

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-graduação em Ciências Biológicas  
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Mara Lúcia de Campos

**DESENVOLVIMENTO FÍSICO E NEUROCOMPORTAMENTAL DE FILHOTES  
APÓS EXPOSIÇÃO MATERNA À VALERIANA (*Valeriana officinalis*)  
DURANTE A GESTAÇÃO EM RATAS (*Rattus Norvegicus*  
BERKENHOUT,1769).**

Juiz de Fora

2012

Mara Lúcia de Campos

**DESENVOLVIMENTO FÍSICO E NEUROCOMPORTAMENTAL DE FILHOTES  
APÓS EXPOSIÇÃO MATERNA À VALERIANA (*Valeriana officinalis*)  
DURANTE A GESTAÇÃO EM RATAS (*Rattus Norvegicus*  
BERKENHOUT,1769).**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>: Martha de Oliveira Guerra

Co-orientador: Dr. Carlos Alberto Mourão Júnior

Juiz de Fora

2012

Campos, Mara Lúcia de.

Desenvolvimento físico e neurocomportamental de filhotes após exposição materna à valeriana (*Valeriana officinalis*) durante a gestação em ratas / Mara Lúcia de Campos. – 2012.

67 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal) — Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Comportamento animal. 2. Ratos. I. Título.

CDU 591.51

Mara Lúcia de Campos

**DESENVOLVIMENTO FÍSICO E NEUROCOMPORTAMENTAL DE FILHOTES  
APÓS EXPOSIÇÃO MATERNA À VALERIANA (*Valeriana officinalis*)  
DURANTE A GESTAÇÃO EM RATAS (*Rattus Norvegicus*  
BERKENHOUT,1769).**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: 10/12/2012

BANCA EXAMINADORA

---

Dr<sup>a</sup>: Martha de Oliveira Guerra (Orientadora)

Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dr. Carlos Alberto Mourão Júnior (Co-orientador)

Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dr. Gilcélcio Amaral da Silveira

Universidade Federal de São João del-Rei

Dedico esse trabalho aos meus pais e irmã  
pelo carinho e incentivo

Ao meu namorado, Tiago, pelo carinho,  
dedicação e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Diná pelo incentivo, amor, carinho. Obrigada por estar do meu lado sempre e me ajudar em cada obstáculo transformando-os em realizações.

À meu pai, por todo o apoio e carinho. Obrigada por me mostrar que em cada experiência existe uma lição a ser aprendida.

À minha querida irmã pelo companheirismo, dedicação, paciência.

Ao meu namorado Tiago pelo carinho, pelas palavras de incentivo e pelo apoio incansável em todos os momentos. Obrigada por estar ao meu lado. Te amo.

À todos os integrantes do CBR, pelo acolhimento e ajuda no trabalho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Martha, primeiramente por ter me aceitado para realização do mestrado e também pelos conhecimentos passados, pela dedicação em todos os momentos e pelo exemplo profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Carlos Alberto Mourão Junior pela colaboração, dedicação e conhecimentos passados.

À Prof<sup>a</sup> Vera Peters pela convivência, ensinamentos passados e exemplo profissional.

À empresa ORTOFARMA pelo fornecimento da valeriana.

Ao professor Marcos Antônio Fernandes Brandão pela colaboração e sugestões no trabalho.

Ao professor Gilcélcio Amaral da Silveira pelas contribuições no trabalho.

Aos meus tios Eber, Heloísa, Luiz e Isabel pelo apoio nessa trajetória.

À minha prima Andréia pelo companheirismo em todos os momentos.

Ao Centro de Biologia da Reprodução e as redes de Bioterismo e Toxicologia pelos recursos oferecidos.

À Lorena, pelo acolhimento desde o meu primeiro momento no CBR, pela amizade e contribuição nos experimentos comportamentais.

Ao Renato, Vinicius, Leandro e Leonardo pelos conhecimentos passados e pela convivência durante este trabalho.

Aos professores do programa de pós-graduação pelos conhecimentos passados.

E à todos que colaboraram de alguma forma neste trabalho.

**Muito Obrigada!**

## RESUMO

A valeriana é moderadamente sedativa e usada no tratamento da ansiedade e distúrbios do sono. De acordo com a literatura a exposição a psicofármacos que atuam em receptores GABA-A durante a gestação podem provocar alterações comportamentais nos filhotes na vida adulta. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito que a administração do extrato de Valeriana durante a gestação possa ter sobre o desenvolvimento físico, o desenvolvimento reflexológico, a ansiedade e a memória dos filhotes. As ratas prenhes foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos (n=10): controle (1ml de água destilada) e três grupos tratados com valeriana, via intragástrica, T-500 (500mg/Kg/dia), T-1000 (1000mg/Kg/dia) e T-2000 (2000mg/Kg/dia) do 12º ao 19º dia de gestação. Depois do nascimento, o comportamento materno foi registrado e os filhotes fêmeas e machos foram avaliados separadamente quanto a alterações no desenvolvimento físico e reflexológico. Os filhotes machos também foram avaliados na vida adulta, 90 dias, quanto à ansiedade e à memória. Os animais apresentaram algumas alterações nas datas de aparecimento dos sinais indicadores físicos, os quais não permaneceram na vida adulta. A data de aparecimento dos reflexos foi semelhante entre os grupos. Em relação à ansiedade e à memória na vida adulta, não houve diferença estatística entre os grupos nos testes utilizados. Portanto, não houve alteração no desenvolvimento neonatal e neurocomportamental dos ratos, não tendo sido possível verificar se tal fato se deveu aos componentes da Valeriana não passarem pela placenta ou se o extrato ser inócuo para os fetos.

**PALAVRAS CHAVE:** Valeriana, prenhez, desenvolvimento neonatal, ansiedade e memória.



## ABSTRACT

Valerian is moderately sedative and used for anxiety problems and sleep disturbance. Previous studies have shown that the exposure to psychopharmacs acting on GABA-A system during gestation in rats can produce behavioral alterations in their descendants in the adult life. This work was designed to evaluate the effects of the exposure to *Valeriana officinalis* L. (Valerianaceae) during gestation on the physical and reflexological development of the offspring and on their anxiety state and memory in the adult stage. Pregnant rats were randomly distributed into four groups (n = 10): control (1 ml distilled water) and three valerian-treated groups with the doses T-500 (500 mg/Kg/ day), T-1000 (1000 mg/Kg/day) and T-2000 (2000 mg/Kg/ day), administered by gavage, from the 12<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup> day of gestation. After birth, maternal behavior was evaluated and the physical and reflexological development of the offspring male and females was assessed separately. The anxiety and memory of offspring male were evaluated at 90 days of age. Maternal behavior was not affected by treatment with valerian. The offspring exhibited some alterations on the day of appearance of physical signs, which did not affect the adult life, whereas similar days of appearance of the reflexes were observed among the groups. No significant difference was detected in the offspring in the anxiety and memory tests. Therefore, no alterations in the neonatal and neurobehavioral development of rats exposed to valerian during intrauterine life were found in the present work.

Key words: Valerian, pregnancy, GABA, neonatal development, anxiety, memory.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Teste preensão palmar: presença do reflexo. ....	33
<b>Figura 2:</b> Teste de resposta postural: a) ausência do reflexo, b) presença do reflexo. ....	34
<b>Figura 4:</b> Geotaxia negativa: a) ausência do reflexo, b) presença do reflexo. ....	34
<b>Figura 5:</b> Labirinto em cruz elevado. ....	36
<b>Figura 6:</b> Placa perfurada. ....	37
<b>Figura 7:</b> Esquiva inibitória. ....	39
<b>Figura 8:</b> Reconhecimento de objetos. ....	40
<b>Figura 9:</b> Consumo estimado de ração por ratas Wistar gestantes tratadas com suspensão aquosa de Valeriana nas concentrações 500 (n=10), 1000 (n=10) ou 2000mg/Kg (n=10) ou o controle (n=10). ....	44
<b>Figura 10:</b> Peso corporal de ratas Wistar gestantes tratadas com suspensão aquosa de Valeriana nas concentrações 500 (n=10), 1000(n=10) ou 2000mg/Kg (n=10) ou o controle (n=10). ....	45
<b>Figura 11:</b> Peso corporal de crias do sexo masculino, desde as 24 horas após o nascimento (dia 2) ao 25 <sup>o</sup> dia de vida. Controle (n=40), 500mg/Kg (n=40), 1000mg/Kg (n=40), 2000mg/Kg (n=40). ....	46
<b>Figura 12:</b> Frequência de aparecimento da erupção do incisivo inferior nas três categorias: antes, dia 11 e posterior em filhotes do sexo masculino expostos ao extrato aquoso de Valeriana na vida intrauterina. ....	48
<b>Figura 13:</b> Frequência de aparecimento do lanugo nas três categorias: antes, dia 4 e dia posterior ao controle, em filhotes do sexo masculino expostos ao extrato aquoso de Valeriana na vida intrauterina. ....	48
<b>Figura 14:</b> Frequência de aparecimento do pêlo nas três categorias: antes, dia 8 e dia posterior ao controle, em filhotes do sexo masculino expostos ao extrato aquoso de Valeriana na vida intrauterina. ....	48
<b>Figura 15:</b> Peso corporal de crias do sexo feminino, desde as 24 horas após o nascimento (dia 2) ao 25 <sup>o</sup> dia de vida. Controle (n=40), 500mg/Kg (n=40), 1000mg/Kg (n=40), 2000mg/Kg (n=40) de mães expostas à Valeriana. ....	50
<b>Figura 16:</b> Frequência de aparecimento da erupção do incisivo inferior nas três categorias: antes, dia 11 e posterior em filhotes de sexo feminino de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana na vida intrauterina. ....	52

**Figura 17:** Frequência de aparecimento do pêlo nas três categorias: antes, dia 8 e posterior em filhotes expostos ao extrato aquoso de Valeriana na vida intrauterina.  
.....52

**Figura 18:** Frequência de abertura do olho nas três categorias: antes, dia 17 e posterior em filhotes expostos ao extrato aquoso de Valeriana na vida intrauterina.  
.....52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Índices de sobrevivência dos filhotes, obtidos de mães (n =10) expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2) ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina.....	44
<b>Tabela 2:</b> Desenvolvimento físico dos filhotes de sexo masculino expostos ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2) ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina. ....	46
<b>Tabela 3:</b> Desenvolvimento reflexológico dos filhotes de sexo masculino, obtidos de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2) ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina. ....	48
<b>Tabela 4:</b> Desenvolvimento físico dos filhotes de sexo feminino obtidos de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2) ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina. ....	50
<b>Tabela 5:</b> Desenvolvimento reflexológico dos filhotes de sexo feminino de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2) ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina. ....	52
<b>Tabela 6:</b> Dados de estatística descritiva dos grupos na esquiiva inibitória de filhotes do sexo masculino de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana500(Tr1), 1000(Tr2) ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina.....	53
<b>Tabela 7:</b> Dados de estatística descritiva dos grupos no labirinto em cruz de filhotes do sexo masculino de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2) ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle intrauterina. ....	54
<b>Tabela 8:</b> Dados de estatística descritiva no teste de reconhecimento de objetos de filhotes do sexo masculino de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2) ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina. ....	54
<b>Tabela 9:</b> Dados de estatística descritiva dos grupos na placa perfurada de filhotes do sexo masculino de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana500(Tr1), 1000(Tr2) ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina.....	55

## SUMÁRIO

<b>1.0- INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2.0- REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
2.1- <i>Valeriana officinalis</i> .....	15
2.2- Ação do GABA no período de neurogênese .....	16
2.3- Comportamento materno .....	18
2.4- Desenvolvimento neonatal .....	20
2.5- Ansiedade .....	21
2.5.1- Labirinto em cruz elevado (LCE) .....	22
2.5.2- Placa perfurada .....	23
2.6- Memória .....	24
2.6.1- Teste da Esquiva Inibitória .....	25
2.6.2- Teste do Reconhecimento de objetos .....	26
<b>3.0- HIPÓTESE</b> .....	27
<b>4.0- OBJETIVOS</b> .....	28
4.1- Objetivo geral .....	28
4.2- Objetivos específicos .....	28
<b>5.0- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
5.1- Valeriana .....	29
5.2- Modelo experimental .....	29
5.3- Acasalamento .....	30
5.4- Grupos experimental .....	30
5.5- Avaliação de toxicidade materna .....	30
5.6- Avaliação do desenvolvimento neonatal .....	31
5.7- Desenvolvimento físico .....	31
5.8- Desenvolvimento reflexológico .....	32
5.9- Avaliação comportamental na vida adulta .....	34
5.9.1- Avaliação do efeito ansiolítico .....	34
5.9.1.1- Labirinto em cruz elevado (LCE) .....	34
5.9.1.1.1- Aparato .....	34
5.9.1.1.2- Procedimentos experimentais .....	35
5.9.1.1.3- Variáveis avaliadas .....	35
5.9.1.2- Placa perfurada .....	36
5.9.1.2.1- Aparato .....	36

5.9.1.2.2- Procedimentos experimentais .....	37
5.9.1.2.3- Variáveis avaliadas .....	37
5.9.2- Efeito memória.....	37
5.9.2.1- Teste de esQUIVA inibitória .....	37
5.9.2.1.1- Aparato .....	37
5.9.2.1.2- Procedimento experimental.....	38
5.9.2.1.3- Variáveis avaliadas .....	39
5.9.2.2- Teste de reconhecimentos de objetos.....	39
5.9.2.2.1- Aparato .....	39
5.9.2.2.2- Procedimento experimental.....	40
5.9.2.2.3- Variáveis avaliadas .....	40
<b>6.0- ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>41</b>
<b>7.0- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>42</b>
<b>8.0- RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
8.1- Avaliação Materna .....	43
8.2- Índices de sobrevivência.....	44
8.3- Desenvolvimento físico em machos.....	45
8.4- Desenvolvimento reflexológico em machos .....	48
8.5- Desenvolvimento físico em fêmeas .....	49
8.6- Desenvolvimento reflexológico em fêmeas.....	52
8.7- Avaliação na vida adulta .....	53
8.7.1- EsQUIVA inibitória.....	53
8.7.2- Labirinto em cruz .....	53
8.7.3- Reconhecimento de objetos .....	54
8.7.4- Placa perfurada modificada .....	55
<b>9.0- DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>10.0- REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>

## 1.0- INTRODUÇÃO

A conceituação de “natural” contribuiu muito para o aumento da utilização de plantas medicinais na última década, pois assim passaram a ser sinônimos de produtos saudáveis (Mengue *et al.*, 2001). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabeleceu normas para a determinação da eficácia e segurança de fitoterápicos, compreendendo a avaliação da toxicidade reprodutiva. Além disso, qualquer uso de medicamento durante a gestação deve ser avaliado, considerando a relação risco-benefício. Sendo que plantas medicinais devem ser evitadas até que estudos garantam seu uso seguro (Mengue *et al.*, 2001). Entretanto, pouco tem sido feito em relação aos efeitos na vida adulta, de crias expostas durante o período intrauterino a fármacos em geral. Recentemente foram sugeridos estudos visando à avaliação dos efeitos durante a puberdade (Goodman *et al.*, 2011).

O desenvolvimento do cérebro é demorado e no rato se completa na vida pós-natal. Durante a gestação a barreira hematoencefálica ainda não está estabelecida, o que permite a passagem de fármacos, via placenta, ao organismo fetal e ao cérebro, caso haja afinidade por esse órgão. Assim, fitoterápicos que tenham potencial como ansiolítico, antidepressivo, anticonvulsivante e outros, podem potencialmente chegar ao cérebro do feto, sendo desconhecidos seus efeitos na vida pós-natal (Yang *et al.*, 2010).

A *Valeriana officinalis* tem atividade moderadamente sedativa sendo indicada nas desordens do sono ou no tratamento da ansiedade e distúrbios do sono induzidos pela ansiedade (Miyasaka *et al.*, 2006), e é hoje uma matéria-prima importante para os medicamentos da medicina contemporânea. Sugere-se que o extrato de Valeriana, assim como os benzodiazepínicos, atua através da modulação de receptores GABA A (Benke *et al.*, 2009). O GABA possui surgimento prévio no desenvolvimento do cérebro de ratos e apresenta papel trófico no desenvolvimento do órgão (Fizman *et al.*, 1993; Lauder *et al.*, 1986). Estudos demonstram que a exposição a drogas que atuam em receptores GABA A durante o desenvolvimento do cérebro pode provocar modificações comportamentais ou do tipo autonômica que podem ser evidentes na vida neonatal ou depois na vida adulta (Kellog, 1985; Ingelfield *et al.*, 1993; Jaiswal e Bhattacharya, 1993; Kellog *et al.*, 1993).

Em virtude do exposto, torna-se importante avaliar o efeito que a administração de extrato de Valeriana durante a gestação possa ter sobre o desenvolvimento neonatal e sobre desenvolvimento neurocomportamental.



## 2.0- REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1- *Valeriana officinalis*

A raiz seca da planta *Valeriana officinalis* L. é utilizada como uma erva medicinal, pelo menos desde o tempo antigo na Grécia e Roma. Espécies relacionadas da família Valerianaceae foram usadas na medicina tradicional chinesa e indiana (Jarema, 2008).

A espécie tem como classificação botânica:

- Reino: Plantae
- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Dipsacales
- Família: Valerianaceae
- Gênero: *Valeriana*
- Espécie: *Valeriana officinalis* L.

O gênero *Valeriana* contém cerca de 250 espécies e diversas subespécies. A espécie *Valeriana officinalis* L. é a mais comumente referida como Valeriana, e é utilizada principalmente como sedativa, ansiolítica, anticonvulsivante e para efeitos hipnóticos, além de que já foi utilizada há mais de mil anos para tratamento de problemas digestivos e do trato urinário (Circosta *et al.*, 2007; Benke *et al.*, 2009).

A atividade farmacológica da *Valeriana* pode ser atribuída a vários constituintes químicos como: o ácido valerênico presente no óleo essencial de *Valeriana* (American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium apud Gonçalves e Martins, 2006), sendo esse o principal constituinte ativo na planta (Maier-Salamon *et al.*, 2009); aos valepotriatos, encontrados principalmente nos órgãos subterrâneos (Russowski, 2007), aos quais é atribuído poder de toxicidade (Al Majed *et al.*, 2006); aminoácidos como ácido gama-aminobutírico (GABA) (Santos *et al.*, 1994); flavanóides (Marder *et al.*, 2003); além de alcaloides, lignanas e triterpenos (Circosta *et al.*, 2007)

A *Valeriana* é moderadamente sedativa e usada nas desordens do sono podendo ser uma alternativa ou uma possível substituta de fortes sedativos, como

os benzodiazepínicos, no tratamento da ansiedade e distúrbios do sono induzidos pela ansiedade (Miyasaka *et al.*, 2006). O mecanismo de ação da *Valeriana officinalis* ainda não está totalmente esclarecido, mas estudos propõem que o efeito farmacológico do extrato de Valeriana e do ácido valerênico, assim como os benzodiazepínicos, são mediados por modulação da função de receptores GABA A. Sugere-se que o ácido valerênico inibe a enzima GABAase na fenda sináptica e aumenta a disponibilidade dos mediadores GABA  $\beta$ 3 do receptor GABA (Benke *et al.*, 2009). Portanto, a Valeriana pode potencializar o efeito sedativo e anestésico de outros medicamentos que agem em receptores GABA.

Estudos sobre a toxicidade de Valeriana demonstram que o valtrato inibe fortemente a síntese de DNA em culturas de células hepáticas de rato (Bounthanh *et al.*, 1983). Hui-Lian *et al.* (2003) detectaram a genotoxicidade in vitro do extrato diclorometanólico de Valeriana em culturas celulares humanas. Resultados do estudo in vivo de YAO *et al.* (2007), no qual administraram durante oito dias por via oral 2,79g/Kg/dia do extrato de Valeriana em ratas prenhas, não mostraram aumento da incidência na má formação interna e externa dos fetos, nem efeitos adversos com relação à fertilidade. No entanto, Tuffik *et al.* (1994) mostraram que altas doses de Valeriana podem aumentar o retardo da ossificação.

## 2.2- Ação do GABA no período de neurogênese.

Vários dos distúrbios neuropsiquiátricos têm sido considerados como resultado da influência em estágios críticos durante o desenvolvimento do cérebro, sendo que esses distúrbios podem ser evidentes em diferentes fases da vida. O período de desenvolvimento do cérebro tanto em humanos quanto em ratos é caracterizado pela ausência da barreira hematoencefálica, uma diferença importante entre o cérebro em desenvolvimento e maturo, que contribui para a vulnerabilidade do cérebro à agentes que interferem em seu desenvolvimento. A estimulação de receptores durante o desenvolvimento pode causar ajuste permanente dos receptores e justifica a ação teratogênica de agentes psicoativos em doses farmacologicamente efetiva em adultos (Rodier, 1994; Rodier, 1995). Neurotransmissores podem modular a proliferação de células não diferenciadas,

neuroblastos e interferir na diferenciação celular (Emerit *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 2001).

Nos vertebrados, o ácido gaba-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central e atua provocando a abertura de canais iônicos para permitir o influxo de íons cloreto ou efluxo de íons potássio, hiperpolarizando o neurônio e inibindo a geração de potencial de ação. O GABA é uma substância que tem surgimento prévio no desenvolvimento do cérebro de ratos (Fizman *et al.*, 1993), o que indica o papel trófico do GABA no início do desenvolvimento do órgão, envolvendo possivelmente receptores para esses neurotransmissores e substâncias correlacionadas (Lauder *et al.*, 1986).

Estudos demonstram que no cérebro de mamíferos em desenvolvimento o GABA exerce um efeito excitatório, despolarizando a membrana e aumentando a taxa de  $Ca^{2+}$  intracelular (Cherubini *et al.*, 1991), em contraste com a ação hiperpolarizante no cérebro maduro. Owens *et al.* (1996) sugeriram que esta despolarização pode influenciar os eventos de desenvolvimento neocorticais iniciais como neurogênese e sinaptogênese, através das vias de transdução de sinal dependentes do  $Ca^{2+}$ , pois constitui um sinal de regulação do crescimento neural que dispara processos mediados pelo  $Ca^{2+}$ , nos precursores neurais, neuroblastos e neurônios imaturos (Fizman e Schousboe, 2004).

Estudos em animais têm apontado que a exposição a drogas que atuam no sistema GABA durante o desenvolvimento do cérebro pode provocar alterações no desenvolvimento neurológico. Kellog *et al.* (1993) estudaram o efeito da exposição à benzodiazepínicos na vida intrauterina e a responsividade do receptor GABA durante situações de estresse em animais de diferentes idades. Ficou demonstrado que nos animais controle as mudanças induzidas pelo estresse na função do receptor não foram evidentes até os 70 dias de idade e os ratos expostos ao diazepam não apresentaram mudança na função do receptor em nenhuma idade, ou seja, parece que ocorreu uma alteração na sensibilidade de receptores GABA, o que pode ocasionar uma alteração nas respostas comportamentais a mudanças ambientais.

Além disso, a avaliação de fatores neurotróficos derivados do cérebro em ratos expostos ao diazepam na vida intrauterina demonstrou influência na expressão desses fatores neurotróficos no cérebro, porém o impacto foi de acordo com o sexo e região, sendo os machos mais afetados. Assim, a manipulação dos receptores

GABA A durante o desenvolvimento poderia interagir com outros fatores tróficos no desenvolvimento levando a alteração na organização neuronal e posteriormente disfunção neurocomportamental (Kellog *et al.*, 2000).

Em relação às consequências metabólica e comportamental à exposição neonatal ao diazepam, Schroeder *et al.* (1995) demonstraram que o diazepam induziu déficit motor e também diminuição no metabolismo energético em algumas regiões que controlam a postura e balanço do corpo, o que pode estar correlacionado com o impedimento da atividade locomotora.

Nicosia *et al.* (2003) observaram que houve um retardo no aparecimento da resposta ao susto e à geotaxia negativa em animais expostos ao diazepam na vida pré-natal. Além disso, as fêmeas demonstraram resistência à indução a convulsão por pentylenetrazol comparado a animais machos. Assim a exposição pré-natal a agentes externos que atuam no receptor GABA provocaram alterações metabólicas, neurotróficas e comportamentais que podem ser influenciadas por fatores dependentes do sexo, portanto torna-se importante argumentar o uso de medicamentos durante a gravidez.

### 2.3- Comportamento materno

O Comportamento materno compreende todos os cuidados oferecidos pela mãe aos filhotes para garantir a sobrevivência destes até que eles se tornem independentes (Marchewska-koj *et al.*, 1999). Em ratos o comportamento materno ocorre mesmo antes do parto, quando as fêmeas gestantes lambem seus mamilos, o que favorece o crescimento mamário e a função secretora (Brown, 1998) e também iniciam a construção do ninho 4 a 5 dias antes do parto.

Após o nascimento, a secreção de dodecilpropionato pela glândula prepucial das crias estimula a mãe a lambem a região ano-genital dos filhotes, induzindo a defecação e micção, comportamento essencial à sobrevivência (Brouette *et al.*, 1998). Os filhotes são completamente dependentes da mãe, e estas despendem a maioria do seu tempo cuidando do ninho, amamentando e recuperando os filhotes. O comportamento materno é mantido por estímulos emitidos pelos filhotes como temperatura, odor e vocalização (Barnett e Burn, 1970; Brown, 1998).

O cuidado com o ninho é importante para manutenção das crias aquecidas. Tal comportamento é realizado até que as crias fiquem ativas e abandonem o ninho (Barnett e Burn, 1970). Em relação à amamentação, esta pode iniciar depois de 15 a 29 minutos após o nascimento (Brown, 1998). Com três semanas de idade o leite fornecido pela mãe deixa ser suficiente para sustentação dos filhotes e o desmame ocorre porque os dentes começam a crescer e provocam irritação à mãe, assim esta começa evitar os filhotes (Kristal, 2008).

A ativação do comportamento materno está relacionada com determinadas áreas do cérebro como o núcleo pré-optico medial do hipotálamo (Numan, 1994; Kendrick, 2000; Poindron, 2005). O desencadeamento ocorre por mecanismos endócrinos que se iniciam no final da gestação como a sensibilização prévia pelo estrogênio, posteriormente a elevação de prolactina e a elevação dos níveis de ocitocina, decorrente da excitação da região cérvico-vaginal durante o parto (Numan, 1994).

Considerando a importância do comportamento materno para sobrevivência dos filhotes, ele também influencia a qualidade do desenvolvimento nas diferentes fases da vida (Poindron, 2005), uma vez que alterações no metabolismo por doenças, estresse ou toxicidade da mãe se refletem no desenvolvimento da cria (Sodersten e Eneroth, 1984; Champagne *et al.*, 2003). Estudos experimentais consideram como sinais de toxicidade materna o decréscimo no ganho de peso, diminuição no consumo de água e alimento, sinais clínicos de toxicidade e mortalidade (Castro, 2004; ICH, 2005).

Nesse sentido, fatores que interferem na relação mãe-filhote nas fases iniciais da vida representam um considerável fator de risco para o desenvolvimento de doenças de ordem psiquiátrica e neurodegenerativas nos filhotes (Levine, 2000; Huang *et al.*, 2002; Renard *et al.*, 2005; Benetti *et al.*, 2009). Estudos utilizam a privação materna (3 a 6h por dia) para avaliação das alterações devido a interferência na relação mãe-filhote (Huot *et al.*, 2002; Renard *et al.*, 2005; Benetti *et al.*, 2009). Por exemplo, ratos privados da mãe na vida neonatal, quando estudados na vida adulta, apresentaram aumento no medo e ansiedade em resposta a um agente estressor (Renard *et al.*, 2005; Renard *et al.*, 2007); altos níveis de corticosterona (Huot *et al.*, 2002; Huot *et al.*, 2004); comportamento depressivo no teste de nado-forçado (Huot *et al.*, 2002; Huot *et al.*, 2004). Além disso, de Kloet *et al.* (1999) demonstraram diminuição nos receptores de glicocorticoides no

hipocampo de filhotes de roedores privados da mãe, considerando que em roedores o impedimento da função de receptores de glicocorticoides compromete a capacidade cognitiva e espacial dos indivíduos. Desta forma, é importante a avaliação do comportamento materno em estudos de toxicidade reprodutiva.

#### 2.4- Desenvolvimento neonatal

Define-se agente teratogênico como qualquer agente externo que pode induzir alteração estrutural ou funcional em indivíduos expostos durante a vida embrionária (Dicke, 1989). Algumas alterações não são evidentes ao nascimento, mas são observadas na vida neonatal.

O estudo do desenvolvimento neonatal consiste em avaliações do desenvolvimento físico (nível anatômico) e reflexológico dos filhotes. O desenvolvimento físico é avaliado a partir da abertura dos olhos, desdobramento do pavilhão auricular, aparecimento de lanugo e pelos, erupção dos incisivos superiores e inferiores, a abertura vaginal ou descida dos testículos, enquanto o desenvolvimento reflexológico é observado os reflexos como a preensão palmar, resposta postural, esquiva ao abismo e geotaxia negativa. Avaliam-se os sinais de desenvolvimento físico e respostas reflexológicas ocorrem em tempo semelhante ao grupo controle (Baso *et al.*, 2003; Chiavegatto *et al.*, 1997; Dorce *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011).

Fox (1965) considera os sinais de desenvolvimento reflexológico como indicativos de maturação do cérebro. Segundo Altman e Sudarshan (1975) a regulação do ajuste postural está envolvido com três sistemas: vestibular, tátil e proprioceptivo. Desta forma, o atraso nas respostas reflexológicas implica em alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central, o que pode representar um fator preditivo para modificações comportamentais na vida adulta. Portanto, o estudo do desenvolvimento neonatal possibilita avaliar se um determinado agente externo poderia diretamente ou indiretamente afetar o desenvolvimento e maturação do filhote.

## 2.5- Ansiedade

O termo ansiedade se refere a um estado muito difícil de definir ou caracterizar. Segundo Coêlho e Tourinho (2008) as múltiplas definições encontradas para ansiedade na literatura não refletem necessariamente conceitos incompatíveis, visto que talvez abordem diferentes relações de um fenômeno complexo. Assim, os diferentes conceitos encontrados podem se referir a componentes fisiológicos ou comportamentais, os quais, em conjunto, formam uma rede de relações complexas que definem a ansiedade do indivíduo. A ansiedade é considerada uma emoção semelhante ao medo, no entanto este é fruto de ameaça definida enquanto na ansiedade a fonte de perigo é incerta ou desconhecida (Graeff e Guimarães, 1999).

Atualmente, vários estudos consideram uma distinção entre ansiedade-estado e ansiedade-traço (Belzung *et al.*, 2001). A ansiedade-estado é aquele estado relacionado a experiências subjetivas em um determinado momento e é aumentado pela presença de um estímulo ansiogênico. Ansiedade-traço, por sua vez, não varia de momento a momento, sendo um quadro persistente e durável, refletindo a maneira como o indivíduo interage com o ambiente.

A ansiedade é então um estado humano subjetivo; tal fato dificulta o estudo da mesma em animais. No entanto, apesar de ser reconhecido que os animais não podem exibir todos os matizes da ansiedade humana, os estudos neles realizados permitem investigações detalhadas dos processos neurobiológicos e psicológicos relacionados ao medo, quando este pode ser inferido como resposta a situações aversivas (Bourin *et al.*, 2007). A maioria das pesquisas em farmacologia comportamental tem abordado mudanças induzidas por drogas na ansiedade-estado, onde o animal é confrontado com uma situação ansiogênica (Lister, 1990). Para tais estudos, vem sendo utilizado testes comportamentais como o labirinto em cruz elevado e o teste da placa perfurada.

### 2.5.1- Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado é um dos testes comportamentais mais populares na pesquisa da ansiedade, sendo baseado no comportamento incondicionado. Derivou de um trabalho com Y-labirinto que compreende números diferentes de becos fechados e abertos, no qual Montgomery (1955) observou que ratos mostram consistentemente altos níveis de exploração e preferência para braços fechados e concluiu que o esquivar-se dos braços abertos se devia ao fato deles evocarem elevado nível de medo.

Durante os testes os ratos podem apresentar comportamentos como congelamento, defecação e micção, além de aumento do nível plasmático de hormônios de estresse, tais como a corticosterona e o cortisol – sinais indicativos de ansiedade (Graeff e Guimarães, 1999).

A causa da aversão aos braços abertos pode ser explicada por diferentes hipóteses. Sugeriu-se que a aversão pelos braços abertos resultaria do medo de altura (Pellow, 1986) e/ou de espaços abertos (Pellow *et al.*, 1985). Treit e Fundytus (1988) propuseram que a relutância do animal entrar nos braços abertos estaria relacionada ao comportamento de tigmotaxia — tendência de o animal permanecer com o corpo próximo ou em contato com superfícies verticais. No entanto, ainda não se sabe exatamente o porquê da preferência pelos braços fechados. Primeiramente foi sugerido que estaria relacionado ao sentido das vibrissas (Treit *et al.*, 1993), paralelamente à utilização da visão (Cadernas *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2002).

Handley e Mithani (1984) fizeram estudos iniciais avaliando o labirinto em cruz elevado em testes farmacológicos como um possível modelo, em animal, para o estudo da ansiedade, sendo que compostos ansiolíticos aumentam, enquanto compostos ansiogênicos diminuem a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos em relação ao tempo gasto em ambos os braços do aparato (braços abertos + braços fechados) (Pellow *et al.*, 1985; Cole *et al.*, 1995), ou seja, uma maior intensidade de ansiedade corresponde uma maior exploração dos braços abertos (Morato e Brandão, 1997). É importante ressaltar que o cálculo do índice de tempo de permanência nos braços abertos/braços abertos+fechados com os resultados do labirinto em cruz elevado elimina a interferência da atividade locomotora na interpretação dos resultados quanto á ansiedade. Desta forma o LCE é uma



ferramenta experimental importante para estudos farmacológicos que sustentam muitas pesquisas no campo da ansiedade (Stern *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2011).

### 2.5.2-Placa perfurada

Testes comportamentais incondicionados são frequentemente utilizados para avaliar efeitos de drogas (Sheldon, 1968). No entanto, dependendo do teste, a interpretação confiável dos resultados pode ser alterada pela atividade locomotora do animal, visto que um animal que apresenta elevado índice de locomoção tende a explorar mais o ambiente, no entanto não é uma resposta do estado de ansiedade e sim uma resposta motora.

Boissier e Simon (1962,1964) introduziram pela primeira vez o teste da placa perfurada, um método simples para avaliar a exploração em um novo ambiente. O aparato consiste em uma arena fechada com buracos no piso, nos quais o animal pode mergulhar a cabeça conhecido como mergulhos (File e Wardill, 1975 a,b). A frequência dos mergulhos da cabeça fornece medidas para avaliar a exploração em um novo ambiente, de forma que ficou demonstrado que os mergulhos da cabeça são independentes da atividade locomotora, eliminando a dificuldade de diferenciação entre o índice de ansiedade e a locomoção do animal (Abel, 1995).

Outros estudos usam a placa perfurada modificada, que compreende um teste comportamental não condicionado utilizando as características do campo aberto e da placa perfurada, assim o teste fornece automaticamente medidas como: atividade locomotora, exploração do ambiente e número de vezes em que o animal se levanta (Takeda *et al.*, 1998; Casarrubea, 2010).

É conhecido que vários testes são utilizados em pesquisas pré-clínicas em farmacologia do comportamento. Takeda *et al.* (1998) avaliando drogas ansiolíticas e ansiogênicas no teste da placa perfurada demonstraram que o comportamento de mergulhos pode refletir o estado ansiolítico e ansiogênico do animal e que a placa perfurada modificada é um novo, sensível e confiável modelo para estudar ansiedade, já que a baixa frequência de mergulhos reflete um alto estado de ansiedade no animal. Acredita-se que esta relação ocorre pelo fato de que quanto

mais ansioso se encontra um animal, menos ele tende de se expor ao perigo, por exemplo, á uma predação (Rodriguez Echandia *et al.*, 1987).

## 2.6- Memória

Apesar de não existir um consenso absoluto acerca da definição dos termos aprendizado e memória, é possível diferenciar alguns conceitos. O aprendizado é a aquisição de novas informações, enquanto que memória engloba a aquisição, a formação, a conservação e a evocação das informações (Izquierdo, 2002).

Memórias são classificadas de acordo com seu conteúdo: as memórias que registram fatos eventos ou conhecimentos são chamadas declarativas (explícitas) e as memórias de capacidade ou habilidades, motoras ou sensorial, são as memórias conhecidas como procedurais (implícitas) (Izquierdo, 2002; Mourão e Abramov, 2011). As memórias também podem ser classificadas de acordo com sua duração: as memórias armazenadas por um curto período de tempo são consideradas memórias de curta duração e aquelas armazenadas por um longo período de tempo são consideradas memórias de longa duração (Goldman,1996; Izquierdo, 2002). Enquanto a memória estiver retida, a informação pode ser recuperada, este processo se denomina evocação, no entanto quando ocorre o desaparecimento de memórias consolidadas, temos o fenômeno do esquecimento (Izquierdo, 2002). Além disso, existe a memória de trabalho que mantém durante alguns segundos a informação que está sendo processada no momento (Mourão e Abramov, 2011). A memória de trabalho se diferencia das outras porque não forma traços bioquímicos (Izquierdo, 2002; Mourão e Abramov, 2011).

O hipocampo é a estrutura central para a formação de memórias declarativas, sendo que várias regiões corticais como a pré-frontal, a entorrinal e a parietal participam do processo. As memórias implícitas envolvem, em diversos casos, algumas dessas áreas, mas dependem fundamentalmente de circuitos subcorticais (núcleo caudado ou globo pálido) ou cerebelares (Izquierdo, 2002; Mourão e Abramov, 2010).

Durante o processo de formação de memórias, elas são susceptíveis à interferência, por exemplo, de drogas ou outros tratamentos (MCgaugh e Izquierdo,

2000). Além disso, fatores que interferem na neurogênese são conhecidos como potenciais mediadores no prejuízo de funções hipocampais (Gould *et al.*, 1999). Pesquisas farmacológicas utilizam modelos comportamentais, para avaliação dos diferentes tipos de memória, como o teste de reconhecimento de objetos, caracterizado por utilizar memórias inatas, relacionadas com reconhecimento de objetos novos e o teste de esquiva inibitória que se caracteriza por ser uma avaliação de memória de conteúdo aversivo. Desta forma, utilizaram-se os dois testes e um mesmo animal para ambos por explorarem memórias de natureza distinta.

### 2.6.1- Teste da Esquiva Inibitória

O teste de esquiva inibitória é amplamente utilizado em avaliações cognitivas (Davoodia *et al.*, 2011; Aghdam *et al.*, 2012). O experimento consiste em duas sessões diferentes: a sessão de treino, na qual o animal é punido com um choque nas patas após descer de uma plataforma e a sessão de teste, na qual o tempo que o animal leva para descer da plataforma é registrado para avaliar se o animal se lembra de que não deve descer para não receber o choque (Bammer, 1982).

O intervalo entre a sessão teste e o teste de retenção depende do tipo de memória que será avaliado. Assim o teste é utilizado para avaliação de memórias, pois o tempo entre a sessão treino e a sessão teste vai determinar a avaliação da memória de longa duração ou curta duração. Izquierdo *et al.* (1998), utilizando o teste de esquiva inibitória, observaram que tratamentos que interferem em sistemas de neurotransmissores no hipocampo, ou nos córtices entorrinal ou parietal, afetam diferentemente dois tipos de memória: podem bloquear a memória de curta duração sem afetar a memória de longa duração, ou podem alterar ambas, porém de maneira distinta.

Além disso, o teste é utilizado em pesquisas farmacológicas. Dickinson-Anson e McGaugh (1997) demonstraram que a administração de benzodiazepínicos posteriormente ao treino altera a retenção da memória no teste de esquiva inibitória, sendo que a transmissão GABAérgica inibe a aquisição inicial da memória do medo e possivelmente a sua consolidação (Kim *et al.*, 2006).

### 2.6.2- Teste de Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi proposto por Ennauceur e Delacour (1988) embasados na observação de um comportamento inato de roedores, em que estes preferem explorar objetos novos em detrimento de objetos já conhecidos. Desta forma, roedores exploram durante maior período de tempo objetos que desconhecem em relação a objetos familiares, conhecido como neofilia.

O teste vem sendo muito utilizado em pesquisas experimentais para avaliar efeitos de drogas sobre a memória (Ennauceur e Aggleton, 1994; Rampon *et al.*, 2000). O teste não requer um treinamento preliminar extenso, nem um condicionamento aversivo (Ennauceur e Delacour, 1988). Devido as suas vantagens e praticidade, o teste de reconhecimento de objetos torna-se uma ferramenta de grande utilidade para pesquisas de processos neuronais e comportamentais sem alterar o comportamento natural do animal. Assim, tanto o teste de reconhecimento de objetos quanto o teste de esquiva inibitória podem ser utilizados para avaliação da memória de longa duração, no entanto se completam, pois o teste de reconhecimento de objetos utiliza estímulo etológico (exploração de ambientes novos), enquanto o teste de esquiva inibitória é embasado em um estímulo aversivo (choque).

### **3.0- HIPÓTESE**

A exposição à Valeriana na vida intrauterina provoca alterações que podem ser evidentes tanto no desenvolvimento neonatal quanto na vida adulta das crias.

## 4.0- OBJETIVOS

### 4.1- Objetivo geral

Avaliar o efeito que a administração de extrato do Valeriana durante a gestação possa ter sobre o desenvolvimento físico e reflexológico na vida neonatal e na ansiedade e memória na vida adulta das crias.

### 4.2- Objetivos específicos

- Observar manifestações de sinais clínicos de toxicidade e alterações do comportamento na mãe;
- Avaliar o aparecimento dos sinais físicos de desenvolvimento pós-natal;
- Determinar o período de aparecimento dos reflexos neuromotores;
- Investigar o estado de ansiedade do filhote na vida adulta;
- Avaliar a memória etológica de longa duração do filhote na fase adulta.
- Avaliar a memória aversiva de longa duração do filhote na fase adulta.

## 5.0- MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1- Valeriana

A Valeriana na forma de extrato seco foi fornecida pela empresa ORTOFARMA®, onde se realizou a análise de controle de qualidade físico-químico. O extrato foi importado pela empresa QUIMER®, sob o lote número 004/2011.

O extrato seco foi suspenso em água deionizada diariamente e mantido sob proteção da luz. O estoque da substância foi conservado em dessecador a vácuo para evitar umidificação.

### 5.2- Modelo experimental

Foram utilizadas 40 ratas Wistar entre 90 e 120 dias provenientes da colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Os animais foram alojados na proporção de cinco animais/ gaiola, em gaiolas de polipropileno (40X30X16 cm), forradas com maravalha selecionada não esterilizadas, dotadas de cocho para ração e local para mamadeira com água. As gaiolas foram mantidas em armários climatizados ALESCO @, em alojamento provido de dispositivo temporizador, mantendo ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6:00 às 18:00 horas e a fase escura de 18:00 às 6:00 horas. Os animais receberam água filtrada não esterilizada e ração tipo pellets (Nuvital® Nuvilab, Colombo-PR, Brasil), *ad libitum*. Os procedimentos com os animais seguiram os princípios preconizados no “Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório” (ILAR,2003).

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios do Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora e no Laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz.

### 5.3- Acasalamento

Duas fêmeas foram transferidas para a gaiola de um macho e colocadas à noite para acasalamento. A presença de espermatozoides no esfregaço vaginal, realizado na manhã seguinte ao acasalamento, foi considerado como evidência do acasalamento e como o dia 1 de gestação(DG1) (Beaudoin, 1985).

Cada rata, no 12<sup>o</sup> dia de gestação, foi colocada em gaiola individual e distribuída aleatoriamente para constituir os grupos experimentais descritos adiante.

### 5.4- Grupos experimentais

As ratas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos com dez (10) animais cada, seguindo o esquema a seguir (Al-majed *et al.*, 2006):

Grupo1 = controle-recebeu 1 ml do veículo utilizado no preparo do extrato

Grupo 2 = Tratado 1- recebeu 500mg/kg do extrato aquoso de Valeriana

Grupo 3 = Tratado 2- recebeu 1000mg/kg do extrato aquoso de Valeriana

Grupo 4 = Tratado 3 – recebeu 2000mg/kg do extrato aquoso de Valeriana

A Valeriana em pó foi diluída em uma proporção de 500mg/ml e cada animal recebeu a dose conforme sua massa corporal, por via intragástrica no período do 12<sup>o</sup> ao 19<sup>o</sup> dia de gravidez, que corresponde ao período mais vulnerável no desenvolvimento do cérebro (Vorhees *et al.*, 1990).

### 5.5- Avaliação de toxicidade materna

Indícios de toxicidade materna foram considerados através da observação de atividade geral, postura, presença de piloereção, diarreia e estereotipia, verificados durante 30 minutos após o tratamento. Todos os animais foram pesados e tiveram o consumo de ração estimado, diariamente. A estimativa do consumo de ração foi feita



pela diferença entre gramos de ração (40g/dia/animal) colocados em um dia e o que restou no dia seguinte.

Também se observou o comportamento materno como: aleitamento, canibalismo, comportamento de lambar os filhotes, recuperação das crias e organização do ninho (Brown, 1998; Chiavegatto *et al.*, 1997). Esses comportamentos foram observados durante cinco minutos para cada rata uma hora antes dos procedimentos de tratamento.

#### 5.6- Avaliação do desenvolvimento neonatal

Para o estudo do desenvolvimento neonatal foram utilizadas 20 ratas entre as 40 inseminadas. As crias foram também homogeneizadas de forma a obter 8 filhotes em cada ninhada (4 machos e 4 fêmeas).

Os filhotes foram identificados através de tatuagem, por nanquim, feita na pele. Machos e fêmeas foram observados separadamente, visto que existem evidências de diferenças de gêneros nos processos neuronais e comportamento (Kelly *et al.*, 1999). Os dados de desenvolvimento físico e reflexológico das crias foram anotados diariamente.

#### 5.7- Desenvolvimento físico

O dia do nascimento foi considerado o primeiro dia pós-natal (DPN1). Para evitar estresse pela manipulação dos filhotes, os animais foram contados, sexados e pesados (em ninhadas separadas por sexo) 24 horas após o nascimento e no 4<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> dias após parto (Bailey *et al.*, 2009). Os sinais indicadores de desenvolvimento físico adotados foram: abertura dos olhos, desdobramento das orelhas, aparecimento de lanugo e pelos, erupção dos incisivos superiores e inferiores, a abertura vaginal ou descida dos testículos. Para estruturas pares a data considerada foi a do aparecimento das duas estruturas (Chiavegatto *et al.*, 1997; Dorce *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011)

Para a observação do aparecimento do lanugo foi utilizada uma lupa de mão. O aparecimento dos pelos foi considerado quando o corpo do animal estava recoberto de pelos e na cor branca. A erupção dos incisivos, superiores e inferiores, foi avaliada com auxílio de um lápis atritando a gengiva. A abertura vaginal foi datada quando havia um orifício discernível e a descida dos testículos quando os dois testículos desciam para o escroto.

#### 5.8- Desenvolvimento reflexológico

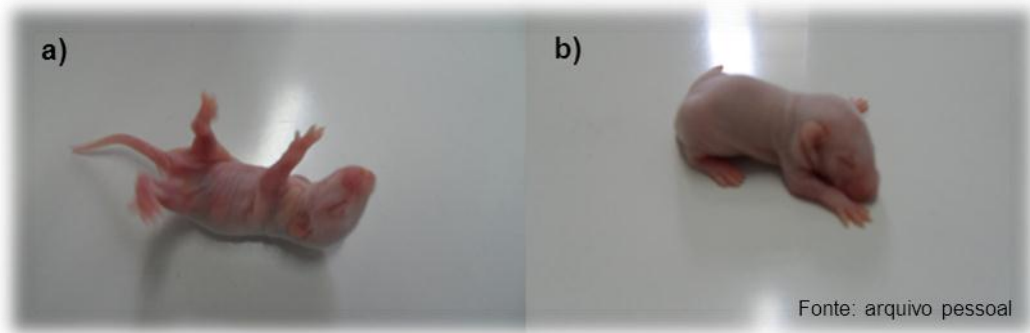
Para verificar aparecimento dos reflexos neuromotores foram feitos os seguintes testes: preensão palmar, resposta postural, esquiva ao abismo, orientação e geotaxia negativa. Os testes foram realizados diariamente até o seu aparecimento, com duração de 15 segundos cada (Chiavegatto *et al.*, 1997; Dorce *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011).

**Preensão palmar:** para observar a preensão palmar foi colocado um clips na pata dianteira dos filhotes e a resposta é o fechamento dos dedos (Fig. 1).



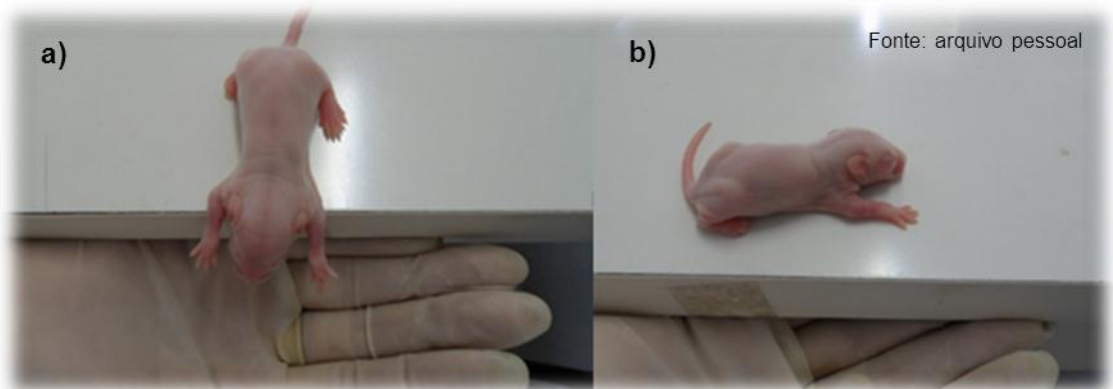
**Figura 1-** Teste preensão palmar: Presença de reflexo.

**Resposta postural:** neste teste o animal é colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície e espera-se a resposta de retornar a posição de decúbito ventral (Fig. 2).



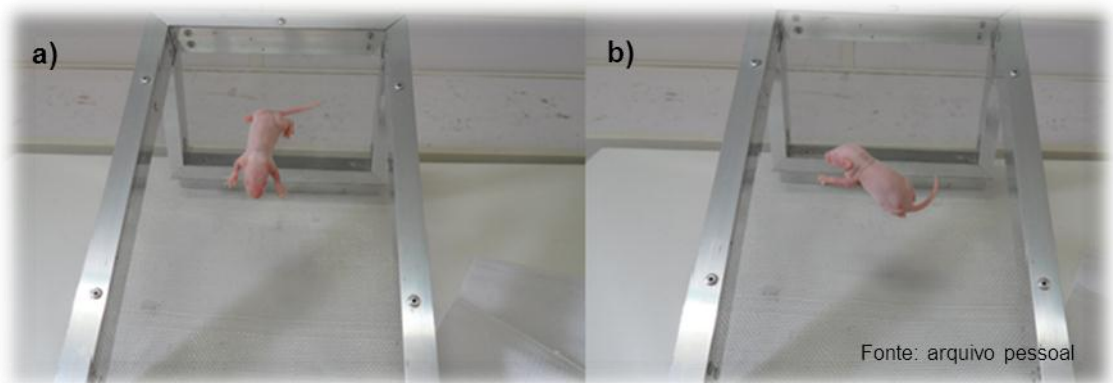
**Figura 2:** Teste de resposta postural: a) ausência do reflexo, b) presença do reflexo.

**Esquiva ao abismo:** O animal é colocado na borda de uma mesa com as patas dianteiras voltadas para fora. A resposta consiste no deslocamento do animal em direção oposta (Fig. 3).



**Figura 3:** Esquiva ao abismo: a) ausência do reflexo b) presença do reflexo.

**Geotaxia negativa:** O filhote foi colocado em uma rampa, com inclinação de  $45^\circ$ , com a cabeça voltada para baixo observa-se o animal girar  $180^\circ$  (Fig. 4).



**Figura 4:** Geotaxia negativa: a) ausência do reflexo, b) presença do reflexo.

## 5.9- Avaliação comportamental na vida adulta

Para avaliação do comportamento na vida adulta foram utilizados três machos de cada ninhada, que foram reagrupados em lotes de três a quatro animais de ninhada diferentes identificados por marcas de acordo com código estabelecido no biotério do Centro de Biologia da Reprodução. Foram selecionados apenas machos para evitar interferência de possíveis diferenças em comportamento entre gêneros devido a bases hormonais (Kelly *et al.*, 1999).

Aos 90 dias de idade (PND 90), foram realizados os testes comportamentais, sendo para cada tratamento 10 animais para os testes de memória e 20 para os testes de ansiedade. Na avaliação da ansiedade foram utilizados animais diferentes, visto que a exposição a um teste pode produzir ansiedade e interferir nos resultados do outro teste. Enquanto nos testes de memória foi utilizado apenas um animal para os dois testes, visto que a natureza da memória explorada em cada teste é diferente.

### 5.9.1- Avaliação do efeito ansiolítico

#### 5.9.1.1- Labirinto em cruz elevado (LCE)

##### 5.9.1.1.1- Aparato

O labirinto é composto por dois braços abertos e dois braços fechados por paredes de 30 centímetros de altura. Cada braço mede 50cm de comprimento por 10 cm de largura e contém uma área central quadrada de 10 x 10 cm. O labirinto está a 60 cm acima do chão (Fig 5).



**Figura 5:** Labirinto em Cruz elevado.

#### 5.9.1.1.2- Procedimentos experimentais

Os animais foram colocados no centro do labirinto e foi monitorado o tempo de permanência do animal nos braços abertos e braços fechados durante cinco minutos (Pellow *et al.*, 1985). Após cada teste o aparato foi limpo com álcool isopropílico 70%.

#### 5.9.1.1.3- Variáveis avaliadas

Uma vez que o grau de ansiedade de um rato está diretamente relacionado com a tendência de o animal evitar os braços abertos do LCE (Morato e Brandão, 1997), preferindo os braços fechados. A variável utilizada como indicadora de ansiedade foi o tempo percentual de permanência do animal nos braços abertos (% tBA), dado por (tempo de permanência nos braços abertos dividido pelo tempo de

permanência nos braços abertos e fechados) x 100. A utilização do % tBA ao invés da simples medida do tempo de permanência nos braços abertos foi utilizada para controlar uma importante variável interveniente que é a atividade locomotora do animal, pois ao se medir o grau de atividade nos braços abertos em relação à atividade em ambos os braços os efeitos de uma maior ou menor atividade exploratória ficam corrigidos (Rodgers e Dalvi, 1997).

#### 5.9.1.2- Placa perfurada

##### 5.9.1.2.1- Aparato

O aparelho consiste em uma caixa quadrada de acrílico transparente (50x50x30cm), com 16 orifícios de 2cm de diâmetros, equidistantes uns dos outros e das bordas, com demarcações feitas entre as diferentes áreas de orifícios (File e Pellow, 1985) (Fig. 6).



**Figura 6:** Placa perfurada.

#### 5.9.1.2.2- Procedimentos experimentais

O animal foi colocado individualmente na placa por um período de 5 minutos e foi registrado o número de vezes que os animais espreitam os orifícios, além do movimento e comportamentos estereotipados do animal. Após cada teste o aparato foi limpo com álcool isopropílico 70%.

#### 5.9.1.2.3- Variáveis avaliadas

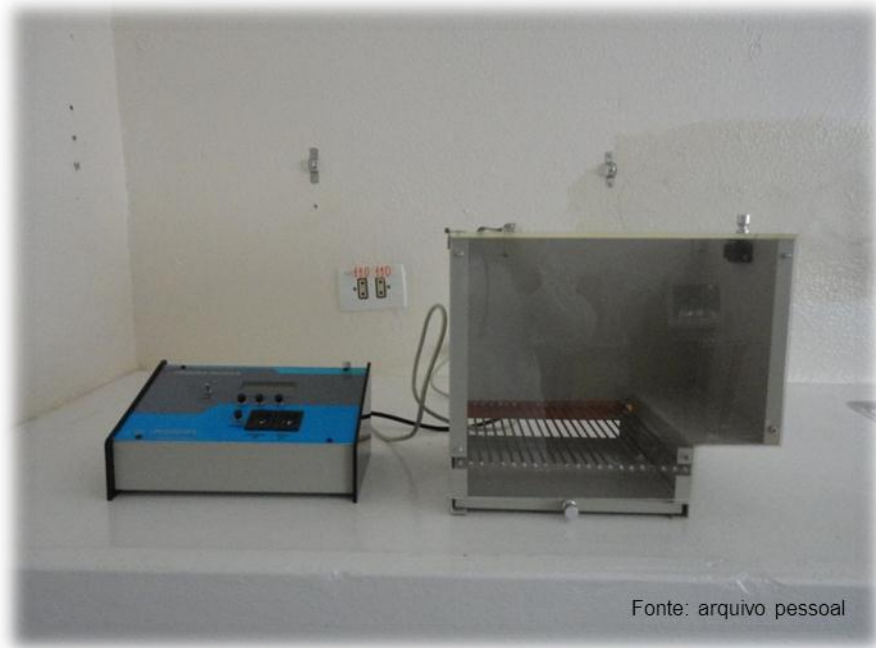
O aumento do número e do tempo gasto espreitando os orifícios implica em ação ansiolítica (Boisser, 1976). Assim, foi registrado o número de vezes que os animais espreitam os orifícios (Rodriguez *et al.*, 1987).

### 5.9.2- Memória

#### 5.9.2.1- Teste de esquiva inibitória

##### 5.9.2.1.1- Aparato

A caixa de esquiva inibitória é formada por quatro paredes de metal de 21 cm de altura e um piso de 20,5 X 22 cm, composto por grades paralelas de aço inoxidável com 1mm de diâmetro e afastadas em 1cm uma da outra. O piso é conectado a um aparato capaz de produzir choques elétricos de intensidade e duração definidos pelo examinador (Fig. 7). O aparato encontra-se em uma sala iluminada por luz fraca ( $22 \pm 1$  lux) e os testes foram realizados durante a fase clara do ciclo, entre 10:00 e 16:00 h.



**Figura 7:** Esquiva inibitória.

#### 5.9.2.1.2- Procedimento experimental

Cada rato foi colocado na plataforma de metal que se localiza no interior do aparato. Na sessão de treino, imediatamente após descer da plataforma o animal recebeu um choque nas patas com 0,5 mA de intensidade e 2 segundos de duração. A sessão de teste para memória de longa duração ocorreu 24 horas após a sessão de treino. Na sessão de teste o animal não recebeu choque e a latência para descer da plataforma foi de 180s, quando o animal não desceu da plataforma durante este tempo foi considerado como 180s. Isto requer o uso de estatística não paramétrica (Izquierdo *et al.*, 1998). Após cada teste o aparato foi limpo com álcool isopropílico 70%.



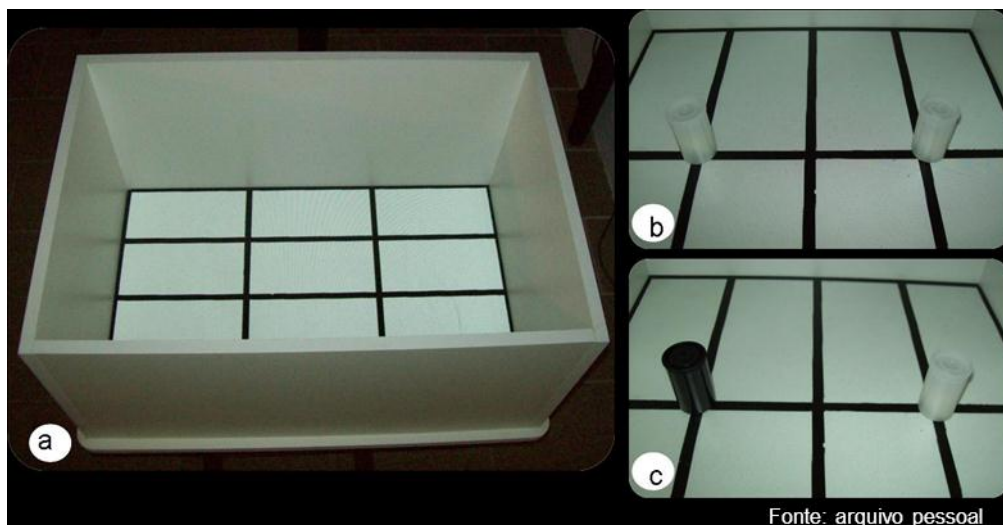
### 5.9.2.1.3- Variáveis avaliadas

Nas sessões de teste foi cronometrado o tempo necessário para o rato descer da plataforma com as quatro patas. Quando o animal não desceu em até 180s, o mesmo foi retirado do aparato e devolvido à sua gaiola. O procedimento experimental foi realizado segundo o protocolo proposto por Vinade *et al.* (2004).

### 5.9.2.2- Teste de reconhecimentos de objetos

#### 5.9.2.2.1- Aparato

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado em uma arena feita de MDF, com base retangular de 60 x 40 cm, piso coberto com vidro antiderrapante, cercada por paredes com 30 cm de altura (Fig. 8a). Foram utilizados quatro cilindros de plástico, três brancos (A1, A2 e A3) e um preto (B), com medidas de 3 cm de diâmetro da base e 5 cm de altura. Os quatro cilindros foram idênticos, exceto pela cor do cilindro B. O aparato encontra-se em uma sala iluminada por luz fraca ( $22 \pm 1$  lux) e os testes foram realizados durante a fase clara do ciclo, entre 10:00 e 16:00 h.



**Figura 8:** Reconhecimento de objetos.

#### 5.9.2.2.2- Procedimento experimental

Todos os animais passaram por um período de habituação, no qual puderam explorar livremente a arena durante 5 minutos. Vinte e quatro horas após a habituação foi realizada uma sessão de treino, com 5 minutos de duração, na qual cada rato foi colocado na arena, na presença de dois cilindros brancos idênticos (A1 e A2) (Fig 8b), posicionados em duas quinas adjacentes e a 10 cm de distância das paredes da arena. No teste da memória de longa duração, realizado 24h após a sessão treino, e com duração de 5 minutos, os objetos A1 e A2 foram substituídos por um cilindro branco (A3) idêntico a A1 e A2, e o objeto novo, ou seja, o cilindro preto (B)(Fig 8c). Entre os testes, a arena e os objetos foram limpos com álcool isopropílico 70%. O motivo de se ter usado o objeto A3 no teste foi evitar que a animal utilizasse pistas olfatórias para reconhecer os objetos.

#### 5.9.2.2.3- Variáveis avaliadas

O tempo que o animal gastou explorando os objetos A3 (TA) e B (TB) foi cronometrado. Em seguida foi calculado o índice de discriminação, dado por  $TB/(TA + TB)$ . Caso o animal se lembre do objeto A3, espera-se que o índice calculado seja maior que 50%. Foi considerado como exploração o comportamento de cheirar ou tocar o objeto com o focinho ou com as patas. Todo o procedimento experimental foi realizado segundo o protocolo proposto por Bevins e Besheer (2006).

## 6.0- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos testes de desenvolvimento físico e reflexológico foram apresentados de acordo com a frequência de filhotes que apresentaram o sinal indicador do desenvolvimento em cada dia. Essa frequência foi agrupada em três categorias, baseando-se no dia em que o grupo controle apresentou a maior frequência de indivíduos com o aparecimento do indicador físico ou do reflexo:

Categoria 1: Frequência semelhante ao do grupo controle

Categoria 2: Frequência anterior a exibida pelo grupo controle

Categoria 3: Frequência posterior à exibida pelo grupo controle.

Os resultados foram submetidos ao teste Qui-quadrado ( $\alpha = 0.05$ ) para comparar o grupo controle com cada grupo tratado. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,01$  (para se evitar o efeito das múltiplas comparações sobre o risco alfa). Nos testes de labirinto em cruz, placa perfurada e reconhecimento de objetos, nas inferências estatística, quando os pressupostos de normalidade, homocedasticidade não foram violados, utilizamos teste paramétrico One-way-ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ), do contrario foi utilizado teste não paramétricos ( $\alpha = 0.05$ ). A normalidade foi verificada por meio do teste Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Levene. Para esquivia inibitória foi utilizado Kruskal-Wallis ( $\alpha = 0.05$ ). Os dados foram apresentados com (média  $\pm$  erro padrão). As diferenças significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$ .

## **7.0- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**

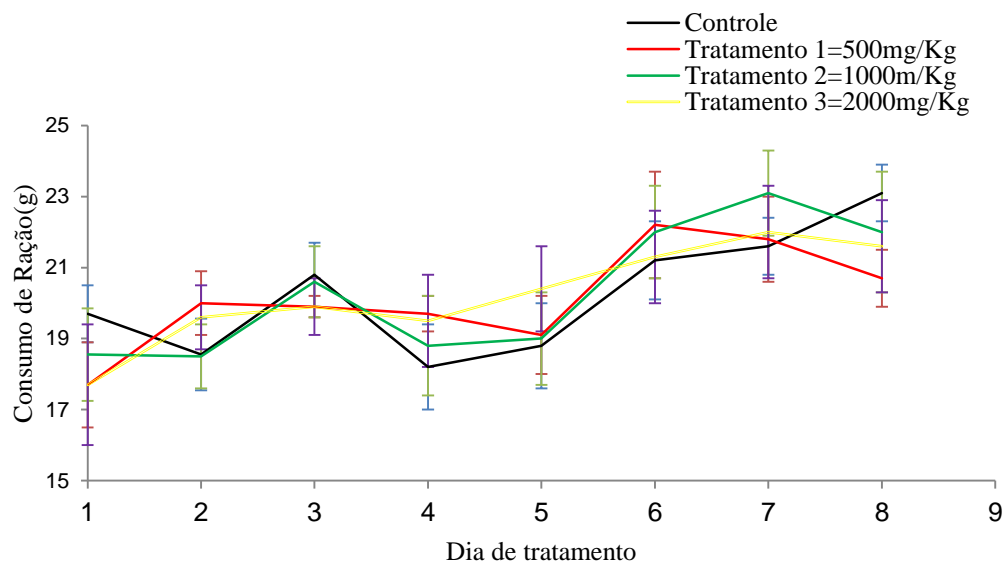
O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, encontrando-se protocolado sob o número de 019/2011.

## 8.0- RESULTADOS

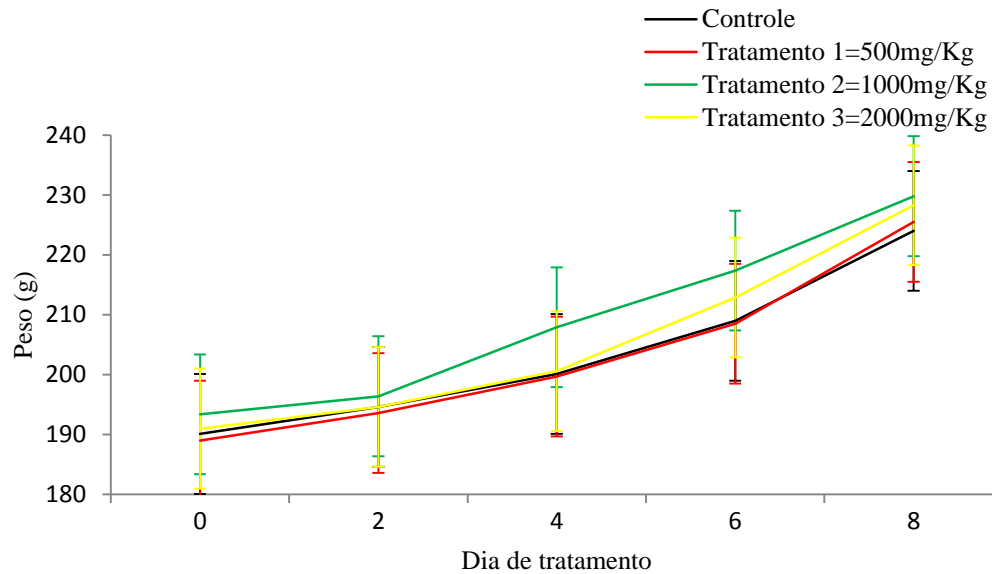
### 8.1- Avaliação Materna

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade materna como: piloereção, estereotípias, diarreia e mortes em nenhum dos grupos estudados. Em relação ao comportamento materno, a postura de amamentação, construção do ninho, o recolhimento dos filhotes e o ato de lambar as crias foram semelhantes entre os grupos.

Também não foram observadas diferenças significativas no consumo de ração (Fig.9) ou peso materno (Fig.10) entre os grupos estudados.



**Figura 9:** Consumo estimado de ração por ratas Wistar gestantes tratadas com suspensão aquosa de Valeriana nas concentrações 500 (n=10), 1000 (n=10) ou 2000mg/Kg (n=10) ou o controle (n=10). Nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa.



**Figura 10:** Peso corporal de ratas Wistar gestantes tratadas com suspensão aquosa de Valeriana nas concentrações 500 (n=10), 1000(n=10) ou 2000mg/Kg (n=10) ou o controle (n=10). Nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa.

## 8.2- Índices de sobrevivência

Os dados referentes aos índices de sobrevivência dos filhotes não mostraram diferença significativa entres os grupos experimentais (Tab. 1).

**Tabela 1:** Índices de sobrevivência dos filhotes, obtidos de mães (n =10) expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2) ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina. Nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa.

Índice	Controle	Tr1	Tr2	Tr3
Viabilidade	100% (91/91)	99,1%(110/111)	99,0%(104/105)	99,0%(94/95)
Lactação	96,7% (88/91)	99,1%(110/111)	99,0%(100/105)	98,0%(93/95)
Pré-desmame	82,4%(75/91)	90,0%(110/111)	81,0%(86/105)	86,0%(82/95)

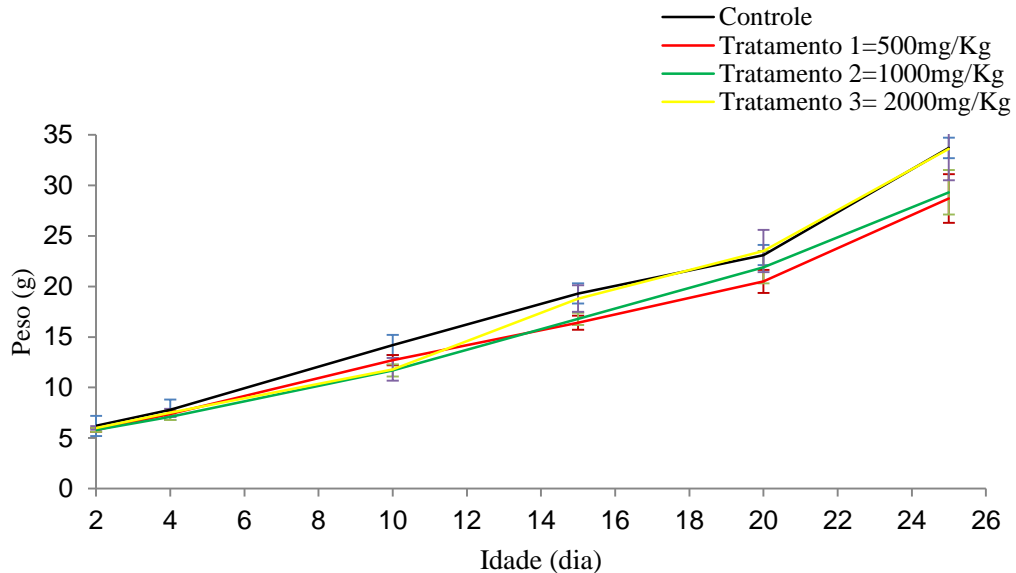
**Índice de viabilidade** = n<sup>o</sup> de filhotes vivos no quarto dia/ n<sup>o</sup> de filhotes nascidos.

**Índice de lactação** = n<sup>o</sup> de filhotes vivos no 21<sup>o</sup> dia de vida/ n<sup>o</sup> de filhotes nascidos

**Índice de pré-desmame** = n<sup>o</sup> de filhotes nascidos vivos – n<sup>o</sup> de crias desmamadas / n<sup>o</sup> de filhotes nascidos vivos.

### 8.3- Desenvolvimento físico em machos

Os dados referentes ao peso dos filhotes não mostraram diferença significativa entres os grupos experimentais em machos (Fig. 11).



**Figura 11:** Peso corporal de crias do sexo masculino, desde as 24 horas após o nascimento (dia 2) ao 25º dia de vida. Controle (n=40), 500mg/Kg (n=40), 1000mg/Kg (n=40), 2000mg/Kg (n=40). Nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa.

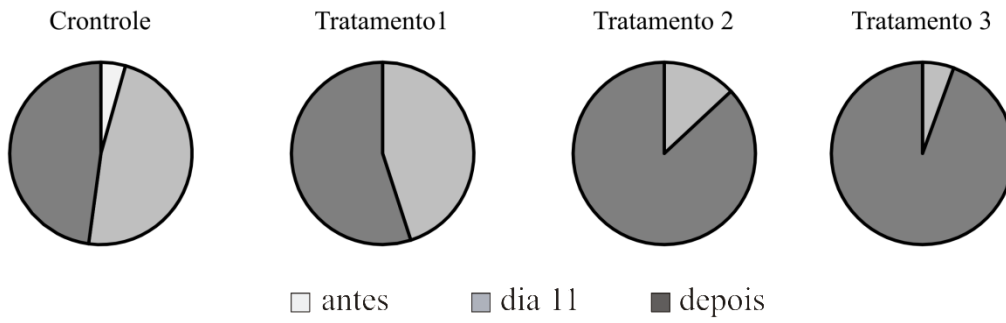
A data de aparecimento dos indicadores físicos como: desdobramento de orelha, erupção do incisivo superior, abertura do olho e descida dos testículos foi semelhante entre os grupos em machos (Tabela 2), no entanto a erupção do incisivo inferior apresentou diferença estatística entre o controle e tratamento 3 ( $\chi^2=10,2$ ; gl=2; p=0,006) (Fig.12), aparecimento do lanugo entre controle e tratamento 1 ( $\chi^2=11,4$ ; gl=2; p=0,003) (Fig. 13) e o aparecimento do pelo entre controle e tratamento 1 ( $\chi^2=17,7$ ; gl=2; p < 0,001) (Fig. 14), controle e tratamento 2 ( $\chi^2=10,4$ ; gl=2; p=0,006) (Fig.14).

**Tabela 2:** Desenvolvimento físico dos filhotes de sexo masculino expostos ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2), ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina. Nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa.

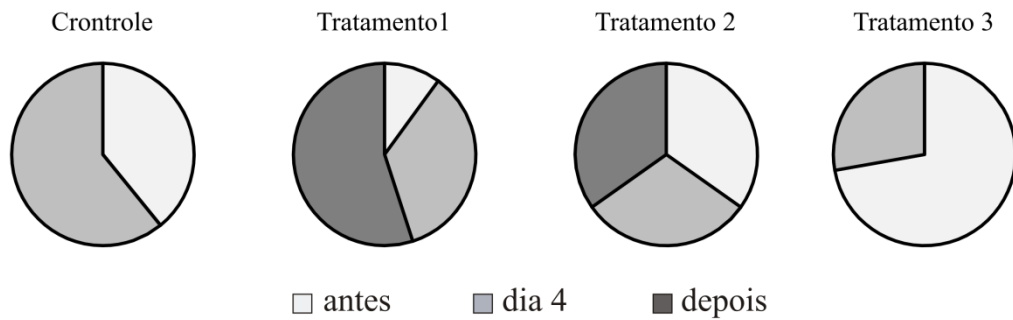
Indicadores Físicos	Controle n=23	Tr1 n=21	Tr2 n=23	Tr3 n=18
<b>Desdobramento da orelha</b>				
Anterior	26,0% (6)	30,0%(6)	13, 0%(3)	66,0%(12)
Dia 5	69,5%(16)	70,0%(14)	82,6%(19)	34,0%(6)
Posterior	04,5%(1)	00,0%(0)	04,4%(1)	00,0%(1)
<b>Erupção do incisivo superior</b>				
Anterior	04,3%(1)	00,0% (0)	00,0%(0)	00,0%(0)
Dia 9	56,5%(13)	55,0%(11)	43,5%(10)	61,1%(11)
Posterior	39,2%(9)	45,0%(9)	56,5%(13)	38,9%(7)
<b>Abertura do olho</b>				
Anterior	26,0%(6)	50,0%(11)	08,7%(2)	16.7%(3)
Dia 17	56,5%(13)	35,0%(7)	65,2%(15)	38,9%(7)
Posterior	17,5%(4)	15,0%(3)	26,1%(6)	44,4%(8)
<b>Descida dos Testículos</b>				
Anterior	0,00%(0)	0,00%(0)	22,7%(5)	00,0%(0)
Dia 20	35,3%(6)	10,6%(2)	04,5%(1)	16,7%(3)
Posterior	64,7%(11)	89,4%(17)	72,8%(16)	83,3%(15)

Os resultados estão apresentados em porcentagem de machos que apresentaram o desenvolvimento físico nas três categorias: antes, mesmo dia e dia posterior ao controle, seguidos pelo número correspondente de animais.

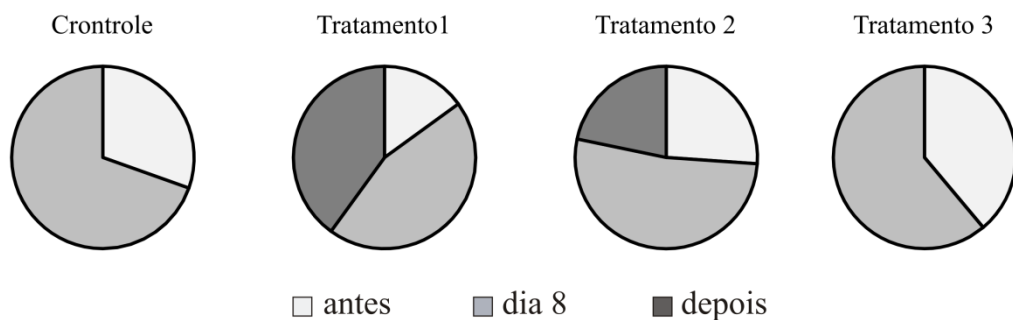




**Figura 12:** Frequência de aparecimento da erupção do incisivo inferior nas três categorias: antes, dia 11 e posterior em filhotes do sexo masculino expostos ao extrato aquoso de Valeriana na vida intrauterina. Diferença estatística entre o controle e tratamento 3 ( $\chi^2=10,2$ ; gl=2;  $p=0,006$ ).



**Figura 13:** Frequência de aparecimento do lanugo nas três categorias: antes, dia 4 e dia posterior ao controle, em filhotes do sexo masculino expostos ao extrato aquoso de Valeriana na vida intrauterina. Diferença estatística entre controle e tratamento 1 ( $\chi^2=11,4$ ; gl=2;  $p=0,003$ ).



**Figura 14:** Frequência de aparecimento do pelo nas três categorias: antes, dia 8 e dia posterior ao controle, em filhotes do sexo masculino expostos ao extrato aquoso de Valeriana na vida intrauterina. Diferença estatística entre controle e tratamento 1 ( $\chi^2=17,7$ ; gl=2;  $p=0,000$ ), controle e tratamento 2 ( $\chi^2=10,4$ ; gl=2;  $p=0,006$ ).

#### 8.4- Desenvolvimento reflexológico em machos

A data de aparecimento dos reflexos em machos não diferiram entre os grupos (Tabela 3).

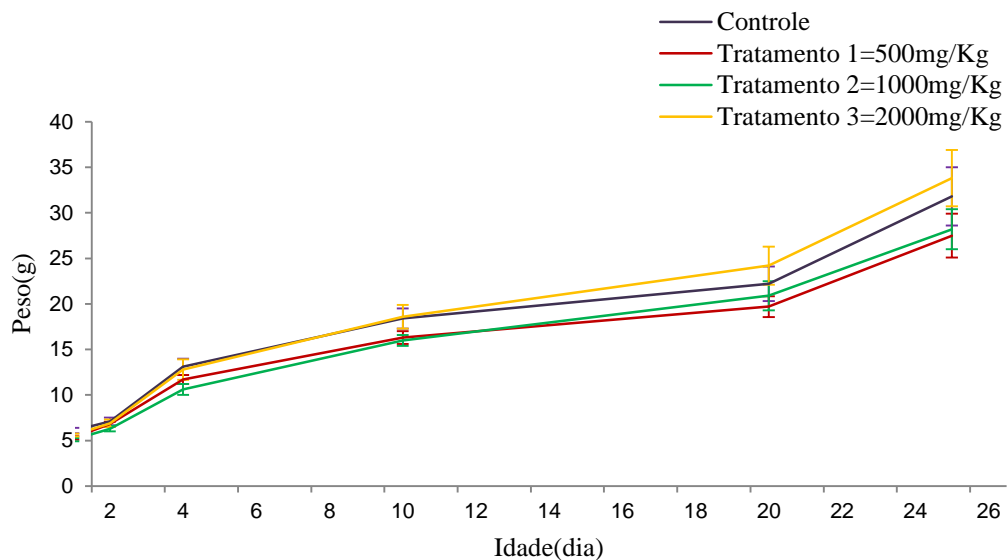
**Tabela 3:** Desenvolvimento reflexológico dos filhotes de sexo masculino, obtidos de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2), ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina. Nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa.

Indicadores Reflexológicos	Controle n=23	Tr1 n=21	Tr2 n=23	Tr3 n=18
<b>Preensão palmar</b>				
Anterior	00,0%(0)	00,0%(0)	00,0%(0)	00,0%(0)
Dia 2	69,5%(16)	80,0%(16)	56,5%(13)	72,0%(13)
Posterior	30,5%(7)	20,0%(4)	43,5%(10)	28,0%(5)
<b>Resposta postural</b>				
Anterior	00,0%(0)	00,0%(0)	00,0%(0)	00,0%(0)
Dia 2	87,0%(20)	90,0%(18)	83,0%(19)	89,0%(16)
Posterior	13,0%(3)	10,0%(2)	17,0%(4)	11,0%(2)
<b>Esquiva ao abismo</b>				
Anterior	34,8%(8)	20,0%(4)	17,4%(4)	22,2%(4)
Dia 7	34,8%(8)	15,0%(3)	47,8%(11)	33,3%(6)
Posterior	30,4%(7)	65,0%(13)	34,8%(8)	44,5%(8)
<b>Geotaxia Negativa</b>				
Anterior	26,0%(6)	15,0%(3)	30,4%(7)	33,0%(6)
Dia 6	26,0%(6)	25,0%(5)	17,4%(4)	11,2%(2)
Posterior	48%(11)	60,0%(12)	52,2%(12)	55,5%(10)

Os resultados estão apresentados em porcentagem seguidos pelo número correspondente de machos que apresentaram o desenvolvimento reflexológico nas três categorias: antes, mesmo dia e dia posterior ao controle.

### 8.5- Desenvolvimento físico em fêmeas

Os dados referentes ao peso dos filhotes não mostraram diferença significativa entres os grupos experimentais em filhotes do sexo feminino (Fig.15).



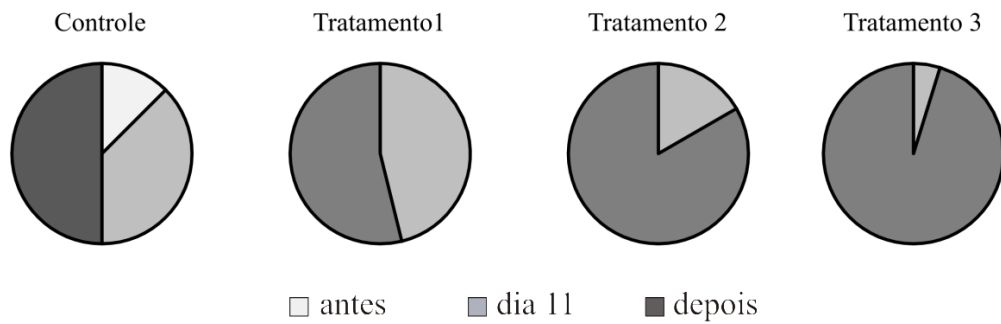
**Figura 15:** Peso corporal de crias do sexo feminino, desde as 24 horas após o nascimento (dia 2) ao 25º dia de vida. Controle (n=40), 500mg/Kg (n=40), 1000mg/Kg (n=40), 2000mg/Kg (n=40) de mães expostas à Valeriana. Nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa.

A data de aparecimento dos indicadores físicos como: desdobramento de orelha, erupção do incisivo superior, abertura do olho e aparecimento do lanugo foram semelhantes entre os grupos em fêmeas (Tabela 4), no entanto a erupção do incisivo inferior apresentou diferença estatística entre o controle e tratamento 1 ( $\chi^2=9,9$ ; gl=2;  $p=0,007$ ) (Fig.16), controle e tratamento 3 ( $\chi^2=11,5$ ; gl=2;  $p=0,003$ ) (Fig.16), o aparecimento do pelo entre controle e tratamento 1 ( $\chi^2=15,9$ ; gl=2;  $p < 0,001$ ) (Fig. 17) e a abertura do olho entre controle e tratamento 1 ( $\chi^2=9,1$ ; gl=2;  $p=0,01$ ) (Fig.18).

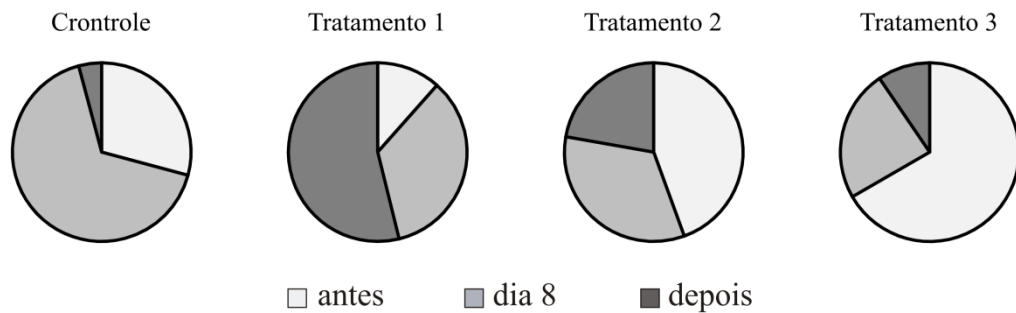
**Tabela 4:** Desenvolvimento físico dos filhotes de sexo feminino obtidos de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2), ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina. Nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa.

Indicadores Físicos	Controle n=24	Tr1 n=26	Tr2 n=18	Tr3 n=21
<b>Desdobramento da orelha</b>				
Anterior	29,2% (7)	23,1%(6)	38,9%(7)	33,3%(7)
Dia 5	58,3%(14)	73,1%(19)	61,1%(11)	61,9%(13)
Posterior	12,5%(3)	03,8%(1)	00,0%(0)	04,8%(1)
<b>Erupção do incisivo superior</b>				
Anterior	04,2%(1)	03,8% (1)	05,5%(1)	0,00%(0)
Dia 9	58,3%(14)	46,2%(12)	33,3%(6)	66,7%(14)
Posterior	37,5%(9)	50,0%(13)	61,1%(11)	22,3%(7)
<b>Aparecimento do lanugo</b>				
Anterior	16,6%(4)	11,6%(3)	33,4%(6)	23,8%(5)
Dia 4	66,7%(16)	34,6%(9)	38,9%(7)	61,9%(13)
Posterior	16,7%(4)	53,8%(14)	27,7%(5)	14,3%(3)
<b>Abertura Vaginal</b>				
Anterior	0,00%(0)	15,4%(4)	27,8%(5)	04,8%(1)
Dia 33	42,8%(10)	23,1%(2)	44,4%(8)	57,2%(11)
Posterior	57,2%(14)	61,5%(17)	27,8%(5)	38,0%(8)

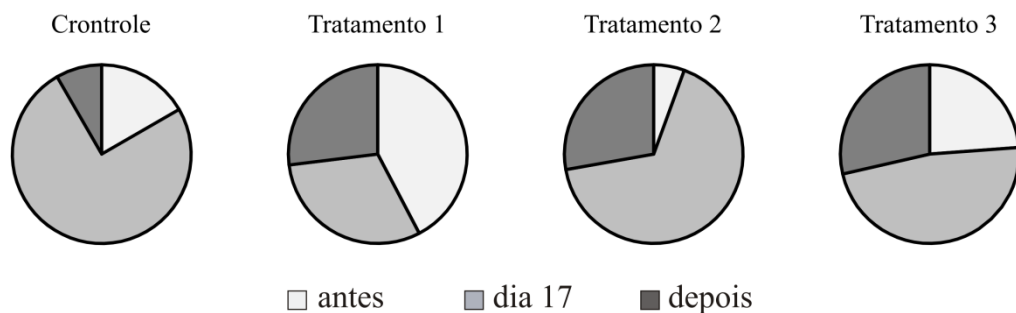
Os resultados estão apresentados em porcentagem seguida pelo número corresponde de fêmeas que apresentaram o desenvolvimento físico nas três categorias: antes, mesmo dia e dia posterior ao controle.



**Figura 16:** Frequência de aparecimento da erupção do incisivo inferior nas três categorias: antes, dia 11 e posterior em filhotes de sexo feminino de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana na vida intrauterina. Diferença estatística entre o controle e tratamento 1 ( $\chi^2=9,9$ ; gl=2;  $p=0,007$ ) e controle e tratamento 3 ( $\chi^2=11,5$ ; gl=2;  $p=0,003$ ).



**Figura 17:** Frequência de aparecimento do pelo nas três categorias: antes, dia 8 e posterior em filhotes expostos ao extrato aquoso de Valeriana na vida intrauterina. Diferença estatística entre controle e tratamento 1 ( $\chi^2=15,9$ ; gl=2;  $p=0,001$ ).



**Figura 18:** Frequência de abertura do olho nas três categorias: antes, dia 17 e posterior em filhotes expostos ao extrato aquoso de Valeriana na vida intrauterina. Diferença estatística entre abertura do olho entre controle e tratamento 1 ( $\chi^2=9,1$ ; gl=2;  $p=0,01$ ).

## 8.6- Desenvolvimento reflexológico em fêmeas

A data de aparecimento dos reflexos em fêmeas não diferiram entre os grupos (Tabela 5).

**Tabela 5:** Desenvolvimento reflexológico dos filhotes de sexo feminino de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2), ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina. Nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa.

Indicadores Reflexológicos	Controle	Tr1	Tr2	Tr3
	n=24	n=26	n=18	n=21
<b>Preensão palmar</b>				
Anterior	29,2% (7)	23,1%(6)	38,9%(7)	33,3%(7)
Dia 2	58,3,(14)	73,1%(19)	61,1%(11)	61,9%(13)
Posterior	12,5%(3)	03,8%(1)	00,0%(0)	04,8%(1)
<b>Resposta postural</b>				
Anterior	04,2%(1)	03,8% (1)	05,5%(1)	00,0%(0)
Dia 2	58,3%(14)	46,2%(12)	33,3%(6)	66,7%(14)
Posterior	37,5%(9)	50,0%(13)	61,1%(11)	22,3%(7)
<b>Esquiva ao abismo</b>				
Anterior	16,6%(4)	11,5%(3)	33,3%(6)	23,8%(5)
Dia 8	66,7%(16)	34,6%(9)	38,9%(7)	61,9%(13)
Posterior	16,7%(4)	53,8%(14)	27,7%(5)	14,3%(3)
<b>Geotaxia Negativa</b>				
Anterior	45,8%(9)	73,1%(19)	61,1%(11)	57,2%(12)
Dia 9	25,0%(6)	07,0%(2)	11,1%(2)	19,0%(4)
Posterior	29,2(7)	19,9%(5)	27,8%(5)	23,8%(5)

Os resultados estão apresentados em porcentagem seguida pelo número corresponde de fêmeas que apresentaram o desenvolvimento físico nas três categorias: antes, mesmo dia e dia posterior ao controle.

## 8.7- Avaliação na vida adulta

### 8.7.1- Esquiva inibitória

A variável avaliada no teste de esquiva inibitória foi o tempo de latência para o rato descer da plataforma com as quatro patas após 24 horas a sessão teste para os quatro grupos. O teste não verificou nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos ( $H=0,93$ ;  $p=0,82$ ). Os dados de estatística descritiva nos quatro grupos estudados estão demonstrados na tabela 6.

**Tabela 6:** Dados de estatística descritiva dos grupos na esquiva inibitória de filhotes do sexo masculino de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2), ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina.

Grupo	n	Latência
Controle	10	153.0±18.0(180.0)
Tratado 1	10	151.3±16.4(180.0)
Tratado 2	10	129.5±22.4(180.0)
Tratado 3	10	147.7±21.0(180.0)

### 8.7.2- Labirinto em cruz

A variável avaliada no labirinto em cruz para os quatro grupos foi a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%tBA). O teste não verificou nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis-2,47;  $p=0,48$ ). Os dados de estatística descritiva nos quatro grupos estudados estão demonstrados na tabela 7.

**Tabela 7:** Dados de estatística descritiva dos grupos no labirinto em cruz de filhotes do sexo masculino de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2), ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina.

Grupo	n	(%tBA)
Controle	10	22.93±4.5 (21.5)
Tratado 1	10	20.30±5.4 (16.2)
Tratado 2	10	21.21±5.5 (15.5)
Tratado 3	10	39.62±9.8 (43.0)

### 8.7.3- Reconhecimento de objetos

A variável avaliada no teste de reconhecimento de objetos para os quatro grupos foi o índice de discriminação entre os objetos considerando um intervalo de 24 horas entre as sessões. O teste não verificou nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos ( $F(3,36)=0,429$ ;  $p=0,73$ ). Os dados de estatística descritiva nos quatro grupos estudados estão demonstrados na tabela 8.

**Tabela 8:** Dados de estatística descritiva no teste de reconhecimento de objetos de filhotes do sexo masculino de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2), ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina.

Grupo	n	Índice de discriminação
Controle	10	58.63±8.8(58.11)
Tratado 1	10	49.82±5.1(50.00)
Tratado 2	10	49.38±8.1(54.92)
Tratado 3	10	54.31±2.4(55.71)



#### 8.7.4- Placa perfurada modificada

As variáveis avaliadas na placa perfurada foi o hole-board para os 4 grupos. O teste não verificou nenhuma diferença estatística significativa ( $H=1,9$ ;  $p=0,58$ ).

**Tabela 9:** Dados de estatística descritiva dos grupos na placa perfurada de filhotes do sexo masculino de mães expostas ao extrato aquoso de Valeriana 500(Tr1), 1000(Tr2), ou 2000mg/Kg(Tr3) ou controle na vida intrauterina.

Grupo	n	Hole-board
Controle	10	50.7±2.7 (52.5)
Tratado 1	10	45.4±3.8 (44.5)
Tratado 2	10	47.3±4.1 (47.5)
Tratado 3	10	44.0±4.5 (40.0)

## 9.0- DISCUSSÃO

Em relação ao desenvolvimento, um agente é considerado tóxico quando há efeitos adversos no desenvolvimento do filhote sem causar sinais de toxicidade materna (Farrar e Blumer, 1991). Estudos experimentais consideram como sinais de toxicidade materna o decréscimo no ganho de peso, diminuição no consumo de água e alimento, sinais clínicos de toxicidade e mortalidade (Castro, 2004; ICH, 2005). De acordo com essas variáveis, no presente estudo, a exposição à Valeriana durante a gestação não demonstrou efeito tóxico às mães, nem alterações em seu comportamento avaliado por aleitamento, canibalismo, comportamento de lambar os filhotes, recuperação das crias e organização do ninho.

Isso é importante, pois o comportamento materno é fundamental para garantir a sobrevivência da prole, pois pode influenciar a qualidade do desenvolvimento dos filhotes nas diferentes fases da vida (Poindron, 2005), uma vez que alterações no metabolismo materno, por doenças, estresse ou toxicidade se refletem no desenvolvimento da cria (Sodersten e Eneroth, 1984; Champagne *et al.*, 2003), sendo que o desenvolvimento cognitivo nos filhotes de ratos pode ser comprometido por fatores que interferem na relação mãe-filho (Renard *et al.*, 2005; Benetti *et al.*, 2009), por exemplo, ratos privados da mãe na vida neonatal, quando estudados na vida adulta, demonstraram aumento no medo e ansiedade em resposta a um agente estressor (Renard *et al.*, 2005; Renard *et al.*, 2007)

Observou-se que os índices de viabilidade, lactação e pré-desmame foram semelhantes entre grupos tratados e controle (Tab.1), além disso, não houve diferença no peso dos filhotes tratados e controle (Fig. 11 e 15). Em conjunto os dados indicam que as crias tiveram aleitamento e cuidados maternos adequados, ou seja, pode-se inferir que a exposição materna à Valeriana não alterou a qualidade ou o volume do leite nem causou alterações comportamentais maternas em longo prazo que pudessem interferir com os cuidados com a prole.

Em relação ao desenvolvimento físico, houve atraso de alguns sinais de desenvolvimento tais como: erupção do incisivo inferior e aparecimento do pêlo, tanto em machos (Fig.12 e 14) quanto em fêmeas (Fig.16 e 17), o aparecimento de lanugo em machos (Fig. 13) e a abertura do olho em fêmeas (Fig.18). Apesar das diferenças constatadas em alguns sinais de desenvolvimento físico, na vida adulta

nenhum dos animais, de qualquer grupo, apresentou alterações morfológicas relacionadas aos indicadores físicos o que permite inferir que a exposição materna ao extrato de Valeriana não causou lesões permanentes no desenvolvimento físico das crias.

Tem sido proposto que o efeito farmacológico do extrato de Valeriana, assim como os benzodiazepínicos, é mediado por modulação da função de receptores GABA A (Benke *et al.*, 2009). Estudos em roedores têm apontado que a exposição a drogas, que atuam no sistema GABA A, na vida pré-natal ou neonatal pode provocar alterações no desenvolvimento reflexológico como: a exposição ao diazepam, agente atuante no receptor GABA A, provocou um atraso na resposta ao susto e geotaxia negativa (Nicosia *et al.*, 2003), ocasionou déficit motor e também diminuição no metabolismo energético em algumas regiões que controlam a postura e balanço do corpo, o que pode estar correlacionado com o impedimento da atividade locomotora (Schroeder *et al.*, 1995). Entretanto, no presente trabalho, não houve diferença na data de aparecimento das respostas reflexológicas, comparando-se o grupo controle com os tratados

A ansiedade e memória também estão relacionadas a modulação dos receptores GABA. A transmissão GABAérgica inibe a aquisição inicial da memória do medo e possivelmente a sua consolidação (Kim *et al.*, 2007), enquanto diminui a ansiedade (Nutt, 2001).

Sabe-se que alterações no sistema GABA durante o desenvolvimento, podem persistir na vida adulta. O neurotransmissor GABA é um dos primeiros a surgir durante o desenvolvimento do cérebro (Fizman *et al.*, 1993), podendo modular a proliferação de células não diferenciadas, neuroblastos e na diferenciação celular (Emerit *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 2001). Estudos demonstram que no cérebro em desenvolvimento de mamíferos o GABA exerce um efeito excitatório, despolarizando a membrana e aumentando a taxa de  $Ca^{2+}$  intracelular (Cherubini *et al.*, 1991), em contraste com a ação hiperpolarizante no cérebro maduro. Owens *et al.* (1996) sugeriram que o efeito excitatório pode influenciar os eventos de desenvolvimento neocorticais iniciais, como neurogênese e sinaptogênese, através das vias de transdução de sinal dependentes do  $Ca^{2+}$ .

Schroeder *et al.* (1997) demonstraram que a exposição neonatal ao diazepam provocou redução no nível de ansiedade, mas não impediu a aprendizagem e memória em ratos adultos. No presente trabalho também não se

observou alteração na memória do animal adulto, cuja mãe foi exposta ao extrato de Valeriana durante o período de maior suscetibilidade do sistema nervoso em desenvolvimento, além disso não causou alterações do estado de ansiedade.

A literatura não relata a passagem da Valeriana pela placenta, no entanto segundo Tuffik *et al.* (1994), a exposição pré-natal à Valeriana provoca retardo na ossificação dos filhotes, sugerindo sua passagem através da placenta.

Segundo Tucker (1995) e Nicosia *et al.* (2003) as alterações no desenvolvimento só ocorrem em altas doses de benzodiazepínicos. No presente trabalho, a dose de 500mg/Kg de Valeriana foi calculada para rato de acordo com a recomendada para humanos (Al-majed *et al.*, 2006) e as outras doses foram duas e quatro vezes maior como é preconizado em estudos toxicológicos. No entanto nem a dose mais alta de Valeriana foi suficiente para causar alterações no desenvolvimento das crias, ou no estado de ansiedade, e nos processos de memória e aprendizado, sugerindo um efeito moderado da Valeriana.

Atualmente sabe-se que existem vários subtipos de receptor GABA-A que se diferenciam em função e farmacologia (Olsen e Sierghat, 2009), assim a diferença apresentada entre a exposição intrauterina a benzodiazepínicos e o resultado do presente trabalho pode ser devido à atuação dos dois psicofármacos em subtipos de receptores GABA-A diferentes.

Em conclusão, os resultados encontrados demonstram que a exposição materna ao extrato aquoso de *Valeriana officinalis* não alterou o desenvolvimento físico, reflexológico, e comportamental de ratos, não tendo sido possível verificar se tal fato se deveu a que os componentes da Valeriana não passaram pela placenta ou se o extrato é inócuo para os fetos.

## 10.0- REFERÊNCIAS

- ABEL, E.L. Further evidence for the dissociation of locomotor activity and head-dipping in rats. **Physiology Behavior**, v. 57, p.529–532, 1995.
- AGHADAM, A.S.; PIRIA, E.; SARIHIA, A.; KOMAKIA, A.; SHAHIDIA, S.; HOSSEINIPANAHA, S.M.; GHADERIA, A.; RAHIMIANA, N.; FALAHA, N. Effects of pre-training injection of orexin-A into dorsal raphe nucleus in passive avoidance acquisition on male rats. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 32, p.438 – 442, 2012.
- AL-MAJED, A., A.; AL-YAHYA, A.,A.; AL-BEKAIRI, A.M.; AL-SHABANAH, O.A.; QURESHI, S. Studies on the cytological and biochemical effects of valerian in somatic and germ cells of Swiss albino mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1830–1837, 2006.
- ALTMAN, J., SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Animal Behavior**, v.23, p.820-896, 1975.
- BAILEY, G.P., WISE, L.D., BUSCHMANN, J., HURTT, M. E FISHER, E. Pré and postnatal developmental toxicity study design for pharmaceuticals. **Birth Defects**, v.6, n.6, p. 437-445, 2009.
- BAMMER, G. Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: a review and some new results. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 6, p. 247 - 296, 1982.
- BARNETT, S.A.; J. BURN. Maternal and infant behavior. In: HAFEZ, ESE. Reproduction and breeding techniques for laboratory animal. **Philadelphia: Lea and Febiger**, p.177-91, 1970.
- BASO, A.C.Z.; GOULART, F.C.; TEODOROV, E.; FELÍCIO, L.F.; BERNARDI, M.M. Effects of maternal exposure to picrotoxin during lactation on physical and reflex development, square crossing and sexual behavior of rat offspring. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.75, p.733–740, 2003.
- BELZUNG, C., GRIEBEL, G.. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural Brain Research**, v.125, p.125: 141-149, 2001.
- BENKE, D.; BARBERIS, A.; KOPP, S.; ALTMANN, K.; SCHUBIGER, M.; VOGT, K.E.; RUDOLPH, U.; MÖHLER, H. GABA A receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of valerianic acid, a major constituent of valerian root extracts. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 174-181, 2009.
- BENETTI, F.; MELLO, P. B.; MONTEIRO, S. C.; BONINI, J. S.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Early postnatal maternal deprivation in rats induces cognitive impairment in adult life; the deficit is reversed by donepezil and galantamine. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.2, p.59–64, 2009.

BEUDOIN, A.R. The embriotoxicity of gossypol. **Teratology**, v.32, p.251-257, 1985.

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial nonmatching-to-sample learning task to study 'recognition memory', **Nature protocols**, v.1, n.3, p.1306-1311, 2006.

BOISSIER, J.R., SIMON, P. La reaction d'exploration chez la souris. **Therapie**, v.17, p.1225–1232, 1962.

BOISSIER, J.R., SIMON, P. Dissociation de deux composantes dans le compartiment d'investigation de la souris. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v.147, p.372–387, 1964.

BROUETTE-LAHLOU, I., GODINOT, F., VERNET-MAURY, E. The mother rat's vomeronasal organ is involved in detection of dodecyl propionate, the pup's preputial gland pheromone. **Physiology Behavior**, v. 66, p.427–436, 1999.

BOUNTHANH, C.; RICHERT, L.; BECK, J.P.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R. The action of valepotriates on the synthesis of DNA and proteins of cultured hepatoma cells, **Planta Medica**, v.49, n.11, p.138-142, 1983.

BOURIN, M., PETIT-DEMOULIERE B., DHONNCHADHA B. N., HASCOET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental Clinical Pharmacology**, v.21, p.567–574, 2007.

BROWN, R.E. Hormônios e comportamento parental. In: **ETOLOGIA Comportamento materno em mamíferos: bases teóricas e aplicações aos ruminantes domésticos**. São Paulo, p.53-99, 1998.

CARDENAS, F.; LAMPREA, M.R. and MORATO, S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v.122, p.169–174, 2001.

CASTRO, V.L.S.S. Aspectos da exposição ambiental aos agroquímicos no desenvolvimento animal. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v.21, n.3, p.469-497, 2004.

CASARRUBEA, M., SORBERA, F, MAGNUSSON, M., CRESCIMANNO, G. Temporal patterns analysis of rat behavior in hole-board. **Behavioural Brain Research**, v.208, p.124–131, 2010.

CIRCOSTA, C.; DE PASQUALE, R.; SAMPERI, S.; PINO, A.; OCHIUTO, F. Biological and analytical characterization of two extracts from *Valerian officinalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 361-367, 2007.

CHAMPAGNE, F.A.; FRANCIS, D.D.; MAR, A.; MEANEY, M.J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology Behavior**, v.79, p.359–371, 2003.

CHERUBINI, E.; GAIARSA, J.L., BEN-ARI, B. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. **Trends in Neuroscience**, v.14, n.12, p.515-519, 1991.

CHIAVEGATTO, S.; OLIVEIRA, C.A.; BERNARDI, M.M. prenatal exposure of rats to diphenhydramine: effects on physical development, open field and gonadal hormone levels in adults. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 19, n. 6, p. 511–516, 1997.

COÊLHO, N.L. & TOURINHO, E.,Z. Conceito de Ansiedade na Análise do Comportamento. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 21, n.2, p.171-178, 2008.

COLE, B.J., HILLMAN, M., SEIDELMANN, D., KLEWER, M. AND JONES, G.H. Effects of benzodiazepine receptor partial inverse agonists in the elevated plus maze test of anxiety in the rat. **Psychopharmacology**, v.121, n.1, p.118-126, 1997.

DAVOODIA, F.G.; MOTAMEDIA, F.; AKBARI, E.; GHABARIAN, E.;JILA, B. Effect of reversible inactivation of reuniens nucleus on memory processing in passive avoidance task. **Behavioural Brain Research**, v.221, p.1–6, 2011.

de KLOET, E.R.; OITZL, M.S.; JOELS, M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? **Trends Neuroscience**.v.22, p.422–426, 1999.

DICKE J.M. Teratology: principles and practice. **Medical Clinics of North America** v.73, p.567-582, 1989.

DICKINSON-ANSON, H., MCGAUGH, J.L. Bicuculline administered into the amygdala after training blocks benzodiazepine-induced amnesia. **Brain Research**, v.752, p.197–202, 1997.

DORCE, A,L.C.; BELLOT, R.G.; DORCE, V.A.C.; NENCIONI, A.L.A. Effects of prenatal exposure to *Tityusbahiensis* scorpion venom on rat offspring development. **Reproductive Toxicology**, v.28, p. 365–370, 2009.

ENNACEUR, A.; AGGLETON, J.P. Spontaneous recognition of object configurations in rats: effects of fornix lesions. **Experimental Brain Research**, v.100, p.85–92, 1994.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v.31, p. 47-59, 1988.

EMERIT, M.B., RIAD, M., HAMON, M. 1992 Trophic effects of neurotransmitters during brain maturation. **Biology of the Neonate**, n. 62, n. 4, p.193–201, 1992.

FARRAR, H.C, BLUMER, J.L. Fetal effects of maternal drug exposure. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, v. 31, p.525–547,1991.

FILE, S.E. & PELLOW, S. The effects of triazolo benzodiazepines in two animal test of anxiety and in the hole board. **Brazilian journal of pharmacology**, v.86, p.729-735, 1985.

FILE, S.E., WARDILL, A.G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. **Psychopharmacology**, v.44, p.53–59, 1975a.

FILE, S.E., WARDILL, A.G. The reliability of the hole-board apparatus. **Psychopharmacology**, v. 44, p.47–51, 1975b.

FIZMAN, M.L, BEHAR, T., LANGE, G.D., SMITH, S.V., NOVOTNY, E.A., BARKER, J.L. GABAergic cells and signals appear together in the early post-mitotic period of telencephalic and striatal development, **Developmental Brain Research**, n.73, p. 243–251, 1993.

FIZMAN, M.L., SCHOUSBOE, A. Role of calcium and kinases on the neurotrophic effect induced by-aminobutyric acid. **Journal of Neuroscience Research** , V.76, P.435–441, 2004.

FOX, M.W. Reflex ontogeny and behavioral development of the mouse. **Animal Behavior**, n.13; p.234-245, 1965.

GARCIA, A.M.B.; CARDERNAS, F.P.; MORATO, S. The effects of pentyle-netetrazol, chlordiazepoxide and caffeine in rats tested in the elevated plus-maze depend on the experimental illumination. **Behavioural Brain Research**, v. 217, p.171–177, 2011.

GOLDMAN-RAKIC P. Regional and cellular fractionation of working memory. **Proceedings of the national academy science USA**, v.93, p.13473–13480, 1996.

GONÇALVES, S; MARTINS, A. P. *Valeriana officinalis*. **Revista lusófona de ciências e tecnologias da saúde**, v. 3, n. 2, p. 209-222, 2006.

GOODMAN, A.; SCHORGE, J; GREENE, M.F. The Long-Term effects of in the exposures- The DES Story. **New England Journal Medicine**, v.364, p.2083-2084, 2001.

GOULD, E.; TANAPT, P. Stress and Hippocampal Neurogenesis, **Biological Psychiatry**, v.46, p.1472–1479, 1999.

GRAEFF, F.G., GUIMARÃES, F.S., *Fundamentos de psicofarmacologia*. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 1999.

HANDLEY, S.L, & MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze- exploration model of 'fear'-motivated behavior. **Naunyn-schmiedeberg's archives of pharmacology**, v.327, n.1, p.1-5, 1984.

HUANG, L.T.; HOLMES, G.L.; LAI, M.C.; HUNG, P.L.; WANG, C.L.; WANG, T.J.; YANG, C.H.; LIOU, C.W.; YANG, S.N. Maternal deprivation stress exacerbates cognitive deficits in immature rats with recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 43, p.1141–1148, 2002.

HUI-LIAN, W.; DONG-FANGA, Z.; ZHAO-FENGA, L.; YANGA, L.; QIAN-RONGB, L.I.; YU-ZHEN, W. In vitro study on the genotoxicity of dichloromethane extracts of valerian (DEV) in human endothelial ECV304 cells and the effect of vitamins e and c in attenuating the DEV-induced DNA damages, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.188, n.1, p. 36-41, 2003.

HUOT, R.L.; PLOTSKY, P.M.; LENOX, R.H.; MCNAMARA, R.K. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. **Brain Research**, v.950, p.52–63, 2002.



HUOT RL, GONZALEZ ME, LADD CO, THRIVIKRAMAN KV, PLOTSKY PM Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29: p.279 –289, 2004.

ICH. International conference of harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use-Guidelines, Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity male fertility S5 (R2). 2005.

INGLEFIELD, J.R.; BITRAN, D.; OLSCHOWKA, J.A.; KELLOGG, C.K. Selective effects on CRF neurons and catecholamine terminals in two stress responsive regions of adult rat brain after prenatal exposure to diazepam. **Brain research bulletin**, v 31, p. 353–359, 1993.

IZQUIERDO I. Memória. Porto Alegre: **Artmed**, 2002.

IZQUIERDO, I.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M.M.; QUEVEDO, J.; RODRIGUES, C.; SANT'ANNA, M. K.; MADRUGA, M.; MEDINA, J. H. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory, **Behavioural pharmacology**, v.9., p. 421-427, 1998.

JAISWAL, A.K. & BHATTACHARYA, S.K. Effect of gestational undernutrition, stress and diazepam treatment on spatial discrimination learning retention in young rats: **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 31, p. 353–359, 1993.

JAREMA, M. Herbal drug treatment. **Neurology Endocrinology Letter**, v. 29, n.1, p. 93–104, 2008.

KELLOGG, C.K., TAYLOR, M.K., RODRIGUEZ-ZAFRA, M. PLEGER, G.L. Altered stressor-induced changes in GABA receptor function in the cerebral cortex of adult rats exposed in utero to diazepam, **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 44, p.267–273, 1993.

KELLOGG, C.K, YAO, J., PLEGER, G.L. Sex-specific effects of in utero manipulation of GABA receptors on pre- and postnatal expression of BDNF in rats. **Developmental Brain Research**, v.121, p.157–167, 2000.

KELLY, S.J., OSTROWSKI, N.L., WILSON, M.A. Gender differences in brain and behavior: hormonal and neural bases. **Pharmacology Biochemistry & Behavior** v.64, n.4, p.655-664, 1999.

KENDRICK, K.M. Oxytocin, motherhood and bonding. **Experimental. Physiology**, v.85, 111–124, 2000.

KIM, J. H.; RICHARDSON, R.A developmental dissociation of context and GABA effects on extinguished fear in rats. **Behavioral Neuroscience**, v.121, p.131–139, 2007.

KRISTAL, M.B. The biopsychology of maternal behavior in nonhuman mammals. **ILAR Journal**, v. 50, p.51-63, 2008.

LAUDER J.M., HAN V.K.M., HENERSON P., VERDOON T., TOWLE, A.C. Prenatal ontogeny of the GABAergic system in the rat brains: an immunocytochemical study. **Neuroscience**, v. 19, p.465–493, 1986.

LEVINE, S. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, p.149–160, 2000.

LISTER, G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology Therapeutics**, v.46, p.321-340,1990.

MAIER-SALAMON, A.; TRAUNER, G.; HILTSCHER, R.; REZNICEK, G.; KOPP, B.; TALLAMMER, T.; JÄGER, W. Hepatic metabolism and biliary excretion of valerenic acid in isolated perfused rat livers: role of Mrp2 (Abcc2). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 10, 2009.

MARCHLEWSKA-KOJ, A.; KAPUSKA, J. & OLEJNICZAK, P. Ultrasonic response of CBA newborn mice to bedding odour. **Behaviour**, v.136, n.3, p. 269-278, 1999.

MARDER, M.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; FERNANDEZ, S.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v.75, p.537-545, 2003.

MARTINEZ, J.C.; CARDENAS, F.; LAMPREA, M.; MORATO, S. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus-maze. **Behavioural Processes**, v. 60, p. 15-26, 2002.

MCGAUGH JL, IZQUIERDO I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Science**, v. 21, p.1467-1465, 2000.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, p.21-35, 2001.

MIYASAKA, L.S.; ATALLAH, A.N.; SOARES, B.G. Valerian for anxiety disorders, **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.18, n.4, 2006.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.48, n.4, p.254–260, 1955.

MORATO, S. & BRANDÃO, M.L. Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, n.9, p.1113-1120, 1997.

MOURÃO JÚNIOR, C. A E ABRAMOV, D. M., **Fisiologia essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

NGUYEN, L., RIGO, J.M., ROCHER, V., BELACHER, S., MALGRANGE, B., ROGISTER, B., LEPRINCE, P., MOONEN, G. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. **Cell and Tissue Research**, v. 305, p.187–202, 2001.

NICOSIA, A., GIARDINA, L., DI LEO, F., MEDICO, M., MAZZOLA, C., GENAZZANI, A.A., DRAGO, F. Long-lasting behavioral changes induced by pre-or neonatal exposure to diazepam in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.469, p.103–109, 2003.

NUMAN, M. Maternal behavior. In: *The Physiology of Reproduction*. In Knobil, E.; Neill, J.D. New York: **Raven, Press**. p.221–302, 1994.

NUTT, D.J. e MALIZIA, A.L. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. **British Journal of Psychiatry** v.179, p.390–396, 2001.

OLIVEIRA, C.D.R.; MOREIRA, C.Q.; SPINOSA, H.S.; YONAMINE, M. Neurobehavioral, reflexological and physical development of Wistar rat offspring exposed to ayahuasca during pregnancy and lactation, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26, p. 1065-1076, 2011.

OWENS, D. F., BOYCE, L. H., DAVIS, M. B. & KRIEGSTEIN, A. R. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. **Journal Neuroscience**, v.16, p.6414–6423, 1996.

PELLOW S., CHOPIN P., FILE S.E., BRILEY M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, n.4, p.149-167, 1985.

POINDRON, P. Mechanisms of activation of maternal behaviour in mammals. **Reproduction Nutrition Development**.v.45, p.341–351, 2005.

RAMPON C, TANG YP, GOODHOUSE J, SHIMIZU E, KYIN M, TSIEN JZ. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. **Nature Neuroscience**, v.3, p.238–44, 2000.

RENARD, G.M., SUAREZ, M.M., LEVIN, G.M., RIVAROLA, M.A. Sex differences in rats: effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. **Physiology Behaviour**, v. 85, p.363–369, 2005.

RENARD, G.M., RIVAROLA, M.A., SUAREZ, M.M. Sexual dimorphism in rats: effects of early maternal separation and variable chronic stress on pituitaryadrenal axis and behavior. **International Journal Developmental Neuroscience**, v. 25, n.6, p.373–379, 2007.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v.21, n.6, p.801-810, 1997.

RODIER, P.M. Vulnerable periods and processes during central nervous system development. **Environmental Health Perspectives**, v.102, n.4, p.121–4, 1994.

RODIER, P.M. Developing brain as a target of toxicity. **Environmental Health Perspectives**, v.103, n.6, p.73–6, 1995.

- RODRIGUEZ ECHANDIA, E.L., BROITMAN, S.T., FOSCOLO, M.R. Effect of the chronic ingestion of chlorimipramine and desipramine on the hole board response to acute stresses in male rats. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v.26, n.2, p.207-210, 1987.
- RUSSOWSKI, D. **Produção de valepotriatos em culturas líquidas de plantas de *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae)**. 2007. 157 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- SANTOS, M.S., FERREIRA, F., FARO, C., PIRES, E., CARVALHO, A.P., CUNHA, A.P., MACEDO, T. The amount of GABA present in aqueous extracts of valerian is sufficient to account for [3H]GABA release in synaptosomes. **Planta Medica**, v.60, p.475-6, 1994.
- SCHROEDER, H., HUMBERT, A.C., KOZIEL, V., DESOR, D., AND NEHLIG, A. Behavioral and metabolic consequences of neonatal exposure to diazepam in rat pups. **Experimental Neurology**, v.131, p.53-63, 1995.
- SCHROEDER, H., HUMBERT, A. C., DESOR, D., AND NEHLIG, A. Long-term consequences of neonatal exposure to diazepam on cerebral glucose utilization, learning, memory and anxiety. **Brain Research**, v.766, p.142–152, 1997.
- SHELDON MH. Exploratory behaviour: the inadequacy of activity measures. **Psychological Science**, p.11:38, 1968.
- SODERSTEN, P., ENEROTH, P., Suckling and serum prolactin and LH concentrations in lactating rats. **Journal Endocrinology**, v.102, p.251–256, 1984.
- STERN, C.A.J.; DO MONTEL, H.M.; GAZARINE, L.; CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. **Neuroscience**, v.170, p.214–222, 2010.
- TAKEDA, H., TSUJI, M., MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology** .v.350, p.21–29, 1998.
- TREIT, D. & FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.31, p.958-962, 1988.
- TREIT D, MENARD J, ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.44, p.463-469, 1993.
- TUCKER, J.C. Benzodiazepine and the developing rat: a critical review. **Neuroscience Biobehavior**, v.9, p.101-111, 1995.
- TUFFIK, S.; FUJITA, K.; SEABRA, M.L.V.; K.; LOBO, L.L. Effects of a prolonged administration of valepotriates in rats on the mothers and their offspring. **Journal Ethnopharmacology**, v. 41, n. 1-2, p. 39-44, 1994.

VINADE, E. R., IZQUIERDO, I., LARA, D. R., SCHMIDT, A. P., & SOUZA, D. O. Oral administration of guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats and mice: **Neurobiology of learning and memory**, v.8, n.2,137-143, 2004.

VORHEES, C.V.; RINDLER, J.M .Effects of exposure period and nutrition on the developmental neurotoxicity of anticonvulsants in rats: short and long-term effects. **Neurotoxicology**, v.11, n.2, p.273-283, 1990.

YANG, W.; JIE, X.; FAN, Q.; JIE, Y.; HASHIM, J.H.; LIU, X. Toxic effect of gestational exposure to nonylphenol on F1 male rats, **Birth Defects Research**, v.89., n.5, p.418-428, 2010.

YAO, M.; RITCHIE, H. E.; BROWN-WOODMAN, P. D. A developmental toxicity-screening test of valerian: **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 204-209, 2007.