

RAFAELA DE FÁTIMA FERREIRA BAPTISTA

*Efeitos cardiovasculares da exposição pré-natal à
permetrina, isoladamente ou em associação à
desnutrição intra-uterina, em ratos adultos e o
comportamento materno nestas condições*

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas
(Área de Concentração: Farmacologia)

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Cordellini

Botucatu-SP
2011

Rafaela de Fátima Ferreira Baptista

*Efeitos cardiovasculares da exposição pré-natal à
permetrina, isoladamente ou em associação à desnutrição
intra-uterina, em ratos adultos e o comportamento materno
nestas condições*

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu,
como requisito parcial para obtenção do título de
mestre em Ciências Biológicas (Área de
Concentração: Farmacologia)

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Cordellini

Botucatu-SP
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Baptista, Rafaela de Fátima Ferreira.

Efeitos cardiovasculares da exposição pré-natal à permetrina, isoladamente ou em associação à desnutrição intra-uterina, em ratos adultos e o comportamento materno nestas condições / Rafaela de Fátima Ferreira Baptista. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2011

Orientador: Sandra Cordellini

Capes: 21007004

1. Desnutrição fetal - Estudos experimentais. 2. Tóxicos – Efeitos fisiológicos. 3. Aorta – Doenças.

Palavras-chave: Aorta; Comportamento; Desnutrição; Permetrina; Prenhez; Reatividade vascular.

Dedicatória

A DEUS

Por ter me dado força para a realização desse objetivo, por Se fazer presente em todos os momentos de alegrias e dificuldades. E me ajudar a suportar a distância das pessoas que eu mais amo. Agradeço-te senhor!

*“Determinando tu algum caminho, segue firme e a luz brilhará em teus caminhos”.
Jó 22: 28.*

Aos meus pais

Luis Rafael e Cida, de onde sempre obtive apoio e incentivo para continuar e não desistir jamais em meio às dificuldades.

*Agradeço, pelas orações, pelo constante apoio,
confiança, e amor.*

*“Ouvi, filhos, a instrução do pai, e estai atentos para conhecerdes o entendimento;
porque vos dou boa doutrina; não deixeis o meu ensino.” Provérbios 4:1-2.*

A meu namorado Tierre

Que soube suportar com paciência todos os momentos difíceis para realização deste trabalho. Pelo amor, confiança, apoio, carinho, compreensão e companheirismo. Obrigada!

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos e não tivesse amor, seria como metal que soa ou como o sino que tine. O amor é benigno, é caridoso, não é invejoso, tudo sofre, tudo crê, tudo suporta”. Coríntios 13: 1 e 4.

A minha orientadora Dra. Sandra Cordellini

Por ter acreditado em meu potencial, e acima de tudo pela sua amizade, atenção, e paciência. Espero continuar contando sempre com seu apoio e dedicação. Obrigada!

*“A sabedoria entrará no teu coração, e o conhecimento será suave a tua alma.
No caminho da sabedoria, te ensinei e, pelas carreiras diretas, te fiz andar.”
Provérbios 2:10 e 4:11.*

Agradecimientos

Aos meus irmãos Luis Renan e Rafael, pelo carinho, estímulo e incentivo que tanto me proporcionaram para o fim desta etapa.

À todos os meus familiares, por sempre me apoiarem.

À minha querida amiga Priscila, pelo carinho, desprendimento que sempre me dedicou e por ter me ajudado nos momentos em que mais precisei.

Aos amigos do laboratório de Reatividade Vascular (Farmacologia), em especial a Priscila e o Thiago, também a Nathália, Martina e Amanda, pela amizade e apoio fornecidos nesta caminhada. Obrigada pelo auxílio, convivência e carinho.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies, e Prof. Dr. Alaor Aparecido Almeida, que tão gentilmente aceitaram em participar de minha banca e por suas valiosas sugestões que contribuíram para o amadurecimento científico.

À todos os colegas da pós-graduação, pela amizade e atenção.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área de concentração: Farmacologia (UNESP - Botucatu), pela oportunidade oferecida para realização deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia da UNESP pela participação em minha formação.

Ao Sr. João Leandro Chaguri pela colaboração na análise das amostras de permetrina no sangue dos animais.

À CAPES, pela Bolsa de Mestrado

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para edificação deste trabalho. Muito obrigada!

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Campo aberto.....	33
Figura 2. Labirinto em cruz elevado.....	34
Figura 3. Evolução do peso corpóreo materno do dia zero ao 21º dia de prenhez. Ratas prenhes submetidas ou não à desnutrição, isoladamente ou em associação à exposição à perimetrina <i>in utero</i>	41
Figura 4. Peso da ninhada ao nascimento de mães submetidas ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à perimetrina.....	43
Figura 5. Evolução do peso corpóreo de ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à perimetrina.....	44
Figura 6. Evolução da ingestão alimentar de ratas prenhes, submetidas ou não à desnutrição durante a prenhez, isoladamente ou em associação à exposição à perimetrina <i>in utero</i>	45
Figura 7. Evolução da pressão arterial sistólica caudal de ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à perimetrina.....	47
Figura 8. Curvas concentração-efeito ao cálcio obtidas em dois anéis, com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à perimetrina.....	49
Figura 9. Curvas concentração-efeito à Noradrenalina obtidas em dois anéis, com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à perimetrina.....	51
Figura 10. Curvas concentração-efeito à noradrenalina na presença de prazosin (10^{-8} M, adicionado nos 30 minutos finais do período de estabilização), obtidas em dois anéis com (+E) e sem endotélio (-E), da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à perimetrina.....	53
Figura 11. Curvas concentração-efeito à noradrenalina na presença de L-NAME (3×10^{-4} M, adicionado nos 30 minutos finais do período de estabilização), obtidas em dois anéis com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à perimetrina.....	55

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios do peso materno durante a prenhez.....	40
Tabela 2. Valores médios do número de filhotes por ninhada, da distância ano-genital e do peso ao nascimento de filhotes de mães expostas ou não à perimetrina, isoladamente ou em associação à restrição alimentar durante a prenhez.....	42
Tabela 3. Valores médios da relação: peso do ventrículo/peso corpóreo, dos rins, e das adrenais de ratos machos adultos provenientes de mães submetidas ou não à restrição alimentar, isoladamente ou em associação à exposição à perimetrina durante a prenhez.....	46
Tabela 4. Concentração sanguínea de perimetrina nas mães e nos filhotes machos adultos.....	48
Tabela 5. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito ao cálcio obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição <i>in utero</i> , isoladamente e em associação à exposição pré-natal à perimetrina.....	50
Tabela 6. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito à noradrenalina obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição <i>in utero</i> , isoladamente e em associação à exposição pré-natal à perimetrina.....	52
Tabela 7. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito à noradrenalina na presença de prazosin, obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição <i>in utero</i> , isoladamente e em associação à exposição pré-natal à perimetrina.....	54
Tabela 8. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito à noradrenalina na presença de L-NAME, obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição <i>in utero</i> , isoladamente e em associação à exposição pré-natal à perimetrina.....	56
Tabela 9. Atividade geral, expressa pelo levantar, limpeza, congelamento e locomoção em campo aberto, de ratas com 21 dias de prenhes, expostas ou não à perimetrina e submetidas ou não à desnutrição durante a prenhez.....	57
Tabela 10. Atividade geral expressa pelo número de entradas nos braços abertos, fechados e centro em labirinto em cruz elevado, de ratas com 21 dias de prenhes, expostas ou não à perimetrina e submetidas ou não à desnutrição durante a prenhez.....	58
Tabela 11. Atividade geral expressa pelo tempo de permanência nos braços abertos, fechados e centro em labirinto em cruz elevado, de ratas com 21 dias de prenhes, expostas ou não à perimetrina e submetidas ou não à desnutrição durante a prenhez.....	59

Sumário

Lista de Figuras.....	12
Lista de Tabelas.....	14
Introdução.....	18
Objetivos.....	26
Materiais e Métodos.....	28
1. Animais.....	28
2. Procedimentos Experimentais.....	28
2.1 Acasalamento.....	28
2.2 Restrição alimentar – Desnutrição <i>in utero</i>	29
2.3 Regime de exposição.....	29
2.4 Procedimentos Pós-Natal e Evolução do Peso Corpóreo.....	29
2.5 Desmame.....	30
2.6 Determinação da Pressão Arterial.....	30
2.7 Análise Quantitativa de Permetrina.....	30
2.8 Avaliação das Adrenais, Rins e Coração.....	31
2.9 Reatividade Vascular.....	31
3. Estudo do Comportamento.....	32
3.1 Campo Aberto.....	32
3.2 Labirinto em Cruz Elevado.....	34
4. Análise Estatística.....	34
5. Drogas e Soluções.....	35
Resultados.....	37
Discussão.....	61
Conclusão.....	69
Referências Bibliográficas.....	71
Abstract.....	80
Resumo.....	82

Introdução

O uso de inseticidas é considerado importante e indispensável para o aumento da produtividade das áreas destinadas à agricultura, já que os insetos são grandes responsáveis pelas perdas verificadas durante a produção de alimentos. Os inseticidas são também utilizados na pecuária, em domicílios e em programas de saúde pública.

Evitar perdas na agricultura e garantir alimentos em quantidade e qualidade adequados para uma população em plena expansão tem sido o grande desafio de especialistas de todo o mundo. Fato que contribui para a classificação do Brasil como o 3º maior consumidor de praguicidas no mundo e o primeiro no âmbito da América Latina (ANVISA, 2007). O uso de praguicidas no Brasil alcançou, no ano de 2009, o patamar de produção e comercialização de aproximadamente, 800 mil toneladas (Pelaez, 2009).

Os piretróides são, atualmente, os inseticidas mais utilizados, pois apresentam baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental, são efetivos contra um largo espectro de insetos e são necessárias baixas quantidades para exercerem sua ação (Santos et al., 2007). Entretanto, deve-se ter em consideração que muitos contaminantes ambientais, em concentrações não nocivas, podem determinar processos fisiopatológicos se estressores físicos ou químicos e/ou condições patológicas estiverem presentes.

A permetrina, um membro da família dos piretróides sintéticos, pertence à classe tipo I (sem grupo cianeto) dos piretróides. Os trabalhadores podem ser expostos à permetrina através da exposição ocupacional (durante o manuseio e/ou a aplicação do produto) principalmente na agricultura e pecuária, devido à ausência de equipamentos de proteção individual ou seu uso inadequado, e os demais membros da população podem ser expostos através de operações de controles de pestes em programas de saúde pública, da contaminação de alimentos e água, e dos domissanitários. A exposição da população a estes agentes ocorre principalmente via resíduos presentes nos alimentos (Heudorf, 2001; Schettgen, 2002). Assim, dentre seus múltiplos usos destacam-se a proteção de grãos estocados, a aplicação em lavouras, o controle de vetores, o uso como repelente e tratamento de piolhos, sarnas, carrapatos, pulgas e cupins. Apesar das vantagens apresentadas pelos piretróides em relação a outros inseticidas, os mesmos cuidados devem

ser tomados para sua utilização, já que podem exercer nos vertebrados efeitos neuro e cardiotoxícos.

Quase todos os efeitos sistêmicos da exposição por piretróides estão relacionados às suas ações sobre o sistema nervoso central. Semelhantemente aos outros piretróides, a permetrina altera a função do sistema nervoso por modificar a bioquímica e fisiologia do canal de sódio-voltagem dependente, a saber, prolongam a fase de abertura do canal. Conseqüentemente, aumentam a entrada de sódio na célula nervosa e induzem despolarização da membrana. Ainda, bloqueio da condução nervosa pode ocorrer com altas concentrações (Narahashi, 1996). Embora o canal de sódio seja o sítio comum, os piretróides podem atuar sobre diferentes isoformas do canal de sódio e sobre outros canais iônicos para produzir seus sinais clínicos (Overview of Permethrin Risk Assessment).

Em ratos, o pesticida piretróide permetrina inibe a atividade da Ca^{+2} -ATPase, alterando a homeostase intracelular de Ca^{+2} (Grosman & Diel, 2005). Em tecidos humanos, os canais de Ca^{+2} -voltagem dependentes também são alvos para a ação dos piretróides (Shafer & Meyer, 2004). Dessa maneira, as alterações no trânsito de Ca^{+2} intracelular induzidas pelos piretróides determinam uma redução da atividade da sintase de óxido nítrico (NOS) constitutiva, dependente de Ca^{+2} , com alteração concomitante da produção de óxido nítrico (NO) (Casares & Mantione, 2006; Casares et al., 2006).

O envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi também postulado como um dos mecanismos através dos quais os pesticidas, como a permetrina, exerce seus efeitos deletérios sobre os tecidos. Assim, dano oxidativo não apenas no cérebro, mas também em outros tecidos alvos como o fígado, eritrócitos, linfócitos, entre outros, têm sido relatados após exposição aos piretróides (Song & Narahashi, 1996; Kale *et al.*, 1999; Dayal *et al.*, 2003; Oberoi *et al.*, 2007).

Os efeitos neurotóxicos dos piretróides são amplamente conhecidos e se caracterizam por tremores, hiperatividade, irritação, aumento da temperatura corpórea, hiper-salivação, diarreia, midríase entre outros. Neste contexto, Lazarini et al (2001) relataram que a exposição aos inseticidas piretróides induz alterações comportamentais em ratos, bem como

em outras espécies, incluindo humano. Ainda, diminuição da atividade motora, prejuízo sexual, social e coordenação motora, aumento do comportamento agressivo, deficiência na aprendizagem e memória, são alguns dos efeitos comportamentais de ratos expostos aos inseticidas piretróides (Crofton & Reiter, 1988; Wolansky & Harrill, 2008).

Surpreendentemente, poucas são as informações disponíveis sobre alterações cardiovasculares relacionadas à exposição por inseticidas piretróides (Forshaw & Bradbury, 1983; Spencer e Sham, 2005), apesar do reconhecido papel desempenhado pelo óxido nítrico e pelas ROS em processos fisiopatológicos relacionados ao sistema cardiovascular (Schulz et al., 2008).

Acredita-se que o ambiente intra-uterino exerça um papel importante na origem de muitas doenças no indivíduo adulto. Tais doenças incluem: hipertensão arterial, diabetes, doenças cardíacas e coronarianas e acidente vascular cerebral. Atuando na predisposição genética, os processos intra-uterinos parecem programar o metabolismo do indivíduo e o sistema endócrino e, após o nascimento, estes fatores de risco são então amplificados ou minimizados por influências ambientais (Newnham, 2001) parecendo ser independentes ao estilo de vida, tais como consumo de cigarros e/ou álcool, peso, classe social e sedentarismo (Barker *et al.*, 1993).

Em ratos, os neurônios catecolaminérgicos desenvolvem-se nos estágios iniciais da ontogênese (Oliff & Gallardo, 1999). Em 1992(a), Wakatsuki *et al.* mostraram uma correlação positiva entre a idade gestacional e a porcentagem de decréscimo da frequência cardíaca basal de ovinos, sugerindo um importante papel do sistema nervoso autônomo sobre o desenvolvimento cardiovascular. Posteriormente, demonstrou-se que o SNA desempenha importante papel sobre a adaptação circulatória e metabólica de fetos ovinos a alterações no seu meio intra-uterino e após o nascimento (Wakatsuki *et al.* 1992b; Segar *et al.*, 1994a,b).

Os fetos, os neonatos e as crianças são muito susceptíveis a agentes químicos porque o sistema nervoso central em desenvolvimento apresenta alta taxa de mitose e migração celular que são processos bastante sensíveis a distúrbios causados por substâncias tóxicas.

Atualmente são reconhecidos diversos fatores que podem aumentar o risco de hipertensão arterial, dentre eles a idade, o histórico familiar de hipertensão, o excesso de peso, as dietas ricas em sal, o sedentarismo e, mais recentemente, a desnutrição intra-uterina (Núñez et al., 2008).

A desnutrição intra-uterina possui causas complexas, onde fatores maternos, fetais e placentários podem estar envolvidos. Dentre os fatores maternos, podemos incluir a desnutrição como sendo o mais comum e o de maior importância. De fato, se considerarmos que o crescimento se inicia na concepção, e não no nascimento, a dieta materna durante a gestação torna-se importante elemento para o perfeito aproveitamento do potencial genético fetal.

As necessidades do embrião são mínimas, mas como essa fase inicial é marcada por intenso crescimento hiperplásico, é imprescindível o fornecimento adequado de nutrientes para que não ocorram danos celulares irreversíveis. Portanto, nessa fase o feto é extremamente vulnerável a qualquer grau de deficiência nutricional. Por outro lado, nos estágios finais de desenvolvimento, quando predomina o crescimento hipertrófico, os danos são menos definitivos e acarretam, principalmente, redução do peso fetal. Assim sendo, os períodos finais da gestação são menos suscetíveis aos efeitos deletérios da desnutrição materna. Isto sugere que a fase da gestação em que ocorre a desnutrição é determinante no aparecimento de alterações irreversíveis nos tecidos e órgãos fetais (Campbell et al., 1996).

Durante as últimas décadas acumularam-se evidências de que o peso corpóreo ao nascimento está associado com o risco elevado de mortalidade cardiovascular (Barker et al., 1989; Leon et al., 1996; Leon et al., 1998). Esses achados levaram ao desenvolvimento da hipótese da “programação fetal” que declara que doenças cardiovasculares, e em particular a hipertensão arterial, originam-se como consequência da má nutrição *in utero*. Assim, a limitação de substrato para o feto retarda o crescimento fetal e induz hipertensão em ratos e cobaias (Persson & Jansson, 1992; Langley-Evans & Jackson, 1994). A restrição de nutrientes específicos na dieta materna também retarda o crescimento fetal de ratos e produz aumento substancial da pressão arterial de proles adultas (Langley-Evans et al., 1994;

Langley-Evans & Jackson, 1996). Por sua vez, as adaptações desenvolvidas sob condições de desnutrição materna podem se tornar maléficas caso o ambiente pós-natal seja provido de abundância relativa de nutrientes (Gluckman & Hanson, 2004).

A desnutrição intra-uterina tem sido apontada como uma das principais causas de morbidez nas primeiras horas após o nascimento. Além disso, trabalhos clínicos têm demonstrado que crianças submetidas à desnutrição intra-uterina são mais propensas a desenvolver hipertensão arterial e também apresentam maior mortalidade por doenças cardíacas quando atingem a maturidade (Barker et al., 1993; Law et al., 1993; Barker, 1996).

Um número potencial de mecanismos através dos quais a desnutrição fetal pode predispor à hipertensão arterial foi investigado e um possível papel da exposição fetal aos glicocorticóides maternos (Langley-Evans et al., 1996; Gardner et al., 1997), fatores endoteliais (Franco et al., 2002), sistema renina-angiotensina e rim (Langley-Evans et al., 1999a,b), e atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, principalmente em condições estressogênicas (Langley-Evans et al., 1996; Lesage et al., 2006; Núñez et al., 2008), na manutenção da pressão arterial elevada foi sugerido.

Alguns autores têm associado um aumento de pressão arterial à diminuição da atividade da 11- β HSD₂ placentária que converte corticosterona em 11-deidroxycorticosterona no rato (cortisol a cortisona no homem) e, conseqüente, permite o acesso do feto aos glicocorticóides maternos, promovendo retardo no crescimento da prole, uma possível resposta de programação relacionada a doenças posteriores (Edwards et al., 2005). O tratamento de ratas prenhes com baixas doses de dexametasona, um glicocorticoide sintético usado na prática da obstetrícia, reduz o peso ao nascimento e eleva a pressão arterial sangüínea na prole adulta (Benediktsson et al., 1993). Mesmo exposições em curto prazo a glicocorticóides no último período de gestação aumentam a pressão arterial em ratos adultos (Levitt et al., 1996).

Um achado consistente é a observação de que a desnutrição intra-uterina está associada com alterações de reatividade vascular em diferentes leitos vasculares e em diferentes espécies (Khan et al., 2005). Em 2002, Franco et al. relataram que a desnutrição *in*

utero induz hipertensão arterial em ratos Wistar, machos e fêmeas, associada a alterações endotélio dependentes da reatividade da aorta torácica. Ainda, a referida disfunção endotelial foi devida a uma diminuição na atividade/expressão da sintase de óxido nítrico presente no endotélio vascular.

A restrição de nutrientes durante o período perinatal exerce importante influência sobre o comportamento do animal. Em estudo de laboratório, a restrição de nutrientes *in utero* exerce influência direta sobre a estrutura, a fisiologia e bioquímica do cérebro, podendo ocasionar danos cerebrais permanentes (Lukoyanov & Andrade, 2000). Em ratos desnutridos *in utero*, durante a vida pós-natal, apresentaram inúmeros prejuízos comportamentais, como por exemplo, alteração no comportamento exploratório e social (Almeida et al., 1996 a,b), distúrbios de emotividade (Jaiswal et al., 1996; Almeida et al., 1996) déficit de memória (Castro et al., 1987; Celedon et al., 1979; Cordoba et al., 1994) e menor ansiedade no teste de exploração forçada (Levey et al., 2007).

Evidências clínicas também sugerem que certos tipos de transtornos alimentares são fatores de risco para ansiedade, pois 83% de indivíduos que possuem anorexia nervosa, já tiveram pelo menos uma vez na vida diagnóstico de transtorno de ansiedade (Godart et al., 2000). Além disso, vários aspectos da gravidez e do parto podem ser afetados pela baixa disponibilidade de alimentos, incluindo a incidência de aborto espontâneo, tempo de duração da gestação, óbitos fetais, dentre outros.

Neste contexto, a desnutrição intra-uterina afeta a regulação cardiovascular podendo representar um fator de risco adicional na exposição aos inseticidas piretróides durante a prenhez. Embora haja relatos sobre alterações comportamentais e/ou de reatividade vascular em indivíduos submetidos à desnutrição intra-uterina ou expostos aos piretróides, isoladamente, torna-se imprescindível, para a avaliação de risco cardiovascular, o conhecimento da adaptação circulatória à exposição pré-natal aos piretróides em proles submetidas à desnutrição intra-uterina.

Investigações abordando os efeitos da desnutrição sobre as respostas cardiovasculares em condição de exposição aos inseticidas piretróides em uma amostra de indivíduos

suficientemente grande para produzir resultados significativos tornam-se por vezes impraticável. Mesmo podendo ser realizada, esta investigação demanda muito tempo antes dos resultados estarem disponíveis. Em tais situações, um modelo animal representa uma alternativa racional e, embora não possa ser utilizado para fazer declarações inequívocas sobre os efeitos em seres humanos, pode acrescentar de forma significativa para o conjunto de evidências. Ainda, a restrição alimentar em ratos tem se mostrado útil como modelo para a desnutrição humana, uma vez que estes animais compartilham muitas características da desnutrição em humanos (Franco *et al.*, 2002; Tomkins *et al.*, 2007).

Objetivos

Geral

Investigar possíveis alterações na resposta cardiovascular de ratos adultos expostos à permetrina *in utero*, isoladamente ou em associação à desnutrição durante a prenhez, e assim determinar se a provável adaptação vascular à exposição ao piretróide *in utero* difere em condição de desnutrição durante a prenhez.

Específicos

Investigar, em ratos machos adultos expostos à permetrina *in utero*, submetidos ou não à restrição alimentar durante a prenhez:

- 1) as alterações de pressão arterial;
- 2) as alterações de reatividade da aorta torácica, com e sem endotélio, à noradrenalina, e ao cálcio (Ca^{+2});
- 3) as alterações de reatividade da aorta torácica, com e sem endotélio, à noradrenalina na presença de L-NAME (inibidor inespecífico da NOS) e de prazosin (bloqueador específico do receptor α_1 -adrenérgico).

Finalmente, investigar possíveis alterações do comportamento de mães expostas à permetrina *in utero*, submetidas ou não à restrição alimentar durante a prenhez.

Material e Métodos

Animais

Ratos Wistar machos e fêmeas (12 - 16 semanas de idade) foram obtidos do CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório - UNICAMP e usados para o acasalamento.

Todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, com ciclo claro-escuro de 12 h e temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os animais tiveram livre acesso à ração e também à água filtrada, com exceção das fêmeas prenhes com restrição alimentar. Como a ninhada foi considerada a unidade experimental, irmãos não foram usados dentro de um mesmo grupo.

Procedimentos experimentais

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu e aprovados, por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Acasalamento

Para o acasalamento, foi colocado um macho dentro de cada gaiola contendo duas fêmeas virgens, ao final da tarde. As ratas foram diariamente observadas e o dia em que se detectou a presença de espermatozóides e a fase estro do ciclo estral no lavado vaginal foi nomeado dia zero de prenhez. Neste dia, as ratas foram alocadas em gaiolas individuais e aleatoriamente separadas em quatro grupos: o controle (CTRL - não exposto à permetrina e não submetido à restrição alimentar), o exposto à permetrina (PERM), o submetido à restrição alimentar (RA), e o submetido à restrição alimentar e exposto à permetrina (RA/PERM).

Restrição Alimentar – Desnutrição in utero

Após a confirmação da prenhez, as ratas fêmeas foram separadas em dois grupos: CTRL – receberam ração comercial padrão e água *ad libitum*, RA – receberam a mesma dieta a 50% do consumo do grupo CTRL, ou seja, 11,5 gramas de ração comercial padrão, determinado em experimentos pilotos pela quantidade de ração consumida pelo grupo CTRL do 1º dia de prenhez até o parto.

Regime de Exposição

A permetrina foi administrada nas fêmeas prenhes, uma vez ao dia, através de gavagem (0,1 ml/kg) na dose de 100 mg/kg, do 11º ao 21º dia de gestação. Fêmeas controles foram tratadas com veículo (óleo de milho 0,1 ml/kg), seguindo o mesmo protocolo.

Procedimentos Pós-Natal e Evolução do Peso Corpóreo

A ingestão de ração foi avaliada diariamente do dia zero de prenhez até o nascimento dos filhotes a partir da quantidade de ração disponibilizada menos a ração ingerida após 24 horas. O peso das mães foi aferido no dia zero de prenhez, no 6º dia e diariamente a partir do 11º dia de prenhez até o 21º dia de gestação. Após o nascimento, mães e filhotes de ambos os grupos receberam ração e água *ad libitum*. De modo a prevenir qualquer variação no crescimento dos neonatos devida à disponibilidade de leite durante a amamentação, o tamanho da ninhada ao nascimento foi padronizado em oito filhotes e manteve-se o maior número possível de filhotes machos nos diferentes grupos. Filhotes fêmeas foram mantidas somente para se completar a ninhada, e ninhadas com número de filhotes inferior a oito foram descartadas. Cada ninhada foi pesada ao nascimento e cada filhote foi pesado semanalmente até a realização do protocolo experimental de reatividade vascular. À distância anogenital, bem como o número total de filhotes machos e fêmeas por ninhada foi determinado no 1º dia pós-natal. À distância anogenital foi normalizada pela raiz cúbica do peso corpóreo como recomendado pela literatura (Gallavan et al., 1999). No dia

do protocolo de reatividade vascular, os seguintes órgãos foram retirados para a pesagem: ventrículo esquerdo e direito; rins direito e esquerdo e adrenais direita e esquerda.

Desmame

O desmame dos filhotes foi realizado entre o 23º dia de vida pós-natal.

Determinação da Pressão Arterial

A pressão arterial (PA) sistólica caudal do animal não anestesiado foi verificada, através de um eletroesfigmomanômetro (Narco Bio-Systems), no 28º, 42º, 56º e 70º dia de vida pós-natal. O valor da PA foi a média de três registros consecutivos obtidos a intervalos de 2 minutos.

Análise Quantitativa de Permetrina

Os níveis de permetrina foram quantificados nas ratas no 21º dia de prenhez e nos filhotes com 70 dias de idade. As amostras de sangue de ratas prenhas foram colhidas 3 horas após a gavagem, respeitando as características farmacocinéticas da droga relatadas na literatura, pico para concentração plasmática máxima de 2-4 horas e tempo de meia vida plasmática de 12,3 horas após administração oral em ratos (Anadon et al., 1991). Os animais foram exanguinados e o sangue que verteu do tronco cerebral foi recolhido e armazenado em baixa temperatura para dosagem de permetrina por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC: cromatógrafo líquido modelo 480°C, Instrumentos Científicos C.G. Ltda, São Paulo, Brasil). Os procedimentos foram os mesmos descritos por Bissacot e Vassilieff (1997). Os resíduos de permetrina foram extraídos da amostra com acetonitrila, previamente acidificada com ácido clorídrico 0,1N, deixada em agitação por trinta minutos, filtrada e, após seca, ressuspensa com *n*-hexano e dietil éter *n*-hexano e purificado através de coluna com Florisil. As medidas quantitativas foram realizadas através da técnica de padrão externo e da medida da área de pico dos cromatogramas. O limite de detecção do HPLC foi < 0,001 µg/ml.

Avaliação das adrenais, rins e coração

Os rins, as adrenais e o coração foram removidos para a avaliação dos pesos líquidos, bem como das relações: VE/PCF= relação entre o peso do ventrículo esquerdo (VE) e o peso corporal final (PCF) e VD/PCF= relação entre o peso do ventrículo direito (VD) e PCF.

Reatividade Vascular

Somente ratos machos adultos com 10 semanas (70-75 dias de idade) foram utilizados para os estudos de reatividade vascular.

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (300 mg/kg i.p.) e mortos por decapitação, após este procedimento foram submetidos a uma toracotomia, e em seguida procedeu-se o isolamento da aorta torácica. Após a remoção do tecido adiposo, a aorta foi subdividida em quatro anéis. Indistintamente, dois dos anéis tiveram os endotélios removidos mecanicamente. Os anéis foram suspensos, em cuba para órgão isolado, contendo solução de Krebs-Henseleit modificado (composição em mM: NaCl 113,0; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,1; NaHCO₃ 25,0; Glicose 11,0; ácido ascórbico 0,11). A solução nutriente foi mantida a 37,0 ± 0,5°C e saturada com carbogênio (95% O₂, 5% CO₂). Os anéis foram conectados a transdutores de força isométricos, acoplados a um fisiógrafo (Ugo Basile).

O período de estabilização foi de 1h, sob uma tensão inicial de 1,5 g mantida ao longo de todo o experimento, com trocas de solução nutriente e ajuste de tensão a cada 15 min. Ao se completar o período de estabilização de 1h, curvas concentração-efeito (CCEs) à noradrenalina (NA 10⁻¹³ a 10⁻⁴ M) foram obtidas em anéis de aorta isolados de ratos CTRL, RA, PERM e RA/PERM. Ao final das CCEs à NA doses únicas de acetilcolina (10⁻⁶ M) e nitroprussiato de sódio (NP 10⁻⁴ M) foram utilizadas para testar a integridade da célula endotelial e da camada muscular lisa, respectivamente. Após o término da 1ª CCE à NA, houve um período de estabilização de 45 minutos numa solução de Krebs livre de cálcio e contendo EDTA. De modo a esgotar o cálcio intracelular, fenilefrina 10⁻⁵ M foi adicionada sucessivamente até a ausência de resposta contrátil. Após este procedimento a preparação foi despolarizada com KCl 80mM ainda num Krebs sem cálcio na ausência de EDTA, e

finalmente CCEs ao cálcio (0,2; 0,4; 0,8; 2; 4; 8 e 10 mM) foram obtidas. A realização de curvas consecutivas não altera a reatividade da aorta aos agentes utilizados (dados anteriores em nosso laboratório).

Quando pertinente, prazosin (10^{-8} M, bloqueador específico de receptor α_1 -adrenérgico) ou N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3×10^{-4} M, inibidor inespecífico da óxido nítrico sintase, NOS) foram adicionados e permaneceram em contato com a preparação até o término da CCE à NA.

Para estudar o papel do endotélio, as respostas aos agentes vasoconstritores foram obtidas em anéis de aorta com (+E) e sem (-E) endotélio, estudados em paralelo. A reatividade vascular foi avaliada através das alterações da resposta máxima e potência (concentração eficaz 50% - CE50) do tecido aos agentes vasoconstritores em experimentos individuais. A CE50 é definida como a concentração molar do agonista responsável pela obtenção de um efeito igual a 50% do efeito máximo. As CE50s foram medidas por determinação gráfica e as médias apresentadas como antilogaritmo da média aritmética dos log CE50 de cada experimento, com os respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%.

Estudo do comportamento

Ratas com 21 dias de prenhez, submetidas à exposição da permetrina associado ou não com a desnutrição *in utero*, tiveram seu comportamento avaliado em campo aberto e em labirinto em cruz elevado. Todos os experimentos de comportamento foram filmados por vídeo câmera para posterior análise.

Campo aberto

A atividade geral dos animais foi avaliada por meio da observação direta, durante 5 minutos, no campo aberto e consistiu na mensuração de comportamentos eliciados num espaço aberto e desconhecido, do qual o animal não pode escapar, construído conforme especificações modificadas por Broadhurst (1960). O campo aberto consiste de uma arena circular de madeira, com 87 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, sendo o assoalho dividido

por meio de três círculos concêntricos e segmentos de reta, em dezenove partes semelhantes. A arena dista 48 cm do chão e tem uma cortina na sua parte frontal, que permite ao observador visão geral do animal, e dificulta a este, a visão do experimentador.

Os animais exibem uma tendência de se movimentar, mesmo na ausência de estímulos. Ao final de cada sessão, o aparato foi limpo com álcool etílico 5%, v/v.

No campo aberto foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Locomoção: número de vezes em que o animal invade, com as quatro patas, um dos campos da arena;

- Levantar: número de vezes em que o animal se apóia nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao piso, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto;

- Limpeza: tempo em segundos de execução de movimentos com as patas anteriores em direção à boca ou à cabeça, podendo haver continuidade destes em direção aos pavilhões auriculares e/ou movimento de lambar dirigido principalmente às porções laterais do corpo e a região genital;

- Congelamento: tempo em segundos em que o animal permanece em imobilidade tônica. Geralmente com o ventre rente ao chão, os olhos bem abertos e com a respiração irregular.



Figura 1. Campo aberto.

Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado é um modelo experimental para a mensuração de ansiedade em roedores (Pellow & File, 1986).

O aparato do labirinto em cruz elevado consiste numa plataforma com dois braços abertos (50x10) e dois braços fechados (50x10x40), perpendiculares. A altura do labirinto em relação ao chão é de 50 cm.

O animal foi colocado no centro do labirinto, denominado centro ou espaço morto, com a cabeça voltada para o espaço aberto, sendo-lhe permitido explorar livremente o aparato por 5 minutos. Durante este período foram registrados:

- o número de entradas nos braços abertos, nos braços fechados, e no centro: número de vezes que o animal adentrou, com as quatro patas no aparato.
- o tempo de permanência nos braços abertos, nos braços fechados e no centro: tempo em segundos que o animal gastou no aparato.



Figura 2. Labirinto em cruz elevado.

Análise Estatística

Número de filhotes por ninhada, distância anogenital de filhotes ao nascimento, reatividade vascular (resposta máxima e CE50%) aos agentes vasoativos, peso de órgãos de ratos machos adultos e o comportamento de ratas prenhes foram comparados através da análise de variância multifatorial, com teste a posteriori de Tukey (SIGMASTAT 3.2). Os fatores para análise foram restrição alimentar e exposição à permetrina. A evolução da

pressão arterial e do peso corpóreo de ratos machos adultos expostos a diferentes protocolos *in utero*, bem como a ingestão alimentar materna foi realizada pela análise de variância no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores e complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou intervalo de confiança de 95%, para a reatividade vascular e CE50% respectivamente, e média $\pm$ desvio padrão para o comportamento. $P < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

Drogas e Soluções

As seguintes drogas serão utilizadas: bitartarato de noradrenalina (Sigma Chemical Co.); cloridrato de acetilcolina (Sigma Chemical Co.); L-NAME (Sigma Chemical Co.); nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Co.); prazosin (Sigma Chemical Co.); e CaCl (Sigma Chemical Co.) e permetrina – pureza: 96,2% (Bilag Industries Ltda, Índia).

A permetrina foi diluída em óleo de milho e as demais soluções foram preparadas utilizando-se solução Krebs-Henseleit.

Resultados

Peso Corpóreo e Procedimentos Pós-Natais

O peso corpóreo materno mostrou aumento gradativo em função da prenhez e não foi alterado pela exposição pré-natal à perimetrina. Entretanto, a restrição alimentar, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à perimetrina, reduziu significativamente a evolução do peso corpóreo materno a partir do 11º dia de prenhez (Figura 3 e Tabela 1).

A restrição alimentar isoladamente e em associação à exposição pré-natal à perimetrina determinou diminuição no peso da ninhada e o peso corpóreo individual dos filhotes ao nascimento (Figura 4 e Tabela 2). Ainda, o peso corpóreo nos diferentes grupos experimentais a partir do nascimento até o 70º dia de idade, mostrou aumento gradativo durante o desenvolvimento pós-natal. Entretanto, não houve qualquer alteração na evolução do peso corpóreo pelos diferentes protocolos experimentais até a idade adulta, exceto ao nascimento (Figura 5).

Nenhum dos tratamentos afetou o número de filhotes por ninhada, quer sejam machos ou fêmeas (Tabela 2). Entretanto, a distância anogenital de filhotes machos foi reduzida tanto pela restrição alimentar *in utero* quanto pela exposição à perimetrina, isoladamente e em associação. Ainda, a exposição à perimetrina, isoladamente, reduziu de modo significativo a distância anogenital de filhotes fêmeas (Tabela 2).

O tratamento com perimetrina não determinou qualquer alteração na ingestão alimentar de ratas prenhes comparado ao grupo controle (Figura 6).

Não houve qualquer alteração do peso dos tecidos (ventrículos, rins e adrenais) de ratos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à perimetrina (Tabela 3).

Pressão arterial

A pressão arterial sistólica caudal, mensurada nos diferentes grupos experimentais a partir do desmame até o 70º dia de idade, mostrou aumento gradativo durante o desenvolvimento pós-natal. Entretanto, os valores observados em ratos submetidos à

restrição alimentar *in utero* isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à permetrina determinou um aumento significativo na pressão arterial a partir da oitava semana de vida pós-natal e se manteve até a idade adulta (Figura 7).

Determinação dos níveis de permetrina no sangue

A concentração de permetrina mensurada nas mães no 21º dia de prenhez mostrou-se aumentada em ratas expostas a permetrina durante a prenhez, tanto isoladamente quanto em associação à restrição alimentar. Em mães controles e submetidas à restrição alimentar *in utero*, bem como em descendentes machos adultos dos diferentes grupos experimentais, o nível de permetrina esteve abaixo do limite de detecção que correspondeu a 0,001µg/ml (tabela 4).

Reatividade vascular

Independentemente da presença do endotélio, a exposição à permetrina *in utero* isoladamente e esta condição em associação a restrição alimentar determinaram um aumento de resposta máxima da aorta ao cálcio sem alteração nos valores de EC50 (Figura 8; Tabela 5). Contrariamente, a reatividade à noradrenalina em aorta com endotélio, expressa pela resposta máxima e EC50, não diferiu entre os grupos experimentais, a saber, CTRL, RA, PERM, e RA/PERM (Figura 9; Tabela 6). Ainda, a presença de prazosin determinou um desvio à direita na curva concentração-efeito à noradrenalina tanto em aorta com quanto sem endotélio que não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 10; Tabela 7).

A remoção do endotélio, independentemente da presença de prazosin, determinou um aumento significativo da resposta máxima à noradrenalina, que atingiu valores semelhantes em todos os grupos experimentais (Figuras 9 e 10; Tabelas 6 e 7). Entretanto, este procedimento não interferiu na resposta máxima ao cálcio (Figura 8; Tabela 5).

A presença de L-NAME determinou um aumento na resposta máxima à noradrenalina em anéis com endotélio, que atingiu valores semelhantes em todos os grupos experimentais e

não diferiram daqueles observados nas preparações sem endotélio para a noradrenalina (Figura 11; Tabela 8).

Comportamento

Campo aberto

A desnutrição intra-uterina independente da associação à perimetrina determinou aumento significativo nos parâmetros locomoção e levantar, avaliados no campo aberto (Tabela 9). Contrariamente, a exposição pré-natal à perimetrina e a restrição alimentar, isoladamente ou em associação, não determinaram qualquer alteração significativa nos parâmetros limpeza e congelamento avaliados, no campo aberto (Tabela 9).

A exposição à perimetrina durante a prenhez não determinou qualquer alteração do comportamento de ratas no campo aberto, avaliado no 21º dia de prenhez (Tabela 9).

Labirinto em cruz elevado

A desnutrição *in utero* independente da associação à perimetrina determinou aumento significativo no número de entradas: braços fechados, braços abertos e centro no labirinto em cruz elevado (Tabela 10). O tempo de permanência nos braços abertos e no centro foi significativamente aumentado pela desnutrição *in utero* independente da associação à perimetrina. No entanto, houve diminuição do tempo de permanência avaliado nos braços fechados (Tabela 11), quando comparado aos respectivos grupos controle e perimetrina. Ainda, a exposição à perimetrina durante a prenhez não determinou qualquer alteração do comportamento de ratas no labirinto em cruz elevado, avaliado no 21º dia de prenhez (Tabelas 10 e 11).

Tabela 1. Valores médios do peso materno durante a prenhez

Peso Materno	Controle	Restrição	Permetrina	Associação
Dia 0 de prenhez	255,7 ± 7,7	263,9 ± 9,4	256,6 ± 14,9	261,7 ± 10,1
6° dia de prenhez	273,6 ± 6,9	257,4 ± 7,3	275,7 ± 28,0	250,6 ± 6,3
11° dia de prenhez	287,2 ± 5,8	256,5 ± 12,2 ⁺	291,7 ± 26,4	251,6 ± 3,9 ⁺
21° dia de prenhez	360,7 ± 7,8	292,8 ± 12,5 ⁺	376,5 ± 20,4	290,8 ± 6,6 ⁺

Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11° ao 21° dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Dados expressos como média ± EPM. * P < 0,05 em relação aos grupos controle. ⁺ P < 0,05 em relação à permetrina. Número de animais = 6 - 8.

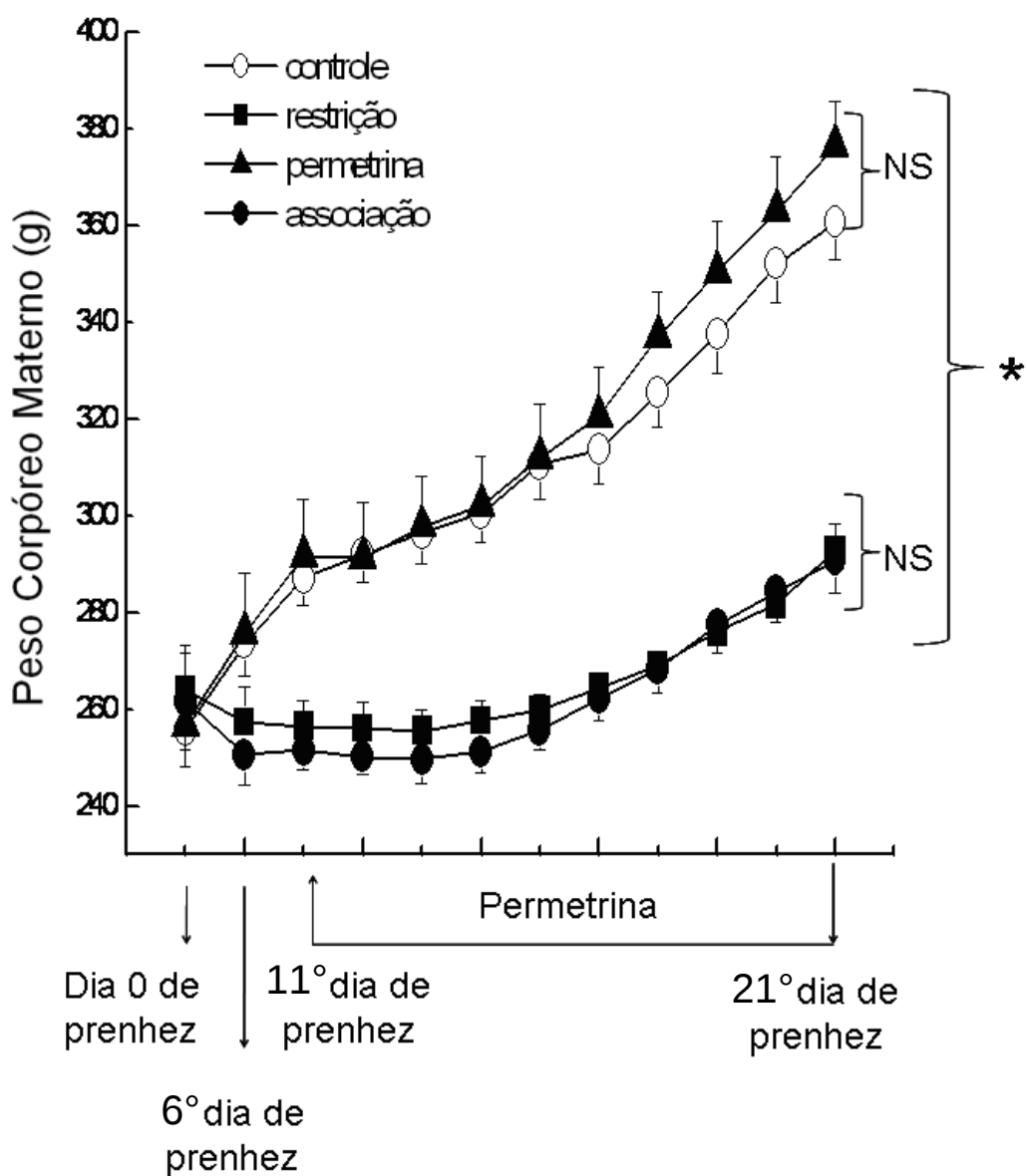


Figura 3. Evolução do peso corpóreo materno do dia zero ao 21º dia de prenhez. Ratas prenhes submetidas ou não à desnutrição, isoladamente ou em associação à exposição à permetrina *in utero*. Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11º ao 21º dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. NS: não significativo. * $P < 0,05$. Número de animais = 6 - 8.

Tabela 2. Valores médios do número de filhotes por ninhada, da distância ano-genital e do peso ao nascimento de filhotes de mães expostas ou não à permetrina, isoladamente ou em associação à restrição alimentar durante a prenhez

Parâmetros		Controle	Restrição	Permetrina	Associação
Número de Filhotes por Ninhada (n= 6-8)	Total	11,33 ± 0,55	12,00 ± 0,31	12,40 ± 0,87	13,33 ± 1,45
	Machos	5,83 ± 0,54	4,20 ± 1,15	5,60 ± 0,40	7,60 ± 1,20
	Fêmeas	5,50 ± 0,54	7,40 ± 1,28	6,80 ± 1,20	5,00 ± 0,00
Distância Anogenital ao Nascimento (mm) (n=10-34)	Fêmeas	1,17 ± 0,01	1,17 ± 0,01	1,11 ± 0,01 ^{*#}	1,19 ± 0,01
	Machos	2,21 ± 0,01	2,09 ± 0,01 [*]	1,90 ± 0,01 [*]	2,09 ± 0,02 [*]
Peso Filhotes ao Nascimento (g) (n= 6-8)		6,42 ± 0,68	5,35 ± 0,29 ^{*+}	6,07 ± 0,18	5,15 ± 0,17 ^{*+}

Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11° ao 21° dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Dados expressos como média ± EPM. * P < 0,05 em relação aos grupos controle. [#] P < 0,05 em relação à restrição. ⁺ P < 0,05 em relação à permetrina. n = Número de animais.

Peso nascimento

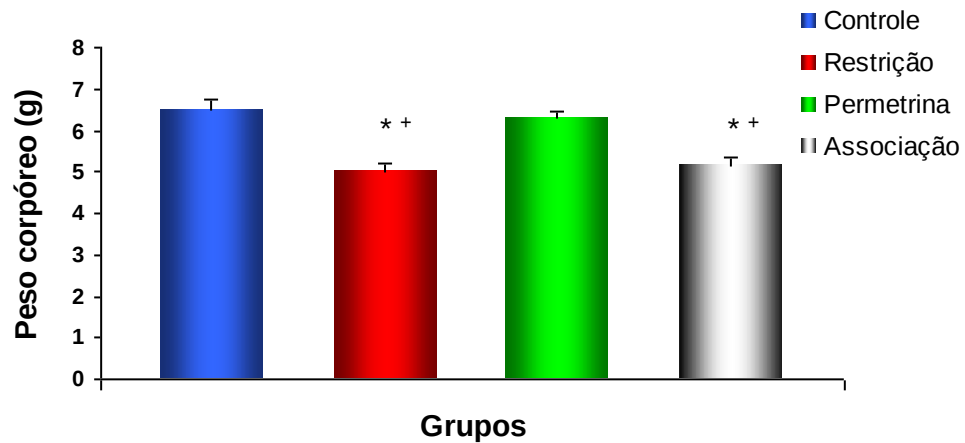


Figura 4. Peso da ninhada ao nascimento de mães submetidas ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à permetrina. Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11° ao 21° dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Dados expressos como média $\pm$ EPM. *P < 0,05 em relação ao grupo controle. + P < 0,05 em relação à permetrina. Número de animais = 8 - 10.

EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL

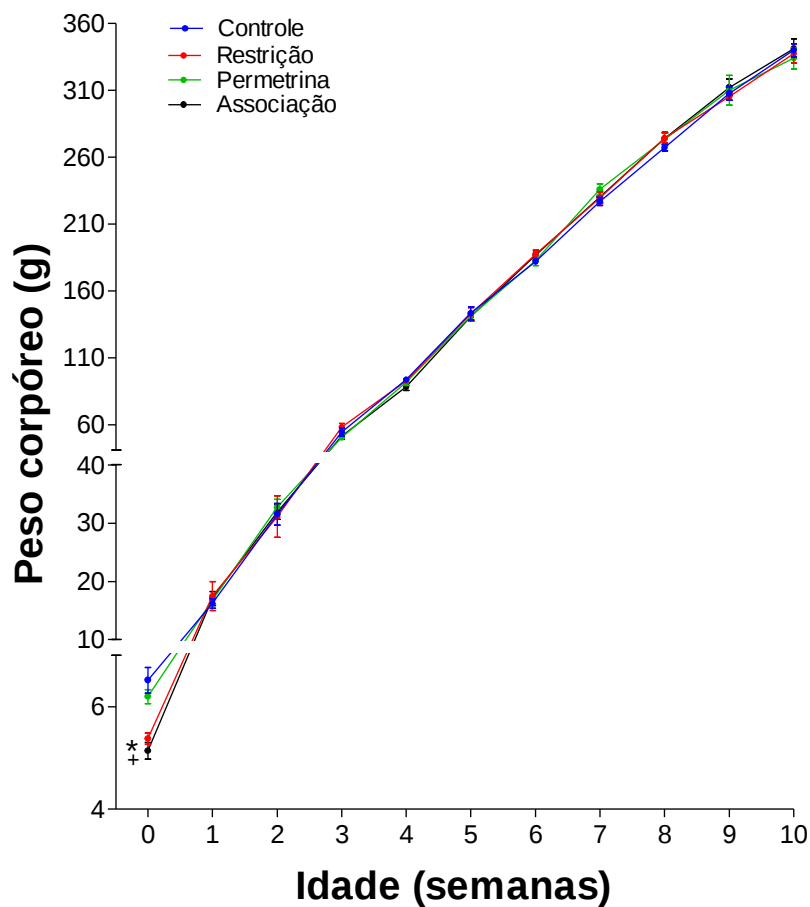


Figura 5. Evolução do peso corpóreo de ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à permetrina. Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11º ao 21º dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Dados expressos como média $\pm$ EPM. Número de animais = 6 - 8. * $P < 0,05$ em relação ao controle. + $P < 0,05$ em relação à permetrina

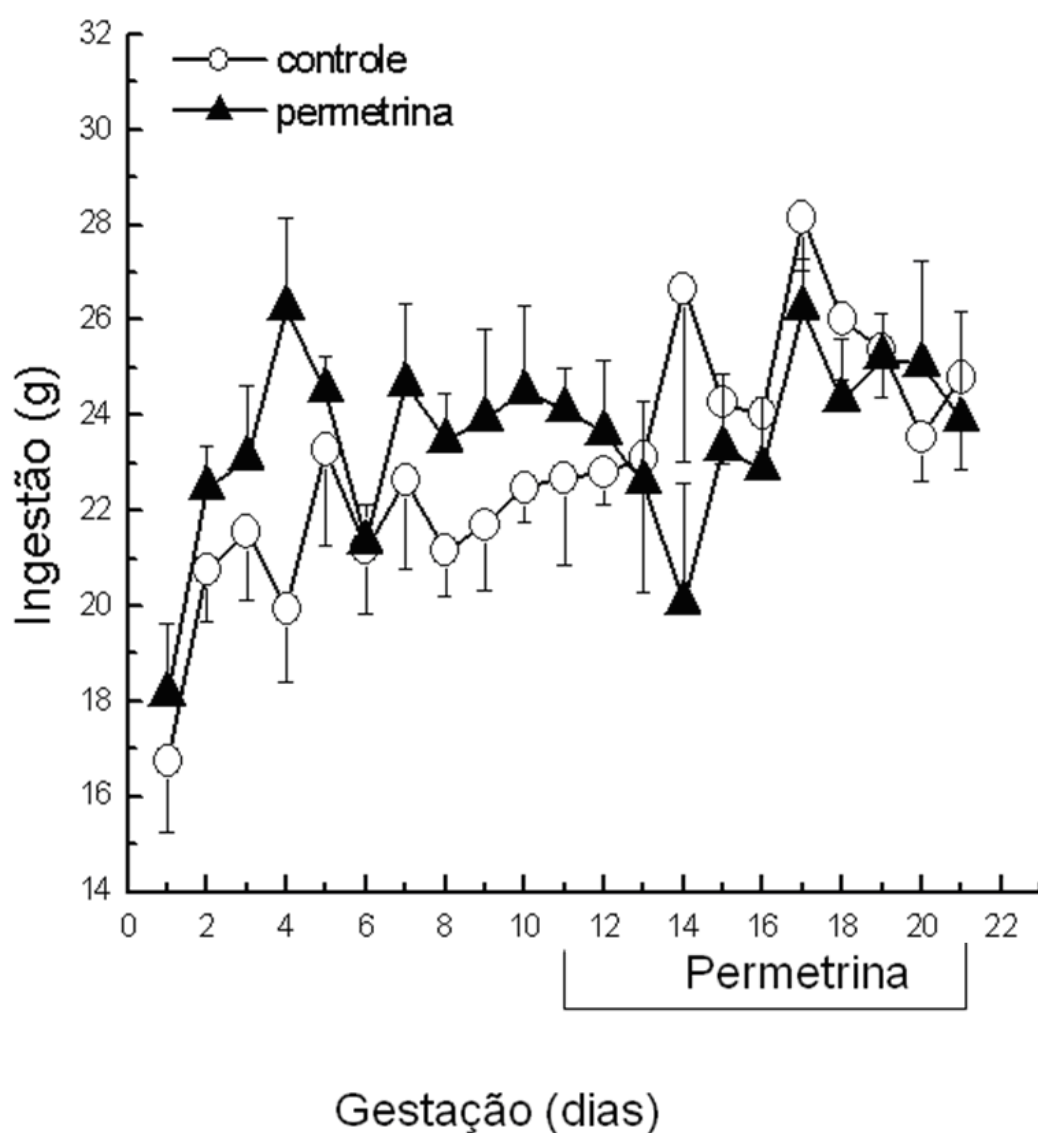


Figura 6. Evolução da ingestão alimentar de ratas prenhes, submetidas ou não à desnutrição durante a prenhez, isoladamente ou em associação à exposição à permetrina *in utero*. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11º ao 21º dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Uma vez que ratas sob restrição alimentar consomem toda a ração 11,5 gramas (50% do controle) a evolução da ingestão nesta condição é indeterminada. Número de animais = 6 - 8.

Tabela 3. Valores médios da relação: peso do ventrículo/peso corpóreo, dos rins, e das adrenais de ratos machos adultos provenientes de mães submetidas ou não à restrição alimentar, isoladamente ou em associação à exposição à permetrina durante a prenhez

Parâmetros	Controle	Restrição	Permetrina	Associação
Ventrículo Direito/ Peso corpóreo (g x 10 ⁻⁴)	7,15 ± 0,03	6,65 ± 0,06	6,61 ± 0,03	6,80 ± 0,07
Ventrículo Esquerdo/ Peso corpóreo (g x 10 ⁻³)	2,11 ± 0,05	2,24 ± 0,01	2,05 ± 0,08	1,99 ± 0,08
Rim direito (g)	1,35 ± 0,03	1,33 ± 0,02	1,34 ± 0,02	1,41 ± 0,03
Rim esquerdo (g)	1,33 ± 0,03	1,26 ± 0,02	1,33 ± 0,07	1,38 ± 0,02
Adrenal esquerda (g x 10 ⁻⁴)	2,9 ± 0,1	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,1	2,9 ± 0,7
Adrenal direita (g x 10 ⁻⁴)	2,7 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,2

Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11° ao 21° dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Dados expressos como média ± EPM. Número de animais = 8 -10.

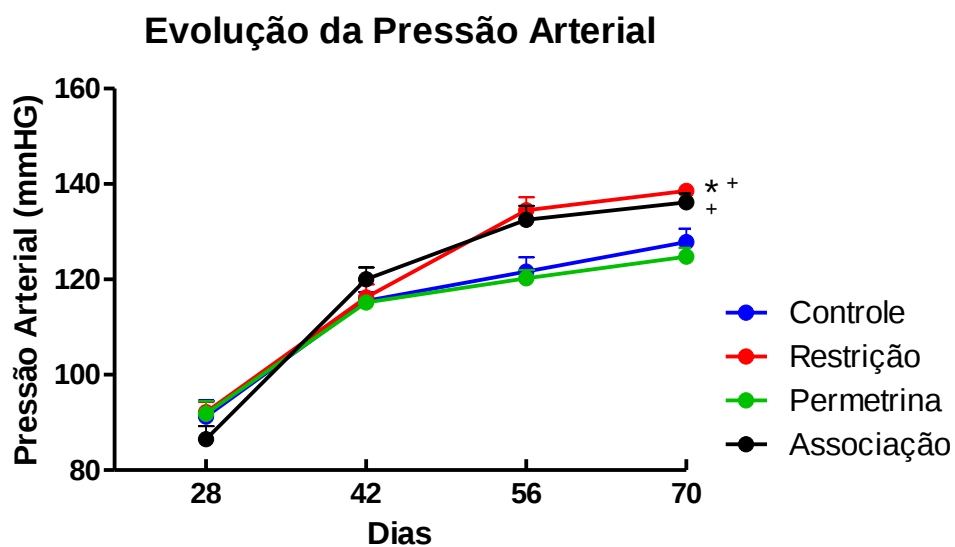


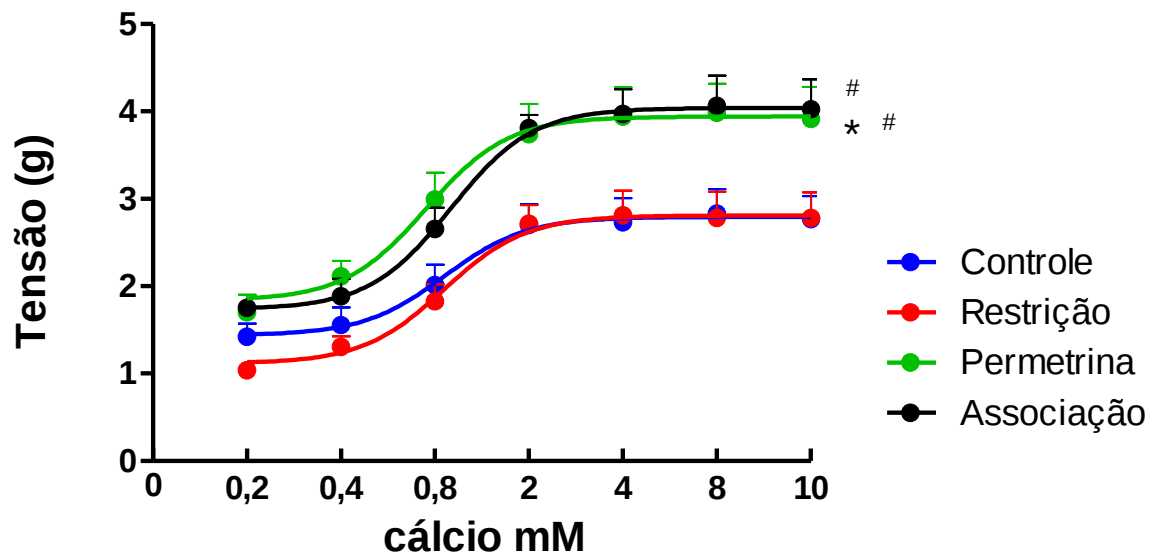
Figura 7. Evolução da pressão arterial sistólica caudal de ratos machos adultos (10 semanas) submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à permetrina. Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11° ao 21° dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Dados expressos como média $\pm$ EPM. *P < 0,05 em relação ao controle, +P < 0,05 em relação à permetrina. Número de animais = 10-12

Tabela 4. Concentração sanguínea de permetrina nas mães e nos descendentes machos adultos

GRUPOS	¹ MÃES (µg/ml)	RATOS MACHOS (70 dias de idade) (µg/ml)
CONTROLE	ND	ND
RA	ND	ND
PERM	0,127 ± 0,086	ND
RA/PERM	0,193 ± 0,139	ND

¹Os dados representam à média ± EPM. Restrição alimentar - RA: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina - PERM: ratas que receberam gavagem com permetrina (100 mg/Kg) diluída em óleo de milho do 11° ao 21° dias de prenhez. Associação dos protocolos anteriormente descritos - RA/PERM. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de intoxicação. ND: não detectado: < 0,001 µg/ml. Número de animais = 5 - 6.

Com endotélio



Sem endotélio

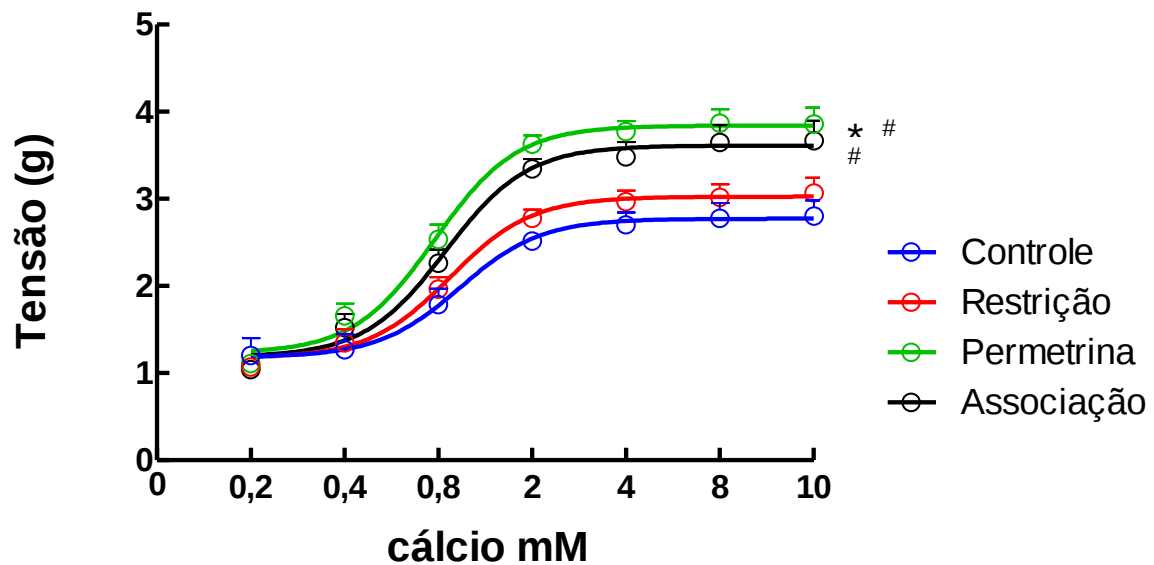


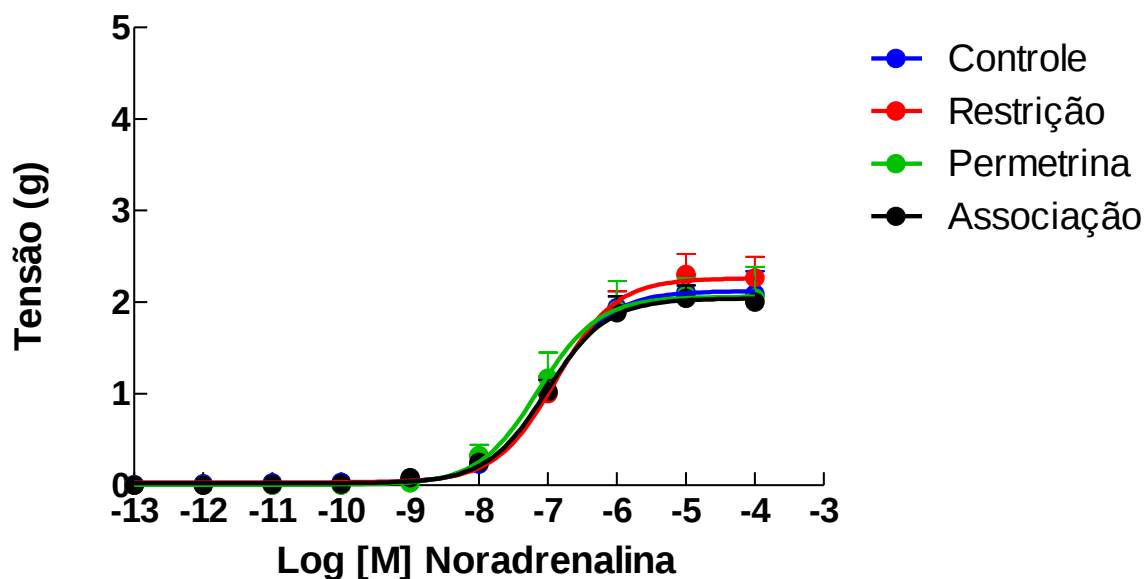
Figura 8. Curvas concentração-efeito ao cálcio obtidas em dois anéis, com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à permetrina. Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11° ao 21° dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Dados expressos como média $\pm$ EPM. *P < 0,05 em relação ao controle e #P < 0,05 em relação à restrição. Número de animais = 8 - 10.

Tabela 5. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito ao cálcio obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição *in utero*, isoladamente e em associação à exposição pré-natal à perimetrina

Ratos adultos 70-75 dias de idade	¹ Resposta máxima tensão (g)		² CE50 (mM)	
	Com endotélio	Sem endotélio	Com endotélio	Sem endotélio
CTRL	2,85 ± 0,27	2,83 ± 0,52	0,36 (0,27 – 0,47)	0,47 (0,30 – 0,73)
RA	2,84 ± 0,29	3,10 ± 0,73	0,53 (0,35 – 0,80)	0,48 (0,36 – 0,63)
PERM	4,02 ± 0,33 ^{*#}	3,76 ± 0,67 ^{*#}	0,36 (0,30 – 0,44)	0,51 (0,43 – 0,60)
RA/PERM	4,11 ± 0,33 [#]	3,79 ± 0,90 [#]	0,48 (0,35 – 0,66)	0,60 (0,44 – 0,82)

¹Os dados representam a média ± EPM. ²Os dados representam a média, entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança 95%. Restrição alimentar - RA: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina - PERM: ratas que receberam gavagem com permetrina (100 mg/Kg) diluída em óleo de milho do 11° ao 21° dias de prenhez. Associação dos protocolos anteriormente descritos - RA/PERM. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de intoxicação. *P < 0,05 em relação ao controle e [#]P < 0,05 em relação à restrição alimentar. Número de animais = 8 - 10

Com endotélio



Sem endotélio

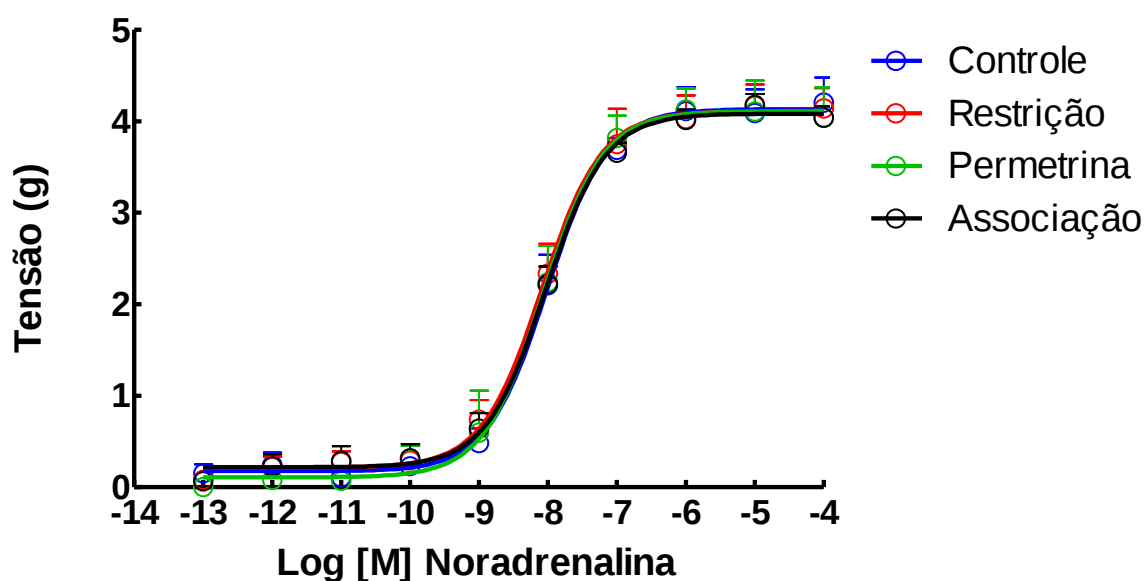


Figura 9. Curvas concentração-efeito à Noradrenalina obtidas em dois anéis, com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à permetrina. Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11º ao 21º dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Dados expressos como média $\pm$ EPM. Número de animais 8 -10.

Tabela 6. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito à noradrenalina obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição *in utero*, isoladamente e em associação à exposição pré-natal à permetrina

Ratos adultos 70-75 dias de idade	¹ Resposta máxima tensão (g)		² CE50 (x10 ⁻⁸ M)	
	Com endotélio	Sem endotélio	Com endotélio	Sem endotélio
CTRL	2,34 ± 0,20	4,32 ± 0,24	15,17 (8,45 – 27,22)	0,70 (0,17 – 2,86)
RA	2,60 ± 0,18	4,33 ± 0,23	11,48 (5,99 – 22,02)	0,63 (0,23 – 1,69)
PERM	2,51 ± 0,35	4,50 ± 0,28	9,74 (4,10 – 23,17)	0,86 (0,23 – 3,17)
RA/PERM	2,22 ± 0,13	4,17 ± 0,11	12,14 (6,87 – 21,42)	0,62 (0,25 – 1,51)

¹Os dados representam a média ± EPM. ²Os dados representam a média, entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança 95%. Restrição alimentar - RA: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina - PERM: ratas que receberam gavagem com permetrina (100 mg/Kg) diluída em óleo de milho do 11° ao 21° dias de prenhez. Associação dos protocolos anteriormente descritos - RA/PERM. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de intoxicação. Número de animais = 8 -10.

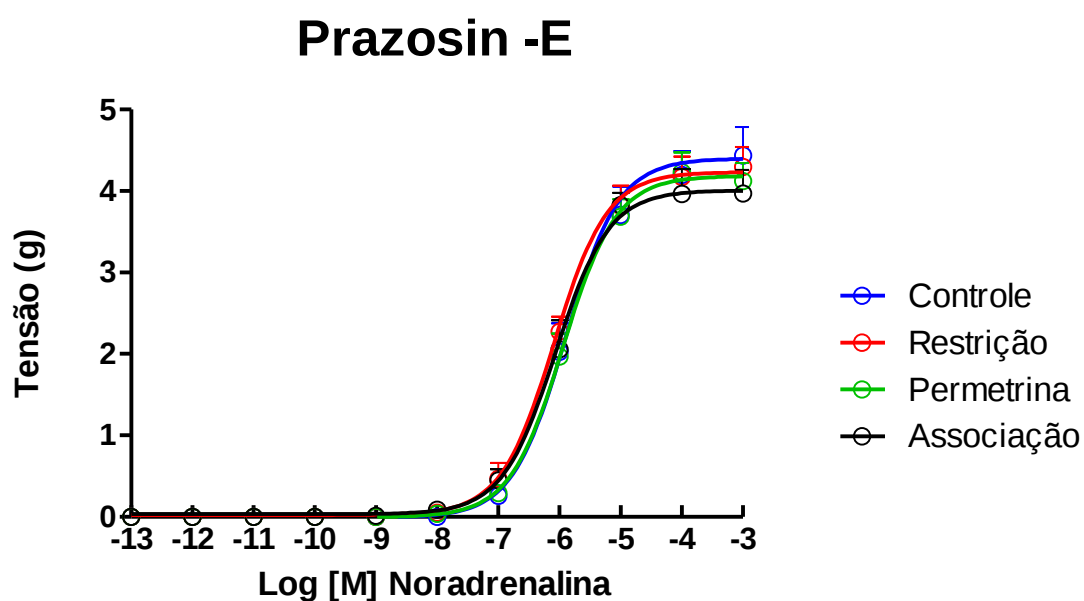
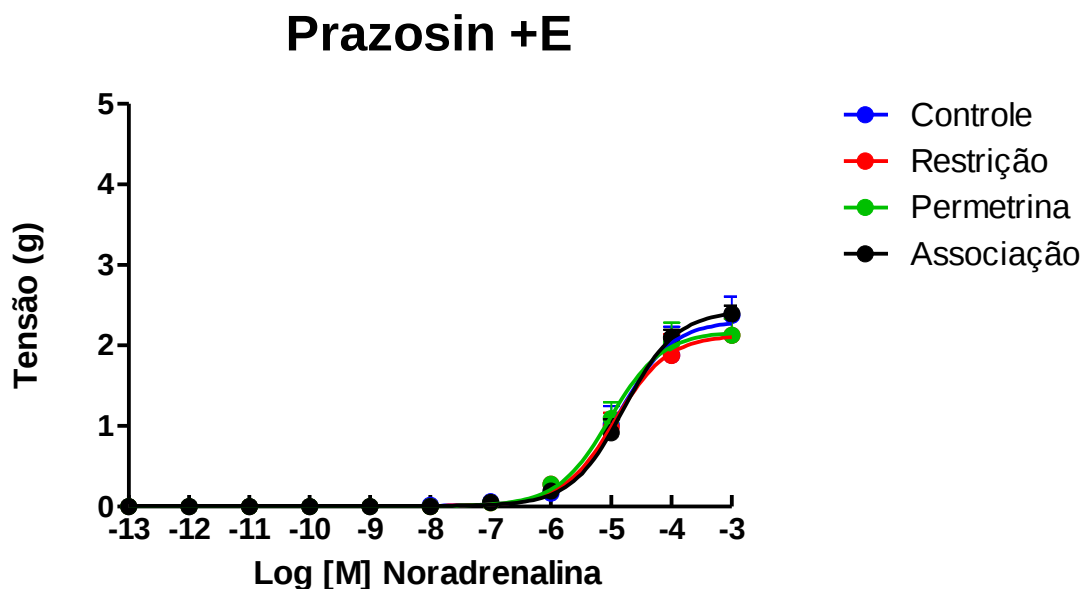


Figura 10. Curvas concentração-efeito à noradrenalina na presença de prazosin (10^{-8} M, adicionado nos 30 minutos finais do período de estabilização), obtidas em dois anéis com (+E) e sem endotélio (-E), da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à permetrina. Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11° ao 21° dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Dados expressos como média $\pm$ EPM. Número de animais 8-10.

Tabela 7. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito à noradrenalina na presença de prazosin, obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição *in utero*, isoladamente e em associação à exposição pré-natal à perimetrina

Ratos adultos 70-75 dias de idade	¹ Resposta máxima tensão (g)		² CE50 (x10 ⁻⁸ M)	
	Com endotélio	Sem endotélio	Com endotélio	Sem endotélio
CTRL	2,66 ± 0,22	4,53 ± 0,96	2,17 (0,65 – 7,22)	0,13 (0,08 – 0,23)
RA	2,15 ± 0,21	4,29 ± 0,69	1,13 (0,3 – 3,5)	0,07 (0,03 – 0,16)
PERM	2,66 ± 0,11	4,15 ± 0,92	2,23 (1,08 – 4,60)	0,18 (0,10 – 0,33)
RA/PERM	2,39 ± 0,10	4,10 ± 0,73	4,50 (2,4 – 8,12)	0,08 (0,02 – 0,23)

¹Os dados representam a média ± EPM. ²Os dados representam a média, entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança 95%. Prazosin: 10⁻⁸ M adicionado às preparações nos 30 minutos finais do período de estabilização. Restrição alimentar - RA: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Perimetrina - PERM: ratas que receberam gavagem com perimetrina (100 mg/Kg) diluída em óleo de milho do 11° ao 21° dias de prenhez. Associação dos protocolos anteriormente descritos - RA/PERM. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de intoxicação. Número de animais = 8 - 10.

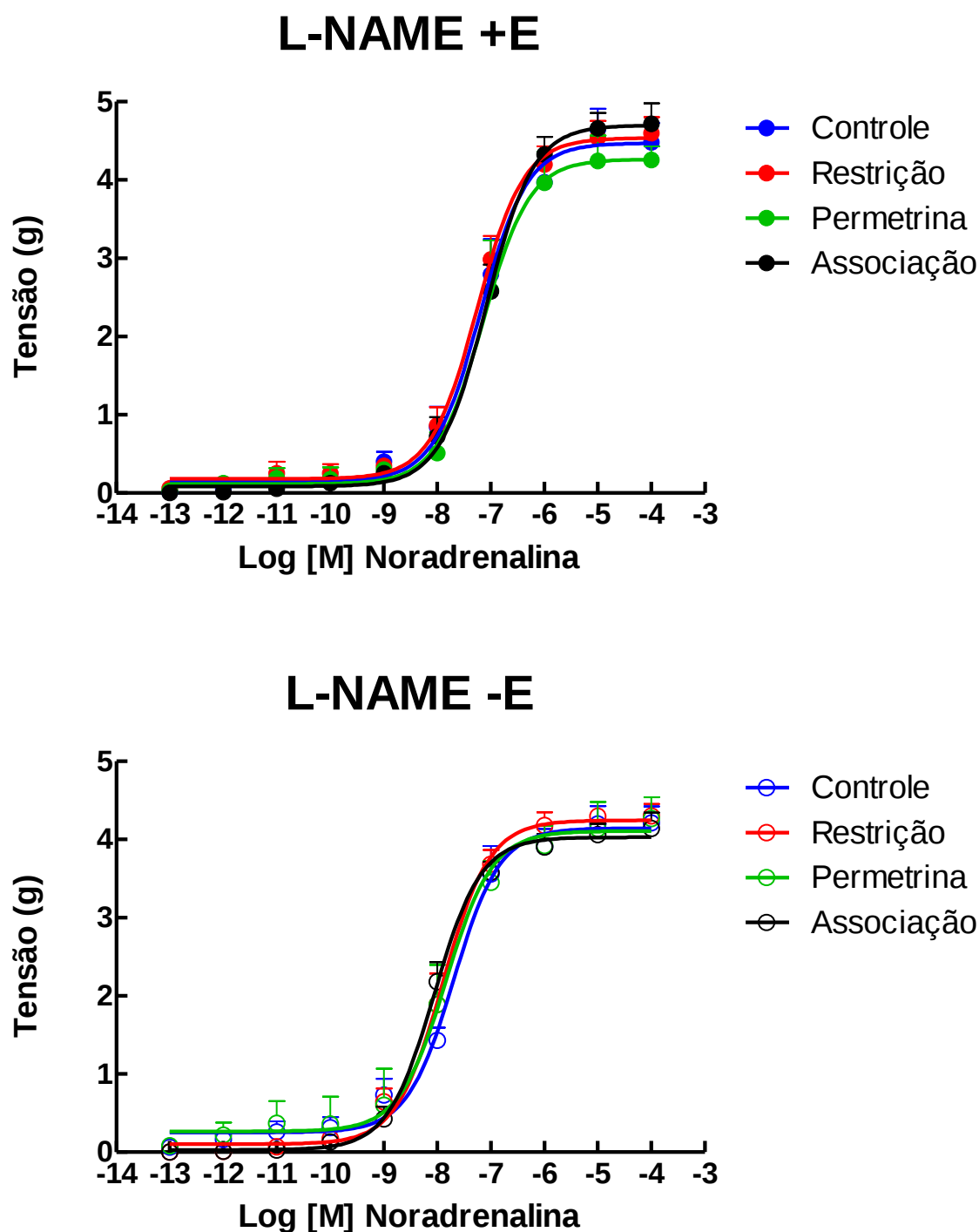


Figura 11. Curvas concentração-efeito à noradrenalina na presença de L-NAME (3×10^{-4} M, adicionado nos 30 minutos finais do período de estabilização), obtidas em dois anéis com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à permetrina. Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11° ao 21° dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Dados expressos como média $\pm$ EPM. Número de animais = 8 - 10.

Tabela 8. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito à noradrenalina na presença de L-NAME, obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada ratos machos adultos submetidos ou não à desnutrição *in utero*, isoladamente e em associação à exposição pré-natal à perimetrina

Ratos adultos 70-75 dias de idade	¹ Resposta máxima tensão (g)		² CE50 (x10 ⁻⁸ M)	
	Com endotélio	Sem endotélio	Com endotélio	Sem endotélio
CTRL	4,77 ± 0,19	4,13 ± 0,19	1,85 (0,53 – 6,49)	1,48 (0,70 – 3,14)
RA	4,65 ± 0,21	4,55 ± 0,21	3,25 (1,31 – 8,08)	1,35 (0,52 – 3,54)
PERM	4,51 ± 0,28	4,40 ± 0,26	3,87 (0,50 – 29,64)	1,19 (0,17 – 8,16)
RA/PERM	4,82 ± 0,23	4,3 ± 0,15	5,11 (1,45 – 17,90)	1,02 (0,47 – 2,22)

¹Os dados representam a média ± EPM. ²Os dados representam a média, entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança 95%. L-NAME: (3 x 10⁻⁴ M, adicionado nos 30 minutos finais do período de estabilização), Restrição alimentar - RA: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Perimetrina - PERM: ratas que receberam gavagem com perimetrina (100 mg/Kg) diluída em óleo de milho do 11° ao 21° dias de prenhez. Associação dos protocolos anteriormente descritos - RA/PERM. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de intoxicação. Número de animais = 8 - 10.

Tabela 9. Atividade geral, expressa pelo levantar, limpeza, congelamento e locomoção em campo aberto, de ratas com 21 dias de prenhez, expostas ou não à permetrina e submetidas ou não à desnutrição durante a prenhez

CAMPO ABERTO				
GRUPOS	Levantar (número)	Limpeza (segundos)	Congelamento (segundos)	Locomoção (número)
Controle	11,1 ± 8,5	2,4 ± 1,6	0,3 ± 0,8	43,1 ± 29,3
Restrição Alimentar	21,3 ± 8,2 ⁺	2,1 ± 1,8	0,7 ± 1,6	68,9 ± 17,4 ⁺
Permetrina	13,0 ± 4,7	2,1 ± 1,9	0,3 ± 0,6	46,0 ± 17,1
Associação	18,7 ± 6,7 ⁺	0,8 ± 0,6	0,4 ± 0,7	68,0 ± 17,4 ⁺

Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11° ao 21° dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Os valores representam a média ± desvio padrão. *P < 0,05 em relação ao controle e ⁺P < 0,05 em relação à permetrina. Número de animais = 10.

Tabela 10. Atividade geral expressa pelo número de entradas nos braços abertos, fechados e centro em labirinto em cruz elevado, de ratas com 21 dias de prenhez, expostas ou não à permetrina e submetidas ou não à desnutrição durante a prenhez

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO			
GRUPOS	Entrada braços abertos (n° vezes)	Entrada braços fechados (n° vezes)	Entrada centro (n° vezes)
Controle	1,3 ± 1,7	5,1 ± 3,6	6,5 ± 4,8
Restrição Alimentar	5,0 ± 3,3 ⁺	7,7 ± 3,6 ⁺	12,7 ± 6,3 ⁺
Permetrina	2,7 ± 2,6	5,1 ± 3,2	7,9 ± 5,3
Associação	5,0 ± 2,6 ⁺	7,5 ± 2,6 ⁺	12,5 ± 4,6 ⁺

Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11° ao 21° dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Os valores representam a média ± desvio padrão. *P < 0,05 em relação ao controle e ⁺P < 0,05 em relação à permetrina. Número de animais = 10.

Tabela 11. Atividade geral expressa pelo tempo de permanência nos braços abertos, fechados e centro em labirinto em cruz elevado, de ratas com 21 dias de prenhez, expostas ou não à permetrina e submetidas ou não à desnutrição durante a prenhez

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO			
GRUPOS	Tempo de permanência braços abertos (segundos)	Tempo de permanência braços fechados (segundos)	Tempo de permanência centro (segundos)
Controle	18,4 ± 22,3	260,6 ± 34,6	20,8 ± 13,7
Restrição Alimentar	69,9 ± 44,5 ⁺	188,0 ± 61,2 ⁺	42,0 ± 22,2 ⁺
Permetrina	33,4 ± 29,6	243,7 ± 33,3	22,8 ± 13,7
Associação	61,9 ± 38,9 ⁺	196,65 ± 56,4 ⁺	41,4 ± 20,4 ⁺

Restrição: ratas que receberam 11,5 gramas (50% do controle) de ração por dia durante a prenhez. Permetrina: ratas que receberam permetrina (100 mg/Kg; p.o) do 11° ao 21° dias de prenhez. Os animais experimentais tiveram controles recebendo óleo de milho pelo mesmo período de exposição ao piretróide. Os valores representam a média ± desvio padrão. *P < 0,05 em relação ao controle e ⁺P < 0,05 em relação à permetrina. Número de animais = 10.

Discussão

A possibilidade de que deficiências nutricionais possam exacerbar os efeitos adversos de exposições ambientais a agentes tóxicos, como os piretróides, não foi ainda suficientemente investigada (Wasserman et al., 2008).

Atualmente os órgãos públicos e o meio científico reconhecem o importante papel dos pesticidas piretróides e outros compostos químicos como disruptores endócrinos (Garey & Wolff, 1998; Sun et al., 2007). De fato, a permetrina apresenta potencial estrogênico e antiandrogênico em ratos (Kim et al., 2005), o qual poderia modificar a função normal do sistema endócrino. No que diz respeito à desnutrição materna, esta determina graves consequências no desenvolvimento das gônadas, e alterações sexuais em longo prazo podem também ser esperadas (Léonhardt et al., 2003; Teixeira et al., 2007). Dessa maneira, a distância anogenital, um marcador da diferenciação sexual, foi investigada em filhotes machos e fêmeas dos diferentes grupos experimentais ao nascimento.

Confirmando os achados da literatura, a desnutrição intra-uterina comprometeu o desenvolvimento sexual de filhotes machos, o que pode ser observado pela redução da distância anogenital (Carney et al., 2004). Contrariamente, este procedimento não afetou de modo significativo o desenvolvimento sexual de filhotes fêmeas. Esta diferença entre os gêneros poderia estar associada a uma deficiência da aromatase consequente à desnutrição materna, uma vez que esta enzima é responsável pela masculinização do feto (Hib & Ponzio, 1995; Teixeira et al., 2007), entretanto este ponto merece futuras investigações.

O presente estudo confirmou, ainda, o potencial de disruptor endócrino da permetrina, tanto isoladamente quanto em associação à desnutrição intra-uterina, como observado pela redução significativa da distância anogenital em machos nestas condições. Entretanto, filhotes fêmeas mostraram-se resistentes ao efeito da permetrina quando em associação à restrição alimentar materna. Este fato poderia estar relacionado à maior resistência a alterações no desenvolvimento sexual de filhotes fêmeas submetidas à desnutrição *in utero*, como acima relatado. Ainda, mães expostas a permetrina durante a prenhez não mostram sinais de intoxicação apesar do nível significativo deste piretróide no sangue, o que pode ser confirmado pela não alteração na evolução do peso corpóreo das mães e no número e peso

dos filhotes ao nascimento. Finalmente, a não observação de nível significativo de permetrina no sangue de ratos adultos expostos a este piretróide *in utero* justifica-se uma vez que a permetrina tem meia vida plasmática bastante curta, cerca de 2 a 4 horas (Anadon et al., 1991) não se depositando no organismo.

A restrição alimentar *in utero* independente da associação à permetrina determinou uma perda significativa no peso corpóreo materno que foi acompanhada de comprometimento do peso da ninhada e do peso individual dos filhotes ao nascimento. A condição de baixo peso ao nascimento tem sido relacionada ao aumento do risco cardiovascular, como doenças coronarianas e hipertensão arterial (Ashton, 2000; Franco et al., 2002). Corroborando estes achados, no presente estudo a desnutrição materna, independentemente da associação à permetrina, determinou além do baixo peso ao nascimento, a elevação da pressão arterial a partir da oitava semana de vida pós-natal em ratos machos adultos.

Roseboom et al. (1999) demonstraram, por estudo retrospectivo, que crianças nascidas na Holanda no período de 1944 a 1945, quando o consumo calórico médio da população era de 600 cal/dia, apresentaram baixo peso ao nascer e na fase adulta exibiram maior mortalidade por hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares. Outros estudos epidemiológicos têm demonstrado que o baixo peso ao nascer em associação com o crescimento desproporcional do feto e também com o aumento do peso da placenta são prenúncio do aparecimento de anomalias no sistema cardiovascular (Barker et al., 1990; Barker et al., 1993; Law et al., 1993; Di Nicolantonio et al., 2000). Ainda, protocolos experimentais em indivíduos adultos, utilizando vários tipos de dietas deficientes e/ou carenciais durante a gestação, mostraram redução do peso ao nascimento, bem como elevação dos níveis pressóricos da prole adulta (Langley-Evans & Jacksson, 1996; Woodall et al., 1996; Langley-Evans, 1997). Corroborando a literatura nossos dados sugerem que a desnutrição intra-uterina pode ser fator desencadeante de eventos que predis põem ao aparecimento de hipertensão arterial na fase adulta.

Vários mecanismos foram propostos para explicar como a restrição alimentar materna durante a prenhez pode afetar a pressão arterial dos descendentes, incluindo aumento da

sensibilidade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), diminuição da atividade da enzima 11- β hidroxisteróide desidrogenase (11- β HSD) presente na placenta e alteração no desenvolvimento renal (Ashton, 2000).

Em ovelhas, fetos expostos à desnutrição *in utero* têm baixa atividade do eixo HPA, baixo cortisol e baixa pressão arterial, entretanto, após o nascimento, mostram uma resposta pressórica aumentada ao desafio do HPA e pressão arterial elevada (Ashton, 2000). Corroborando o papel dos glicocorticóides na manutenção da pressão arterial elevada conseqüente à desnutrição intra-uterina, Gardner et al. (1997) mostraram que a adrenalectomia em ratos expostos a dieta pobre em proteína *in utero* reduz a pressão arterial, e que a reposição subsequente de corticosterona eleva a pressão arterial.

O feto é normalmente protegido dos níveis circulantes elevados de glicocorticóides maternos pela atividade da enzima 11- β HSD que converte corticosterona em 11-deidroxycorticosterona no rato (cortisol a cortisona no homem). A atividade desta enzima correlaciona-se positivamente com o baixo peso ao nascimento em ambos rato e homem (Benediktsson et al., 1993; Stewart et al., 1995), sugerindo que ela desempenha papel na regulação do crescimento fetal e desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta. De fato, a restrição protéica materna em ratas durante a prenhez determina diminuição da atividade da enzima 11- β HSD resultando em um aumento da exposição do feto aos glicocorticóides de origem materna e aumento da pressão arterial da vida adulta (Ashton, 2000). Ainda, a administração de dexametasona que não é metabolizada pela 11- β HSD pode assim atravessar a barreira placentária exercendo um efeito glicocorticóide no feto de mães prenhes resultando em filhotes com baixo peso que desenvolvem pressão arterial elevada (Benediktsson et al., 1993).

A exposição a glicocorticóides *in utero* pode promover elevação dos níveis pressóricos por ações diretas e/ou indiretas em leitos vasculares. De fato, a exposição a estes esteróides *in utero* promove alteração da atividade simpática devido ao aumento da expressão de receptores adrenérgicos (Seckl et al., 1995), diminuição da síntese de prostaciclina (Jun et al., 1999), modificações do sistema renina-angiotensina e hipersensibilidade dos vasos

sanguíneos às ações vasoconstritoras da ANGII (Langley-Evans et al., 1999a). Portanto, o excesso de exposição a glicocorticóides maternos pode desempenhar papel importante na programação da hipertensão arterial.

Em comum com a atividade da 11- β HSD placentária e da sensibilidade do eixo HPA, o rim do feto pode ser afetado pela dieta materna durante a prenhez. Assim, a restrição protéica moderada está associada com a redução no número de glomérulos maduros ao nascimento que persiste por 2 a 4 semanas pós-natal mesmo se o filhote receber dieta normal (Langley-Evans et al., 1999b). Ao lado do efeito sobre o desenvolvimento glomerular, a restrição protéica materna também influencia a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, que se apresenta aumentada em ratos expostos a dieta hipoprotéica *in utero* (Ashton, 2000).

Ainda, no presente estudo não foi observado qualquer alteração no peso dos rins, coração e adrenais de ratos adultos desnutridos *in utero*, isoladamente ou em associação a exposição à perimetrina, corroborando com os achados de Desai et al. (2005), bem como os de Franco et al. (2007) que não observaram qualquer alteração no número de filhotes por ninhada de ratas desnutridas durante a prenhez.

Embora a restrição alimentar *in utero* tenha determinado aumento de pressão arterial de ratos machos adultos, nenhuma alteração na reatividade da aorta ao cálcio e à noradrenalina, na ausência ou presença de L-NAME e prazosin, foi observada nestes animais. Dessa maneira, sugere-se que a pressão arterial aumentada em ratos adultos submetidos à restrição alimentar *in utero* envolva outros mecanismos que não alterações da homeostase vascular ao cálcio ou da transmissão noradrenérgica, possivelmente sistema renina-angiotensina como sugerido por Langley-Evans et al. (1999), entre outros.

Atualmente, os piretróides são os inseticidas mais utilizados por apresentarem baixa toxicidade aguda em mamíferos e a não persistência no ambiente, entretanto as consequências da exposição em longo prazo merecem maior consideração. Assim, a segurança que se pode ter em seu uso está diretamente relacionada com a toxicidade do composto, o grau de contaminação e o tempo de exposição.

Os piretróides exercem seus efeitos primariamente modulando a cinética de abertura dos canais de Na^+ nos nervos, resultando numa diminuição no potencial de ação e na geração de impulsos nervosos. Estes agentes também atuam sobre algumas isoformas dos canais de cloreto e de cálcio sensíveis à voltagem e outros sistemas de transporte de cálcio, como a Ca^{+2} ATPase, e estes efeitos podem contribuir para a toxicidade de alguns compostos (Soderlund et al., 2002; Shafer, 2003; Grosman & Diel, 2005; Casares & Mantione, 2006). Além disso, os piretróides alteram o trânsito de cálcio intracelular determinando uma redução da atividade da sintase de óxido nítrico constitutiva, dependente de Ca^{+2} , com alteração concomitante da produção de óxido nítrico (Casares & Mantione, 2006; Casares et al., 2006). Dano oxidativo não apenas no cérebro, mas também em outros tecidos alvos como o fígado, eritrócitos, linfócitos, etc. têm sido relatados após exposição aos piretróides (Song & Narahashi, 1996; Kale et al., 1999; Dayal et al., 2003; Oberoi et al., 2007). Ainda, efeitos sobre aspectos essenciais da atividade enzimática intracelular como demonstrado em ambos tecidos periférico (Nasuti et al., 2003) e cérebro (Enan & Matsumura, 1993) fazem parte do alvo dos piretróides.

No presente estudo, a exposição pré-natal à permetrina independente da restrição alimentar *in utero* determinou alterações na homeostase vascular ao cálcio em ratos machos adultos, caracterizada por hiperreatividade da aorta a este íon independente da integridade do endotélio. Entretanto investigações futuras serão necessárias para esclarecer os mecanismos envolvidos nas alterações da homeostase vascular ao cálcio. Por outro lado, nenhuma alteração de pressão arterial e de reatividade da aorta a noradrenalina na ausência ou presença de L-NAME e prazosin foi observada nestes animais. Mesmo assim, a alteração da homeostase vascular ao cálcio poderia representar um fator de risco aumentado a doenças cardiovasculares em ratos machos adultos expostos à permetrina *in utero*, principalmente se outros estressores estiverem presentes.

Sabe-se que a desnutrição isoladamente constitui-se em importante fator de risco cardiovascular (Langley-Evans & McMullen, 2010) e esta condição está comumente presente em associação à exposição aos poluentes ambientais, como os inseticidas piretróides.

Entretanto a restrição alimentar *in utero* não se constituiu em fator de risco cardiovascular adicional à exposição à perimetrina durante a prenhez, uma vez que não foi observado sinergismo para a resposta cardiovascular nestas condições em associação.

A literatura é falha na abordagem de alterações comportamentais de fêmeas prenhes expostas à restrição alimentar e à exposição à perimetrina, isoladamente ou em associação durante a prenhez. Dessa maneira, investigou-se o comportamento de ratas prenhes através da observação em campo aberto, o qual avalia a atividade geral do animal e do teste de labirinto em cruz elevado, o qual avalia a ansiedade do animal.

A análise dos dados referentes ao comportamento em campo aberto sugere que a restrição alimentar, independentemente da associação à perimetrina *in utero*, é capaz de alterar a atividade geral das ratas prenhes, expressa pelo aumento do levantar e da locomoção. Tal aumento da atividade exploratória em ratas submetidas à restrição alimentar durante a prenhez poderia ser explicado pela busca por alimentos em ambiente desconhecido. De acordo com Levay et al., 2007; Genn et al., 2003; Inoue et al., 2004 o aumento da exploração de ratos machos que sofreram restrição calórica representa uma resposta adaptativa à necessidade de encontrar alimento durante o período de escassez.

Embora o teste de labirinto em cruz elevado seja comumente utilizado como ferramenta para avaliar a ansiedade dos animais, não se pode atribuir com segurança uma diminuição na ansiedade de ratas prenhes submetidas à restrição alimentar durante a prenhez, como sugerido pelo no aumento no número de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos observado nestes animais. Esta dificuldade reside no fato de que a restrição alimentar poderia interferir na avaliação deste parâmetro, uma vez que a necessidade pela busca por alimento poderia suplantiar a aversão pelo braço aberto, característica presente no comportamento de um animal controle. Segundo Genn em 2003, o aumento da exploração nos braços abertos por ratos machos adultos submetidos a restrição alimentar, pode refletir um comportamento de procura por alimento e essa motivação pode ter maior prioridade do que a ansiedade gerada neste modelo de aparato.

Independentemente da associação à restrição alimentar, à exposição à permetrina durante a prenhez não determinou qualquer alteração no comportamento em campo aberto ou labirinto em cruz elevado de ratas prenhes.

Semelhantemente ao observado para as respostas cardiovasculares, a exposição à permetrina *in utero* não se constituiu em fator de risco adicional à restrição alimentar durante a prenhez no que diz respeito ao comportamento.

Conclusões

A desnutrição intra-uterina e a exposição à permetrina *in utero*, isoladamente, promoveram prejuízos cardiovasculares em descendentes machos adultos.

Não se observou efeito adverso sinérgico da desnutrição *in utero* e da exposição à permetrina durante a prenhez em ratos machos adultos sobre a resposta cardiovascular.

A alteração comportamental observada em ratas prenhez parece ser devida à necessidade premente de busca por alimento mais do que uma consequência de alterações fisiológicas.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA S.S., GARCIA R.A., DE OLIVEIRA L.M. Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior.**, v.54, n.4, p.749-752, 1993.
- ALMEIDA S.S., SOARES E.G., BICHUETTE M.Z., GRAEFF F.G., DE OLIVEIRA L.M. Effects of early postnatal malnutrition and chlordiazepoxide on experimental aversive situations. **Physiology & Behavior.**, v.51, n.6, p.1195-1199, 1992.
- ALMEIDA S.S., TONKISS J., GALLER J.R. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.20, n.3, p.389-402, 1996.
- ALMEIDA S.S., TONKISS J., GALLER J.R. Prenatal protein malnutrition affects the social interactions of juvenile rats. **Physiol. Behav.**, v.60, p.197-201, 1996a.
- ALMEIDA S.S., TONKISS J., GALLER J.R. Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiol Behav.**, v.60, p.675-680, 1996b.
- ANADON A., MARTINEZ-LARRAÑAGA M.R., DIAZ M.J., BRINGAS P., Toxicokinetics of permethrin in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 110, n. 1, p.1-8, 1991.
- ASHTON N. Perinatal development and adult blood pressure. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, n.7, p.731-740, 2000.
- BARKER D.J. The fetal origins of hypertension. **J. Hypertens. Suppl.**, v.14, n.5, p.117-120, 1996.
- BARKER D.J., BULL A.R., OSMOND C., SIMMONDS S.J. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. **BMJ.**, v.301, p.259-262, 1990.
- BARKER D.J., GLUCKMAN P.D., GODFREY K.M., HARDING J.E., OWENS J.A., ROBINSON J.S. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet.**, v. 341, p.938-941, 1993.
- BARKER D.J.P., WINTER P.D., OSMOND C., MARGETTS B., SIMMONDS, S.J. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet.**, p.577-580, 1989.
- BENEDIKTSSON R., LINDSAY R., NOBLE J., SECKL J.R., EDWARDS C.R.W. Glucocorticoid exposure in utero: A new model for adult hypertension. **Lancet.**, v.341, p.339-341, 1993.
- BISSACOT D.Z., VASSILIEFF I. Pyrethroid residues in milk and blood of dairy cows following single topical applications. **Vet. Hum. Toxicol.**, v.39, n.1, p.6-8, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Piretróides**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 03 fev. 2007.
- BROADHURST P.L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. **Fortschr. Psychosom Med.**, v.1, p.63-69, 1960.

- CAMPBELL D.M., HALL M.H., BARKER D.J., CROSS J., SHIELL A.W., GODFREY K.M. Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v.103, n.3, p.273-80, 1996.
- CARNEY E.W., ZABLOTNY C.L., MARTY M.S., CRISSMAN J.W., ANDERSON P., WOOLHISER M., HOLSAPPLE M. The effects of feed restriction during in utero and postnatal development in rats. **Toxicol Sci.**, v.82, p.237-249, 2004.
- CASARES F.M., MANTIONE K.J., OH K., LEE R., STEFANO G.B. Nitric oxide's pulsatile release in lobster heart and its regulation by opiate signaling: pesticide interference. **Med Sci Monit.**, v.12, n.12, p.373-378, 2006.
- CASARES FM, MANTIONE K. Pesticides may be altering constitutive nitric oxide release, thereby compromising health. **Med Sci Monit.**, v.12, n.10, p.235-240, 2006.
- CASTRO C.A., RUDY J.W. Early-life malnutrition selectively retards the development of distal- but not proximal-cue navigation. **Dev. Psychobiol.**, v.20, p.521-537, 1987.
- CELEDON J.M., COLOMBO M. Effects of chlordiazepoxide on maze performance of rats subjected to undernutrition in early life. **Psychopharmacology.**, v.63, p.29-32, 1979.
- CORDOBA N.E., AROLFO M.P., BRIONI J.D., ORSINGER O.A. Perinatal undernutrition impairs spatial learning in recovered adult rats. **Acta Physiol. Pharmacol Ther Latinoam.**, v.44, p.70-76, 1994.
- CROFTON K.M., REITER L.W. The effects of type I and II pyrethroids on motor activity and the acoustic startle response in the rat. **Fundam Appl Toxicol.**, v.4, p.624-34, 1988.
- DAYAL M., PARMAR D., DHAWAN A., ALI M., DWIVEDI U.N., SETH P.K. Effect of pretreatment of cytochrome P450 (P450) modifiers on neurobehavioral toxicity induced by deltamethrin. **Food Chem. Toxicol.**, v.41, n.3, p.431-437, 2003.
- DESAI M., GAYLE D., BABU J., ROSS M.G. Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. **American Journal of Obstetrics and Gynecology.**, v.193, p.1224-1232, 2005.
- DI NICOLANTONIO R., KOUTSIS K., WLODEK M.E. Fetal versus maternal determinants of the reduced fetal and placental growth in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v.18, n.1, p.45-50, 2000.
- EDWARDS L.J., MCFARLANE J.R., KAUTER K.G., MCMILLEN I.C. Impact of periconceptional nutrition on maternal and fetal leptin and fetal adiposity in singleton and twin pregnancies. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v.288, p.39-45, 2005.
- ENAN E., MATSUMURA F. Activation of phosphoinositide/protein kinase C pathway in rat brain tissue by pyrethroids. **Biochem Pharmacol.**, v.3, p.703-710, 1993.
- FORSHAW P.J., BRADBURY J.E. Pharmacological effects of pyrethroids on the cardiovascular system of the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v.91, n. 2-3, p.207-213, 1983.

- FRANCO M. do C., AKAMINE E.H., REBOUÇAS N., CARVALHO M.H.C., TOSTES R.C.A., NIGRO D., FORTES Z.B. Long term effects of intrauterine malnutrition on vascular function in female offspring: Implications of oxidative stress. **Life Sciences.**, v.80, p. 709-715, 2007.
- FRANCO M. do C., ARRUDA R.M., DANTAS A.P., KAWAMOTO E.M., FORTES Z.B., SCAVONE C., CARVALHO M.H., TOSTES R.C., NIGRO D. Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. **Cardiovasc. Res.**, v.56, n.1, p.145-153, 2002.
- GALLAVAN R.H., HOLSON J.F., STUMP D.G., KNAPP J.F., REYNOLDS V.L. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. **Reprod. Toxicol.**, v.13, p.383-390, 1999.
- GARDNER D.S., JACKSON A.A., LANGLEY-EVANS S.C. Maintenance of maternal diet-induced hypertension in the rat is dependent on glucocorticoids. **Hypertension.**, v.30, n.6, p.1525-1530, 1997.
- GAREY J., WOLFF M.S. Estrogenic and Antiprogestagenic Activities of Pyrethroid Insecticides. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.251, p.855-859, 1998.
- GENN R.F., TUCCI S.A., THOMAS A., EDWARDS J.E., FILE S.E. Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.27, n.1-2, p.155-161, 2003.
- GLUCKMAN P.D., HANSON M.A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Science**, v.305, p.1733-1736, 2004.
- GODART N.T., FLAMENT M.F., LECRUBIER Y., JEAMMET P. Anxiety disorders in anorexia nervosa and bulimia nervosa: co-morbidity and chronology of appearance. **Eur. Psychiatry.**, v.15, n.1, p.38-45, 2000.
- GROSMAN N., DIEL F. Influence of pyrethroids and piperonyl butoxide on the Ca(2+)-ATPase activity of rat brain synaptosomes and leukocyte membranes. **Int. Immunopharmacol.**, v.5, n.2, p.263-270, 2005.
- HEUDORF U., ANGERER J. Metabolites of pyrethroids insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. **Environ. Health Perspect.**, v.9, p.213-217, 2001.
- HIB J., PONZIO R. The abnormal development of male sex organs in the rat using a pure antiandrogen and a 5 alpha-reductase inhibitor during gestation. **Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.**, v.45, p.27-33, 1995.

- INOUE K., ZORRILLA E.P., TABARIN A., VALDEZ G.R., IWASAKI S., KIRIIKE N., KOOB G.F. Reduction of anxiety after restricted feeding in the rat: implication for eating disorders. **Biol. Psychiatry.**, v.55, n.11, p.1075-1081, 2004.
- JAISWAL A.K., UPADHYAY S.N., SATYAN K.S., BHATTACHARYA S.K. Behavioural effects of prenatal and postnatal undernutrition in rats. **Indian J. Exp. Biol.**, v.34, p.1216-1219, 1996.
- JUN S.S., CHEN Z., PACE M.C., SHAUL P.W. Glucocorticoids downregulate cyclooxygenase-1 gene expression and prostacyclin synthesis in fetal pulmonary artery endothelium. **Circ. Res.**, v.84, n.2, p.193-200, 1999.
- KALE M., RATHORE N., JOHN S., BHATNAGAR D. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. **Toxicol. Lett.**, v.105, n.3, p.197-205, 1999.
- KHAN O.A., TORRENS C., NOAKES D.E., POSTON L., HANSON M.A., GREEN L.R., OHRI S.K. Effects of pre-natal and early post-natal undernutrition on adult internal thoracic artery function. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.**, v.28, n.6, p.811-815, 2005.
- KIM S.S., LEE R.D., LIM K.J., KWACK S.J., RHEE G.S., SEOK J.H., LEE G.S., AN B.S., JEUNG E.B., PARK K.L. Potential estrogenic and antiandrogenic effects of permethrin in rats. **J. Reprod. Dev.**, v.51, n.2, p.201-210, 2005.
- LANGLEY-EVANS S.C. Hypertension induced by foetal exposure to a maternal low-protein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. **J. Hypertens.**, v.15, n.5, p.537-544, 1997.
- LANGLEY-EVANS S.C., GARDNER D.S., JACKSON A.A. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **J. Nutr.**, v.126, p.1578-1585, 1996.
- LANGLEY-EVANS S.C., JACKSON A.A. Rats with hypertension induced by in utero exposure to maternal low protein diets, fail to increase blood pressure in response to a high salt intake. **Ann. Nutr. Metab.**, v.40, p.1-9, 1996.
- LANGLEY-EVANS S.C., JACKSSON A.A. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. **Clin. Sci.**, v.86, p.217-222, 1994.
- LANGLEY-EVANS S.C., MCMULLEN S. Developmental origins of adult disease. **Med. Princ. Pract.**, v.2, p.87-98, 2010.
- LANGLEY-EVANS S.C., PHILLIPS G.J., JACKSON A.A. In utero exposure to maternal low protein diets induces hypertension in weanling rats, independently of maternal blood pressure changes. **Clin. Nutr.**, v.13, p.319-324, 1994.

- LANGLEY-EVANS S.C., SHERMAN R.C., WELHAM S.J., NWAGWU M.O., GARDNER D.S., JACKSON A.A. Intrauterine programming of hypertension: the role of the renin–angiotensin system. **Biochem Soc. Trans.**, v.27, p.88-93, 1999a.
- LANGLEY-EVANS S.C., WELHAM S.J.M., JACKSON A.A. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. **Life Sci.**, v.64, p.965-974, 1999b.
- LAW C.M., DE SWIET M., OSMOND C., FAYERS P.M., BARKER D.J., CRUDDAS A.M., FALL C.H. Initiation of hypertension in utero and its amplification throughout life. **BMJ.**, v.306, p.24-27, 1993.
- Lazarini C.A., Florio J.C., Lemonica I.P., Bernardi M.M. Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. **Neurotoxicol Teratol.**, v.23, n.6, p.665-73, 2001.
- LEON D.A., KOUPILOVA I., LITHELL H.O., BERGLUND L., MOHSEN R., VAGERO D., LITHELL U.B., MCKEIGUE P.M. Failure to realise growth potential in utero and adult obesity in relation to blood pressure in 50 year old Swedish men. **Br. Med. J.**, v.312, p.401-406, 1996.
- LEON D.A., LITHELL H.O., VAGERO D., KOUPILOVA I., MOHSEN R., BERGLUND L., LITHELL U.B., MCKEIGUE P.M. Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915-29. **Br. Med. J.**, v.317, p.241-245, 1998.
- LÉONHARDT M., LESAGE J., CROIX D., CASTELOOT I.D., BEAUVILLAIN J.C., DUPOUY J.P. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. **Biol. Reprod.**, v.68, p.390-400, 2003.
- LESAGE J., SEBAAI N., LEONHARDT M., DUTRIEZ-CASTELOOT I., BRETON C., DELOOF S., VIEAU D. Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Stress.**, v.9, n.4, p.183-98, 2006.
- LEVAY E.A., GOVIC A., PENMAN J., PAOLINI A.G., KENT S. Effects of adult-onset calorie restriction on anxiety-like behavior in rats. **Physiol. Behav.**, v.92, n.5, p.889-96, 2007.
- LEVITT N., LINDSAY R.S., HOLMES M.C., SECKL J.R. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. **Neuroendocrinology.**, v.64, p.412-418, 1996.
- LUKOYANOV N.V., ANDRADE J.P. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. **Behav. Brain Res.**, v.112, n.1-2, p.85-97, 2000.

- NARAHASHI T. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. **Pharmacol Toxicol.**, v.79, n.1, p.1-14, 1996.
- NASUTI C., CANTALAMESSA F., FALCIONI G., GABBIANELLI R. Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology.** v.2-3, p.233-244, 2003.
- NASUTI C., GABBIANELLI R., FALCIONI M.L, DI STEFANO A., SOZIO P., CANTALAMESSA F. Dopaminergic system modulation, behavioral changes, and oxidative stress after neonatal administration of pyrethroids. **Toxicology.**, v.229, n.3, p.194-205, 2007.
- NEWNHAM J.P. Is prenatal glucocorticoid administration another origin of adult disease? **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.28, n.11, p.957-961, 2001.
- NÚÑEZ H, RUIZ S, SOTO-MOYANO R, NAVARRETE M, VALLADARES L, WHITE A, PÉREZ H. Fetal undernutrition induces overexpression of CRH mRNA and CRH protein in hypothalamus and increases CRH and corticosterone in plasma during postnatal life in the rat. **Neurosci. Letters.**, v.448, p.115-119, 2008.
- OBEROI S., AHMED R.S., SUKE S.G., BHATTACHARYA S.N., CHAKRABORTI A., BANERJEE B.D. Comparative effect of topical application of lindane and permethrin on oxidative stress parameters in adult scabies patients. **Clin. Biochem.**, v.40, n.16-17, p.1321-1324, 2007.
- OLIFF H.S., GALLARDO K.A. The effect of nicotine on developing brain catecholamine systems. **Front Biosci.**, v.4, p.883-897, 1999.
- Overview of Permethrin. Risk Assessment. August 2005. Disponível em: http://www.up3project.org/documents/Permethrin_PRA_Overview.pdf. Acessado em 08 janeiro 2009.
- Pelaez V. Monitoramento do mercado de agrotóxico. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/07ee7e0041d81501a0d9f5255d42da10/estudo_monitoramento.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 30 dez. 2010
- PELLOW S., FILE SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem and Behav.**, v.24, n.3, p. 525-529, 1986.
- PERSSON E., JANSSON T. Low birth weight is associated with elevated adult blood pressure in the chronically catheterized guinea-pig. **Acta Physiol. Scand.**, v.145, n.2, p.195-196, 1992.
- ROSEBOOM T.J., VAN DER MEULEN J.H.P., RAVELLI A.C.J., VAN MONTFRANS G.A., OSMOND C., BARKER D.J.P., BLEKER O.T. Blood pressure in adults after prenatal exposure to famine. **J. Hypertension.**, v.17, p.325-330, 1999.

- SANTOS M.A.T., AREAS M.A., REYES F.G.R. Piretróides - uma visão geral. **Alim. Nutr.**, v.18, n.3, p.339-349, 2007.
- SCHULZ E., JANSSON T., WENZEL P., DAIBER A., MÜNDEL T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. **Antioxid Redox Signal.**, v.10, n.6, p.1115-1126, 2008.
- SECKL J.R., BENEDIKTSSON R., LINDSAY R.S., BROWN R.W. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the programming of hypertension. **J. Steroid Biochem Mol Biol.**, v.55, n.5-6, p.447-455, 1995.
- SEGAR J.L., MAZURSKY J.E., ROBILLARD J.E. Changes in ovine renal sympathetic nerve activity and baroreflex function at birth. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p.1824-1832, 1994a.
- SEGAR J.L., MERRILL D.C., SMITH B.A., ROBILLARD J.E. Role of sympathetic activity in the generation of heart rate and arterial pressure variability in fetal sheep. **Pediatr. Res.**, v.35, n.2, p.250-254, 1994b.
- SHAFER T.J., MEYER D.A. Effects of pyrethroids on voltage-sensitive calcium channels: a critical evaluation of strengths, weaknesses, data needs, and relationship to assessment of cumulative neurotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.196, n.2, p.303-318, 2004.
- SHAFER T.J., MEYER D.A. Effects of pyrethroids on voltage-sensitive calcium channels: a critical evaluation of strengths, weaknesses, data needs, and relationship to assessment of cumulative neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology.**, v.196, p.303-318, 2003.
- SODERLUND D.M., CLARK J.M., SHEETS L.P., MULLIN L.S., PICCIRILLO V.J., SARGENT D., STEVENS J.T., WEINER M.L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology.**, v.1, p.3-59, 2002.
- SONG J.H., NARAHASHI T. Modulation of sodium channels of rat cerebellar Purkinje neurons by the pyrethroid tetramethrin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 277, n.1, p.445-453, 1996.
- SPENCER C.I., SHAM J.S. Mechanisms underlying the effects of the pyrethroid tefluthrin on action potential duration in isolated rat ventricular myocytes. **J Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 315, n.1, p.16-23, 2005.
- STEWART P.M., WHORWOOD C.B., MASON J.I. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life. **J. Steroid Biochem Mol Biol.** v.55, n.5-6, p.465-471, 1995.
- SUN H., XU X.L., XU L.C., SONG L., HONG X., CHEN J.F., CUI L.B., WANG X.R. Antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides and their metabolite in reporter gene assay. **Chemosphere.**, v.66, p.474-479, 2007.

- TEIXEIRA C.V., SILANDRE D., SANTOS A.M.S.S., DELALANDE C., SAMPAIO F.J.B., CARREAU S., RAMOS C.F. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. **J. Endocrinol.**, v.192, p.301-311, 2007.
- TOMKINS C.C. Does fetal under-nutrition predispose disease in adult offspring? **University Alberta Health Sci. J.**, v.4, p.16-20, 2007.
- VIRAN R., UNLÜ ERKOÇ F., POLAT H., KOÇAK O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicol. Envirol. Saf.**, v.55, p.82-85, 2003.
- WAKATSUKI A., MURATA Y., NINOMIYA Y., MASAOKA N., TYNER J.G., KUTTY K.K. Physiologic baroreceptor activity in the fetal lamb. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.167, n.3, p.820-827, 1992a.
- WAKATSUKI A., MURATA Y., NINOMIYA Y., MASAOKA N., TYNER J.G., KUTTY K.K. Autonomic nervous system regulation of baseline heart rate in the fetal lamb. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.167, n.2, p.519-523, 1992b.
- WASSERMAN G.A., LIU X., FACTOR-LITVAK P., GARDNER J.M., GRAZIANO J.H., Developmental impacts of heavy metals and undernutrition. **Basic Clinical Pharmacology Toxicology**, v.102, p.212-217, 2008.
- WOLANSKY M.J., HARRILL J.A. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: a critical review. **Neurotoxicol Teratol.**, v.2, p.55-78, 2008.
- WOODALL S.M., BREIER B.H., JOHNSTON B.M., GLUCKMAN P.D. A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: effects on the somatotrophic axis and postnatal growth. **J. Endocrinol.**, v.150, n.2, p.231-242, 1996.

Abstract

Pyrethroids are widely used due to its high activity as an insecticide and low mammalian toxicity. Nevertheless, one should take into account that many environmental contaminants at levels not harmful may determine pathophysiological processes whether chemical or physical stressors and/or pathological conditions are present. The goals were to investigate (1) changes in blood pressure as well as in thoracic aorta reactivity to calcium and norepinephrine, in the absence or presence of prazosin and L-NAME in adult rats submitted or not to intrauterine malnutrition, alone or in association with prenatal exposure to permethrin; and (2) changes in the behavior of rats subjected to food restriction during pregnancy, exposed or not to permethrin *in utero*. The prenatal exposure to permethrin led to a decrease in the anogenital distance of male and female pups at birth while intrauterine malnutrition had promoted a decrease in the anogenital distance of male but not female offspring. The intrauterine malnutrition either alone or in combination, significantly reduced birth weight and induced elevation in blood pressure in adulthood. Moreover, prenatal exposure to permethrin, but not malnutrition *in utero*, determined changes in vascular calcium homeostasis in adult male rats, characterized by hyperactivity to calcium independent of endothelial integrity. None of the experimental protocols, i.e, food restriction and exposure to permethrin *in utero*, induced any change in aorta reactivity to norepinephrine, regardless the presence of the endothelium, L-NAME or prazosin. Finally, food restriction alone or in combination with permethrin exposure *in utero*, increased the general activity of pregnant rats expressed as an increase in locomotion and rears in the open field. This condition also induced an increase in the number of entries in closed arms, open arms and center and increase in time spent in open arms and center, but decrease the time spent in closed arms in elevated plus maze. In turn, exposure to permethrin during pregnancy did not cause any change in behavior. Moreover, the behavioral changes observed in rats subjected to feed restriction during pregnancy appears to be due to the pressing need to search for food rather than a consequence of physiological changes. This study confirmed the potential for endocrine disruptor of permethrin, and suggests that female pups malnourished *in utero* seem to be more resistant to changes in sexual development. In turn, changes in vascular homeostasis to calcium induced by permethrin, as well as high blood pressure induced by food restriction *in utero* suggests a higher vulnerability to cardiovascular disease in offspring of mothers exposed to both permethrin and food restriction *in utero*. However, the combination of these procedures does not constitute an additional cardiovascular risk factor.

Resumo

Os piretróides são amplamente utilizados devido à sua alta atividade como inseticida e sua baixa toxicidade em mamíferos. Apesar disso, deve-se ter em consideração que muitos contaminantes ambientais, em concentrações não nocivas, podem determinar processos fisiopatológicos se estressores físicos ou químicos e/ou condições patológicas estiverem presentes. O objetivo do presente estudo foi avaliar, em ratos adultos submetidos ou não à desnutrição intra-uterina, isoladamente ou em associação à exposição pré-natal à permetrina, as alterações de pressão arterial e de reatividade da aorta torácica ao cálcio e à noradrenalina, na ausência ou presença de prazosim e L-NAME. Ainda, investigar possíveis alterações do comportamento de mães submetidas ou não à restrição alimentar e expostas ou não à permetrina durante a prenhez. A exposição pré-natal à permetrina determinou uma diminuição na distância anogenital de filhotes machos e fêmeas ao nascimento, a desnutrição intra-uterina também promoveu uma diminuição na distância anogenital de filhotes machos, mas não de filhotes fêmeas. A desnutrição intra-uterina tanto isoladamente quanto em associação, reduziu significativamente o peso de filhotes ao nascimento e induziu elevação na pressão arterial na vida adulta. Ainda, a exposição pré-natal à permetrina, mas não a desnutrição in utero, determinou alterações na homeostase vascular ao cálcio em ratos machos adultos, caracterizada por hiperreatividade ao cálcio independente da integridade do endotélio. Nenhum dos protocolos experimentais, restrição alimentar e exposição à permetrina in utero, induziram qualquer alteração de reatividade à noradrenalina, independentemente da presença do endotélio, prazosim e L-NAME. Finalmente, a restrição alimentar isoladamente ou em associação à permetrina in utero, aumentou a atividade geral das ratas prenhes, expressa pelo aumento da locomoção e do levantar em campo aberto. Esta condição determinou ainda, aumento no número de entradas nos braços fechados, braços abertos e centro, aumento no tempo de permanência nos braços abertos e no centro, e diminuição no tempo de permanência nos braços fechados avaliados no labirinto em cruz elevado. Por sua vez, a exposição à permetrina durante a prenhez não determinou qualquer alteração de comportamento das ratas prenhes. Ainda, a alteração de comportamento observada em ratas prenhez submetidas à restrição alimentar durante a prenhez parece ser devida à necessidade premente de busca por alimento mais do que uma consequência de alterações fisiológicas. O presente estudo confirmou o potencial de disruptor endócrino da permetrina, e sugere que filhotes fêmeas desnutridas in utero parecem ser mais resistentes as alterações no desenvolvimento sexual. Por sua vez, as alterações na homeostase vascular ao cálcio induzidas pela permetrina, bem como a elevação da pressão arterial induzida pela restrição alimentar sugerem maior vulnerabilidade a doenças cardiovasculares na descendência de mães expostas tanto à permetrina quanto à restrição alimentar in utero. Entretanto, a associação destes procedimentos não se constituiu em fator de risco cardiovascular adicional.