

Estudo do reflexo de subir como parâmetro do desenvolvimento físico de filhotes expostos perinatalmente ao fungicida fenarimol

Lia Hanna Martins Morita, Cemeq/Faepa/HCFMRP/USP, liahanna@yahoo.com.br.

Carlos Alberto Ribeiro Diniz, DEs/UFSCar, dcad@polvo.ufscar.br.

Vera Lucia S. S. Castro, CNPMA/EMBRAPA/Jaguariúna, castro@cnpma.embrapa.br

RESUMO: Foram realizados estudos sobre o desempenho de filhotes de ratos Wistar testados quanto ao reflexo de subir, medido em segundos. Esses filhotes foram expostos perinatalmente ao fungicida fenarimol. A técnica utilizada para avaliar os efeitos dos fatores (fase de prenhez/lactação e dose do fungicida) e de suas interações na resposta foi modelo não paramétrico para medidas repetidas. Verificamos dos resultados obtidos que há efeito do fator tempo e da interação entre os fatores dose do fungicida e fase de exposição das ratas-mães no score do reflexo dos filhotes. Nas comparações múltiplas verificamos quais combinações de níveis de fase e dose foram responsáveis pela significância da interação das mesmas.

Palavras chave: reflexo subir, filhotes de ratos, fenarimol, Análise de Experimentos com Medidas Repetidas, Modelo não Paramétrico para Medidas Repetidas, Comparações Múltiplas.

1. INTRODUÇÃO

Durante as primeiras fases do desenvolvimento, o organismo em formação pode sofrer influências ambientais, por exemplo devido a exposição aos xenobióticos. Os fatores que podem atuar neste período influenciarão a evolução morfofuncional dos sistemas, de modo quantitativo e qualitativo. Assim, eventos bioquímicos e estruturais do período de desenvolvimento são fundamentais na determinação bioquímica, morfológica, funcional e comportamental do organismo, em particular do sistema nervoso. Há várias evidências em relação a alterações fisiológicas no sistema nervoso de ratos expostos a poluentes ambientais demonstrando, por exemplo, retardo na ontogenia de reflexos e na evolução de

padrões locomotores relacionados a interferências em algumas aminas biogênicas neurotransmissoras.

Nesse sentido, testes de desenvolvimento neurocomportamental como a avaliação da maturação de reflexos nos filhotes, a exemplo do de subir; pode ser utilizada a fim de avaliar o desenvolvimento neuromuscular, a coordenação motora além do desenvolvimento do sistema nervoso (sentido de orientação).

Para tanto, foram usadas 10 fêmeas para cada grupo experimental e usados três filhotes por ninhada em cada teste.

Foi observada a resposta de subir da seguinte forma: o animal é colocado com as quatro patas sobre uma rampa de tela de arame de 30°, com a cabeça virada para o lado mais alto desta; verifica-se se o animal sobe, desce ou permanece onde foi colocado inicialmente e mede-se o tempo gasto para realizar a tarefa até o máximo de 300s.

2. METODOLOGIA

Foi utilizado o modelo de medidas repetidas no tempo, levando em conta dois fatores, caracterizados por fase e dose.

O fator fase caracteriza-se pelos períodos: 1-início da prenhez, 2- final da prenhez e 3- lactação. O fator dose caracteriza-se pelos níveis: 1-tratamento com salina (0,9% NaCl), 2- tratamento com solução de fenarimol 150 mg e 3- tratamento com solução de fenarimol 300 mg. Foram levantadas 23 medidas em 23 dias consecutivos.

2.1 Experimentos com Medidas Repetidas

Experimentos com medidas repetidas envolvem um tratamento ou vários tratamentos, avaliado em diversos pontos no tempo; os efeitos dos fatores são fixados e os indivíduos constituem uma amostra aleatória.

2.2 - Modelo não Paramétrico

Seja $X_{ij} = (X_{ij1}, X_{ij2}, X_{ij3}, X_{ij4}, X_{ij5}, X_{ij6})'$ as observações do i -ésimo indivíduo, t -ésimo tratamento caracterizado por combinações dois a dois de fase e dose. Assim, temos $j=1, \dots, 9$.

Sob a hipótese de independência entre as observações de diferentes unidades amostrais, Akritas e Brunner (1997) propuseram um modelo não paramétrico em que a função distribuição de cada elemento X_{ijk} desses vetores é a mesma para todas as observações obtidas do j -ésimo tratamento e k -ésimo dia.

No caso em que a função distribuição de X_{ijk} não é contínua, utiliza-se a sua forma normalizada:

$$F_{jk}(x) = \frac{1}{2} \{ F_{jk}^+(x) + F_{jk}^-(x) \}$$

com $F_{jk}^+(x) = P(X_{ijk} \leq x)$ e $F_{jk}^-(x) = P(X_{ijk} < x)$, para $j=1, \dots, 9$ e $k=1, \dots, 6$.

Na análise sob o modelo não-paramétrico substituímos as esperanças α_{jk} pelas funções distribuição $F_{jk}(x)$. Esse enfoque é baseado no conceito de comparação estocástica entre duas ou mais variáveis aleatórias, visto em outros procedimentos não-paramétricos, como nos testes propostos por Mann and Whitney (1947) e Kruskal and Wallis (1952).

Seja $F = (F_{11}, \dots, F_{16}, F_{21}, \dots, F_{26}, F_{31}, \dots, F_{36}, F_{41}, \dots, F_{46}, F_{51}, \dots, F_{56}, F_{61}, \dots, F_{66}, F_{71}, \dots, F_{76}, \dots, F_{81}, \dots, F_{86}, F_{91}, \dots, F_{96})'$ o vetor cujo elemento F_{jk} representa a função distribuição de X_{ijk} , $i=1, \dots, 30$, $j=1, \dots, 9$, $k=1, \dots, 6$. As hipóteses de interesse são formuladas como combinações lineares de F_{jk} que podem ser expressas como $CF=0$, com C representando uma matriz de contrastes.

As hipóteses de inexistência de efeitos do tratamento e do tempo e de inexistência de interações entre os fatores tratamento e tempo são explicadas detalhadamente por Rosa (2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos os níveis descritivos das estatísticas de Wald para as hipóteses de inexistência de efeito dos fatores entre-indivíduos, intra-indivíduos e interação destes fatores, segundo o método proposto por Singer (2001).

Verificamos que há efeito do fator Tempo e do fator Tratamento, porém não há efeito da interação Tratamento*Tempo.

A verificação de quais níveis de Fase e Dose foram responsáveis pela existência dos efeitos da interação foi realizada via matriz de contrastes.

Foram testadas as hipóteses de igualdade entre fases duas a duas, dose fixado e as hipóteses de igualdade entre doses duas a duas, fase fixado.

4. CONCLUSÕES

Nas comparações entre doses, verificamos que não há diferenças entre as doses 150 mg e 300 mg quando as ratas-mães são tratadas no início da prenhez ou no final da prenhez.

Nas comparações entre fases, verificamos que não há diferenças entre as fases, verificamos que: 1-não há diferenças entre as fases início da prenhez e final da prenhez quando as ratas-mães são tratadas com fenarimol 150 mg ou 300 mg; 2-não há diferenças entre as fases início da prenhez e lactação quando as ratas-mães são tratadas com fenarimol 300 mg; 3-não há diferenças entre as fases final da prenhez e lactação quando as ratas-mães são tratadas com salina (0,9% NaCl) ou fenarimol 300 mg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akritas, M.G.; Arnold, S.F. (1994). *Fully nonparametric hypotheses for factorial design I: Multivariate repeated measures designs. Journal of the American Statistical Association*, **89**, 336-343.

Alder, S. (1983). Zbinden, Q.; Racagni, G. (1983). *Application of Behavioral Pharmacology in Toxicology*. New York. Raven Press. 57-66.

Ames, R. G.; Steenland, K.; Jenkins, B. (1995). *Chronic neurologic sequelae to cholinesterase inhibition among agricultural pesticide applicators. Archives of Environmental Health*, **50**, 440-444.

Castro, V.; Silveira, M.; Perez, M. (1999). *Application of clinical indicators of exposition in the evaluation of family agriculture health: the Sumaré case – Brazil. International Journal of Sustainable and Development World Ecology*, **6**, 172-184.

Claudio, L.; Bearer, C.F.; Wallinga, D. (1999). *Assessment of the U.S. Environmental Protection Agency methods for identification of hazards to developing organisms, part I: The reproduction and fertility testing guidelines. American Journal of Industrial Medicine*, **35**, p.543-553, 1999.

Hirsch, K.; Weaver, D.; Black, L. (1987). *Inhibition of central nervous system aromatase activity: a mechanism for Fenarimol-induced infertility in the male rats. Toxicology and Applied Pharmacology*, **91**, 235 – 245.

Nelson, B. (1991). *Evidence for behavioral teratogenicity in humans. Journal of Applied Toxicology*, **11**, 33-37.

Nurminen, T.(1995). *Maternal pesticide exposure and pregnancy outcome. Journal of Occupational Medicine*, **37**, 935-940.

Palut, D.; Ludwick, J.; Szlezak-Kopec, J. (1992). *The influence of Fenarimol on DNA synthesis and mitotic activity in rat liver. Journal of Applied Toxicology*, **12**, 275 – 279.

Paolini.; M; Mesirca, R.; Pozzetti, L. (1996). *Genetic and non-genetic biomarkers related to carcinogenesis in evaluating toxicological risk from Fenarimol. Mutation Research*, **368**, 27 - 39.

Rosa, P.; Singer, J.M. (2001). *Análise não-paramétrica de dados ordinais com medidas repetidas*. Tese de Mestrado do Instituto de Matemática e Estatística. Universidade de São Paulo.