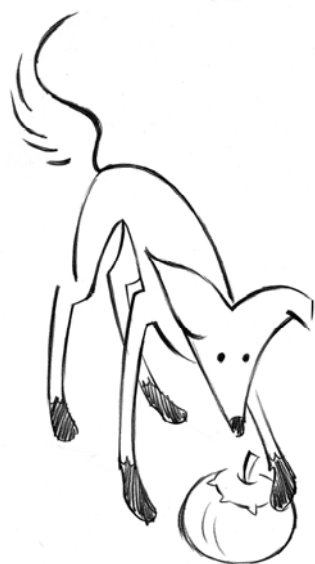
Assim, considerando que a *Solanum lycocarpum* contém alcalóides esteroidais e que o período da puberdade é particularmente sensível a hormônios sexuais, escolheu-se, no presente estudo, este período para avaliar as conseqüências da exposição à planta na maturação sexual de ratos e as possíveis conseqüências tardias na esfera sexual destes animais.



**OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

Estudar os efeitos na esfera reprodutiva causados pela ingestão dos frutos de *S. lycocarpum* a 10% na ração, durante 21º ao 70º dias de vida, avaliando-se o comportamento e a orientação sexuais, os níveis de hormônios sexuais nas fezes, a bioquímica sérica e os achados anatomopatológico, tanto de ratos machos como de fêmeas.



## **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos (machos e fêmeas com 21 dias de vida) Wistar de mesma linhagem, obtidos em nossos biotérios através de cruzamentos sucessivos. Os animais foram alojados, em grupos de cinco, em gaiolas plásticas com tampas metálicas, medindo 40 x 50 x 20 cm. Todas as gaiolas foram mantidas em sala com temperatura controlada por meio de aparelhos de ar condicionado ( $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) e com ciclo de doze horas de claro e escuro, sendo a luz acesa às 6:00 horas. Os experimentos de observação do comportamento sexual e orientação sexual foram conduzidos em sala com o ciclo de luz parcialmente invertido (luz acesa às 12:00hs).

Água e comida foram fornecidas *ad libitum* aos animais durante todo o procedimento experimental.

#### 3.2. ADMINISTRAÇÃO DE *S. lycocarpum*

Os frutos verdes da *S. lycocarpum* foram coletados na cidade de Itajubá, sul do estado de Minas Gerais. A identificação foi feita pelo Prof. Dr. João Rubens Pirani, do Instituto de Botânica da USP e o exemplar foi depositado no Herbarium HSF do Instituto de Botânica da USP (01 Schwarz).

Os frutos verdes foram picados, pesados (balança BG 4000g – Gehaka) e encaminhados ao Departamento de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, onde foram dessecados em estufa a  $50^{\circ}\text{C}$  (SOC. FABRE Ltda.). Após a retirada de toda a umidade existente no fruto, os frutos secos foram encaminhados ao Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX) localizado no campus de

Pirassununga da USP, onde os frutos secos foram moídos com auxílio do desintegrador (Nogueira Ltda.) e adicionados à ração moída na proporção de 10% (Balança Toledo - capacidade para 3 Kg). Após a homogeneização, a mistura foi peletizada (peletizadora marca Rosim), devidamente empacotada em sacos de papel fechados e encaminhados ao Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP.

A ração peletizada contendo 10% do fruto foi oferecida a partir do 21º ao 70º dia de vida dos machos e fêmeas. Os animais controle receberam apenas a ração durante o mesmo período.

### 3.3. EQUIPAMENTOS, APARELHOS E OUTROS

- Aparelho para avaliação da orientação sexual: consiste de uma arena branca de madeira (94 cm de diâmetro) circundada por parede metálica também branca de 14,5 cm de altura, elevada 60 cm do solo. O chão da arena é dividido, por segmentos de reta, em 32 partes aproximadamente iguais (traçados com tinta preta). Acoplado à arena, em posições dialmetralmente opostas, encontram-se dois compartimentos de madeira fechados (25 × 25 × 14,5 cm) com parede frontal à arena feita de arame, denominados de caixa incentivo;
- Balança BG – Gehaka 4.000 g;
- Balança Nohaus LS 2.000 g;
- Balança Nohaus LS 200 g;



- Balança semi-analítica Acculab V 1-ng, capacidade 120 g;
- Balança Toledo – capacidade 3 Kg;
- Banho-maria Quimis®;
- Bomba hidráulica KDT®;
- Caixa de madeira cinza medindo 56 × 35 × 31 cm com tampa de madeira móvel em sua parte superior e parede frontal de vidro para avaliação do comportamento sexual;
- Caneta sonicadora LAB LINE® Instruments;
- Capilares de vidro;
- Centrífuga FANEM 206 MP;
- Centrífuga Sorval RCZ-B®;
- Contador gama (RIE) – Cobra Auto-Gamma Packard;
- Desintegrador Nogueira;
- Equipamento de ar comprimido Láctea Ltda;
- Estufa SOC. FABBE Ltda;
- Gaze de algodão;
- HPLC-ED Shimadzu® Modelo 6 A;
- Lâminas de vidro;
- Microscópio óptico de contraste de fase Nikon®;
- Tubo tipo eppendorf de 1,5 ml;
- Papel de filtro;
- Peletizadora Rosim Ltda;
- Pipeta automática 200 µl Finpippete®;

- Pipeta automática 1000 µl Finpippete®;
- Ponteiros descartáveis para pipetas de 200 e 1000 µl;
- Vórtex manual Muti-tube VX 2500.

### 3.4. DROGAS E REAGENTES

- Ácido acético glacial (Merck);
- Ácido diaminoetilenotetracético dissódico (EDTA - Merck);
- Ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC - Sigma);
- Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA - Sigma);
- Ácido heptanossulfônico (Merck);
- Ácido homovanílico (HVA - Sigma);
- Ácido perclórico (HClO<sub>4</sub> - Merck);
- Água ultra pura Milli-Q (Millipore);
- Álcool iodado (2:1);
- 17-β-estradiol (Sigma);
- Etanol comercial 93,6°GL (Archote);
- Etanol p.a. (Merck);
- Cloridrato de dopamina (DA - Sigma);
- Bitartarato de noradrenalina (NOR - Sigma);
- Cetamina (Dopalen® - Agribrands);
- Cloridrato de serotonina (5-HT - Sigma);
- Metabissulfito de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - Merck);
- Metanol absoluto (Synth);
- Metanol p.a. (Merck);

- Óleo de amêndoas doce (Musa);
- Óxido de alumínio ativado (alumina - Merck);
- Progesterona (Sigma);
- Solução de cloreto de sódio (NaCl - Dinâmica) 0,9%;
- Tampão gelatina (PBS): Fosfato de sódio dibásico (12 H<sub>2</sub>O - Merck),  
Fosfato de sódio monobásico (1 H<sub>2</sub>O - Merck),  
Azida de sódio (Merck),  
Cloreto de sódio (Merck),  
Gelatina 4070 (Merck)
- Tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O - Merck);
- Xilazina (Rompum® - Bayer).

### 3.5. KITS ANALÍTICOS

- Kit comercial DPC – Diagnostic Products Incorporation para detecção de β-estradiol Coat-a-Count por radioimunoensaio;
- Kit comercial DPC - Diagnostic Products Incorporation para detecção de progesterona Coat-a-Count por radioimunoensaio;
- Kit comercial DPC - Diagnostic Products Incorporation para detecção de testosterona Coat-a-Count por radioimunoensaio;
- Kit comercial DPC - Diagnostic Products Incorporation para detecção de triiodotironina (T4) Coat-a-Count por radioimunoensaio;

- Kit comercial DPC - Diagnostic Products Incorporation para detecção de tiroxina (T3) Coat-a-Count por radioimunoensaio;

### 3.6. PROCEDIMENTO

#### 3.6.1. CONTROLE DO CICLO ESTRAL

O ciclo estral foi acompanhado fazendo-se observações microscópicas diárias do lavado vaginal, nos últimos 15 dias de tratamento. Os lavados foram realizados sempre pela manhã, sendo obtidos pela introdução e aspiração de solução de NaCl 0,9% (0,5 ml) na vagina, com o auxílio de uma pipeta automática com ponteiros plásticos descartáveis. O lavado obtido foi colocado em lâminas de vidro para observação em microscópio óptico. Foi considerado indicativo da fase de diestro a existência de grande quantidade de leucócitos, com ou sem a presença de muco, no material examinado; o proestro foi indicado pelo achado de muitas células epiteliais nucleadas; a presença de muitas células queratinizadas indicou a fase de estro; e, finalmente, a predominância de células queratinizadas e de leucócitos no esfregaço, foi tomada como indicativo do metaestro.

#### 3.6.2. OVARIECTOMIA DAS FÊMEAS

Este procedimento foi realizado para a obtenção de ratas iscas (sexualmente maduras que não passaram por nenhum tipo de procedimento experimental) necessárias para a avaliação do comportamento sexual de ratos machos.

Os animais foram previamente anestesiados (0,1 ml/100 g de peso vivo de xilazina + 0,1 ml/100 g de peso vivo de cetamina, pela via intraperitoneal), A seguir, foi feita a tricotomia da região lombar-bilateral (flanco), utilizando-se uma lâmina de barbear. Posteriormente, foi realizada a antissepsia do local com álcool iodado, incisão da pele e musculatura, seguida a exposição dos ovários. Nestes, ainda intactos, fez-se sutura dos ligamentos meso-ovarianos com fio de sutura do tipo algodão 2-0 e, só depois de devidamente suturado, fez-se a extração dos mesmos com bisturi. Por fim, após aproximação da musculatura e pele através de pontos simples e separados, as fêmeas foram mantidas em local aquecido por pelo menos três horas e, em seguida, encaminhadas à sala de ciclo de luz invertido do biotério, onde permaneceram alojadas. Após 21 dias da cirurgia, período necessário para a total eliminação dos hormônios sexuais e de seus metabólitos (FELÍCIO et al., 1989), as ratas já se encontravam aptas para a realização dos testes.

### 3.6.3. COMPORTAMENTO SEXUAL DE RATOS MACHOS E FÊMEAS

Os animais foram alojados em salas com o ciclo de luz parcialmente invertido (por 3 semanas) antes do experimento, este período é suficiente para a adaptação dos animais a um novo regime de iluminação, sendo a luz desligada às 10:00 hs e as observações realizadas entre 14:00 e 18:00 hs. Durante as sessões de observação do comportamento sexual a sala foi iluminada com duas lâmpadas infravermelhas de 20 Watts cada.

O comportamento sexual foi avaliado baseado nos métodos descritos por HART e LEEDY (1985) e AHLENIUS e LARSSON (1984). Para tanto foi utilizada uma caixa de madeira (Figura 2) para observação do comportamento sexual, medindo 56 x 35 x 31 cm, pintada de cinza, provida na sua parte superior de tampa móvel e parede frontal de vidro. Uma camada de maravalhas no interior da mesma serve de cama para os animais.

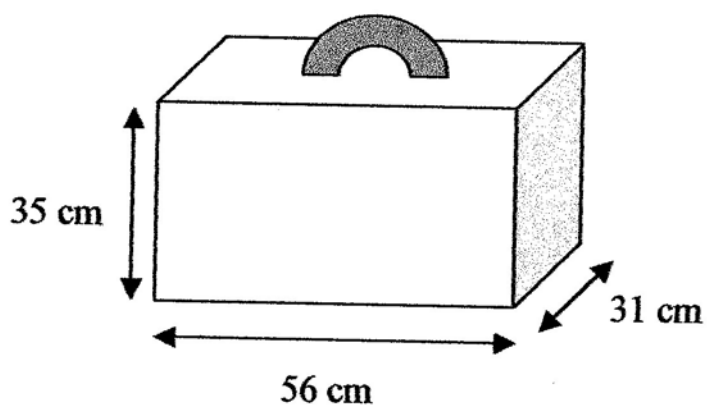


Figura 2. Desenho esquemático da caixa para observação do comportamento sexual.

### **Em fêmeas**

As ratas foram previamente alojadas em gaiolas na sala com o ciclo de claro-escuro parcialmente invertido. Antes do pareamento com o macho, o ciclo estral foi acompanhado fazendo-se observações microscópicas diárias do lavado vaginal e quando confirmado o estro foi realizado o teste. Para as observações comportamentais, cada fêmea foi colocada individualmente na caixa de observação com um macho sexualmente ativo

(isto é, que já se acasalou com outras fêmeas), permitindo-se a realização de dez montas. Foi anotado, então, em cada uma, a presença ou não de lordose. Define-se lordose como o ato da fêmea curvar para baixo o dorso, ao mesmo tempo em que a cauda se ergue expondo, assim, a genitália. Com esses dados, calculou-se para cada rata, o coeficiente de lordose (CL), como especificado abaixo:

$$CL = \frac{\text{número de lordoses}}{\text{número de montas}} \times 100$$

### **Em machos**

Para o estudo do comportamento sexual de machos, foram utilizadas fêmeas especialmente preparadas para cada pareamento, denominadas ratas iscas. Estas ratas foram previamente ovariectomizadas (item 3.3.2) e alojadas na sala com ciclo de claro-escuro parcialmente invertido; após três semanas da castração foram tratadas com 50  $\mu$ /kg de 17- $\beta$ -estradiol e 2 mg/kg de progesterona, 54 e 6 horas, respectivamente, antes do início dos testes. Cada rato a ser estudado foi colocado individualmente na caixa de observação cinco minutos antes da rata preparada para o pareamento, para adapta-se a esta nova situação. A seguir, a fêmea foi introduzida na caixa de observação, registrando-se os seguintes parâmetros:

- presença ou não de monta nos dez minutos subsequentes; os animais que não apresentaram monta neste período foram retirados do experimento;
- presença ou não de ejaculação nos quarenta minutos subsequentes;

- latência para a primeira monta;
- latência para a primeira intromissão. Infere-se a ocorrência da intromissão peniana através da presença conjunta dos seguintes sinais: monta com duração superior a dois segundos, lordose da fêmea e limpeza genital do rato após a monta;
- latência para a ejaculação. A ejaculação foi caracterizada pela ocorrência de monta e intromissão, seguidas pelo levantar do tronco do macho e imobilidade por alguns segundos;
- número de montas incompletas (sem intromissão) até a ejaculação;
- número de intromissões até a ejaculação;
- número total de montas (montas incompletas + intromissões);
- latência para a primeira monta pós-ejaculação;
- número de ejaculações após a primeira intromissão observado por um período de trinta minutos.

A partir destes parâmetros pode-se obter os seguintes dados:

- N.º total de montas = n.º de montas + n.º de intromissões;
- Freqüência de intromissões por minuto = número de intromissões ÷ latência para ejaculação;
- Freqüência de montas por minuto = número de intromissões ÷ tempo entre a 1ª monta e a ejaculação;
- Eficiência ou taxa copulatória = número de intromissões ÷ total de montas (número de montas incompletas + número de intromissões) x 100;
- Índice de atividade sexual (IAS) foi calculado da seguinte forma:



$$IAS = \log (1/LM \times 15) + \log (1/LI \times 15) + \log (1/LE \times 15) + \sqrt{(NM + NI)} + Y$$

Onde: LM = latência para 1ª monta;

LI = latência para 1ª intromissão;

LE = latência para ejaculação;

NM = n.º total de montas;

NI = n.º total de intromissões;

Y = 4 se o animal ejacular e 0 se o animal não ejacular.

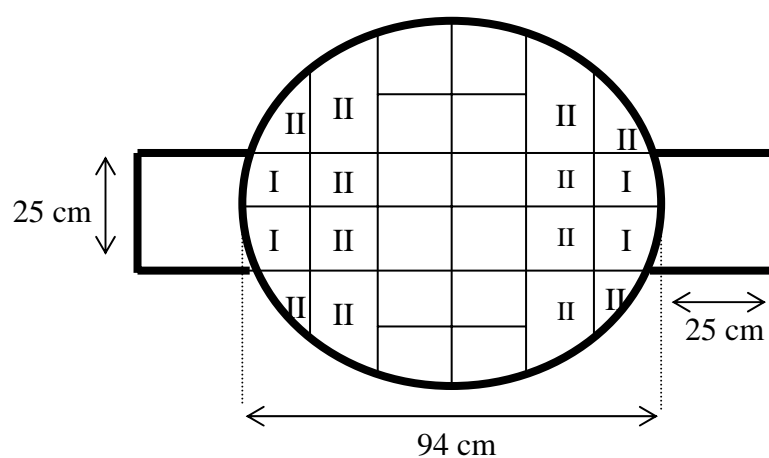
#### 3.6.4. ORIENTAÇÃO SEXUAL

Foram utilizados para o teste dois ratos iscas, sendo um rato macho e uma rata fêmea previamente castrada (3 semanas antes) e com cio induzido por manipulação hormonal, como acima citado.

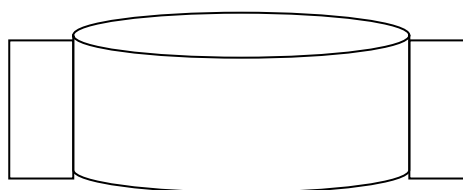
Três semanas antes do início do teste, os ratos machos a serem avaliados bem como os ratos iscas (machos e fêmeas) foram colocados na sala de ciclo de luz invertido. Este teste foi executado 3 horas após o término de período de luz do ciclo invertido.

Foi utilizada uma arena circular de madeira com diâmetro de 94 cm, que é circundada por uma parede metálica de 14,5 cm de altura. Acoplado a arena, existem 2 compartimentos localizados nas extremidades laterais diametralmente opostas, denominados de caixas incentivos, medindo 25 x 25 x 14,5 cm. Estas caixas alojam, respectivamente, um macho isca e uma fêmea isca; são isoladas da arena por uma tela de arame e ficam fechadas por uma placa de acrílico removível. O chão da arena é dividido, por segmentos de reta, em 32 partes aproximadamente iguais: as duas partes

próximas tanto da caixa incentivo do macho quanto da fêmea são denominadas de área I do macho ou da fêmea; as 6 partes subsequentes são pintadas de cinza e são denominadas de área II; e finalmente as 16 partes localizadas na região central da arena são denominadas de área indiferente (Figura 3 e 4).



Vista de cima



Vista lateral

Figura 3. Desenho esquemático do aparelho empregado para avaliação da orientação sexual.

Foram colocados nas respectivas caixas incentivo um rato macho isca e uma fêmea isca com cio induzido, sendo mantidas as placas de acrílico que separam este compartimento da arena de teste. A seguir, o rato a ser avaliado foi colocado na arena por um período de 5 minutos para a exploração do território (período de habituação), antes do início do teste. Após este período, o animal foi posicionado no centro da arena, as placas de acrílico das caixas incentivo foram retiradas, iniciando-se a observação da motivação sexual dos animais, por 20 minutos.

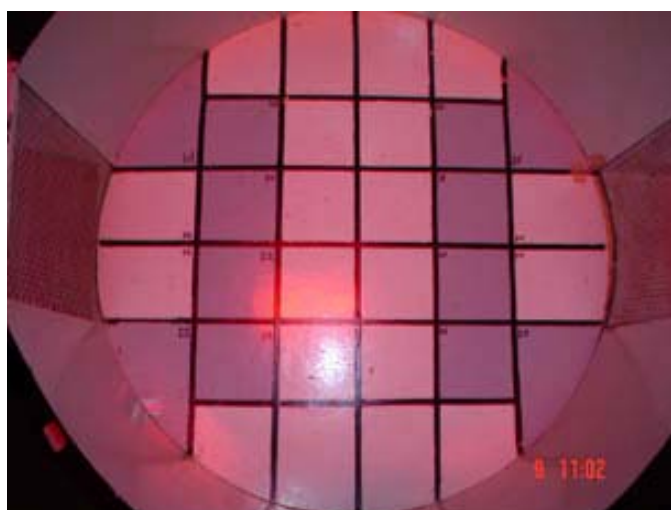


Figura 4. Fotografia ilustrativa da arena circular utilizada para a avaliação da orientação sexual dos ratos machos.

#### 3.6.5. HEMOGRAMA

Ao final dos experimentos, após a anestesia dos animais (0,1 ml/100 g de peso vivo de xilazina + 0,1 ml/100 g de peso vivo de cetamina, pela via

intra-peritoneal), amostras de sangue (2 ml) para o hemograma foram colhidas da veia cava posterior de cada rato. Estas amostras foram colocadas em frascos plásticos contendo 10 $\mu$ L de EDTA (sal dissódico do ácido etileno diamino tetra-acético) a 10%, como anticoagulante. O hemograma foi realizado em contador automático de células (CELM CC-550).

### 3.6.6. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SANGUE

Ao final do experimento os animais foram anestesiados (0,1 ml/100 g de peso vivo de xilazina + 0,1 ml/100 g de peso vivo de cetamina, pela via intra-peritoneal) e amostras de sangue (5 ml) foram colhidas da veia cava posterior de cada rato. O sangue colhido foi colocado em tubos, centrifugado e o soro separado e armazenado em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . A avaliação bioquímica foi feita por meio de sistema automatizado empregando-se kits comerciais e o aparelho CELM SBA-200.

### 3.6.7. DOSAGENS HORMONAIS

#### 3.6.7.1. Metabólitos de hormônios sexuais

Para o monitoramento não invasivo dos hormônios nas fêmeas e nos machos, foram colhidas amostras fecais aos 30, 50 e 70 dias de vida. Cada amostra colhida foi acondicionada em recipiente de polipropileno com tampa resistente à baixas temperaturas.

As amostras foram armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de seu transporte para o Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do

Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP, onde foi realizado o processo de extração e dosagem hormonal.

#### 3.6.7.1.1. Processamento das amostras fecais

Utilizou-se da técnica de BROWN et al. (1994), com algumas modificações, para a extração dos metabólitos dos hormônios sexuais das fezes (BROWN et al., 1995; BROWN et al., 1996; ROSTE et al., 2003).

Em tubos de ensaio de vidro (15 ml), devidamente identificados, foram colocadas alíquotas de 0,25 g a 0,30 g de fezes, nas quais adicionou-se 5 ml de etanol a 90% (v/v), sendo o volume final marcado sobre a superfície do vidro, com o auxílio de uma caneta de retroprojektor. Em seguida, estes tubos foram colocados em banho-maria (Quimis®) a 90°C, por 25 minutos. Durante esse período o etanol evaporado foi sendo gradativamente repostado para que nenhuma amostra ficasse com volume de etanol inferior a 5 ml. A seguir, o material foi homogeneizado em aparelho vortex (Daigger Genie 2) e centrifugado a 500 g, por 15 minutos (FANEM 206 MP). Ao final, o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e o pellet resultante desta centrifugação foi homogeneizado novamente em 5 ml de etanol 90%, agitado por 30 segundos e centrifugado por 15 minutos. Este último sobrenadante foi adicionado ao anterior e evaporado por completo em banho maria (Láctea Ltda.) com fluxo de ar comprimido (MSI 5,2 ML/100). O extrato seco resultante foi reconstituído em 1ml de metanol, através de agitação no aparelho vortex, por 5 minutos. Esse extrato em seguida foi

armazenado em freezer (-20°C) onde permaneceu até a etapa de dosagem dos metabólitos dos hormônios sexuais.

No dia da análise, as amostras foram diluídas em tampão gelatina. Para a dosagem dos níveis dos metabólitos de estrógeno, progesterona e testosterona nas fezes das fêmeas foram preparadas diluições 1:20 partindo da adição de 950 µl de tampão em 50 µl do extrato metanólico de fezes. Para a dosagem dos níveis de estrogênios e progestágenos nas fezes dos machos, também foram preparadas diluições 1:20, conforme acima descrito. Já para a dosagem dos metabólitos fecais da testosterona em machos, partiu-se de uma diluição 1:4 onde 750 µl de tampão foram adicionados à 250 µl de extrato metanólico de fezes.

#### 3.6.7.1.2. Dosagens dos metabólitos hormonais nas fezes

Para a dosagem dos metabólitos fecais dos hormônios: estradiol, progesterona e testosterona, utilizou-se da técnica do radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial (kits comerciais DPC – Diagnostics Products Corporation) desenvolvido para avaliação quantitativa de progesterona, estradiol e testosterona no soro humano.

O princípio desta técnica baseia-se na reação antígeno-anticorpo, usando-se como competidor o hormônio a ser dosado marcado com I125 (iodo radioativo). Após as etapas do ensaio a radioatividade remanescente é detectada em um contador gama computadorizado (COBRA, MOD. AUTO-GAMMA), provido de *software* específico para cálculo automático dos

resultados. A quantidade de radiação detectada é inversamente proporcional à concentração do hormônio, que é, por sua vez, determinada através de curva padrão fornecida com o kit comercial.

Os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos dos fornecedores e os seguintes parâmetros de controle de qualidade (CQ) foram analisados em cada kit: contagem por minuto total (CPM), capacidade de ligação (CL), ligações não específicas (LNE), sensibilidade e coeficientes de variação (CV) intra-ensaio alto e baixo para cada um dos ensaios realizados. Foram realizados dois ensaios para progesterona e estradiol, uma vez que algumas amostras foram mensuradas duas vezes, em busca de melhor diluição e melhores resultados. Por este motivo, nestes dois kits, o CV inter-ensaio também foi analisado (Quadro 1).

Quadro 1. Parâmetros de controle de qualidade analisados nos kits de hormônios tireoideanos e sexuais.

<b>Parâmetros</b>	<b>Triiodotironina Ensaio único</b>	<b>Tiroxina Ensaio único</b>	<b>Testosterona Ensaio único</b>	<b>Progesterona Ensaio 1 / Ensaio 2</b>	<b>Estradiol Ensaio 1 / Ensaio 2</b>
CPM total	18190	24515,5	16482,3	27573,8 / 25556,8	13420,8 / 12479,3
CL	37	29	59	52 52	46 45
LNE	0,66	0,49	0,89	0,43 0,42	0,97 0,74
Sensibilidade (% dose)	95	91,8	88,1	95,6 94,4	93,3 94,5
CVintra alto	5,38	5,33	4,29	4,15 1,07	3,64 1,15
CVintra baixo	2,54	12,86	9,65	3,04 4,32	7,96 3,53
CVinter alto	-----	-----	-----	2,72	1,41
CVinter baixo	-----	-----	-----	0,28	2,45

CPM= contagem por minuto; CL= capacidade de ligação (%); LNE= ligações não específicas (%) e CV= coeficiente de variação (%).

### 3.6.7.1.3. Validação

Para a validação dos kits diagnósticos comerciais DPC MEDLAB® usados em extrato de fezes de ratos machos e fêmeas, foi usado o método do paralelismo utilizando matriz depletada, que indica se os hormônios da espécie estudada estão interagindo com o anticorpo do kit diagnóstico de forma similar ao hormônio usado como padrão. Foi realizada a depleção hormonal de um “pool” de amostras com uma solução de carvão-dextran (DARBRE et al., 1983; REDDEL et al., 1984). A essa matriz depletada adicionaram-se valores conhecidos do hormônio padrão, com diluições que se aproximavam dos pontos da curva do kit diagnóstico. Com esta diluição construí-se uma curva correlacionando estes valores.

Foi encontrado paralelismo entre as curvas de diluição de metabólitos de estradiol e a curva do conjunto comercial, com  $r=0,98$  e  $p<0,05$  (figura 5). Quanto a curva dos metabólitos de progesterona também verificou-se paralelismo com  $r=0,98$  e  $p<0,05$  (figura 6). E por último, a curva dos metabólitos de testosterona também verificou-se paralelismo com  $r=0,98$  e  $p<0,05$  (figura 7). Sendo  $r=R$  quadrado ajustado.

Da equação da reta e correlação de linearidade ( $R^2$ ) obtidos de cada kit diagnóstico, certificou-se que os hormônios da espécie estudada estão interagindo com os anticorpos do kit diagnóstico de maneira similar ao hormônio usado como padrão. Assim, as concentrações obtidas nas amostras de fezes, mostraram-se confiáveis.



Foi realizada a validação dos conjuntos diagnósticos comerciais da DPC MEDLAB® em fase sólida, para uso em extratos fecais de ratos. Os resultados obtidos para verificação de paralelismo nos métodos empregados estão representados nas figuras 5 a 7.

E2

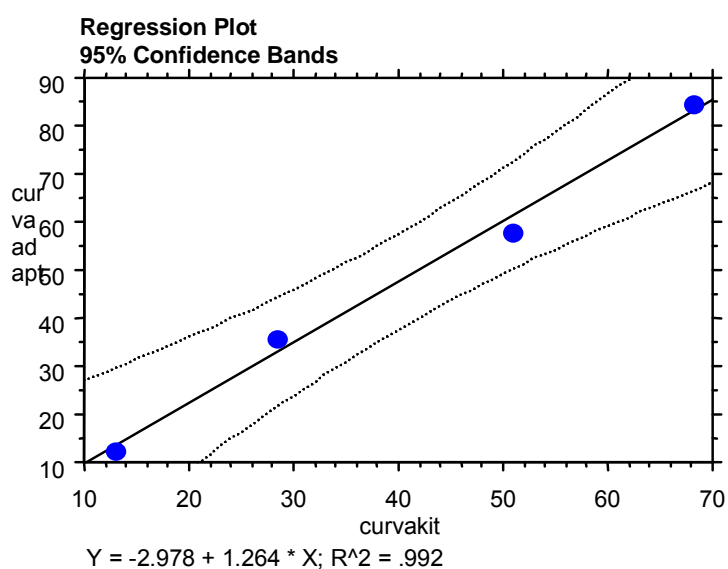


Figura 5. Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para os metabólitos de estradiol nas fezes. São Paulo, 2004.

## P4

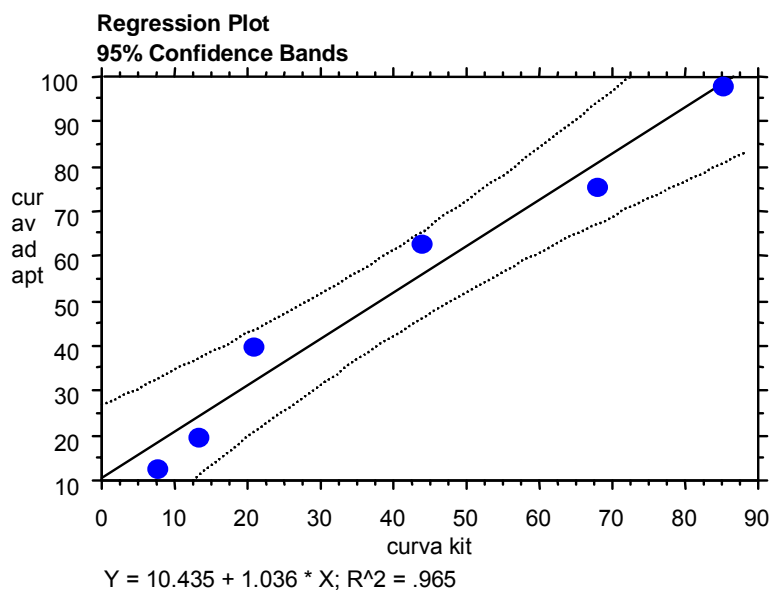


Figura 6. Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para os metabólitos de progesterona nas fezes. São Paulo, 2004.

## Testosterona

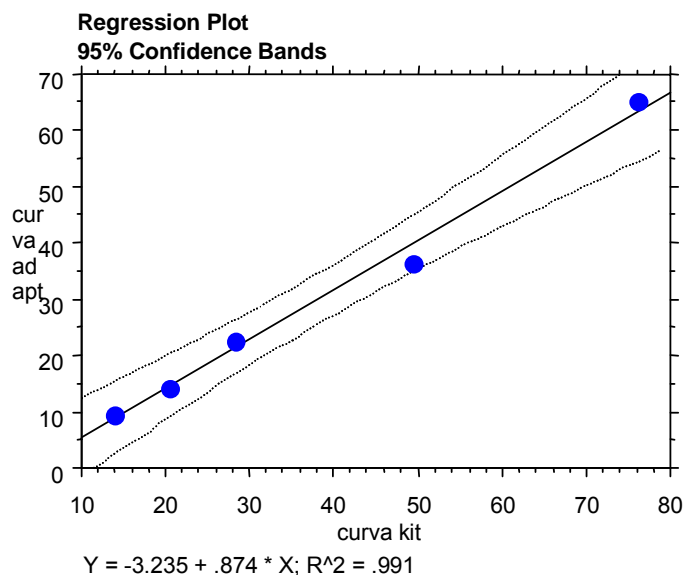


Figura 7. Representação gráfica da curva de paralelismo obtida para os metabólitos de testosterona nas fezes. São Paulo, 2004.

#### 3.6.7.1.4. Cálculo das concentrações finais determinadas por

##### RIE

As concentrações determinadas primariamente por RIE (Radioimunoensaio) foram expressas nos metabólitos de progesterona em ng/ml, de estradiol em pg/ml e de testosterona em ng/dl. Os resultados obtidos foram calculados (em ng/g) pela seguinte equação:

$$CF = \frac{C \times V_f \times D \times 1}{P_i} \div 1000$$

Onde:

CF= concentração final (em ng/g)

C= concentração fornecida pelo RIE

Vf= volume das fezes ao final da etapa de extração

D= diluição empregada

Pi= peso inicial

#### 3.6.7.2. Dosagens de hormônios T3 e T4

Ao final dos experimentos, após a anestesia dos animais (0,1 ml/100 g de peso vivo de xilazina + 0,1 ml/100 g de peso vivo de cetamina, pela via intra-peritoneal), amostras de sangue (5 ml) foram colhidas da veia cava posterior de cada rato, colocados em tubos, centrifugado e o soro separado e armazenado em freezer -80°C.

##### 3.6.7.2.1. Procedimento laboratorial

As concentrações séricas de hormônios tireoideanos (T3 e T4) foram determinados através de radioimunoensaio (RIE), utilizando-se conjuntos

diagnósticos comerciais em fase sólida (DPC MEDLAB), no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP.

#### 3.6.7.2.2. Validação

Realizou-se a validação dos conjuntos diagnósticos comerciais DPC MEDLAB para uso em soro de ratos. Para isso foi utilizado o método de paralelismo utilizando matriz depletada. Este método indica se os hormônios da espécie estudada estão interagindo com o anticorpo do kit de forma similar ao hormônio usado como padrão. Foi realizada a depleção hormonal das amostras, uma alíquota de cada espécie estudada, com uma solução de carvão-dextran (DARBRE et al., 1983; REDDEL et al., 1984). A essa matriz depletada foram adicionados valores conhecidos do hormônio padrão com diluições próximas dos pontos da curva do kit. Com esta diluição construiu-se uma curva correlacionando estes valores.

#### 3.6.8. COLETA DE MATERIAL E ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO

Os animais foram pesados e submetidos a eutanásia (xilazina + cetamina). O aparelho reprodutor do macho foi retirado fazendo-se uma incisão na região ventro-púbica e separando-se os testículos, próstata e a vesícula seminal, que foram pesados separadamente e encaminhados para estudo anatomopatológico. Em fêmeas foram retirados e pesados os ovários e o útero e encaminhados também para estudo anatomopatológico.

Além do aparelho reprodutor foram retirados adrenais, timo, coração, pulmões, rins, fígado, bexiga e linfonodos mesenquimais. Após a inspeção macroscópica, todos os órgãos foram pesados e devidamente fixados e encaminhados para o estudo anatomopatológico.

#### 3.6.8.1. Avaliação morfométrica dos folículos ovarianos

A avaliação morfométrica foi realizada com a utilização do sistema de análise de imagens computadorizado BIOSCAN/OPTIMAS®. Este sistema é composto por um microscópio óptico acoplado a uma câmera de vídeo e um computador, que possui uma placa digitalizadora e o programa Optimas®. As imagens observadas ao microscópio foram transmitidas ao monitor, permitindo a sua análise. A avaliação morfométrica foi realizada utilizando-se cortes histológicos dos ovários. A mensuração foi feita com régua utilizando-se uma objetiva de 40x. O território de interesse foi localizado, procedendo-se, em seqüência, o congelamento da imagem e a sua mensuração.

### 3.7. DOSAGENS DOS NÍVEIS CEREBRAIS DE DA, HVA, DOPAC, DHBA, VMA, 5-HT E 5-HIAA

#### 3.7.1. PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE HOMOGENADOS CEREBRAIS

Para a realização das dosagens neuroquímicas os animais foram decapitados no período da manhã (9:00-12:00 hs), retirados seus encéfalos do crânio e imediatamente lavados em solução salina 0,9% gelada. Em

seguida, o cérebro foi dessecado sobre placa de gelo, rodeado por gelo seco. O estriato direito e o hipotálamo foram retirados, pesados e imediatamente congelados (-80 °C) num período máximo de 3 minutos por animal. Os tecidos foram então homogeneizados com caneta sonicadora (LAB LINE Instruments) sob refrigeração com gelo, em ácido perclórico 0,01M, contendo 0,02% de metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) e 0,02% de ácido diaminoetilenotetracético dissódico (EDTA), na proporção de 10  $\mu\text{l}$  para cada miligrama de tecido. Os homogenatos obtidos foram conservados em geladeira por 24 horas para a precipitação de proteínas e ácidos nucleicos, interferentes das amostras. Em seguida, o material foi centrifugado a 11.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado, devidamente acondicionado em tubo de polipropileno do tipo eppendorf e mantido em freezer -80 °C até o momento da análise.

### 3.7.2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Foi empregada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – Shimatzu 6A acoplado a um detector eletroquímico, empregando-se uma coluna C-18 Shimpak - ODS). As condições do sistema foram: sistema isocrático com fluxo constante de 0,8 ml/min, temperatura de 65 °C, tempo de corrida de 18 minutos, detector com potencial mantido a +0,83V no eletrodo de trabalho. A fase móvel utilizada foi constituída por 0,55 g/L de ácido heptanossulfônico, 7,16 g/L de  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 4,20 g/L de ácido cítrico, 0,04 g/L de EDTA dissódico, 80 ml/L de metanol e água Milli-Q para completar o volume de 1000 ml. O pH foi ajustado para 3,1 com ácido

ortofosfórico. A fase móvel foi filtrada com membranas milipore de 0,22  $\mu\text{m}$  em sistema à vácuo e deaerada por 30 minutos com fluxo constante de hélio. Em seguida a fase móvel circulou em sistema cromatográfico fechado por 18 horas para estabilização da coluna e da linha de base, operando em fluxo constante de 1,0 ml/min. A caracterização das diferentes substâncias analisadas se deu pelo tempo de retenção, reflexo da polaridade destes compostos. Desta forma, substâncias mais polares se retêm menos na sílica da coluna, apresentando um tempo de retenção menor.

### 3.7.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE MONOAMINAS

Os padrões de concentrações de 1 mM de NOR, DA, DOPAC, HVA, 5-HIAA e 5-HT foram diluídos em solução de ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , distribuídos em tubos de polipropileno do tipo eppendorf de 1,5 ml e em seguida congelados em freezer  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  por período não superior a 2 meses. No momento da análise os padrões foram descongelados, diluídos 10.000 vezes com solução de ácido perclórico 0,01 M. Os padrões foram injetados todos os dias antes do início das corridas analíticas, intercaladamente e ao final das dosagens. A curva de calibração foi obtida com o auxílio de 3 concentrações diferentes de padrão.

## 4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1. AVALIAÇÃO DO PESO, CONSUMO DE ÁGUA E CONSUMO DE RAÇÃO

Foram utilizadas 30 fêmeas (15 controles e 15 experimentais) e 30 machos (15 controles e 15 experimentais). Todos os ratos foram mantidos



## **DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**



em gaiolas individuais. Os animais receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Durante esse período registrou-se o peso, a ingestão hídrica e o consumo de ração.

#### 4.2. ANÁLISE DO PESO ÚMIDO, PESO RELATIVO E ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DE ÓRGÃOS

Após o último dia de tratamento (aos 71 dias de vida), os ratos machos e fêmeas foram sacrificados para a análise do peso úmido e relativo (n=15 por grupo) dos seguintes órgãos: ovários direito e esquerdo, útero, testículos direito e esquerdo, epidídimo, vesícula seminal, baço, pâncreas, adrenal, rim, coração, timo, pulmão, fígado, intestinos e estômago.

Logo após pesagem, porções representativas dos ovários direito e esquerdo, útero, testículos direito e esquerdo, epidídimo, vesícula seminal, baço, pâncreas, adrenal, rim, coração, timo, pulmão e fígado (n=5 por grupo) foram coletados, mantidos em solução de formol a 10%. Cada amostra foi submersa em parafina líquida. Os blocos sólidos resultantes foram devidamente cortados, fixados em lâmina e corados com hematoxilina eosina.

#### 4.3. AVALIAÇÃO DA ORIENTAÇÃO SEXUAL E DO COMPORTAMENTO SEXUAL

Para a orientação sexual foram utilizados 15 machos controle e 15 machos experimentais com 80 dias de vida. Fêmeas e machos “iscas” em idade reprodutiva foram empregados conforme já descrito no item 3.6.4.

Com auxílio de cronômetros e da arena circular avaliou-se a preferência sexual dos animais.

Para o comportamento sexual das fêmeas foram empregadas 15 fêmeas do grupo controle e 15 fêmeas do grupo experimental. Essas fêmeas foram transferidas para uma sala de ciclo de luz invertido. Após 21 dias de permanência nesta nova condição, aos 80 dias de vida, avaliou-se o comportamento sexual das fêmeas, após a detecção do estro por observações microscópicas do lavado vaginal. Para tal foram empregados ratos machos “iscas” comprovadamente férteis e sexualmente ativos que foram mantidos individualmente na caixa de observação descrita no item 3.6.3, 5 minutos antes de se inserir a fêmea a ser analisada. O coeficiente de lordoses (% CL) foi analisado a partir do número de lordoses realizadas pela fêmea em 10 montas realizadas pelo macho.

Para o comportamento sexual dos machos foram empregados 15 machos do grupo controle e 15 machos do grupo experimental, com 80 dias de vida, e ratas “iscas” com o estro induzido após injeção subcutânea de 17- $\beta$ -estradiol (50  $\mu$ g/kg) e de progesterona (2,0 mg/kg) 54 e 6 horas antes do teste, respectivamente. Os ratos machos foram inseridos individualmente na caixa de observação descrita no item 3.6.3, 5 minutos antes da fêmea “isca”. Por 40 minutos, com auxílio de cronômetros, fez-se a observação de diversos parâmetros citados no item 3.6.3.

#### 4.4. AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SANGÜÍNEA

Após o final do tratamento (aos 71 dias de vida), os ratos machos e fêmeas foram anestesiados como já descrito no item 3.6.5 e 3.6.6. Foi colhido o sangue para a análise do hemograma (n=10 por grupo) e da bioquímica sangüínea (n=15 por grupo), sendo posteriormente sacrificados.

#### 4.5. DOSAGEM DOS METABÓLITOS DE HORMÔNIOS SEXUAIS NAS FEZES E DE HORMÔNIOS TIREOIDEANOS NO SORO

Foram colhidas amostras de fezes nos dias 30, 50 e 70 de vida de ratos machos e fêmeas (n=7 por grupo), para o monitoramento dos metabólitos dos hormônios sexuais durante o experimento. A coleta, extração e dosagem dos metabólitos dos hormônios sexuais foi realizados conforme descrito no item 3.6.7. Após o final do tratamento (71 dias de vida), foi colhido sangue, centrifugado e separado seu soro para a avaliação dos níveis séricos dos hormônios tireoideanos T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina), conforme descrito no item 3.6.7.2.

#### 4.6. DOSAGEM DOS NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES E SEUS METABÓLITOS NO HIPOTÁLAMO E ESTRIATO

Para a realização das dosagens neuroquímicas, ratos machos e fêmeas (n=7 por grupo), com 75 dias de vida, foram decapitados, seus encéfalos retirados da caixa craniana e porções do hipotálamo e estriato processados e armazenados para posterior análise, conforme descrito no item 3.7.

#### 4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi empregado o *software* GRAPHPAD INSTAT (1998) para a realização das seguintes análises estatísticas:

- Análise de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, comparando-se os dados de dois grupos;
- Teste t de Student para dados paramétricos, comparando-se duas médias.

O nível de significância crítico para todas as análises estatísticas realizadas foi de  $p < 0,05$  (5%).



**RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

A Tabela 1 e a Figura 8 mostram o peso corpóreo de ratas que receberam durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). A análise estatística revelou redução no peso das ratas nos dias de vida 61 ( $t=2,158$ ;  $p=0,0396$ ), 62 ( $t=2,373$ ;  $p=0,0248$ ), 63 ( $t=2,583$ ;  $p=0,0153$ ), 64 ( $t=2,646$ ;  $p=0,0132$ ), 65 ( $t=2,666$ ;  $p=0,0126$ ), 66 ( $t=2,719$ ;  $p=0,0111$ ), 67 ( $t=2,747$ ;  $p=0,0104$ ), 68 ( $t=2,756$ ;  $p=0,0102$ ), 69 ( $t=2,695$ ;  $p=0,0118$ ) e 70 ( $t=2,548$ ;  $p=0,0166$ ), quando comparados com aqueles do grupo controle.

Tabela 1. Peso corpóreo (g) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \*  $p<0,05$ , teste t.

Dias de vida	Controle (n=15)	Experimental (n=15)
21	54,2 ± 1,6	57,4 ± 0,8
22	58,5 ± 1,8	59,2 ± 0,9
23	63,5 ± 1,8	62,6 ± 0,8
24	67,4 ± 1,7	65,8 ± 1,1
25	73,0 ± 1,7	71,3 ± 1,1
26	78,3 ± 1,8	76,7 ± 1,2
27	83,8 ± 1,9	82,4 ± 1,3
28	88,6 ± 2,1	87,5 ± 1,4
29	93,8 ± 2,3	92,6 ± 1,5
30	100,0 ± 2,3	97,4 ± 1,7
31	106,1 ± 2,3	102,0 ± 1,9
32	110,4 ± 2,2	106,3 ± 2,0
33	114,8 ± 2,3	110,9 ± 2,1
34	119,0 ± 2,4	115,5 ± 2,3
35	123,6 ± 2,3	119,8 ± 2,4
36	128,2 ± 2,4	124,1 ± 2,5
37	132,7 ± 2,5	128,4 ± 2,7
38	136,9 ± 2,8	132,7 ± 2,9
39	140,6 ± 2,9	136,1 ± 2,9

continua

Tabela 1. Peso corpóreo (g) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \* p<0.05, teste t. (continuação).

Dias de vida	Controle (n=15)	Experimental (n=15)
40	144,0 ± 3,1	139,6 ± 2,9
41	147,7 ± 3,4	143,0 ± 3,1
42	151,1 ± 3,6	146,3 ± 3,2
43	154,0 ± 3,6	148,8 ± 3,3
44	156,3 ± 3,7	151,2 ± 3,3
45	159,4 ± 3,7	153,8 ± 3,4
46	163,0 ± 3,8	156,5 ± 3,4
47	166,3 ± 3,8	159,5 ± 3,3
48	169,6 ± 3,9	162,4 ± 3,3
49	172,4 ± 3,9	165,3 ± 3,3
50	175,7 ± 4,0	168,2 ± 3,2
51	178,9 ± 4,2	170,6 ± 3,3
52	182,2 ± 4,2	173,4 ± 3,3
53	183,6 ± 4,3	173,7 ± 3,4
54	184,9 ± 4,4	174,2 ± 3,6
55	186,2 ± 4,7	174,3 ± 4,1
56	187,4 ± 5,1	174,5 ± 4,6
57	189,4 ± 5,3	176,6 ± 4,4
58	191,2 ± 5,6	178,7 ± 4,3
59	193,2 ± 5,8	181,3 ± 4,1
60	195,9 ± 5,4	189,4 ± 8,0
61	198,4 ± 5,0	184,4 ± 4,1*
62	201,5 ± 5,0	186,1 ± 4,1*
63	203,4 ± 4,4	187,7 ± 4,1*
64	204,6 ± 4,3	188,8 ± 4,1*
65	205,8 ± 4,3	190,0 ± 4,1*
66	207,2 ± 4,3	191,0 ± 4,1*
67	208,6 ± 4,3	192,0 ± 4,2*
68	209,9 ± 4,4	193,2 ± 4,2*
69	211,0 ± 4,4	194,4 ± 4,3*
70	212,0 ± 4,6	195,6 ± 4,5*

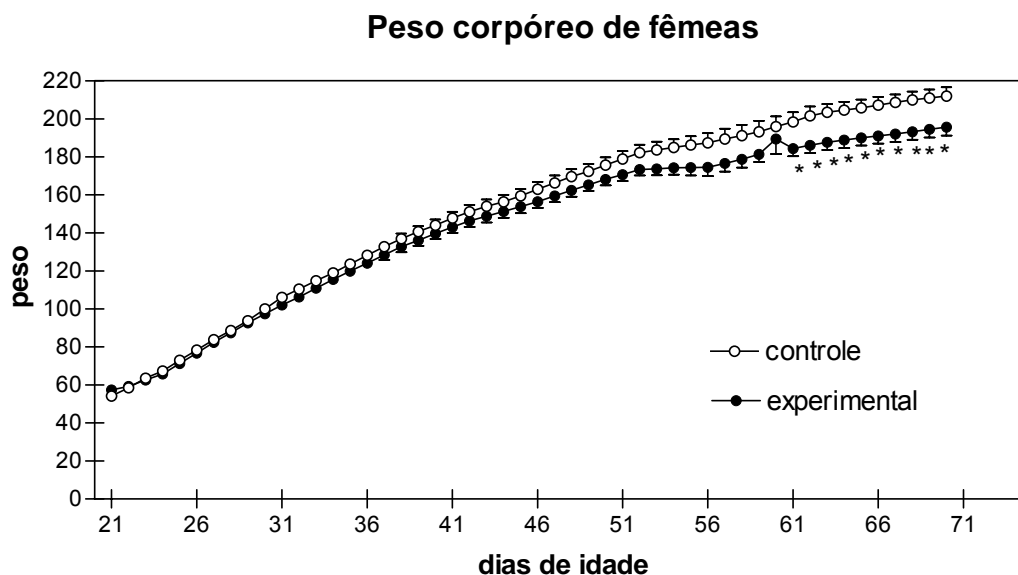


Figura 8. Peso corpóreo (g) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \*  $p < 0,05$ , teste t.

A Tabela 2 e a Figura 9 mostram o peso corpóreo de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *S. lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que houve redução no peso dos ratos nos dias de vida 23 ( $t=2,077$ ;  $p=0,0471$ ), 24 ( $t=2,181$ ;  $p=0,0377$ ), 25 ( $t=2,207$ ;  $p=0,0357$ ), 26 ( $t=2,083$ ;  $p=0,0465$ ), 28 ( $t=2,356$ ;  $p=0,0257$ ), 29 ( $t=2,848$ ;  $p=0,0082$ ), 30 ( $t=2,816$ ;  $p=0,0088$ ), 31 ( $t=2,726$ ;  $p=0,0109$ ), 32 ( $t=2,958$ ;  $p=0,0062$ ), 33 ( $t=3,041$ ;  $p=0,0051$ ), 34 ( $t=3,118$ ;  $p=0,0042$ ), 35 ( $t=3,522$ ;  $p=0,0015$ ), 36 ( $t=3,872$ ;  $p=0,0006$ ), 37 ( $t=4,106$ ;  $p=0,0003$ ), 38 ( $t=4,454$ ;  $p=0,0001$ ), 39 ( $t=4,818$ ;  $p=0,0001$ ), 40 ( $t=5,234$ ;  $p=0,0001$ ), 41 ( $t=5,500$ ;  $p=0,0001$ ), 42 ( $t=5,780$ ;



p=0,0001), 43 (t=5,976; p=0,0001), 44 (t=6,070; p=0,0001), 45 (t=6,222; p=0,0001), 46 (t=6,437; 0,0001), 47 (t=6,283; p=0,0001), 48 (t=6,495; 0,0001), 49 (t=6,948; p=0,0001), 50 (t=7,363; p=0,0001), 51 (t=7,677; p=0,0001), 52 (t=8,094; p=0,0001), 53 (t=8,097; p=0,0001), 54 (t=4,578; p=0,0001), 55 (t=6,668; p=0,0001), 56 (t=6,402; p=0,0001), 57 (t=6,089; p=0,0001), 58 (t=5,716; p=0,0001), 59 (t=6,387; p=0,0001), 60 (t=7,072; p=0,0001), 61 (t=7,766; p=0,0001), 62 (t=8,445; p=0,0001), 63 (t=8,600; p=0,0001), 64 (t=8,714; p=0,0001), 65 (t=8,711; p=0,0001), 66 (t=9,243; p=0,0001), 67 (t=9,598; p=0,0001), 68 (t=9,778; p=0,0001), 69 (t=9,631; p=0,0001) e 70 (t=9,594; p=0,0001), quando comparados com aqueles do grupo controle.

Tabela 2. Peso corpóreo (g) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t.

Dias de vida	Controle (n=15)	Experimental (n=15)
21	56,4 ± 1,7	56,2 ± 1,7
22	61,5 ± 1,8	57,0 ± 1,7
23	66,3 ± 1,7	61,1 ± 1,8*
24	70,7 ± 2,2	64,3 ± 1,9*
25	76,7 ± 2,4	69,9 ± 1,9*
26	82,4 ± 2,7	75,3 ± 2,0*
27	87,6 ± 3,3	80,9 ± 2,0
28	94,8 ± 3,1	86,0 ± 2,1*
29	102,4 ± 3,1	91,3 ± 2,3**
30	108,1 ± 3,3	96,4 ± 2,5**
31	114,2 ± 3,7	101,6 ± 2,8*
32	121,7 ± 4,0	106,5 ± 2,8**

Continua

Tabela 2. Peso corpóreo (g) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t. (continuação).

Dias de vida	Controle (n=15)	Experimental (n=15)
33	127,7 ± 4,4	111,6 ± 2,9**
34	134,1 ± 4,8	116,2 ± 3,1**
35	141,9 ± 4,8	121,6 ± 3,1**
36	149,4 ± 4,7	127,2 ± 3,2**
37	156,6 ± 4,8	132,6 ± 3,3**
38	163,2 ± 4,6	137,9 ± 3,3**
39	169,5 ± 4,4	143,2 ± 3,2**
40	176,0 ± 4,2	148,4 ± 3,2**
41	182,0 ± 4,0	153,6 ± 3,2**
42	189,4 ± 4,1	158,6 ± 3,3**
43	196,8 ± 4,2	163,8 ± 3,5**
44	203,9 ± 4,4	168,6 ± 3,7**
45	211,2 ± 4,5	174,2 ± 3,8**
46	218,4 ± 4,6	179,3 ± 3,9**
47	224,6 ± 4,9	184,7 ± 4,0**
48	232,0 ± 5,0	189,9 ± 4,1**
49	238,4 ± 4,8	194,2 ± 4,1**
50	244,6 ± 4,6	198,5 ± 4,2**
51	250,1 ± 4,5	202,5 ± 4,2**
52	255,1 ± 4,3	207,0 ± 4,1**
53	260,1 ± 4,3	211,3 ± 4,1**
54	258,4 ± 8,1	215,0 ± 4,7**
55	269,6 ± 5,1	219,8 ± 5,4**
56	273,6 ± 5,6	223,8 ± 5,3**
57	277,4 ± 6,2	228,2 ± 5,1**
58	280,9 ± 6,9	232,2 ± 4,9**
59	286,0 ± 6,2	234,8 ± 4,9**
60	291,0 ± 5,6	237,4 ± 5,0**
61	296,0 ± 5,1	239,6 ± 5,1**
62	300,8 ± 4,7	242,4 ± 5,0**
63	305,2 ± 4,6	246,1 ± 5,0**
64	309,9 ± 4,7	249,8 ± 4,9**
65	314,1 ± 4,8	253,3 ± 4,9**
66	319,2 ± 4,5	257,2 ± 4,9**
67	324,1 ± 4,3	260,8 ± 4,9**
68	329,3 ± 4,2	264,6 ± 5,0**
69	333,3 ± 4,4	268,2 ± 5,1**
70	337,7 ± 4,6	271,6 ± 5,1**

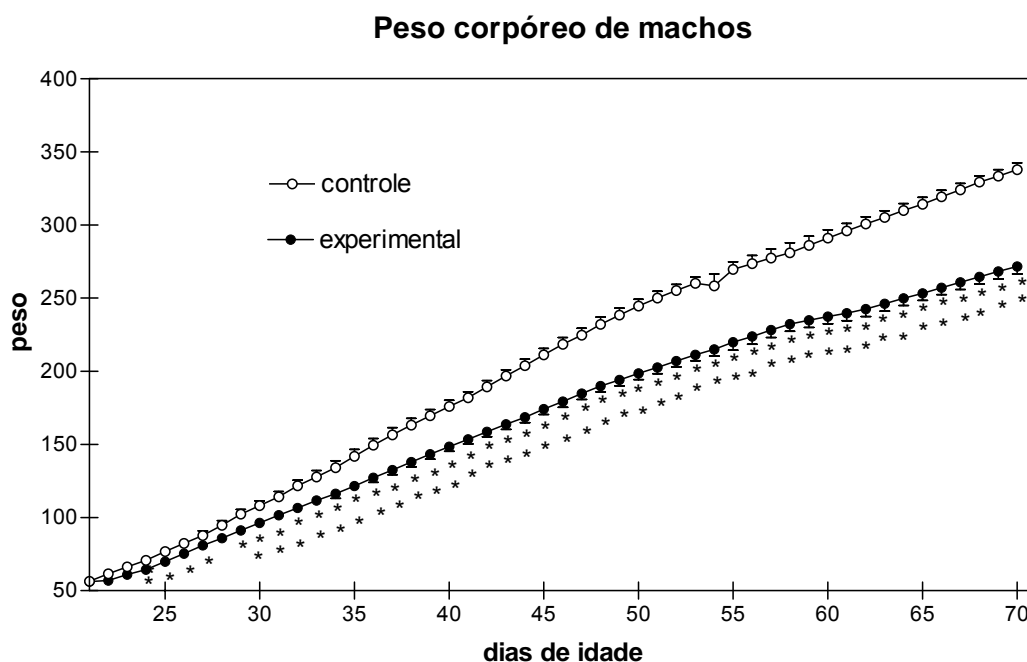


Figura 9. Peso corpóreo (g) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21<sup>o</sup> ao 70<sup>o</sup> dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; p< 0,05\* e \*\* p<0,01, teste t.

A Tabela 3 e a Figura 10 mostram o consumo de ração de ratas que receberam durante o período da puberdade (21<sup>o</sup> ao 70<sup>o</sup> dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que houve redução no consumo de ração das ratas nos dias de vida 21 (t=11,502; p=0,0001), 22 (t=2,253; p=0,0323), 65 (t=2,577; p=0,0155), 66 (t=2,577; p=0,0155), 67 (t=2,577; p=0,0155), 68 (t=2,577; p=0,0155) e 69 (t=2,577; p=0,0155) e aumentou o consumo de ração nos dias de vida 31 (t=2,327; p=0,0274), 32 (t=2,327; p=0,0274), 33 (t=2,327; p=0,0274), 34 (t=4,022; p=0,0004), 35 (t=4,022; p=0,0004), 36 (t=4,022; p=0,0004), 37

( $t=3,522$ ;  $p=0,0015$ ), 38 ( $t=3,046$ ;  $p=0,0050$ ), 39 ( $t=3,046$ ;  $p=0,0050$ ), 40 ( $t=3,046$ ;  $p=0,0050$ ), 41 ( $t=3,081$ ;  $p=0,0046$ ), 42 ( $t=2,893$ ;  $p=0,0073$ ), 43 ( $t=2,893$ ;  $p=0,0073$ ), 44 ( $t=3,063$ ;  $p=0,0048$ ), 45 ( $t=2,552$ ;  $p=0,0164$ ), 46 ( $t=2,552$ ;  $p=0,0164$ ) e 47 ( $t=2,552$ ;  $p=0,0164$ ), quando comparados com aqueles do grupo controle.

Tabela 3. Consumo de ração (g) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \*  $p<0,05$  e \*\*  $p<0,01$ , teste t.

Dias de vida	Controle (n=15)	Experimental (n=15)
21	9,2 ± 0,3	5,3 ± 0,1 **
22	8,5 ± 0,3	7,6 ± 0,2 *
23	11,0 ± 0,4	11,7 ± 0,4
24	11,0 ± 0,4	11,8 ± 0,4
25	11,0 ± 0,4	11,8 ± 0,4
26	11,0 ± 0,4	11,8 ± 0,4
27	12,9 ± 0,4	13,7 ± 0,4
28	13,0 ± 0,4	13,7 ± 0,4
29	12,4 ± 0,3	12,8 ± 0,3
30	13,5 ± 0,4	12,8 ± 0,3
31	15,2 ± 0,3	16,6 ± 0,4*
32	15,2 ± 0,3	16,6 ± 0,4*
33	15,2 ± 0,3	16,6 ± 0,4*
34	14,5 ± 0,5	17,1 ± 0,4**
35	14,5 ± 0,5	17,1 ± 0,4**
36	14,5 ± 0,5	17,1 ± 0,4**
37	14,7 ± 0,5	17,1 ± 0,4**
38	14,8 ± 0,5	16,8 ± 0,4**
39	14,8 ± 0,5	16,8 ± 0,4**
40	14,8 ± 0,5	16,8 ± 0,4**
41	14,8 ± 0,4	16,8 ± 0,4**
42	14,7 ± 0,5	17,0 ± 0,5**
43	14,7 ± 0,5	17,0 ± 0,5**

continua

Tabela 3. Consumo de ração (g) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t. (continuação).

Dias de vida	Controle (n=15)	Experimental (n=15)
44	14,4 ± 0,6	17,0 ± 0,5**
45	15,2 ± 0,6	17,3 ± 0,5*
46	15,2 ± 0,6	17,3 ± 0,5*
47	15,2 ± 0,6	17,3 ± 0,5*
48	16,1 ± 0,4	17,3 ± 0,5
49	15,8 ± 0,4	16,6 ± 0,4
50	15,8 ± 0,4	16,6 ± 0,4
51	15,8 ± 0,5	16,6 ± 0,4
52	14,6 ± 0,7	14,8 ± 0,6
53	14,6 ± 0,7	14,8 ± 0,6
54	14,6 ± 0,7	14,8 ± 0,6
55	14,7 ± 0,7	14,8 ± 0,6
56	14,1 ± 0,9	15,5 ± 0,3
57	14,1 ± 0,9	15,5 ± 0,3
58	14,2 ± 1,0	15,5 ± 0,3
59	16,2 ± 0,4	16,1 ± 0,3
60	16,2 ± 0,4	16,1 ± 0,3
61	16,2 ± 0,4	16,1 ± 0,3
62	15,6 ± 0,4	16,1 ± 0,3
63	14,4 ± 0,4	13,7 ± 0,2
64	14,4 ± 0,4	13,7 ± 0,2
65	15,2 ± 0,5	13,7 ± 0,2*
66	15,2 ± 0,5	13,7 ± 0,2*
67	15,2 ± 0,5	13,7 ± 0,2*
68	15,2 ± 0,5	13,7 ± 0,2*
69	15,2 ± 0,5	13,7 ± 0,2*

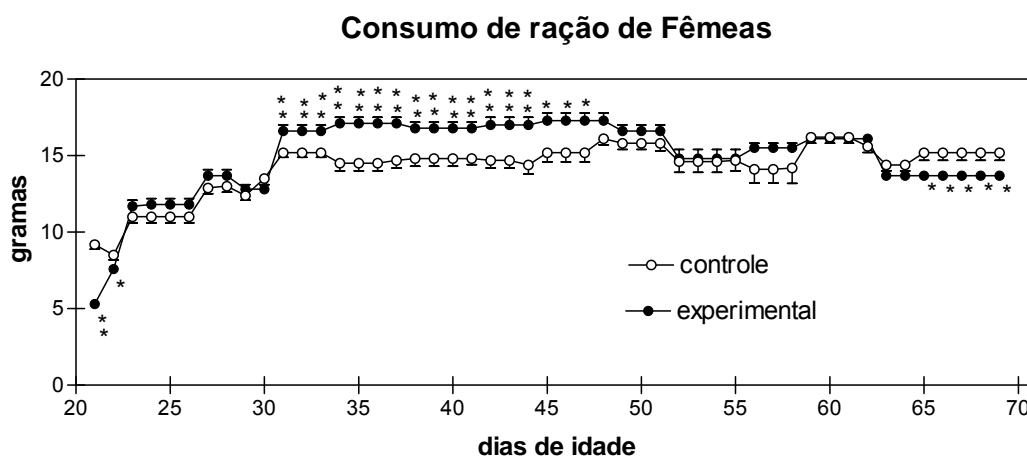


Figura 10. Consumo de ração (g) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , teste t.

A Tabela 4 e a Figura 11 mostram o consumo de ração de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que houve redução no consumo de ração dos ratos nos dias de vida 21 ( $t=10,435$ ;  $p=0,0001$ ), 22 ( $t=4,732$ ;  $p=0,0001$ ), 23 ( $t=5,662$ ;  $p=0,0001$ ), 37 ( $t=4,659$ ;  $p=0,0001$ ), 38 ( $t=4,659$ ;  $p=0,0001$ ), 39 ( $t=4,659$ ;  $p=0,0001$ ) e 40 ( $t=4,659$ ;  $p=0,0001$ ) e aumentou o consumo de ração no dia de vida 29 ( $t=1,894$ ;  $p=0,0686$ ), quando comparados com aqueles do grupo controle.

Tabela 4. Consumo de ração (g) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t.

Dias de vida	Controle (n=15)	Experimental (n=15)
21	9,8 ± 0,2	7,3 ± 0,1**
22	10,1 ± 0,2	7,6 ± 0,4**
23	10,4 ± 0,1	7,6 ± 0,4**
24	12,4 ± 0,8	13,4 ± 0,9
25	12,4 ± 0,8	13,4 ± 0,9
26	12,4 ± 0,8	13,4 ± 0,9
27	14,4 ± 0,6	14,4 ± 0,7
28	14,4 ± 0,6	14,4 ± 0,7
29	12,9 ± 0,5	14,3 ± 0,4*
30	13,7 ± 0,6	14,3 ± 0,4
33	16,5 ± 0,7	14,8 ± 0,7
34	18,2 ± 0,7	17,7 ± 0,7
35	18,2 ± 0,7	17,7 ± 0,7
36	18,2 ± 0,7	17,7 ± 0,7
37	19,0 ± 0,3	16,3 ± 0,4**
38	19,0 ± 0,3	16,3 ± 0,4**
39	19,0 ± 0,3	16,3 ± 0,4**
40	19,0 ± 0,3	16,3 ± 0,4**
41	20,8 ± 0,5	19,8 ± 0,5
42	20,8 ± 0,5	19,8 ± 0,5
43	20,8 ± 0,5	19,8 ± 0,5
44	21,1 ± 0,8	19,9 ± 0,6
45	21,1 ± 0,8	19,9 ± 0,6
46	21,1 ± 0,8	19,9 ± 0,6
47	21,1 ± 0,8	20,4 ± 0,8
48	19,2 ± 1,6	23,2 ± 0,8
49	19,2 ± 1,6	23,2 ± 0,8
50	19,2 ± 1,6	23,2 ± 0,8
51	19,2 ± 0,9	19,9 ± 1,2
52	19,2 ± 0,9	19,9 ± 1,2
53	19,2 ± 0,9	19,9 ± 1,2
54	19,2 ± 0,9	19,9 ± 1,2
55	21,6 ± 1,3	22,4 ± 1,0
56	21,6 ± 1,3	22,4 ± 1,0
57	21,6 ± 1,3	22,4 ± 1,0
58	20,4 ± 0,6	20,9 ± 0,8
59	20,4 ± 0,6	20,9 ± 0,8
60	20,4 ± 0,6	20,9 ± 0,8

continua

Figura 4. Consumo de ração (g) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão; \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t. (continuação).

Dias de vida	Controle (n=15)	Experimental (n=15)
61	20,8 ± 0,5	20,9 ± 0,8
62	22,7 ± 0,6	23,9 ± 0,9
63	22,7 ± 0,6	23,9 ± 0,9
64	22,7 ± 0,6	23,9 ± 0,9
65	22,7 ± 0,6	22,0 ± 0,6
66	22,9 ± 0,6	22,0 ± 0,6
67	22,9 ± 0,6	22,0 ± 0,6
68	22,9 ± 0,6	22,0 ± 0,6
69	22,9 ± 0,6	22,0 ± 0,6

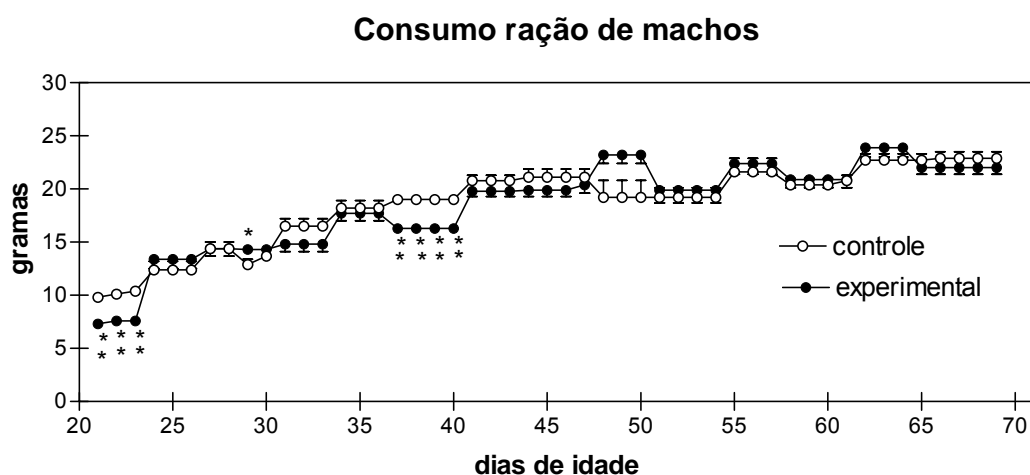


Figura 11. Consumo de ração (g) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t.



A Tabela 5 e a Figura 12 mostram o consumo de água de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que houve redução no consumo de água das ratas nos dias de vida 21 (t=15,999; p=0,0001), 22 (t=4,200; p=0,0002), 42 (t=2,194; p=0,0367), 47 (t=2,275; p=0,0308), 55 (t=2,068; p=0,0480), 59 (t=3,149; p=0,0039), 60 (t=3,149; p=0,0039), 61 (t=2,807; p=0,0090), 62 (t=3,292; p=0,0027), 63 (t=2,641; p=0,0134), 64 (t=2,641; p=0,0134), 65 (t=2,077; p=0,0471), 66 (t=2,077; p=0,0471), 67 (t=2,077; p=0,0471), 68 (t=2,077; p=0,0471) e 69 (t=2,077; p=0,0471) e aumentou o consumo de água nos dias de vida 23 (t=3,242; p=0,0031), 24 (t=3,242; p=0,0031), 25 (t=3,242; p=0,0031), 26 (t=3,242; p=0,0031), 33 (t=2,496; p=0,0187), 34 (t=2,230; p=0,0339), 35 (t=2,230; p=0,0339) e 36 (t=2,230; p=0,0339), quando comparados com aqueles do grupo controle.

Tabela 5. Consumo de água (ml) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t.

<b>Dias de vida</b>	<b>Controle (n=15)</b>	<b>Experimental (n=15)</b>
21	12,7 ± 0,2	8,0 ± 0,6**
22	16,7 ± 0,4	14,0 ± 0,4**
23	19,5 ± 1,1	25,2 ± 1,3**
24	19,5 ± 1,1	25,2 ± 1,3**
25	19,5 ± 1,1	25,2 ± 1,3**
26	19,5 ± 1,1	25,2 ± 1,3**
27	20,1 ± 1,2	22,4 ± 1,2

continua

Tabela 5. Consumo de água (ml) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t. (continuação).

Dias de vida	Controle (n=15)	Experimental (n=15)
28	20,1 ± 1,2	22,4 ± 1,2
29	20,1 ± 1,2	22,4 ± 1,2
30	20,0 ± 0,7	21,3 ± 0,8
31	20,0 ± 0,7	21,3 ± 0,8
32	20,0 ± 0,7	21,3 ± 0,8
33	22,3 ± 1,0	25,6 ± 0,8*
34	22,8 ± 0,8	25,6 ± 0,8*
35	22,8 ± 0,8	25,6 ± 0,8*
36	22,8 ± 0,8	25,6 ± 0,8*
37	32,3 ± 2,4	30,5 ± 1,3
38	32,3 ± 2,4	30,5 ± 1,3
39	32,3 ± 2,4	30,5 ± 1,3
40	32,3 ± 2,4	30,5 ± 1,3
41	32,2 ± 2,5	30,5 ± 1,3
42	25,1 ± 2,2	19,7 ± 1,0*
43	25,1 ± 2,2	19,7 ± 1,0*
44	25,3 ± 2,2	19,7 ± 1,0*
45	29,4 ± 2,3	23,3 ± 1,3*
46	29,4 ± 2,3	23,3 ± 1,3*
47	29,4 ± 2,3	23,3 ± 1,3*
48	25,6 ± 2,7	23,3 ± 1,3
49	21,5 ± 1,6	22,3 ± 1,3
50	23,5 ± 1,4	22,3 ± 1,3
51	23,8 ± 1,6	22,3 ± 1,3
52	26,0 ± 1,9	22,8 ± 1,3
53	26,0 ± 1,9	22,8 ± 1,3
54	26,7 ± 2,1	22,8 ± 1,3
55	27,7 ± 1,9	22,8 ± 1,3*
56	29,7 ± 2,3	25,5 ± 1,6
57	29,7 ± 2,3	25,5 ± 1,6
58	29,4 ± 2,3	25,5 ± 1,6
59	33,8 ± 2,3	25,6 ± 1,1**
60	33,8 ± 2,3	25,6 ± 1,1**
61	32,9 ± 2,3	25,6 ± 1,1**
62	33,7 ± 2,1	25,6 ± 1,1**
63	26,8 ± 1,1	23,4 ± 0,6*
64	26,8 ± 1,1	23,4 ± 0,6*
65	26,0 ± 1,0	23,4 ± 0,6*

continua

Tabela 5. Consumo de água (ml) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t. (continuação).

Dias de vida	Controle (n=15)	Experimental (n=15)
66	26,0 ± 1,0	23,4 ± 0,6*
67	26,0 ± 1,0	23,4 ± 0,6*
68	16,0 ± 1,0	23,4 ± 0,6*
69	26,0 ± 1,0	23,4 ± 0,6*

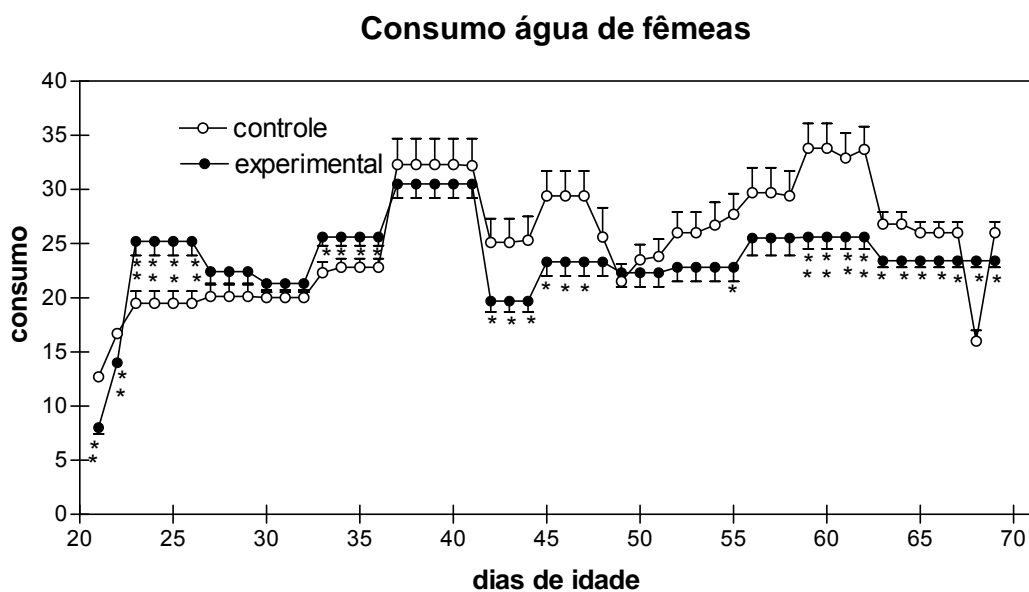


Figura 12. Consumo de água (ml) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t.

A Tabela 6 e a Figura 13 mostram o consumo de água de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que houve redução no consumo de água dos ratos nos dias de vida 21 (t=4,385; p=0,0001), 37 (t=2,823; p=0,0087), 38 (t=2,823; p=0,0087), 39 (t=2,823; p=0,0087), 40 (t=2,823; p=0,0087), 41 (t=2,496; p=0,0187), 42 (t=2,496; p=0,0187) e 43 (t=2,336; p=0,0269), quando comparados com aqueles do grupo controle.

Tabela 6. Consumo de água (ml) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t.

Dias de vida	Controle	Experimental
21	10,7 ± 0,7	7,3 ± 0,2**
22	16,7 ± 0,6	16,6 ± 0,6
23	16,7 ± 0,6	16,6 ± 0,6
24	16,7 ± 0,6	16,6 ± 0,6
25	16,7 ± 0,6	16,6 ± 0,6
26	14,5 ± 0,8	15,9 ± 0,9
27	15,6 ± 1,2	15,9 ± 0,9
28	15,6 ± 1,2	15,9 ± 0,9
29	15,6 ± 1,2	15,9 ± 0,9
30	20,9 ± 0,8	18,9 ± 0,7
31	20,9 ± 0,8	18,9 ± 0,7
32	20,9 ± 0,8	18,9 ± 0,7
33	23,4 ± 1,1	23,1 ± 0,5
34	24,5 ± 1,6	23,1 ± 0,5
35	24,5 ± 1,6	23,1 ± 0,5
36	24,5 ± 1,6	22,4 ± 0,6
37	31,6 ± 1,5	26,0 ± 1,2**
38	31,6 ± 1,5	26,0 ± 1,2**
39	31,6 ± 1,5	26,0 ± 1,2**

continua

Tabela 6. Consumo de água (ml) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t. (continuação).

<b>Dias de vida</b>	<b>Controle</b>	<b>Experimental</b>
40	31,6 ± 1,5	26,0 ± 1,2**
41	29,6 ± 3,0	21,7 ± 0,6*
42	29,6 ± 3,0	21,7 ± 0,6*
43	29,6 ± 3,0	22,2 ± 0,7*
44	29,9 ± 1,1	27,2 ± 0,8
45	29,9 ± 1,1	27,2 ± 0,8
46	29,9 ± 1,1	27,2 ± 0,8
47	29,9 ± 1,1	27,2 ± 0,8
48	25,9 ± 2,1	25,1 ± 1,1
49	25,9 ± 2,1	25,1 ± 1,1
50	28,2 ± 1,8	25,1 ± 1,1
51	25,7 ± 1,8	25,5 ± 1,7
52	25,7 ± 1,8	25,5 ± 1,7
53	25,7 ± 1,8	25,5 ± 1,7
54	25,7 ± 1,8	25,5 ± 1,7
55	26,4 ± 1,7	27,8 ± 1,2
56	26,4 ± 1,7	27,8 ± 1,2
57	26,4 ± 1,7	27,8 ± 1,2
58	29,9 ± 1,1	28,9 ± 0,8
59	29,9 ± 1,1	28,9 ± 0,8
60	29,9 ± 1,1	28,9 ± 0,8
61	29,6 ± 1,3	28,9 ± 0,8
62	30,3 ± 1,4	28,0 ± 1,1
63	30,3 ± 1,4	28,0 ± 1,1
64	30,3 ± 1,4	28,0 ± 1,1
65	29,7 ± 1,2	30,8 ± 1,0
66	28,6 ± 1,2	30,8 ± 1,0
67	28,6 ± 1,2	30,8 ± 1,0
68	28,6 ± 1,2	30,8 ± 1,0
69	28,6 ± 1,2	30,8 ± 1,0

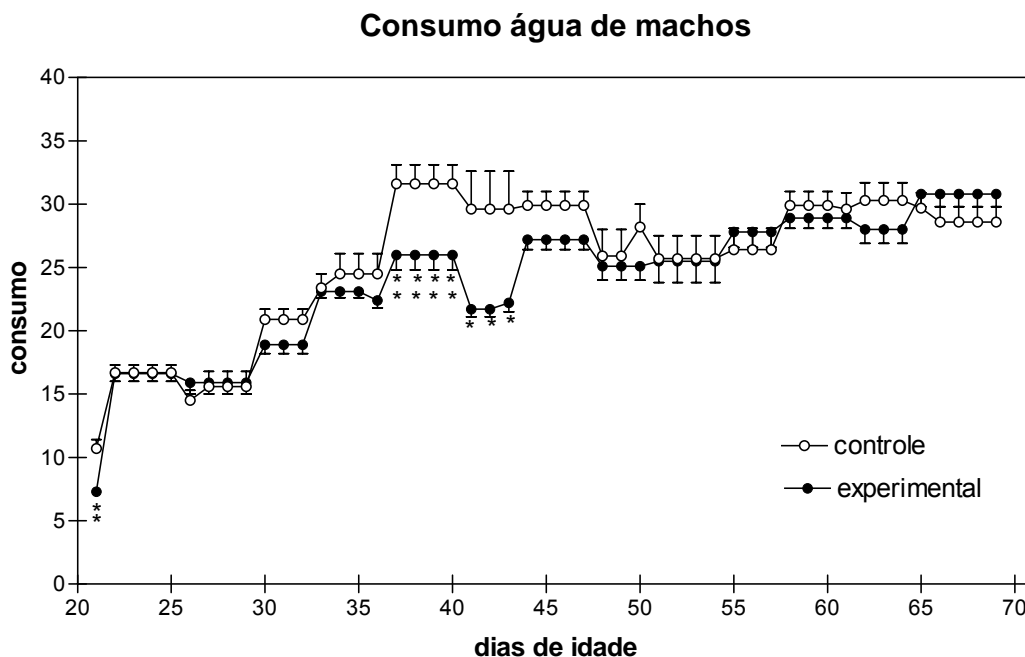


Figura 13. Consumo de água (ml) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , teste t.

A Tabela 7 e a Figura 14 mostram o peso (g) do órgão e peso relativo (peso do órgão  $\div$  peso corpóreo  $\times$  100) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que houve redução no peso relativo do coração ( $t=2,154$ ;  $p=0,0400$ ), do ovário esquerdo ( $t=2,149$ ;  $p=0,0404$ ) e do pulmão ( $t=2,333$ ;  $p=0,0270$ ), quando comparados com aqueles do grupo controle.

Tabela 7. Peso (g) do órgão e peso relativo (peso do órgão ÷ peso corpóreo x 100) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* (E) a 10% ou apenas ração (C). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* p<0,05, teste t.

Órgãos	Peso de órgãos		Peso Relativo	
	C	E	C	E
Adrenal	0,05 ± 0,002	0,04 ± 0,002	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,010
Baço	0,61 ± 0,018	0,59 ± 0,022	0,27 ± 0,006	0,26 ± 0,006
Coração	0,83 ± 0,017	0,82 ± 0,017	0,38 ± 0,007	0,36 ± 0,004*
Fígado	8,58 ± 0,190	8,54 ± 0,190	3,96 ± 0,090	3,73 ± 0,090
Ovário esquerdo	0,06 ± 0,001	0,06 ± 0,003	0,03 ± 0,001	0,02 ± 0,001*
Ovário direito	0,06 ± 0,002	0,06 ± 0,003	0,03 ± 0,002	0,02 ± 0,001
Pâncreas	0,90 ± 0,030	0,91 ± 0,030	0,42 ± 0,017	0,39 ± 0,009
Pulmão	1,33 ± 0,020	1,38 ± 0,060	0,63 ± 0,020	0,58 ± 0,010*
Rim	0,84 ± 0,020	0,80 ± 0,020	0,37 ± 0,009	0,36 ± 0,007
Timo	0,48 ± 0,020	0,44 ± 0,010	0,20 ± 0,006	0,20 ± 0,006
Útero	0,51 ± 0,040	0,46 ± 0,030	0,21 ± 0,010	0,22 ± 0,020

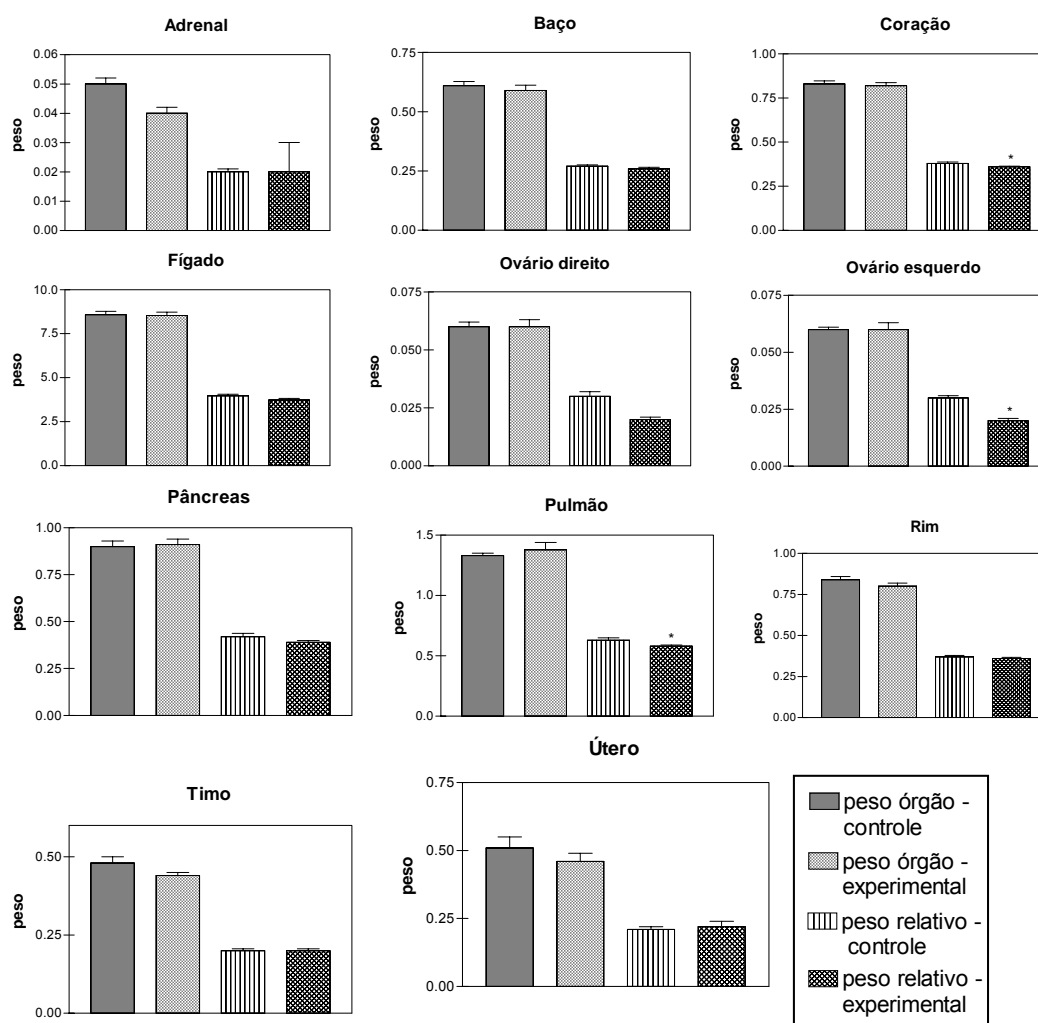


Figura 14. Peso (g) do órgão e peso relativo (peso do órgão  $\div$  peso corpóreo  $\times$  100) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21<sup>o</sup> ao 70<sup>o</sup> dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*  $p < 0,05$ , teste t.



A Tabela 8 e a Figura 15 mostram o peso (g) do órgão e peso relativo (peso do órgão ÷ peso corpóreo x 100) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que houve redução no peso dos seguintes órgãos: adrenal (t=3,040; p=0,0051), baço (t=4,629; p=0,0001), coração (t=2,068; p=0,0480), rim (t=4,011; p=0,0004) e timo (t=2,841; p=0,0083). Em relação ao peso relativo houve redução no peso da adrenal (t=2,269; p=0,0312) e aumento no peso do coração (t=2,593; p=0,0150), do epidídimo direito (t=3,350; p=0,0023), do epidídimo esquerdo (t=3,621; p=0,0011), do pulmão (t=2,702; p=0,0116), da vesícula seminal (t=2,420; p=0,0222), do testículo direito (t=5,444; p=0,0001) e do testículo esquerdo (t=5,796; p=0,0001), quando comparados com aqueles do grupo controle.

Tabela 8. Peso (g) do órgão e peso relativo (peso do órgão ÷ peso corpóreo x 100) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) ) ração contendo *Solanum lycocarpum* (E) a 10% ou apenas ração (C). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \* p<0,05 e \*\* p<0,01, teste t.

Órgãos	Peso de órgãos		Peso Relativo	
	C	E	C	E
Adrenal	0,04 ± 0,003	0,02 ± 0,002**	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001*
Baço	0,78 ± 0,010	0,65 ± 0,020**	0,23 ± 0,010	0,23 ± 0,010
Coração	1,15 ± 0,020	1,10 ± 0,030*	0,33 ± 0,010	0,40 ± 0,010*
Fígado	13,3 ± 0,460	11,9 ± 0,520	4,00 ± 0,100	4,11 ± 0,140
Epidídimo esquerdo	0,55 ± 0,020	0,52 ± 0,010	0,15 ± 0,004	0,20 ± 0,006**
Epidídimo direito	0,54 ± 0,020	0,53 ± 0,020	0,16 ± 0,004	0,20 ± 0,005**
Pâncreas	1,05 ± 0,100	1,00 ± 0,040	0,31 ± 0,020	0,33 ± 0,013
Pulmão	1,75 ± 0,100	1,65 ± 0,100	0,51 ± 0,014	0,60 ± 0,020*
Rim	1,14 ± 0,030	1,00 ± 0,030**	0,33 ± 0,010	0,34 ± 0,010
Timo	0,70 ± 0,040	0,53 ± 0,030**	0,20 ± 0,011	0,20 ± 0,011
Vesícula seminal	1,70 ± 0,030	1,70 ± 0,030	0,25 ± 0,020	0,30 ± 0,011*
Testículo esquerdo	1,70 ± 0,070	1,70 ± 0,030	0,51 ± 0,010	0,60 ± 0,013**
Testículo direito	0,85 ± 0,070	0,85 ± 0,040	0,51 ± 0,010	0,60 ± 0,014**

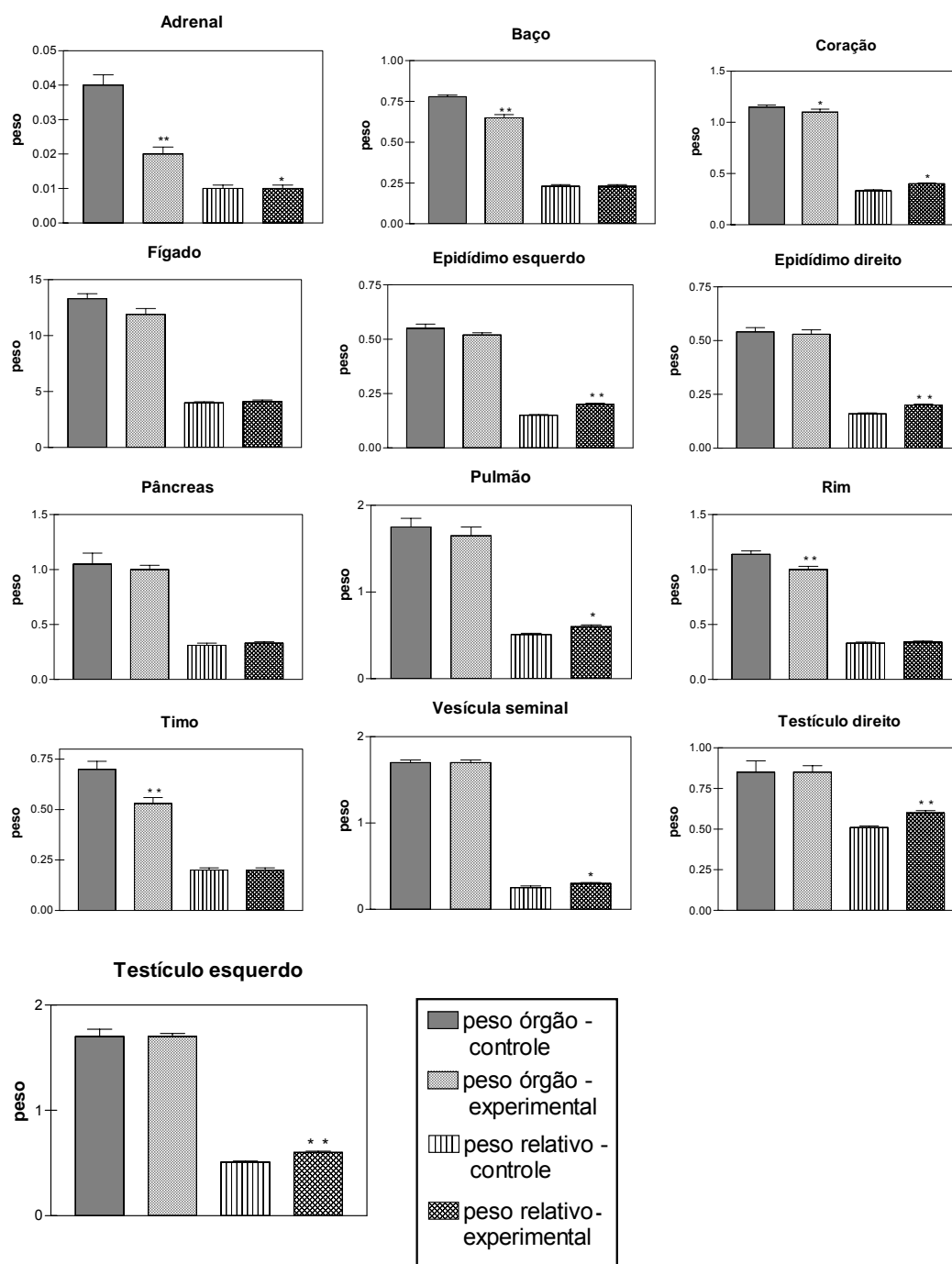


Figura 15. Peso (g) do órgão e peso relativo (peso do órgão ÷ peso corpóreo x 100) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*p<0,05 e \*\*p<0,01, teste t.

A Tabela 9 mostra os valores das médias e erros-padrão da contagem total de hemácias, de leucócitos, da concentração de hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o hematócrito (HCT) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que não houve alterações no hemograma, quando comparados com aqueles do grupo controle.

Tabela 9. Valores das médias e erros-padrão da contagem total de hemácias, de leucócitos, da concentração de hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o hematócrito (HCT) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle).  $p > 0,05$ , teste t.

Parâmetros	Controle (N=15)	Experimental (N=15)
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	$6,21 \pm 0,2$	$6,01 \pm 0,1$
Leucócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	$3,96 \pm 0,2$	$4,39 \pm 0,2$
Hemoglobina (g/dl)	$14,4 \pm 0,4$	$15,1 \pm 0,2$
VCM (fl)	$84,4 \pm 1,1$	$83,2 \pm 1,1$
HCM (pg)	$23,5 \pm 1,2$	$25,1 \pm 0,5$
CHCM(%)	$28,0 \pm 2,0$	$30,3 \pm 1,0$
HCT	$52,5 \pm 2,0$	$50,1 \pm 1,3$

A Tabela 10 mostra os valores das médias e erros-padrão da contagem total de hemácias, de leucócitos (WBC), da concentração de hemoglobina (HGB), do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o hematócrito (HCT) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que houve redução no volume corpuscular médio ( $t=2,185$ ;  $p=0,0424$ ), quando comparados com aqueles do grupo controle.

Tabela 10. Valores das médias e erros-padrão da contagem total de hemácias, de leucócitos, da concentração de hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o hematócrito (HCT) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). \*  $p<0,05$ , teste t.

Parâmetros	Controle (N=15)	Experimental (N=15)
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	$7,06 \pm 0,2$	$7,13 \pm 0,2$
Leucócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	$5,90 \pm 0,4$	$4,87 \pm 0,3$
Hemoglobina (g/dl)	$15,8 \pm 0,2$	$15,5 \pm 0,3$
VCM (fl)	$79,9 \pm 1,2$	$76,8 \pm 1,0^*$
HCM (pg)	$22,5 \pm 0,4$	$21,8 \pm 0,3$
CHCM(%)	$28,2 \pm 0,5$	$28,5 \pm 0,3$
HCT	$56,4 \pm 2,0$	$54,7 \pm 1,3$

A Tabela 11 mostra os níveis séricos de albumina (g/dl); colesterol (mg/dl); creatinina (mg/dl); glicose (mg/dl); proteínas totais (g/dl) e triglicerídeos (mg/dl) de ratos machos e fêmeas, que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se, nas fêmeas, redução dos níveis séricos de Triglicerídeos ( $t=2,82$ ;  $p=0,0094$ ) (Figura 16) e nos machos uma redução nos níveis séricos de proteínas totais ( $t=5,95$ ;  $p=0,50$ ) e Triglicerídeos ( $t=2,34$ ;  $p<0,0001$ ) e um aumento dos níveis séricos de Albumina ( $t=2,82$ ;  $p=0,23$ ) e AST ( $t=2,50$ ;  $p=0,35$ ) (Figura 17), quando comparados com aqueles do grupo controle. Não foram observadas alterações nos demais parâmetros avaliados.

Tabela 11. Níveis séricos de albumina (g/dl); ALT (alanina amino transferase -U/L); AST (aspartato amino transferase - U/L); colesterol (mg/dl); creatinina (mg/dl); glicose (mg/dl); proteínas totais (g/dl) e triglicerídeos (mg/dl) de ratos machos e fêmeas, que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão. \*p<0,05 e \*\*p<0,01, teste t.

	Fêmeas		Machos	
	Controle n=15	Experimental n=15	Controle n=15	Experimental n=15
Albumina	4,15 ± 0,10	4,02 ± 0,10	4,31 ± 0,20	5,00 ± 0,15**
ALT	114,4 ± 3,01	120,6 ± 5,00	63,5 ± 3,11	68,4 ± 3,14
AST	380,0 ± 15,13	376,50 ± 13,62	318,25 ± 29,24	427,0 ± 32,46*
Colesterol	168,6 ± 14,00	201,2 ± 14,20	151,7 ± 12,61	157,0 ± 11,80
Creatinina	0,71 ± 0,02	0,70 ± 0,02	0,80 ± 0,04	0,76 ± 0,03
Glicose	112,2 ± 7,00	101,1 ± 6,00	94,7 ± 4,80	90,0 ± 4,83
Proteínas Totais	6,6 ± 0,14	6,4 ± 0,20	6,4 ± 0,25	5,6 ± 0,24*
Triglicerídeos	164,70 ± 11,10	129,51 ± 5,80**	189,70 ± 25,10	129,51 ± 6,00*

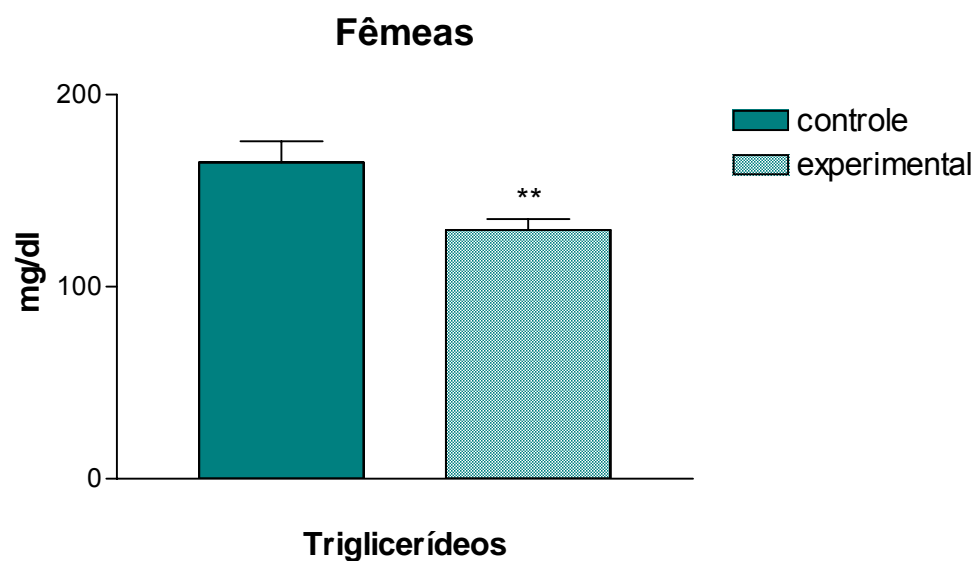


Figura 16. Níveis séricos de Triglicerídeos (mg/dl) de fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*\* $p < 0,01$  teste t.



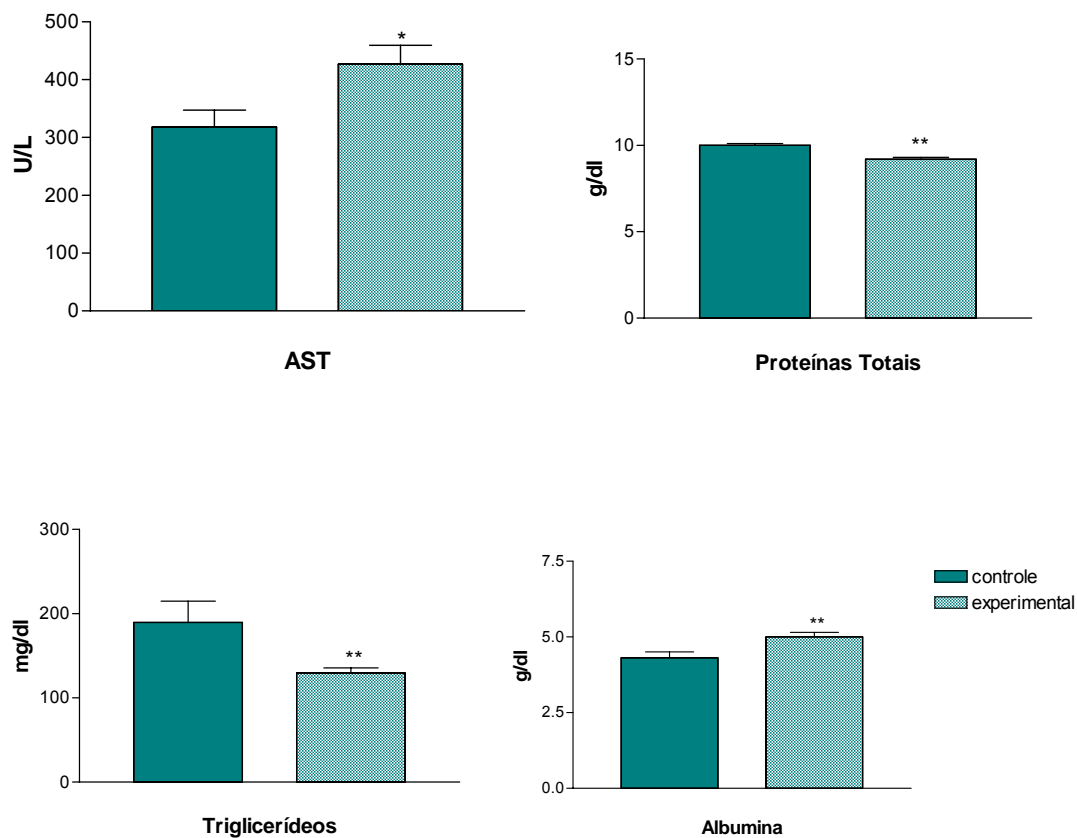


Figura 17. Níveis séricos de Albumina (g/dl), AST (U/L), Proteínas Totais (g/dl) e Triglicerídeos de machos que receberam durante o período da puberdade (21<sup>o</sup> ao 70<sup>o</sup> dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*p<0,05 e \*\*p<0,01, teste t.

A Tabela 12 mostra o número de dias em cada fase do ciclo estral e o intervalo entre ciclos, avaliados durante 15 dias, em ratas que receberam durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que não houve alterações entre os grupos.

Tabela 12. Número de dias em cada fase do ciclo estral e intervalo entre ciclos, avaliados durante 15 dias, em ratas que receberam durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão;  $p > 0,05$ , teste t.

Fase do ciclo estral	Controle (n=15)	Experimental (n=15)
Pró-estro	3,93 ± 0,20	4,13 ± 0,20
Estro	3,60 ± 0,20	3,73 ± 0,30
Metaestro	3,70 ± 0,13	3,90 ± 0,20
Diestro	3,60 ± 0,20	3,50 ± 0,20
Intervalo entre ciclos	4,00 ± 0,14	4,00 ± 0,10

A Figura 18 mostra o comportamento sexual, avaliado pelo número de lordoses, em ratas que receberam durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) ração contendo *S. lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que não houve diferenças significantes entre os grupos.

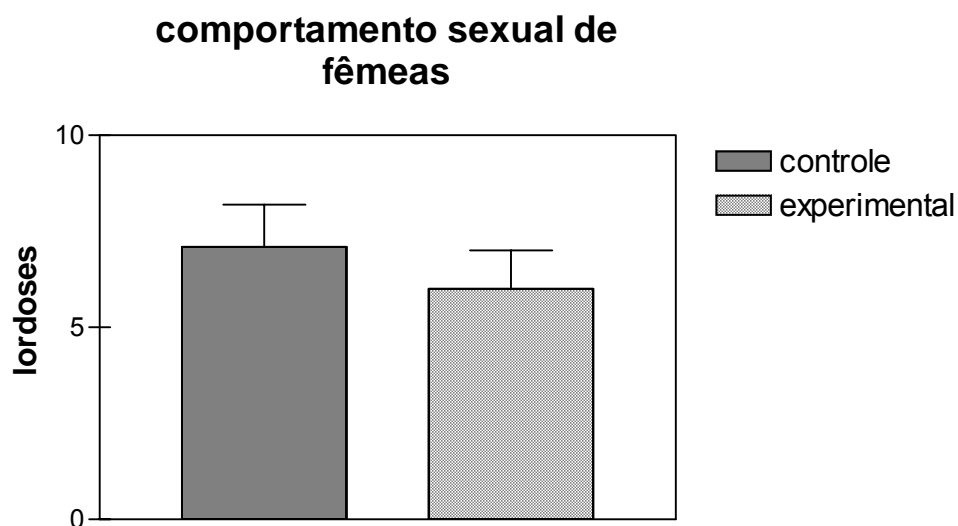


Figura 18. Comportamento sexual, avaliado pelo número de lordoses, em ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão;  $p > 0,05$ , teste t.

A Tabela 13 mostra o comportamento sexual de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) de ração contendo *S. lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que houve redução no número de montas por 10 minutos ( $t=2,547$ ;  $p=0,0166$ ), no número de montas incompletas ( $t=2,511$ ;  $p=0,0181$ ) e no número total de montas ( $t=2,311$ ;  $p=0,0284$ ) e aumento no índice de eficiência copulatória ( $t=2,113$ ;  $p=0,0437$ ), quando comparados com aqueles do grupo controle.

Tabela 13. Comportamento sexual de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão;  $p < 0,05$  teste t.

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle (N=15)</b>	<b>Experimental (N=15)</b>
Montas em 10 minutos	27,3 ± 2,4	19,6 ± 2,0*
Ejaculação aos 40 minutos	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,3
Latência 1° monta (min)	29,6 ± 6,8	69,9 ± 36,0
Latência 1° intromissão (min)	50,8 ± 10,2	81,6 ± 37,0
Latência ejaculação (min)	1311,0 ± 217,0	1460,8 ± 213,0
N° montas incompletas	23,3 ± 3,0	14,4 ± 2,1*
N° intromissão até ejaculação	39,2 ± 6,4	37,6 ± 4,0
Latência 1° monta pós-ejaculação (min)	225,4 ± 37,2	219,3 ± 37,6
N° ejaculação após 1° intromissão por 30 minutos	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2
Número total de montas	82,3 ± 6,0	66,4 ± 3,5*
Frequência de intromissão por minuto	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,2
Frequência de montas por minuto	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,2
Eficiência copulatória (%)	71,7 ± 2,8	79,6 ± 2,5*
Índice de atividade sexual	15,0 ± 0,4	14,7 ± 0,5

A Tabela 14 mostra a Orientação sexual de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que não houve diferenças entre os grupos.

Tabela 14. Orientação sexual de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e respectivos erros padrão do tempo (s) de permanência em cada área da caixa de observação;  $p > 0,05$ , teste t.

<b>Áreas</b>	<b>Controle (N=15)</b>	<b>Experimental (N=15)</b>
fêmea - área I	391,3 ± 47,3	413,5 ± 39,0
- área II	112,4 ± 12,5	99,7 ± 10,2
macho - área I	330,6 ± 34,0	365,0 ± 34,2
- área II	144,9 ± 17,1	128,6 ± 17,1

A Tabela 15 mostra a concentração média dos metabólitos de estrógeno, progesterona e testosterona fecais (ng/g de fezes) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que houve aumento apenas nos níveis dos metabólitos de progesterona nas fezes aos 50 dias de vida ( $t=2,299$ ;  $p=0,0402$ ), quando comparado com aqueles do grupo controle.

Tabela 15. Concentração média dos metabólitos de estrógeno, progesterona e testosterona fecais (ng/g de fezes) de ratas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*p<0.05, teste t.

Dias de vida	grupos	Estrógeno	Progesterona	Testosterona
30	C	37,9 ± 7,00	0,1 ± 0,02	0,7 ± 0,10
	E	24,3 ± 4,10	0,1 ± 0,01	0,7 ± 0,05
50	C	43,1 ± 3,60	0,4 ± 0,10	2,6 ± 1,00
	E	42,2 ± 10,30	0,8 ± 0,20*	3,8 ± 1,20
70	C	83,3 ± 15,50	1,1 ± 0,20	7,0 ± 2,60
	E	54,1 ± 5,00	1,2 ± 0,30	5,0 ± 2,00

A Tabela 16 mostra a concentração média dos metabólitos de estrógeno, progesterona e testosterona fecais (ng/g de fezes) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que houve redução nos níveis dos metabólitos de estrógenos nas fezes aos 30 (t=2,951; p=0,0121) e 50 (t=9,450; p=0,0001) dias de vida e também houve redução nos níveis dos metabólitos de testosterona nas fezes aos 50 (t=3,701; p=0,0030) dias de vida, enquanto os níveis dos metabólitos de progesterona nas fezes aumentou aos 30 (t=1,114; p=0,0151) e 70 (t=2,906; p=0,0132) dias de vida, quando comparados com aqueles do grupo controle.

Tabela 16. Concentração média dos metabolitos de estrógeno, progesterona e testosterona fecais (ng/g de fezes secas) de ratos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão, \*p<0.05, teste t.

Dias de vida	grupos	Estrógeno (n=7)	Progesterona (n=7)	Testosterona (n=7)
30	C	37,0 ± 4,30	0,1 ± 0,01	0,6 ± 0,06
	E	23,7 ± 1,40*	0,6 ± 0,40*	0,9 ± 0,40
50	C	37,6 ± 1,00	0,2 ± 0,03	7,3 ± 1,00
	E	26,0 ± 1,00**	0,3 ± 0,04	3,0 ± 0,50**
70	C	37,7 ± 2,30	0,1 ± 0,02	14,7 ± 3,00
	E	39,0 ± 3,00	0,2 ± 0,03*	8,7 ± 2,00

A Tabela 17 e as Figuras 19 e 20 mostram os níveis séricos dos hormônios tireoideanos T3 – triiodotironina (ng/ml) e T4 – tiroxina (µg/ml) de ratos machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* (E) a 10% ou apenas ração (C). Assim, nota-se que não houve alterações nos níveis séricos dos hormônios tireoideanos tanto de ratos machos como das fêmeas.

Tabela 17. Níveis séricos dos hormônios tireoideanos T3 (triiodotironina - ng/ml) e T4 (tiroxina -  $\mu\text{g/ml}$ ) de ratos machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão.  $P>0,05$ , teste t.

Grupos	n	T3 (ng/ml)	T4 ( $\mu\text{g/ml}$ )
Fêmeas controle	5	73,5 $\pm$ 8,33	3,5 $\pm$ 0,46
Fêmeas experimentais	5	66,9 $\pm$ 2,33	3,2 $\pm$ 0,24
Machos controle	5	68,0 $\pm$ 1,50	4,7 $\pm$ 0,34
Machos experimentais	5	65,3 $\pm$ 4,00	3,9 $\pm$ 0,20

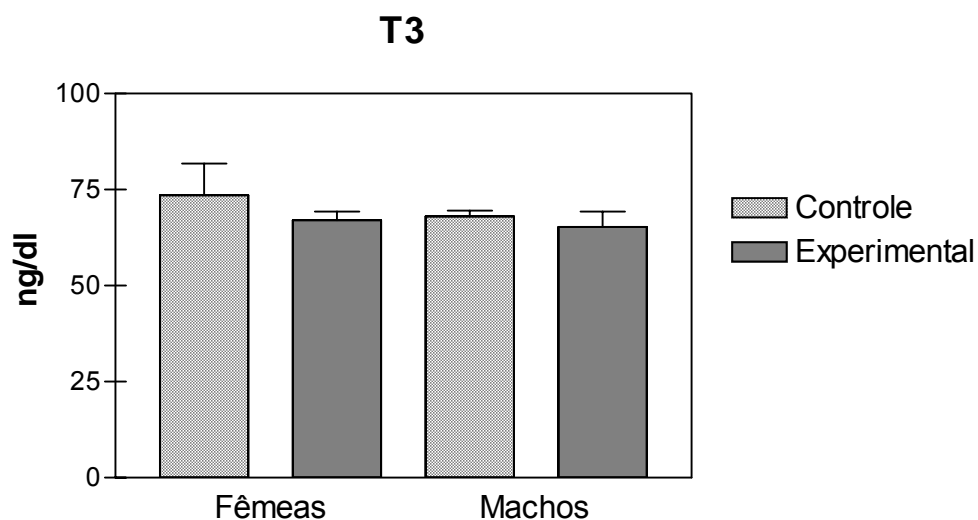


Figura 19. Níveis séricos dos hormônios tireoideanos T3 (triiodotironina - ng/ml) de ratos machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão.  $p>0,05$ , teste t.



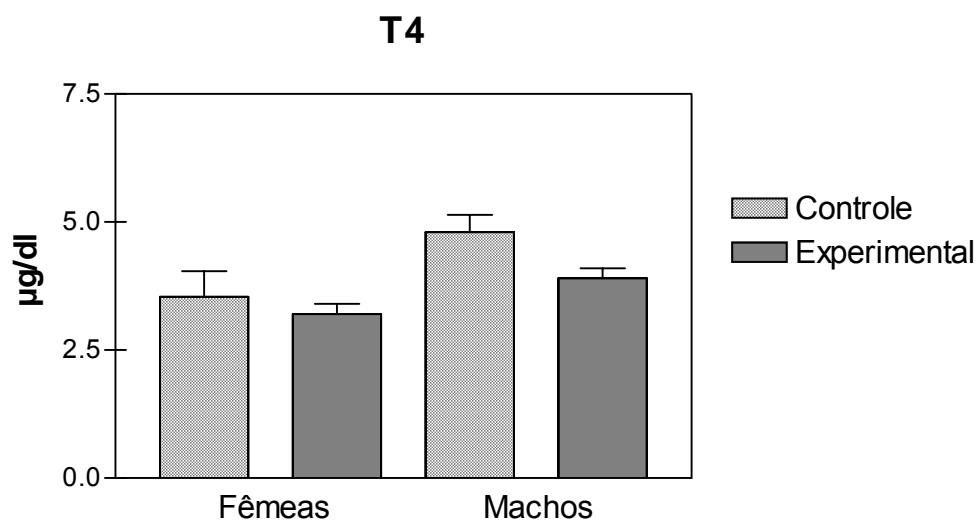


Figura 20. Níveis séricos dos hormônios tireoideanos T4 (tiroxina - µg/ml) de ratos machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão.  $p > 0,05$ , teste t.

A Tabela 18 e as figuras 21 e 22 mostram os níveis estriatais (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* (E) a 10% ou apenas ração (C). Assim, nota-se aumento nos níveis estriatais de NOR ( $t=2,89$  e  $p=0,06$ ), DA ( $t=3,37$  e  $p=0,11$ ), 5-HT ( $t=2,75$  e  $p=0,07$ ) e aumento nos metabólitos HVA ( $t=2,80$  e  $p=2,46$ ), DOPAC ( $t=3,81$  e  $p=0,29$ ), 5HIAA ( $t=3,61$  e  $p=0,24$ ) das fêmeas. Enquanto nos machos observou-se apenas redução nos níveis estriatais de NOR ( $t=3,84$  e  $p=0,11$ ).

Tabela 18. Níveis estriatais (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , teste t

Neurotransm. e metabólitos	Fêmeas		Machos	
	Controle n=7	Experimental n=7	Controle n=7	Experimental n=7
NOR	9,80 ± 2,00	22,01 ± 3,80*	46,00 ± 6,50	17,00 ± 4,00**
DA	3371,7 ± 303,5	5363 ± 507,0**	3743,60 ± 555,5	3745,40 ± 564,45
5-HT	112,50 ± 18,80	222,81 ± 35,41*	278,00 ± 59,00	157,00 ± 26,34
HVA	266,03 ± 29,33	419,05 ± 46,10*	443,10 ± 71,71	317,20 ± 50,52
VMA	21,00 ± 10,60	53,50 ± 15,13	90,12 ± 12,00	79,40 ± 10,00
DOPAC	320,13 ± 28,50	495,6 ± 36,06**	387,00 ± 59,00	344,40 ± 47,34
5-HIAA	232,20 ± 35,14	444,4 ± 47,00**	353,00 ± 35,00	269,02 ± 34,50
DHBA	255,74 ± 1,30	252,80 ± 1,00	254,00 ± 4,10	259,42 ± 2,81

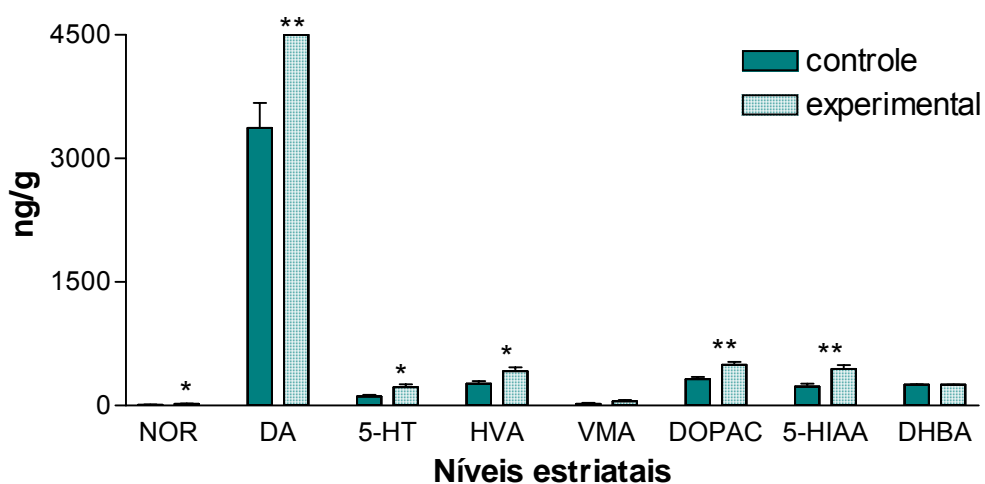


Figura 21. Níveis estriatais (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21<sup>o</sup> ao 70<sup>o</sup> dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , teste t.

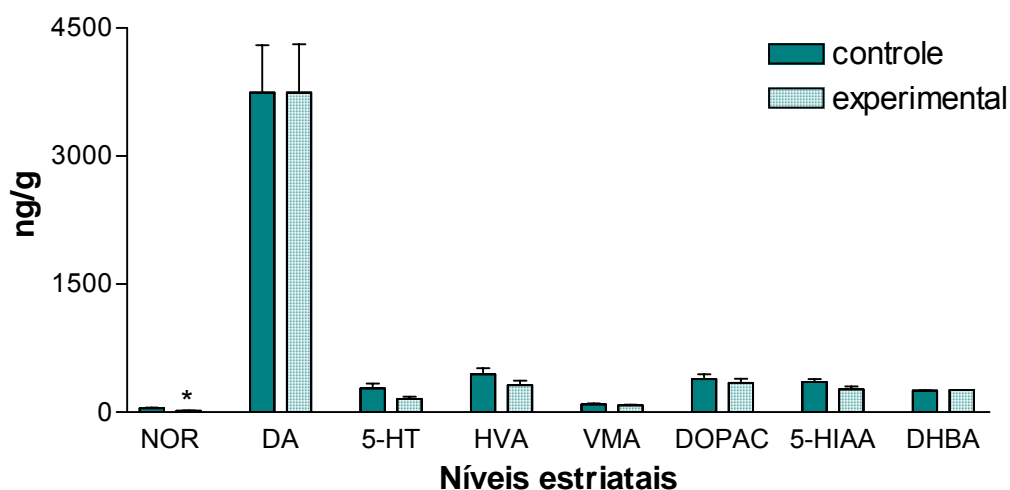


Figura 22. Níveis estriatais (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em machos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , teste t.

As Tabelas 19 e as figuras 23 e 24 mostram os níveis hipotalâmicos (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em ratos machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se que não houve alterações nos níveis hipotalâmicos tanto de ratos machos como das fêmeas.

Tabela 19. Níveis hipotalâmicos (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em machos e fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão. P>0,05, teste t

<i>Neurotransm. e metabólitos</i>	<u>Fêmeas</u>		<u>Machos</u>	
	<i>Controle</i> n=7	<i>Experimental</i> n=7	<i>Controle</i> n=7	<i>Experimental</i> n=7
NOR	527,50 ± 35,00	590,00 ± 45,14	537,00 ± 46,53	511,51 ± 41,20
DA	242,62 ± 48,60	215,00 ± 25,52	218,00 ± 24,00	161,00 ± 18,30
5-HT	541,30 ± 66,21	549,40 ± 78,00	412,42 ± 50,01	341,40 ± 54,11
HVA	28,00 ± 10,04	16,20 ± 4,20	18,51 ± 5,54	12,55 ± 4,33
VMA	12,41 ± 8,13	37,60 ± 14,00	29,00 ± 11,21	34,60 ± 13,00
DOPAC	19,65 ± 9,40	23,20 ± 7,00	31,30 ± 13,60	7,64 ± 5,42
5-HIAA	391,30 ± 40,00	417,23 ± 48,34	375,60 ± 48,00	271,13 ± 42,00
DHBA	189,60 ± 2,20	185,80 ± 0,83	184,40 ± 3,30	184,00 ± 2,16

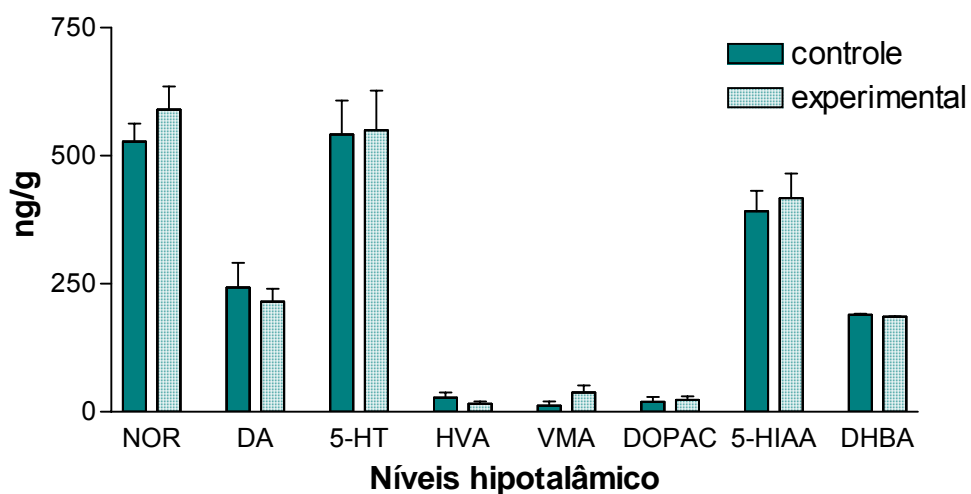


Figura 23. Níveis hipotalâmicos (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em ratos fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , teste t.

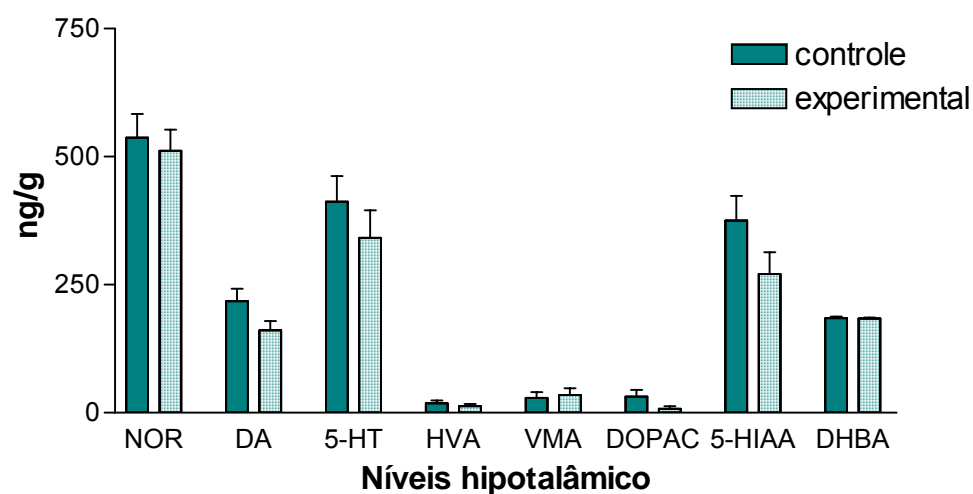


Figura 24. Níveis hipotalâmicos (ng/g) de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos DHBA, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, em ratos machos que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão.  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , teste t.

Foi feita a análise histopatológica de tecidos colhidos dos animais controle e experimental. A Figura 25 mostra cortes histológicos dos ovários de ratas adultas que receberam durante o período da puberdade (21° ao 70° dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). Assim, nota-se presença de cistos foliculares com aumento do colóide.

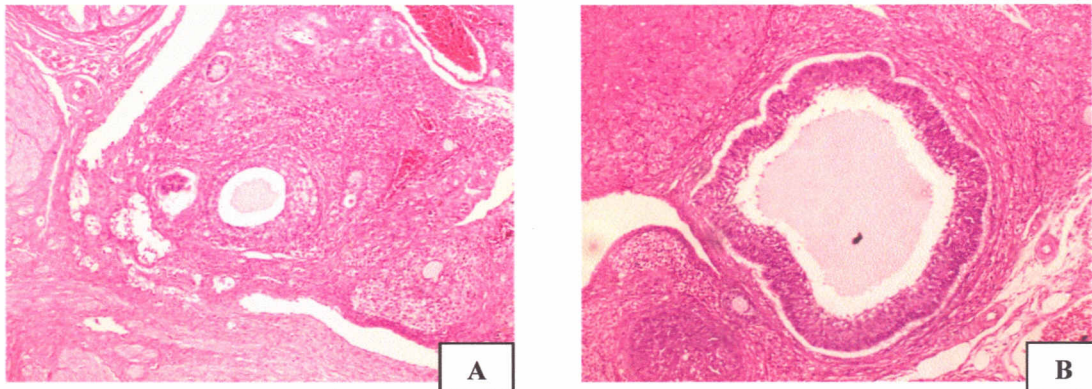


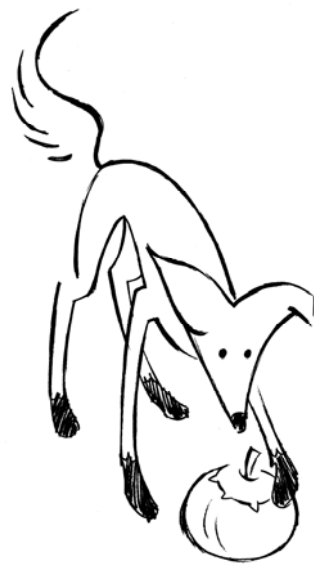
Figura 25. Fotomicrografia dos ovários de fêmeas adultas controle (A) e experimental (B) mostrando cisto folicular com aumento do colóide (HE, 10x).

A Tabela 20 mostra a avaliação morfométrica dos folículos ovarianos de fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* (E) a 10% ou apenas ração (C). Assim, nota-se que não houve alterações no tamanho dos folículos ovarianos quando comparados com o grupo controle.

Tabela 20. Avaliação morfométrica dos folículos ovarianos ( $\mu\text{mm}$ ) de fêmeas que receberam durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) ração contendo *Solanum lycocarpum* a 10% ou apenas ração (controle). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão (n=05/grupo).  $p > 0,05$ , teste t

	Área Total	Área Menor
controle	178613.98 $\pm$ 112384	343.021 $\pm$ 220.64
experimental	226347.10 $\pm$ 115383	454.340 $\pm$ 129.31





**DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

Num estudo feito sobre a presença dos princípios ativos presentes nos frutos da *S. lycocarpum* observou-se que estes apresentam 1,87% de alcalóides totais, sendo que 0,6% corresponde ao glicoalcalóide solamargina e 0,9% ao glicoalcalóide solasonina (SCHWARZ et al., 2004). Estes glicoalcalóides esteroidais presentes na planta podem ser, portanto, responsáveis pelos efeitos observados nos animais expostos a planta no presente experimento.

Os efeitos tóxicos de uma substância química no organismo de um animal podem ser avaliados pelo exame físico diário, peso corporal e de órgãos, avaliação do consumo de água e de comida, exames hematológicos, provas bioquímicas da função de órgãos/tecidos, estudos anatomopatológicos, dentre outros. Neste estudo estes parâmetros foram usados para avaliar a toxicidade da *S. lycocarpum* administrada, em ratos machos e fêmeas, durante a puberdade.

O peso corporal é um dos parâmetros mais empregados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento, muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal. No presente estudo, a administração durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) de ração contendo *S. lycocarpum* causou, em fêmeas, redução de peso corpóreo apenas nos últimos dias de tratamento (dias 61º ao 70º), sendo acompanhado também por redução do consumo de ração (65º ao 69º) e de água (59º ao 69º); deve ser ressaltado também que foram detectadas flutuações no consumo de água e ração em outros dias de

exposição à planta, porém não foram acompanhados de alterações no peso corpóreo das fêmeas.

Em machos, a administração durante o período da puberdade (21º ao 70º dias de vida) de ração contendo *S. lycocarpum* causou redução no peso corpóreo já a partir do 23º dia de vida (exceto no dia 27) e este efeito não foi acompanhado de maneira consistente com a redução do consumo de ração e de água (Tabela 4 - redução no consumo de ração entre os dias 21 a 23 e do dia 37 ao 40 e aumento do consumo no dia 29; e Tabela 6 - redução do consumo de água no dia 21 e do dia 37 ao 43). Estes achados sugerem que a exposição a *S. lycocarpum* causou efeito tóxico, caracterizado pela redução do peso corpóreo, de maneira mais evidente em machos do que em fêmeas. Esta redução do peso não pode ser atribuída exclusivamente à redução do consumo de ração e de água, pois estes sofreram oscilações durante o experimento. A falta de desenvolvimento muscular dos machos, causada pela presença de glicoalcalóides esteroidais na *S. lycocarpum*, e a pouca formação de tecido adiposo (notada durante a necrópsia e também pela pele frouxa quando da contenção do animal) nestes animais expostos à planta pode ser a causa da redução do peso corpóreo. Acrescente-se, ainda, que a testosterona é um dos hormônios responsável pelo desenvolvimento da massa muscular (LUKE, 1994) e no presente experimento foi observado redução dos níveis de metabólitos de testosterona nas fezes dos animais tratados (Tabela 16), fato que pode ter contribuído para a redução do desenvolvimento muscular dos machos.

Em relação ao peso e peso relativo dos órgãos dos animais que receberam a ração contendo *S. lycocarpum*, observou-se nas fêmeas redução apenas no peso relativo do coração, do ovário esquerdo e do pulmão. Nos machos, houve redução no peso da adrenal, baço, coração, rim e timo, enquanto o peso relativo dos órgãos reduziu apenas na adrenal e aumentou o peso do coração, dos epidídimos direito e esquerdo, do pulmão, da vesícula seminal e dos testículos direito e esquerdo. Estes resultados podem ser atribuídos aos efeitos tóxicos produzidos pela planta tanto em fêmeas como em machos e o aumento relativo dos órgãos dos machos pode ser consequência da redução do peso corpóreo, que foi mais evidente nos machos quando comparado com as fêmeas. Por outro lado, o aumento do peso relativo de órgãos do sistema reprodutor (epidídimos, vesícula seminal e testículos) pode indicar um efeito hormonal dos princípios ativos presentes na planta sobre estes tecidos (THOMAS et. al., 1989). No entanto, a avaliação histopatológica dos órgãos do sistema reprodutor dos machos não apresentou nenhuma alteração.

A avaliação do hemograma tanto das fêmeas como dos machos (exceto o VCM – Tabela 10) expostos à planta não mostraram diferenças em relação aos animais do grupo controle. Por outro lado, foram observadas reduções dos níveis plasmáticos de triglicérides, tanto em fêmeas como em machos, e nos níveis de proteínas totais de machos expostos a planta; observou-se também aumento dos níveis de AST e de albumina apenas em machos do grupo experimental.

Uma das principais funções do fígado no metabolismo de lipídios consiste em sintetizar triglicerídeos principalmente a partir dos carboidratos e, em menor grau, a partir das proteínas (GUYTON & HALL, 2002). A redução nos níveis plasmáticos de triglicerídeos encontrada tanto em fêmeas como em machos expostos à planta pode indicar algum transtorno no metabolismo hepático dos lipídeos, porém de pequena relevância, uma vez que não houve alteração nos níveis de colesterol, outro importante lipídeo sintetizado no fígado. O mesmo pode ser dito em relação à redução nos níveis plasmáticos de proteínas totais e aumento nos níveis de albumina encontrados nos machos expostos à planta, pois albumina, juntamente com as globulinas, constituem as principais proteínas séricas, fazendo com que a redução nos níveis de uma, aumente o valor relativo da outra. Ou ainda, há a possibilidade de ter ocorrido redução nos níveis séricos de globulinas; porém esta hipótese não parece provável, uma vez que reduziria a resposta imune do animal e, assim, comprometendo sua saúde (aumentando a morbidade), fato não observado neste estudo.

O aumento nos níveis plasmáticos de AST pode refletir lesões em células musculares e nos hepatócitos (MEYER et al., 1995). Portanto, no presente estudo, o aumento dos níveis de AST encontrado em machos do grupo experimental pode indicar lesões nestes tecidos. Talvez a perda da massa muscular, anteriormente citada, possa reforçar esta hipótese, contudo a lesão nas células hepáticas parece ser pouco provável, uma vez que esta deveria ser acompanhada também de aumento nos níveis de ALT, fato este não observado no presente estudo (Tabela 11). Acrescente-se, ainda, que

não foram achadas alterações histopatológicas no fígado dos animais expostos à planta. Vale ressaltar, que a avaliação histopatológica dos demais órgãos (rins, baço, linfonodos mesenquimais, timo, adrenais, coração e pulmão) não apresentaram sinais de citotoxicidade.

Estes resultados obtidos na bioquímica sérica indicaram leve toxicidade em células hepáticas e musculares, e ausência de disfunção renal, particularmente em machos expostos à planta. Estes achados corroboram aqueles referentes ao peso corpóreo e de órgãos, os quais mostraram que os efeitos tóxicos produzidos pela planta foram mais evidentes nos machos que em fêmeas.

É fato conhecido que o hipotálamo liga o sistemas nervoso central e o sistema endócrino por meio do sistema porta-hipotálamo-hipofisário, coordenando as funções das gônadas. O hipotálamo funciona como uma interface entre os sistemas nervoso e endócrino, desempenhando um papel crucial na regulação hormonal da reprodução.

A expressão dos comportamentos sexuais é influenciada por hormônios presentes na circulação, e modificações no comportamento trazem mudanças na secreção desses hormônios, afetando os comportamentos subseqüentes (HAFEZ e HAFEZ, 2004; AGMO, 1997; MCEWEN, 1981; KRISTENSEN et al., 2001; WITT et al., 1995; NORMAN e LITWACK, 1997; PRINCE et al., 1998; LOMBARDI et al., 2001; RHEES et al., 1990a; RHEES et al., 1990b; SEGOVIA et al., 1999).

O comportamento de lordose de fêmeas ocorre na presença de estradiol e progesterona (WITT et al., 1995); a área medial basal do

hipotálamo, em particular, o núcleo ventromedial hipotalâmico, mostra-se muito importante para regular e manter os efeitos dos esteróides sexuais, promovendo assim, esse comportamento (RUBIN e BARFIELD, 1980; RHEES et al., 1990<sup>a</sup>; RHEES et al., 1990b).

A *S. lycocarpum* possui glicoalcalóides esteroidais (fitoestrógenos) que são substâncias com certas similaridades estruturais com o 17 $\beta$ -estradiol, o que, presumivelmente, as permitem interagir em receptores nucleares para estrógeno em órgãos-alvo e, dessa maneira, desencadear mecanismos em processos dependentes de estrógenos, como no sistema nervoso central (em particular, na hipófise) e no sistema reprodutor de machos e fêmeas (SONNENSCHNEIN e SOTO, 1998; OSOSKI e KENNELLY, 2003; ADAMS, 1995).

Neste estudo não foi constatada nenhuma alteração no ciclo estral e no comportamento sexual das fêmeas que receberam a *S. lycocarpum* na ração. Resultados semelhantes também foram observados com a administração pré-púbere de outros fitoestrógenos a camundongos (geneistein, zearalenone, zeranol, bisfenol A e dietilestilbestrol), embora em alguns casos tenha-se observado maior duração do estro nas fêmeas (NIKAIDA et al., 2005). Além disto, as dosagens dos metabólitos dos hormônios esteroidais nas fezes das fêmeas expostas à planta, se mostraram com valores semelhantes àqueles do grupo controle, indicando que os princípios ativos da planta estariam mimetizando as ações dos hormônios sexuais, como aquela de disruptores endócrinos. Vale ressaltar, contudo, que estas últimas substâncias podem tanto mimetizar, como

bloquear ou aumentar os efeitos dos hormônios sexuais (YURINO et al., 2004; SONNENSCHNEIN e SOTO, 1998; BHATT, 2000). Embora seja descrito que os fitoestrógenos induzam estro nos animais, não são todas as plantas que demonstraram esse tipo de atividade estrogênica (OSOSKI e KENNELLY, 2003). Além disso, existem plantas como o gossipol que reduzem a ovulação e a concentração de progesterona circulante, provavelmente devido à capacidade dessas toxinas de inibir a resposta dos ovários as gonadotrofinas hipofisárias (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Na avaliação histopatológica dos ovários das fêmeas que receberam a ração contendo os frutos da *S. lycocarpum*, observou-se a presença de cistos foliculares. Sabe-se que, a falha da ovulação pode ser devida a um insucesso do folículo em ovular durante o ciclo normal ou, então, a presença de cistos do ovário. Os cistos foliculares passam por mudanças cíclicas, isto é, eles crescem e regridem alternadamente, porém não ovulam. Existem evidências de que o cisto folicular pode ser provocado por uma falha no mecanismo de liberação de LH; essa falha não é devida a uma deficiência ou liberação de GnRh, mas sim a uma insensibilidade do eixo hipotalâmico-hipofisário para níveis elevados de estradiol (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Provavelmente, os glicoalcalóides esteroidais presente na planta possam ter causado os cistos ovarianos, a semelhança do que ocorre com os níveis elevados de estradiol. Ressalte-se que ovários císticos em animais de produção são causa de falha reprodutiva e muitas vezes importante razão para descarte.



A atividade sexual dos animais compreende uma série de eventos fisiológicos com a finalidade de reprodução das espécies, sendo organizada durante a vida intra-uterina ou poucos dias após o nascimento e ativada na puberdade. O comportamento sexual é a expressão comportamental desta atividade, sendo consequência de múltiplas interações entre sinais hormonais, neurais e ambientais, mediadas por uma ampla variedade de mensageiros químicos que atuam em diferentes níveis do sistema nervoso. O período neonatal é crítico no desenvolvimento de futuras conexões receptor-hormônio no sistema nervoso central. Durante a gestação ocorre um *imprinting* hormonal em áreas específicas do sistema nervoso central, necessário para maturação do sistema do sinal de transdução (BREEDLOVE, 1997; GORSKI, 1985a; GORSKI, 1985b). Na ausência do hormônio naquele momento, a conexão receptor-hormônio pode ser alterada, causando modificações morfológicas e comportamentais. (GERARDIN et al., 2005).

Como dito, a puberdade representa o período de ativação do comportamento sexual e também neste período, fatores ambientais e neuroendócrinos podem determinar alterações no comportamento sexual. TEMPLE et al. (2003) mostram que camundongos *knockout* do receptor para estrógeno na puberdade apresentam tendência em aumentar os níveis plasmáticos de testosterona em torno do 37-45 dias de vida, aumento no número de montas incompletas, montas com intromissão e no total de montas bem como aumento nas latências para ejaculação. Os autores propõem que na puberdade o estrógeno teria papel crítico no

estabelecimento do comportamento sexual regulando não só a motivação sexual, mas também os processos ejaculatórios.

A administração da *S. lycocarpum* durante a puberdade, por sua provável ação estrogênica, promoveu efeitos contrários que aqueles reportados por esses autores no comportamento sexual masculino. De fato, foram observadas alterações neste comportamento caracterizadas por redução no número de montas nos primeiros minutos de observação, no número de montas incompletas e no número total de montas, além de aumento no índice de eficiência copulatória. Por outro lado, nenhuma alteração foi encontrada na motivação sexual dos machos expostos à planta, desde que as latências dos vários comportamentos não foram modificadas.

Estes achados indicam que os animais experimentais apresentaram facilitação neste comportamento, devido principalmente a uma melhora na potência do comportamento sexual. Neste sentido, o comportamento sexual de machos pode ser analisado por meio de dois componentes: libido e potência (BITRAN e HULL, 1987). A motivação sexual ou libido é medida através das latências para montas e intromissões, sendo que, a redução ou aumento nas mesmas refletem, respectivamente, facilitação e prejuízo no mesmo. A potência sexual é baseada na eficiência copulatória, que é avaliada através da taxa copulatória, ou seja, a proporção de montas com inserção peniana (MALMNAS, 1973), ou pelo número total de ejaculações num período pré-determinado. A redução no número de montas com intromissões, associada a um mesmo número de ejaculações observada neste trabalho, refletem uma facilitação na potência do comportamento

sexual. Estes dados associados à observação do aumento do peso relativo dos epidídimos, vesícula seminal e testículos indicam que os princípios ativos da *S. lycocarpum* apresentam efeito estrogênico quando administrado durante a puberdade dos ratos.

Por outro lado, no comportamento sexual dos machos não foram observadas alterações nas latências de outros parâmetros avaliados, fato indicativo de que os aspectos motivacionais do mesmo não foram alterados. Confirma este fato a ausência de efeitos na motivação sexual avaliada. Além disso, não foram detectadas alterações na frequência de montas e intromissões/minuto, o que também sugere que fatores ligados a função motora não participaram da facilitação observada.

No presente experimento, observou-se que a exposição dos machos à planta reduziu os níveis dos metabólitos de testosterona nas fezes apenas aos 50 dias de vida, não mostrando alterações aos 30 e 70 dias de vida. Estes achados indicam que a alteração nos níveis deste metabólito nas fezes foi reversível. Sabe-se que, a inibição da testosterona pode retardar a puberdade em animais jovens e diminuir o libido em animais adultos (HAFEZ e HAFEZ, 2004), o que explicaria as alterações encontrados nesse experimento. No entanto, NOMURA et al. (2002) mostram que animais pré-púberes *knockout* do receptor estrogênico apresentam aumento da testosterona plasmática entre 37-45 dias de vida, resultado contrário ao presentemente observado. Este fato ocorreu simultaneamente ao estabelecimento da puberdade, sugerindo que o estrógeno seja importante

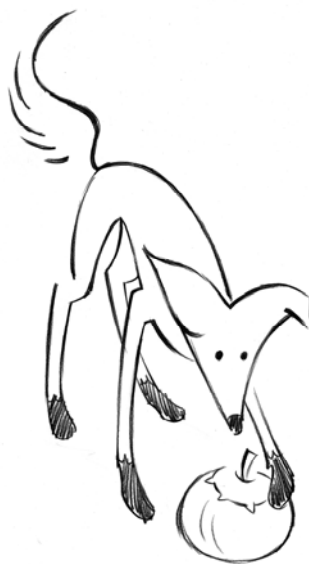
nestes processos. Achados do presente experimento corroboram esta hipótese.

Estudos em humanos e em animais tem demonstrado relações entre as funções tireoideanas e reprodutivas. As afecções da tireóide podem afetar a fertilidade, o desenvolvimento da gestação e até mesmo a saúde do neonato. Embora animais e seres humanos com desordens tireoideanas possam também apresentar problemas reprodutivos, ainda não está bem estabelecida a correlação entre os dois aspectos (JOHNSON, 2002). Por isto, no presente experimento avaliou-se os níveis séricos dos hormônios tireoideanos e estes não se mostraram alterados nos animais, tanto nos machos como nas fêmeas, expostos à planta.

O efeito prolongado dos esteróides em eventos comportamentais ocorre quando há uma mudança na liberação ou na ação de um ou mais neurotransmissores (HULL et al., 1997; HULL et al., 1999). Neste sentido, no presente estudo foram escolhidas duas regiões do sistema nervoso central, uma mais relacionada com a função motora (o estriado) e outra mais relacionada com a função hormonal (hipotálamo) para se estudar os efeitos da exposição a *S. lycocarpum*. O resultados obtidos mostraram a ocorrência de diferenças significantes entre os grupos, principalmente aumento nos níveis de neurotransmissores/metabólitos estriatais das fêmeas experimentais, não tendo sido detectadas alterações no hipotálamo de machos e fêmeas. Mesmo em frente às alterações neuroquímicas detectadas, as fêmeas experimentais não apresentaram prejuízo no comportamento sexual, indicando que, as alterações neuroquímicas

encontradas não sejam suficientemente capazes de promover alterações no comportamento sexual. Considerando-se que os neurotransmissores NOR e DA facilitam e 5-HT prejudica o comportamento sexual de machos e fêmeas (DE VRIES, 1990; UPHOUSE, 2000), esperava-se que as alterações mais evidentes ocorressem no hipotálamo ao invés do estriato, uma vez que a fisiopatologia da reprodução está centrada no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Portanto, estes achados não podem ser explicados em função de alterações hormonais.

Estes achados, tomados em conjunto, indicam que *S. lycocarpum* administrada durante a puberdade exerce efeitos tóxicos, principalmente em machos, provavelmente em consequência da presença de princípios ativos com atividade estrogênica.



**CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

A ingestão dos frutos da *S. lycocarpum* a 10% na ração, durante a puberdade de ratos (21º ao 70º dia de vida) causou:

- redução do peso corpóreo indicando que a planta causou efeito tóxico, sendo este mais evidente em machos do que em fêmeas;

- redução no peso relativo de alguns órgãos de fêmeas e em machos observou-se efeito oposto; este achado parece ser consequência da redução do peso corpóreo causada pelo efeito tóxico da planta. Em particular, o aumento do peso relativo de órgãos do sistema reprodutor dos machos pode indicar um efeito hormonal dos princípios ativos presentes na planta;

- redução dos níveis de metabólitos de testosterona nas fezes dos animais tratados, fato que pode ter contribuído para redução do desenvolvimento muscular dos machos;

- ausência de efeitos no hemograma em ambos os sexos e alterações na bioquímica sanguínea indicativa de leve toxicidade em células musculares e hepáticas, achados estes mais evidentes em machos;

- nenhuma alteração no ciclo estral, comportamento sexual e dosagem dos metabólitos dos hormônios esteroidais nas fezes das fêmeas experimentais. Porém observaram-se cistos foliculares na avaliação

histopatológica dos ovários dessas fêmeas, achados sugestivos do possível efeito estrogênico da planta;

- facilitação do comportamento sexual, em machos, devido principalmente a uma melhora na potência deste comportamento. Os níveis dos metabólitos de testosterona nas fezes reduziram durante o tratamento, mas este efeito foi reversível;

- nenhuma alteração nos níveis séricos dos hormônios tireoideanos, tanto em machos como nas fêmeas;

- alterações significantes nos níveis de neurotransmissores/metabólitos do estriato, principalmente em fêmeas;

Estes achados indicam que *S. lycocarpum* administrada durante a puberdade exerce efeitos tóxicos, principalmente em machos, provavelmente em consequência da presença de princípios ativos com atividade estrogênica.





**REFERÊNCIAS**

## 8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, N. Detection of the Effects of phytoestrogens on sheep and cattle. **Journal Animal Science**, v.73, p.1509-1515, 1995.
- AGMO, A. Male rat sexual behavior. **Brain Research Protocols**, v.1, p.203-209, 1997)
- AHLENIUS, S.; LARSSON, K. A Apomorphine and haloperidol-induced effects on male rat sexual behavior: no evidence for actions due of central dopamine autoreceptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, New York, v.21, p.246-466, 1984.
- BHATT, R. V. Environmental influence on reproductive health. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**,v.70, p.69-75, 2000.
- BITRAN, D.; HULL, E.M. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior.. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 11, nº4, p. 365-389, 1987.
- BLANKEMEYER, J. T.; STRINGER, B. K.; RAYBURN, J. R.; BANTLE, J. A.; FRIEDMAN, M. Effects of potato alkaloids  $\alpha$ -chaconine and  $\alpha$ -solanine on membrane potential of frog embryos. **J. Agric. Food Chem**, v. 40, p. 2022-2025, 1992
- BREEDLOVE, S.M.; Sex on the brain. **Nature**, v.189, p.801, 1997. BROWN, J.L.; WASSER, S.K.; WILDT, D.E.; GRAHAM, L.H. Comparative aspects os steroid hormones metabolism and ovarian activity in felids, measured noinvasively in feces. **Biol. Reprod.**, Madison, v.51, p.776-786, 1994.

- BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L.H.; BYERS, A. P.; COLLINS, L.; BARRETT, S.; HOWARD, J. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. **Biology of Reproduction**, v.53, p.93-102, 1995.
- BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; WIELEBNOWSKI, N.; GOODROWE, K. L.; GRAHAM, L. H.; WELLS, S.; HOWARD, J. G. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, p.337-346, 1996.
- BRUNETON, J. **Plantas tóxicas. Vegetales peligrosos para el hombre y los animales**. Zaragoza: Acribia, 2001. p.447-482.
- CALDWELL, K. A.; GROSJEAN, O. K.; HENIKA, P. R.; FRIEDMAN, M. Hepatic ornithine decarboxylase induction by potato glycoalkaloids in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, p. 531-535, 1991.
- CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 3. ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1985. 360 p.
- DALL'AGNOL, R.; VON POSER, G. L. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, p. 337-341, 2000.
- DARBRE, P.; YATES, J.; CURTIS, S.; KING, R.J.B. Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture. **Cancer Res.**, Birmingham, v.43, p.349-354, 1983.

FELÍCIO, L. F.; PALERMO-NETO, J.; NASELLO, A. G. Perinatal bromopride treatment: effects on sexual behavior of male and female rats. **Behav. Neural Biol.**, v.52, p.145-151, 1989.

GERARDIN, D.C.; PEREIRA, O.C.; KEMPINAS, W.G.; FLORIO, J.C.; MOREIRA, E.G.; BERNARDI, M.M. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. **Physiol Behav**, v. 84, nº1, p. 97-104, 2005.

GORSKI, R.A. Sexual differentiation of the brain: Possible mechanisms as implications. **Can J Physiol Pharmacol**, v.63, p.577-594, 1985a.

GORSKI, R.A. Sexual differentiation of the brain. **J Anim Sci**, v.61, p.38-61, 1985b

GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Como um mamífero se desenvolve desde a fertilização até a implantação do blastocisto. **Bol. Cent. Biol. Reprod.**, v.18, p.15-32, 1999.

GUYTON, A. C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2002. 973p.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7 ed, São Paulo, Editora Manole, 2004, 513p.

HARAGUCHI, M., UCHIMURA, R. T., MOTIDOME, M., GOTTLIEB, O. Aproveitamento dos esteróides dos frutos da lobeira. **Ciência e Cultura**, v.32, p.81-82, 1978.

HART, B.L.; LEEDY, M.S. Neurological bases of male sexual behavior: a comparative analysis. In: ADLER, N.; PFAFF, D.W.; GOY, R.W. **Reproduction: handbook of behavioral neurobiology**. 7.ed. Nova York: Plenum Press, 1985. P.373-422.

HAYES, J. R.; CAMPBELL, T. C. Food additives and contaminants. In: KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J. **Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons**. 3. ed. New York: Macmillan Publishing Company, 1986. p.796-7.

HSU, S. H.; TSAI, T. R.; LIN, C. N.; YEN, M. H.; KUO, K. W. Solamargine purified from *Solanum incanum* Chinese Herb Triggers gene expression of human TNFR I which may lead to cell apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.229, p.1-5, 1996.

HULL, E. M.; DU, J.; LORRAIN, D. S.; MATUSZEWICH, L. Testosterone, Preoptic dopamine, and copulation in male rats. **Brain Research Bulletin**, v.44, n°4, p.327-333, 1997.

HULL, E. M.; LORRAIN, D. S.; DU, J.; MATUSZEWICH, L.; LUMLEY, L. A.; PUTNAM, S. K.; MOSES, J. Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. **Behav. Brain Res.**, Amsterdam, v.105, p.105-116, 1999.

JOHNSON, C. A. Thyroid issues in Reproduction. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 17, n.3, p.129-132, 2002.

KERBER, V. A., MIGUEL, O. G., MOREIRA, E. A., GOMES, E. C., WEISS, F. A., VIEIRA, R. F. Avaliação quantitativa de alcalóides esteroidais em três espécies de *Solanum* Solanaceae (*S. grandifolium*, *S. lacerdae* e *S. lycocarpum*), ênfase à solasodina. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, p. 67-69, 1993.

- KISSMANN, K.G.; DORIS, G. **Plantas infestantes e nocivas**. v.3. São Paulo: BASF, 1995. p. 544-547.
- KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**, 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p.363-397.
- KRISTENSEN, V. N.; KURE, E. H.; ERIKSTEIN, B.; HARADA, N.; BORRESEN-DALE, A. Genetic susceptibility and environmental estrogen-like compounds. **Mutation Research**, v.482, p.77-82, 2001.
- LOMBARDI, G.; ZARRILI, S.; COLAO, A.; PAESANO, L.; DI SOMMA, C.; ROSSI, F.; DE ROSA, M. Estrogens and health in males. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.178, p.51-55, 2001.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1991. 392p.
- LUKE, M.C.; COFFEY, D.S. The male sex accessory tissues: structure, androgen action and physiology. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D., eds. **The physiology of reproduction**. 2ed. Nova York: Raven Press, 1994. p.989-1034.
- MALMNAS, C.O. Monoaminergic influence on testosterone-activated copulatory behavior in the castrated male rat. **Acta Physiol Scand Suppl.**; v.395, p.1-128, 1973.
- MARUO, V.M.; BERMARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Toxicological evaluations of long term consumption of *Solanum lycocarpum* St. Hill fruits in male and female adult rats. **Phytomedicine**, Jena, v. 10, p.48-52, 2003a.

- MARUO, V.M.; SOARES, M.R.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Embryotoxic effects of *Solanum lycocarpum* St. Hill fruits consumption during preimplantation and organogenesis in rats. **Neurotoxicol. Teratol.**, Amsterdam, v.25, p.627-631, 2003b.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais. Guia de seleção e emprego de plantas medicinais do nordeste do Brasil.** v.1. Fortaleza: IOCE, 1989. p.45-57.
- MCEWEN, B. S. Neural gonadal steroid actions. **Science**, v.211, p.1303-1311, 1981.
- MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de Laboratório Veterinária – Interpretação e Diagnóstico**, 1 ed, São Paulo, Editora Roca, 1995, 307p.
- MOTIDOME, M.; LEEKNING, M. E.; GOTTLIEB, O. R. A química de solanáceas brasileiras. I - A presença de solamargina e de solasonina no juá e na lobeira. **An. Acad. Brasil. Ciênc.**, v.42, p.375-6, 1970.
- NIKAIDA, Y.; DANBARA, N.; TSUJITA-KYUTOKU, M.; YURI, T.; UEHARA, N.; TSUBARA, A, Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of estrogen target organs in female mice. **In Vivo**, v.19, nº 3, p.487-494, 2005.
- NISHIE, K.; GUMBMAN, M. R.; KEYL, A. C. Pharmacology of solanine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.19, p.81-92, 1971.

NOMURA, M.; DURBACK, L.; CHAN, L.; SMITHIES, O.; GUSTAFSSON, J.Á.; KORACH, K.S.; PFAFF, S.W.; OGAWA, S. Genotype/age interactions on aggressive behavior in gonadally intact estrogen receptor beta knockout beta male mice. **Horm. Behav.**, v.41, p.288-296, 2002.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. **Hormones**, 2 ed., San Diego, Academic Press, 1997, 558 p.

OLIVEIRA, A. C. P.; ENDRINGER, D. C.; ARAÚJO, R. J. P.; BRANDÃO, M. G. L.; COELHO, M. M. The starch from *Solanum lycocarpum* St. Hill. Fruit is not a hypoglycemic agent. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p. 525-530, 2003.

ORGELL, W.H. Inhibition of human plasma cholinesterase in vitro by alkaloids, glycosides and other natural substance. **Lloydia**, v.26, p.36-43, 1963.

OSOSKI, A.L.; KENNELLY, E.J. Phytoestrogens: a review of the present state of research. **Phytother. Res.**, Bognor Regis, v. 17, p.845-869, 2003.

PLANETA, C. S.; MARIN, M. T. Effect of cocaine on periadolescent rats with or without early maternal separation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.1367-1371, 2002.

PRINCE, K. N.; PRINCE, J. S.; KINGHORN, E. W.; FLEMING, D. E.; RHEES, R. W. Effects of sexual behavioral manipulation on brain plasticity in adult rats. **Brain Research Bulletin**, v. 47, nº4, p.349-355, 1998.



- REDDEL, R.R.; MURPHY, L.C.; SUTHERLAND, R.L. Factors affecting the sensitivity of T-47 human breast cancer cell to tamoxifen. **Cancer Res.**, Birmingham, v.44, p.2398-2405, 1984.
- RHEES, R. W.; SHRYNE, J. E.; GORSKI, R. A. Onset of the hormone-sensitive perinatal period for sexual differentiation of the sexually dimorphic. **Journal of Neurobiology**, v.21, n°5, p.781-786, 1990a.
- RHEES, R. W.; SHRYNE, J. E.; GORSKI, R. A. Termination of the hormone-sensitive period for differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. **Developmental Brain Research**, v.52, p.17-23, 1990b.
- RODDICK, J. G. The acetylcholinesterase-inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2631-2634, 1989.
- RODDICK, J. G., RIJENENBERG, A. L.; WEISSENBERG, M. Alterations to the permeability of liposome membranes by the solasodine-based glycoalkaloids solasonine and solamargine. **Phytochemistry**, v. 31, p. 151-154, 1992.
- ROSTE, L. S.; TAUBOLL, E.; ISOJARVI, J. I. T.; BERNER, A.; BERG, K. A.; PAKARINEN, A. J.; HUHTANIEMI, I. T.; KNIP, M.; GJERSTAD, L. Gonadal morphology and sex hormones in male and female Wistar rats long-term lamotrigine treatment. **Seizure**, v.12, p.621-627, 2003.
- SÁ, R. C. S.; VIREQUE, A. A.; REIS, J. E. P.; GUERRA, M. O. Evaluation of the toxicity of *Solanum lycocarpum* in the reproductive system of male mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.283-287, 2000.

- SCAVONE, O.; PANIZZA, S. **Plantas tóxicas**. 2. ed. São Paulo: CODAC-USP, 1981. p. 128.
- SCHWARZ, A.; SOARES, M. R.; HARAGUCHI, M.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Estudo químico dos frutos verdes da *Solanum lycocarpum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24(Supl.), p.66, 2004. (SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE PLANTAS TÓXICAS, 1, 2004, Salvador).
- SEGOVIA, S.; GUILLAMÓN, A.; DEL CERRO, M. C. R.; ORTEGA, E.; PÉREZ-LASO, C. RODRIGUEZ-ZAFRA, M.; BEYER, C. The development of brain sex differences: a multisignaling process. **Behavioural Brain Research**, v.105, p.69-80, 1999.
- SOARES, M.R.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Possíveis efeitos teratogênicos da administração de 10% de *Solanum lycocarpum* na raça de ratas durante a gestação. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 10, e SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 4, Piracicaba, 2002. Resumos. Número 177. (CD rom).
- SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A.M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **J. Steroid Biol.**, v.65, nº1-6, p.143-150, 1998).
- TEMPLE, J.L.; SCORDALAKES, E.M.; BODO, C.; GUSTAFSSON, J.; RISSMAN, E. F. Lack of functional estrogen receptor  $\beta$  gene disrupts pubertal male sexual behavior. **Hormones and Behavior**, v.44, p.427-434, 2003.
- THOMAS, J.A.; THOMAS, M.J.; THOMAS, D.J. Hormone assays and endocrine functions. In: HAYESA, A.W. Principles and methods of toxicology. 2 ed. New york, Raven Press. p. 677-698, 1989.

- UPHOUSE, L. Female gonadal hormones, serotonin, and sexual receptivity. **Brain Research Reviews**, v.33, p.242-257, 2000.
- VAN GELDER, W. M. J. Chemistry, toxicology, and occurrence of steroidal glycoalkaloids: potential contaminants of the potato. In: RIZK, A. F. **Poisonous plants contaminating edible plants**. Boca Raton: CRC, 1990, p. 117-156.
- WITT, D. M.; YONG, L. J.; CREWS, D. Progesterone modulation of androgen-dependent sexual behavior in male rats. **Physiology & Behavior**, v.57, n°2, p.307-313, 1995.
- YURINO, H.; ISHIKAWA, S; SATO, T.; AKADEGAWA, K.; ITO, T.; UEHA, S.; INADERA, H.; MATSUSHIMA, K. Endocrine Disruptors (Environmental Estrogens) Enhance Autoantibody Production by B1 Cells. **Toxicological Sciences**, v.81, p.139-147, 2004.