



**Universidade Federal de Juiz de Fora**

*Programa de Pós-Graduação em Saúde*

*Mestrado em Saúde*

**NÚCLEO DE TOXICOLOGIA DA REPRODUÇÃO**

**LÚCIA DE ARAÚJO PIÚMA**

**CANIBALISMO EM FÊMEAS DE CAMUNDONGOS SWISS  
EXPOSTAS À IRRADIAÇÃO IONIZANTE DURANTE A  
PRENHEZ: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ASSOCIADAS**

**JUIZ DE FORA  
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

**LÚCIA DE ARAÚJO PIÚMA**

**CANIBALISMO EM FÊMEAS DE CAMUNDONGOS SWISS  
EXPOSTAS À IRRADIAÇÃO IONIZANTE DURANTE A  
PRENHEZ: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ASSOCIADAS**

**JUIZ DE FORA  
2007**

**CANIBALISMO EM FÊMEAS DE CAMUNDONGO SWISS  
EXPOSTAS À IRRADIAÇÃO IONIZANTE DURANTE A  
PRENHEZ: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ASSOCIADAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Saúde - área de concentração em Saúde Brasileira  
da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de  
Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do  
grau de mestre em Saúde Brasileira.

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MARTHA DE OLIVEIRA GUERRA**

**JUIZ DE FORA  
2007**

**LÚCIA DE ARAÚJO PIÚMA**

**CANIBALISMO EM FÊMEAS DE CAMUNDONGO SWISS EXPOSTAS À  
IRRADIAÇÃO IONIZANTE DURANTE A PRENHEZ: ALTERAÇÕES  
MORFOLÓGICAS ASSOCIADAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde - área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Saúde Brasileira.

Aprovado em agosto de 2007

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Martha de Oliveira Guerra, Doutora em Ciências**

Centro da Biologia da Reprodução  
Universidade Federal de Juiz de Fora.

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Maria Peters, Doutora em Biologia Animal**

Centro da Biologia da Reprodução  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof Dr Antônio Carlos Guimarães de Almeida**

**Doutor em Engenharia Biomédica**  
Centro de Neurociência Experimental e Computacional  
Universidade Federal de São João Del Rei

Aos meus pais, Jaime e Laura, pilares fortes da minha plataforma de vôo.  
Aos companheiros de jornada Manuela e João Francisco, professores e significantes de vida.  
Ao meu irmão Marcelo, à Simone, Luíza e Gabriela, presenças constantes mesmo que distantes.  
À Mestra Dr<sup>a</sup>Martha, sem a qual ainda estaria no caos primordial de onde surgem as idéias.

Agradecimentos.

Agradeço à minha orientadora Dra Martha de Oliveira Guerra e à Dra Vera Maria Peters, por acreditarem, acolherem e tornarem possível. Pelos ensinamentos técnicos, éticos e humanos para sempre serei grata.

À Dra Carla Márcia Lanna por ter me contagiado com vida acadêmica.

Ao Dr Rogério Baumgratz de Paula pelo empréstimo de sua força ética quando precisei.

Ao físico Gilberto Maroco que irradiou os modelos experimentais com radiação ionizante, e a mim com o seu entusiasmo e conhecimento.

À toda a equipe do Setor de Radioterapia do Hospital ASCOMCER pela enorme boa vontade, carinho, atenção e respeito com que eu e meus animais fomos tratados.

Aos pacientes do Setor de Radioterapia do Hospital ASCOMCER por dividirem comigo o seu tempo e tornarem a espera sempre proveitosa e mais leve.

Ao diretor clínico do Hospital ASCOMCER, Dr João Paulo Vieira, e ao chefe da Radioterapia Dr João Ramin pelo empréstimo generoso de sua casa-hospital.

À Dra Angela Gollner e Dra Sônia Neuman Cupollino, pelo apoio, utilização do laboratório CITO, confecção das lâminas e análise anatomopatológica.

Ao técnico de histologia Leonardo da Silva Hauck agradeço a boa vontade e disponibilidade.

Aos técnicos Paulo do Carmo e Evelise de Souza, meus sinceros agradecimentos por me apresentarem aos camundongos e me tornarem mais apta a esse convívio.

À doutoranda Luciana Valente Borges, pelos gráficos, fotos, leituras críticas e generosidade na amizade e conhecimento.

À família CBR, presente de várias formas: técnicos do biotério e dos laboratórios, secretários, pessoal da limpeza e manutenção, estagiários, mestrandos, doutorandos e pesquisadores.

Aos professores do ICB, Dr Luis Carlos Bertges, Dr Luis Augusto do Amaral e Dr Carlos Alberto Mourão, pelo tempo passado juntos.

Aos funcionários do ICB Almir, Angela e Sidney, pelo apoio e carinho.

Aos professores do curso de Pós-graduação pelos ensinamentos, exemplos e apoio.

À Coordenação do curso de Pós-graduação de Saúde Brasileira.

À Dra Darcília pelo profissionalismo, atenção amistosa e entusiasmo.

Aos secretários da Pós-graduação de Saúde Brasileira, sempre dispostos a resolverem da melhor maneira as dificuldades.

Ao Dr Renan Vitral, pelo iniciar.

À Rede Mineira de Bioterismo pelo fornecimento de animais e manutenção dos mesmos.

Agradeço aos amigos que compreenderam as minhas faltas e se fizeram presentes na minha ausência.

Aos amigos-colegas de Mestrado que tornaram o caminhar mais leve.

Meus agradecimentos sinceros às Forças presentes no meu caminho.

## RESUMO

Fêmeas de camundongos *Swiss* irradiadas apresentaram comportamento canibalístico inesperado durante um experimento para avaliação de teste de memória operacional e de referência, não mencionado em trabalhos prévios, o que levou ao estudo mais detalhado da incidência e de possíveis causas relacionadas ao comportamento anormal. Um grupo de 31 fêmeas de camundongos *Swiss* prenhes foram submetidas à irradiação ionizante com raios X de corpo inteiro através de aparelho acelerador linear de elétrons de energia fotônica de 6 MeV com dose total absorvida gerada de 3 Gy (300cGy) e distribuídas aleatoriamente em dois grupos para análise do período pré e pós-natal e foram comparadas com fêmeas controles. Os dados observados indicam que a irradiação não induziu comportamento materno indicativo de estresse ou intoxicação nem de comprometimento do sistema endócrino, mas as fêmeas irradiadas apresentaram uma incidência de 86,67% de canibalismo. O peso corporal fetal do grupo irradiado ( $1077,1 \text{ mg} \pm 152,6$  n=16) foi significativamente menor ( $p < 0,001$ ) quando comparado com o do grupo controle ( $1241,2 \text{ mg} \pm 64,2$  n=15) e apresentaram, em 28,1, % dos casos, hipoatividade acompanhada de desorganização das camadas laminares corticais e diminuição da população neuronal. Verifica-se que a irradiação não causou alterações morfológicas evidenciáveis nos ovários, hipófise e áreas cerebrais maternas. O distúrbio motor fetal provavelmente induziu para o comportamento canibalístico observado.

Palavras-chave: radiação ionizante, canibalismo, comportamento materno, memória, aprendizado.



## ABSTRACT

Irradiated female Swiss mice presented unexpected cannibalistic behaviors during an experiment involving tests for operational memory and reference assessment. This finding is not mentioned in previous works, which lead us to a more detailed study of the incidence and the possible causes related to that abnormal behavior. One group of 31 pregnant Swiss mice was exposed to whole body ionizing irradiation of X-rays through a linear accelerator apparatus of 6 MeV electron photonic energy, presenting total absorbed dose of 3 Gy (300cGy). Those animals were randomly divided into two groups, one for the analysis of prenatal and another for postnatal periods, and they were compared to mice from control groups. The data indicate that irradiation did not induce stress, intoxication or endocrine changes in mothers, however, irradiated female showed a high incidence (86.67%) of cannibalism. Fetuses from irradiated mothers had a decreased body weight ( $1077.1 \text{ mg} \pm 152.6$  n=16) ( $p < 0.001$ ) when compared to the control group ( $1241.2 \text{ mg} \pm 64.2$  n=15) and also presented 28.1% of hypo activity, together with desorganization of brain cortical laminar layers and decrease in neuronal population. It was observed that irradiation did not cause morphological changes in maternal ovaries, hypophysis and brain. The fetal motor disturbance probably induced the observed cannibalistic behavior.

**Keywords:** Ionizing radiation, cannibalism, maternal behavior, memory, learning.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Figura- Vista superior do cérebro de camundongo  
(*Mus musculus*) com marcações para cortes coronais .....48
- Figura 2- Gráfico com proporção de comportamento canibalístico  
em fêmeas de camundongo irradiadas e controles .....51
- Figura 3- Foto de filhotes de camundongo de mães irradiadas e controle  
com 40 dias de vida.....52
- Figura 4- Gráfico do peso corporal materno (g) em animais  
do grupo controle (C) e irradiados (T2).....53
- Figura 5- Foto. Corpos lúteos de fêmeas de camundongo  
controle (A) e irradiads (B). 40x. HE.....55
- Figura 6- Foto. Hipófise de fêmeas de camundongo  
dos grupos controle (A) e irradiados (B). 40x. HE.....55
- .
- Figura 7- Gráfico do Peso de cérebro materno (mg) de camundongos  
controle (C2) e irradiados (T2).....56
- Figuras 8- Foto. Área pré-óptica medial de fêmeas de camundongo  
dos grupos controle (A, B) e irradiadas (C, D).40X. HE.....57

Figura 9- Gráfico com a proporção de recém nascidos conforme o grau de atividade motora.....	58
Figura 10- Gráfico com peso (mg) corporal de fetos obtidos de mães irradiadas (T2) e controle (C2) .....	59
Figura 11- Gráfico do peso corporal fetal de acordo com graus de atividade motora no grupo irradiado.....	60
Figura 12- Foto. Pulmões de fetos de camundongo dos grupos controle (A, B) e irradiados (C, D, E, F). Fetos com atividade Grau II (C, D) e grau III (E, F). A, C, E 10X; B, D, F.40X. HE.....	61
Figura 13 – Foto. Rins de fetos de camundongo. Grupo controle (A, B) e irradiado (C, D, E, F). Atividade motora Grau II (C e D), Grau III (E, F). A, C, E 10X ; B, D, F 40X. HE.....	62
Figura 14- Foto. Córtex de fetos de camundongo. Fetos controles (A) e com grau de atividade motora II (B) e III (C). 10X. HE.....	63

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Variáveis relacionadas ao desempenho reprodutivo materno em fêmeas de camundongo irradiadas no D-15 e controles.....	54
Tabela 2. Variáveis Maternas.....	77
Tabela 3. Variáveis Fetais.....	77

# SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

**LISTA DE TABELAS**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
4.1 Correlação entre memória e comportamento .....	17
4.2 Comportamento parental.....	18
4.2.1 Fatores genéticos relacionados à conduta materna.....	19
4.2.2 Fatores endócrinos relacionados à conduta materna.....	20
4.2.3 Circuitos neurais relacionados à conduta materna.....	21
4.2.4 Neuroquímica e comportamento materno.....	24
4.2.5 Características das crias relacionadas à conduta materna.....	29
4.3 Comportamento parental aberrante .....	30
4.3.1 Canibalismo .....	31
4.3.2 Infanticídio .....	32
4.4 Radiação Ionizante .....	33
4.4.1 Efeitos da radiação ionizante sobre o sistema nervoso.....	35
4.4.2 Irradiação pré-natal – alterações na neurogênese.....	36
4.4.3 Alterações funcionais e comportamentais após irradiação do sistema nervoso.....	39
4.4.4 Radiação ionizante em modelos animais .....	41

<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
5.1 Procedimento experimental .....	42
5.1.1 Modelo experimental e alojamento .....	42
5.1.2 Indução do cio e acasalamento .....	42
5.1.3 Procedimento para a irradiação dos modelos experimentais .....	43
5.1.4 Distribuição dos grupos experimentais .....	44
5.1.5 Avaliação pós-natal .....	45
5.1.6 Avaliação pré-natal .....	46
5.1.7 Processamento histológico .....	48
5.2 Análise estatística.....	49
5.3 Comissão de Ética na Experimentação Animal.....	49
<b>6. RESULTADOS</b> .....	50
6.1 Avaliação pós-natal .....	50
6.2 Avaliação pré-natal .....	53
6.2.1 Variáveis maternas .....	53
6.2.2 Variáveis fetais .....	58
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	70
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	71
<b>ANEXO 1 – Tabelas de variáveis maternas e fetais</b> .....	77
<b>ANEXO 2 – Artigo submetido</b> .....	78

# 1 INTRODUÇÃO

O estudo da memória é de grande interesse para neurobiólogos dado que ela é o substrato para a aprendizagem e linguagem, e sua função se mescla com a definição de inteligência e entendimento (LENT, 2004). O fenômeno mnemônico tem no ser humano papel de destaque no desenvolvimento da civilização (PINKER, 2004). Suas alterações patológicas podem ser correlacionadas com alterações clínicas de pacientes com distúrbios como dislexia, esquizofrenia, retardo mental e doenças degenerativas cerebrais (GOLDMAN-RAKIC, 1995; SOUZA, 1995; VITRAL, 2001; PINKER, 2004; HALL *et al.*, 2004; VITRAL *et al.*, 2005).

Vários métodos e técnicas têm sido utilizados para estudar os sistemas de memória como manipulações genéticas e cirúrgicas (ENNACEUR e MELIANI, 1992; KESLEY e VARGAS 1993; RAWIINS *et al.*, 1993; WAN, PANG e OLTON, 1994; GAZZANIGA, 1999; MOOSMANG *et al.*, 2005). De todas elas, a mais específica é a radiação pré-natal de cobaias, com eliminação seletiva de células neuronais e que consiste em submeter animais prenhes à radiação ionizante em um determinado período da neurogênese. Tem sido utilizada como um método efetivo para eliminar uma população neuronal específica, principalmente as indiferenciadas e ainda em desenvolvimento (SCHMIDT *et al.*, 2001 a b; VITRAL *et al.*, 2005).

Para comparar os desempenhos nos testes de memória operacional e de referência com graus variados de desorganização laminar cortical, projetou-se uma pesquisa onde seriam utilizados camundongos *swiss*, machos, adultos, obtidos de mães expostas à radiação ionizante de corpo inteiro no 15<sup>o</sup> (I-15) e 16<sup>o</sup> (I-16) dias pós-inseminação.

Iniciado o procedimento experimental, observou-se que as fêmeas de camundongos prenhes, submetidas á irradiação ionizante apresentavam elevada incidência de canibalismo. Os trabalhos prévios mencionam os resultados obtidos com os testes realizados nas crias originadas de mães submetidas à radiação ionizante, mas não fazem menção a canibalismo (MINAMISAWA *et al.*,1992; SOUZA, 1995; SCHMIDT *et al.*, 2001a,b; VITRAL *et al.*, 2005).

Em roedores são citados vários motivos que levam ao canibalismo realizado por mães em suas crias, entre eles a presença de malformações ou indícios de debilidade física do recém-nascido e quando as mães são portadoras de alterações genéticas, endócrinas ou neurológicas (FERRARI *et al.*, 1996; ALSTON-MILLS, 1999; HOUPY, 2000; LONSTEIN e GAMMIE, 2002; BONSIGNORE *et al.*, 2006).

A elevada incidência de canibalismo observada, ao mesmo tempo em que inviabilizava a obtenção de animais em número suficiente para os testes, suscitou dúvida sobre os resultados a serem obtidos com os sobreviventes em testes de memória e aprendizado. A necessidade de analisar com mais detalhe a incidência de canibalismo bem como tentar buscar as causas de sua ocorrência foi o propósito do presente trabalho.



## **2 HIPÓTESE**

A radiação ionizante em fêmeas de camundongo prenhes gera alterações morfofisiológicas na mãe e /ou no feto acarretando alta incidência de canibalismo no período neonatal e infantil

### **3 OBJETIVOS**

Avaliar, em fêmeas de camundongos *Swiss* prenhes, expostas à irradiação ionizante:

1. Incidência de canibalismo e índice de sobrevivência de crias durante o período neonatal e infantil.
2. Alterações morfológicas de órgãos do sistema neuroendócrino materno.
3. Alterações do desenvolvimento fetal: atividade motora, e alterações morfológicas do sistema nervoso e órgão vitais.

## **4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 Correlação entre memória e comportamento**

Duas modalidades de memória relacionadas através de conexões com funções complementares atuam como base nas rotinas comportamentais, a memória operacional, de curtíssima duração, sendo esquecida após sua utilização, gera noção de continuidade temporal e espacial essencial para funções executivas cotidianas (GOLDMAN-RAKIC, 1995) e a memória de referência que tem como função formar o conhecimento de um mapa espacial do ambiente onde se está inserido, ou seja, permitir uma localização precisa no espaço circundante (ENNACEUR e MELIANI, 1992; KESLEY e VARGAS, 1993; RAWLINS *et al.*, 1993; WAN *et al.*, 1994; VITRAL *et al.*, 2005).

O aprendizado pode ser moldado geneticamente e por processos fisiológicos, mas implica necessariamente na organização de novas conexões e alterações funcionais neurais (LENT, 2004) e a retenção de novos padrões comportamentais é feita através da memória.

As pesquisas desenvolvidas até o presente momento encontraram como correlato celular da memória e aprendizado, a distribuição laminar cortical e presença de células específicas em determinadas camadas (GOLDMAN-RAKIC, 1995; GAZZANIGA, 1999).

A busca pelo maior conhecimento dos substratos moleculares, celulares e plasticidade sináptica, alterações cerebrais que ocorrem durante o aprendizado e execuções comportamentais, tem impulsionado as pesquisas na área da neurociência e neurobiologia (GAZZANIGA, 1999).

As alterações patológicas correlacionam modificações de vias e funcionalidade sináptica com distúrbios clínicos de aprendizagem e comportamento como dislexia, esquizofrenia, retardo mental e doenças degenerativas cerebrais (GOLDMAN-RAKIC, 1995; SOUZA, 1995; VITRAL, 2001; HALL *et al.*, 2004; PINKER, 2004; VITRAL *et al.*, 2005). A Neurobiologia e os estudos neurocomportamentais vêm se destacando na elucidação das bases fisiológicas e anatômicas da memória, da aprendizagem e dos processos de aquisição de novos comportamentos frente à experiência.

Atualmente o conhecimento sobre as bases neurofisiológicas e endócrinas do comportamento é de grande interesse e compreender os processos fisiológicos ajuda na elucidação dos comportamentos aberrantes e patológicos, bem como na busca por tratamentos mais eficazes e específicos para os mesmos.

## **4.2 Comportamento parental**

Todo cuidado dispensado às crias, tanto por parte das fêmeas como dos machos, é chamado de comportamento parental e visa aumentar as chances de sobrevivência dos filhotes e suas aptidões para a vida adulta (MOTTA, 2000). Nos mamíferos o cuidado parental é prolongado e intenso e se confunde com materno, pois é a fêmea quem se ocupa da proteção e alimentação das crias que nascem dependentes (KREBS e DAVIES, 1996; LONSTEIN e VRIES, 2000).

O comportamento maternal é caracterizado como um complexo de seqüências comportamentais estereotipadas tais como postura de amamentação, lambidas nas crias,

cuidados com o ninho, manutenção da ninhada agrupada e defesa da cria diante de um invasor (LONSTEIN e VRIES, 2000; MOTTA, 2000; BONSIGNORE *et al.*, 2006), que relaciona-se a fatores hormonais, neurológicos, características genéticas e estímulos sensoriais das crias (FERRARI *et al.*, 1996; HOUP, 2000; LONSTEIN e GAMMIE, 2002; BONSIGNORE *et al.*, 2006).

Conforme descrito por Lonstein e Gammie (2002), o comportamento materno é mantido ao longo da amamentação e até que a prole se torne independente. Os comportamentos de proteção e agressividade contra invasores declinam com o tempo de lactação tendo seu pico máximo durante as duas primeiras semanas. Tais comportamentos não têm sua base fisiológica perfeitamente definida, mas sabe-se que o estímulo de sucção das crias é responsável pelo seu início e a manutenção e o decréscimo nas fases tardias de lactação é devido, principalmente, à diminuição da frequência de amamentação e fatores neuroendócrinos ainda não totalmente explicados. Algumas linhagens de camundongo não apresentam atitudes protetoras, levando à hipótese de que fatores genéticos também são responsáveis pelo seu aparecimento.

#### **4.2.1 Fatores genéticos relacionados à conduta materna**

Alguns genes, em ratas, foram identificados e relacionados com a conduta materna demonstrando a importância destes no comportamento. Houpt (2000) observou que, em ratos, alteração genética do receptor de prolactina produz distúrbio não só na conduta materna como também no aprendizado e anormalidades na função do gen do receptor para estrogênio e vitamina D levam ao aparecimento de condutas anormais, como canibalismo. A ausência do gene *Mest* leva à falta de cuidado materno e da placentofagia fisiológica, e a

presença do gen Peg 3, de transmissão paterna, gera comportamento anormal.

Os ratos FSL (*Flinders Sensitive Line*), manipulados geneticamente para servirem como modelo animal para depressão, apresentam redução das atividades relativas ao cuidado das crias (LAVI-AVNON, 2005) e camundongos mutantes *hubb/hubb*, além de demonstrarem diminuição do comportamento padrão de cuidados com a prole, podem desenvolver condutas aberrantes como canibalismo (ALSTON-MILLS, 1999).

Mutação no gen da ocitocina gera maior agressividade em ratos machos (LONSTEIN e GAMMIE, 2002) e possivelmente alterações maternas.

Os estudos genéticos apresentam campo vasto e aberto para novas pesquisas e descobertas.

#### **4.2.2 Fatores endócrinos relacionados à conduta materna**

Os hormônios atuam em variadas áreas cerebrais modulando os comportamentos e influenciando mudanças fisiológicas e possivelmente patológicas. As flutuações dos níveis hormonais ovarianos e hipofisários durante os ciclos reprodutivos e suas funções no controle da agressividade e cuidados parentais vêm sendo amplamente estudados. As alterações hormonais a que as fêmeas se encontram expostas durante os períodos de gestação e lactação levam a mudanças comportamentais adaptativas para as novas tarefas de cuidados com a prole (LONSTEIN e VRIES, 2000; LONSTEIN e GAMMIE, 2002) que visam à sua proteção, bem estar e à defesa territorial, e interferências patológicas nos seus níveis refletem-se nos padrões de comportamento observáveis.

Os estímulos desencadeadores do comportamento materno em ratas são as alterações hormonais do final da gestação e pós-parto. No período de prenhez, as ratas apresentam elevação dos níveis de progesterona, estrogênio e prolactina, seguida de queda das taxas de progesterona no pré-parto. Concomitantemente as ratas exibem os comportamentos de construção e manutenção do ninho e lambar os mamilos (MOTTA, 2000; LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

O comportamento protetor, com aumento da agressividade contra invasores, é promovido, nas ratas, pela elevação dos níveis de estrogênio e estímulo de sucção das crias ao mamarem e, nas fêmeas de camundongo, é dependente apenas do reflexo de sucção, pois o estrogênio encontra-se baixo nesta espécie, durante lactação. Os níveis de progesterona elevados durante a gestação não afetam diretamente a agressividade, mas geram aumento no alerta ao perigo (LONSTEIN e GAMMIE, 2002; D'AMATO *et al.*, 2006).

O papel da prolactina como indutora de comportamento materno não está bem estudado ainda, e a sua importância não pode ser descartada, mas parece ser irrelevante na origem e manutenção da agressividade contra invasores. Também a ocitocina parece estar mais ligada a um reconhecimento da identidade do invasor, do que aumento da agressividade materna contra o mesmo (LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

#### **4.2.3 Circuitos neurais relacionados à conduta materna**

O envolvimento dos circuitos neurais e neurotransmissores na gênese do comportamento reprodutivo e parental é de inegável importância, mas ainda requer maior esclarecimento. Os circuitos neurais da agressão em roedores, comuns à fêmea lactante e ao

macho, incluem áreas ventrais e mediais do hipotálamo que recebem informações hormonais e sensoriais para integração, e enviam padrões motores de respostas, ligadas a agressividade.

Áreas cerebrais identificadas durante comportamento protetor materno, utilizando marcadores de atividade neural, cFOS e pCREB, podem estar relacionadas a aferências de estímulos da cria ou eferências motoras comportamentais, o que tem tornado difícil interpretações baseadas nestes resultados.

Os estímulos sensoriais durante interação com as crias são importantes para a manutenção do comportamento materno de proteção e as alterações de áreas ligadas a aferência e processamento de pistas sensoriais das crias diminuem as reações de cuidados (LONSTEIN e GAMMIE, 2002; OLAZÁBAL *et al.*, 2004).

As lesões da área talâmica mediodorsal ou do córtex insular pré-frontal levam a um decréscimo da agressividade protetora das fêmeas lactantes e essa anormalidade comportamental não se deve a anosmia, mas sim a um não reconhecimento das pistas olfatórias das crias, não ocorrendo discriminação entre essas e o intruso (LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

Lesões dos núcleos peripedunculares, que transmitem impulsos da amamentação para hipotálamo e sistema límbico, causam diminuição das atitudes de proteção apenas se ocorrerem após o quarto dia de parto demonstrando que os estímulos hormonais parecem ter uma importância maior como iniciadores desse comportamento, sendo apenas a manutenção de responsabilidade dos circuitos neurais peripedunculares. Quando são observadas lesões no hipotálamo ventromedial de ratos, onde terminam as projeções dos núcleos peripedunculares,



ocorre decréscimo da agressividade contra intrusos em fêmeas lactantes e entre machos. O neurotransmissor GABA (ácido gama amino butírico) parece ser o facilitador neste sítio, para o comportamento maternal, já que seus antagonistas geram uma alteração na conduta agressiva (LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

O papel dos núcleos paraventriculares do hipotálamo não está bem claro, mas lesões precoces realizadas após dois dias do parto causam aumento do comportamento protetor, porém quando estas alterações ocorrem mais tardiamente, cinco dias após o nascimento das crias, há um decréscimo da atitude contra agressores. Independente da ocasião, pré ou pós- parto, que ocorra lesão na área cinzenta periaquedutal haverá um aumento da agressividade materna, indicando ter essa região um controle inibitório sobre o comportamento protetor e diminuição na postura de amamentação já que as áreas laterais e ventrolaterais desta região são estimuladas durante amamentação (LONSTEIN e STERN, 1997; LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

Lesões no septum prejudicam as atitudes de ataque frente a um agressor por parte de fêmeas lactantes, e a serotonina parece estimular esse comportamento quando aumentada nesta área (LONSTEIN e GAMMIE, 2002), ao contrário, alterações dos níveis de serotonina nos núcleos da rafe mediana causam interrupção do comportamento materno (OLAZÁBAL *et al.*, 2004).

A área pré-óptica medial tem um papel importante para comportamentos maternais como construção de ninho e busca de crias para retorná-las ao ninho, mas pode ser estimulada por dois neurotransmissores diferentes já que ratas adultas (60 a 100 dias de vida) expostas à presença de filhotes apresentam aumento dos níveis de dopamina neste núcleo,

porém nas ratas jovens (19 a 21 dias de vida) expostas a esse mesmo estímulo, os níveis aumentados são de serotonina (LONSTEIN e GAMMIE, 2002; OLAZÁBAL *et al.*, 2004).

A área talâmica mediodorsal, córtex insular pré-frontal, núcleos peripedunculares, região cinzenta periaquedutal e septum estão relacionados ao comportamento agressivo protetor em ratas e fêmeas de camundongo, mas não diretamente a agressões contra crias.

As regiões mais relacionadas ao comportamento materno de cuidado com as crias são: área pré-óptica medial, região da amígdala e núcleo acumbens. A amígdala está relacionada ao reconhecimento das crias e o núcleo acumbens à manifestação de recolhimento destas para o ninho, a área pré-óptica medial no hipotálamo é responsável tanto pelo início como pela expressão do comportamento da fêmea frente às crias (OLAZÁBAL, 2004) e é considerada a principal região implicada no comportamento materno (BRIDGES *et al.*, 1990; CALAMANDREI, 2006).

Áreas envolvidas na gênese do comportamento materno de cuidado e interação com as crias podem estar relacionadas a comportamentos maternos aberrantes quando lesadas.

#### **4.2.4 Neuroquímica e comportamento materno**

As alterações no equilíbrio neuroquímico podem ser transitórias ou permanentes e mesmo quando discretas podem provocar mudanças comportamentais. Vários neurotransmissores e moduladores, bem como suas vias de interação, estão relacionados ao comportamento agressivo frente a um invasor e proteção das crias (LONSTEIN e VRIES,

2000; LONSTEIN e GAMMIE, 2002; OLAZÁBAL *et al.*, 2004; D'AMATO *et al.*, 2006). A especificidade de cada um na gênese dos comportamentos ainda está longe de estar totalmente esclarecida, e é uma lacuna a ser preenchida visando inclusive tratamentos mais direcionados para alterações patológicas comportamentais.

### **Serotonina**

Níveis baixos de serotonina estão relacionados a alto índice de agressividade em machos de várias espécies, de roedores a humanos, mas ao inverso, o uso de agonistas e precursores da serotonina, em fêmeas de camundongos e ratas lactantes, induzem à diminuição do seu comportamento agressivo. Contrariamente, agonista serotoninérgico no *septum* medial aumenta o comportamento agressivo em ratas e as lesões das vias serotoninérgicas na área mediana dos núcleos da rafe levam à inibição do comportamento materno (LONSTEIN e GAMMIE, 2002; OLAZÁBAL *et al.*, 2004).

### **Óxido Nítrico**

O óxido nítrico, neuromodulador gasoso, tem sua síntese aumentada em várias regiões do hipotálamo (área medial pré-óptica, núcleos supraquiasmático e subparaventricular) em fêmeas de camundongo lactantes durante execução de comportamento agressivo. Nos machos da mesma espécie, o oposto ocorre, e a diminuição dos níveis de óxido nítrico está relacionada ao aumento de agressividade, talvez por uma interação com vias serotoninérgicas (LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

## **GABA**

Altos níveis de GABA são mantidos pelo estímulo de sugar das crias durante amamentação e são responsáveis pela agressão protetora das fêmeas e este comportamento pode ser induzido em ratas virgens tratadas com benzodiazepínicos e diminuído quando ratas e fêmeas de camundongo são tratadas com antagonistas dos benzodiazepínicos (LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

## **Sistemas Dopaminérgicos**

Os sistemas dopaminérgicos estão envolvidos no despertar e na manutenção do cuidado materno, e as alterações em seus níveis causam anormalidades neste comportamento (BONSIGNORE *et al.*, 2006). A dopamina parece inibir o comportamento agressivo em ratas, mas a injeção de seu antagonista leva à diminuição do comportamento agressivo em fêmeas de camundongo. O uso crônico de cocaína durante gravidez em ratas aumenta a agressividade, já seu uso agudo pós-parto reduz este comportamento (LONSTEIN e GAMMIE, 2002). Lesões nas vias dopaminérgicas causam interrupção no comportamento materno, e o uso de seu antagonista leva à inibição de comportamento de recolhimento de crias para o ninho (OLAZÁBAL *et al.*, 2004).

## **Vasopressina e Prolactina**

A vasopressina está relacionada à agressividade em várias espécies, mas não há um número significativo de trabalhos incluindo este neuropeptídeo no estudo de comportamento agressivo ou de proteção em fêmeas com cria. A prolactina, tanto de origem

hipofisária como placentária, está mais relacionada ao início dos cuidados parentais e aparentemente não influencia a agressividade materna. O papel da prolactina sintetizada em neurônios não está esclarecido (LONSTEIN e GAMMIE, 2002), mas apenas a prolactina administrada no sistema nervoso central gera comportamento materno, atuando principalmente na área pré-optica medial (BRIDGES *et al.*, 1990).

### **Fator liberador de corticotropina**

A liberação de fator liberador de corticotropina é responsável pelo aumento de ansiedade e reação de medo em machos de roedores. Durante a lactação há decréscimo dos níveis deste hormônio no hipotálamo das fêmeas já que o comportamento agressivo protetor pós-parto está relacionado à diminuição da ansiedade e medo, e a administração de fator liberador de corticotropina e o hormônio adrenocorticotrópico inibem sua manifestação (LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

### **Opióides**

Os opióides diminuem a agressividade, e níveis mais baixos desse neuropeptídeo são necessários para o aparecimento de comportamento protetor de fêmeas durante a lactação, entretanto no período pré-parto, várias áreas cerebrais apresentam taxas altas de opióides e o comportamento protetor já se manifesta em roedores, não deixando clara a especificidade desse modulador. O uso de agonistas, como a morfina, talvez leve ao comportamento menos agressivo por diminuição de pistas olfatórias ou aferência algica (LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

### **Ocitocina e complexo amigdalóide**

A presença de níveis mais altos de ocitocina no complexo amigdalóide produz reconhecimento social em camundongos e permite às fêmeas diferenciarem suas crias de intrusos inclusive discriminando o sexo e idade de invasores, sendo os ataques mais ferozes contra machos adultos.

A lesão do órgão vomeronasal que tem forte associação com complexo amigdalóide, elimina ataque a agressores, mas não altera comportamento maternal frente às crias, sugerindo que pistas olfatórias são mais importantes para identificação de invasores do que geradoras de estímulo para cuidados maternos (LONSTEIN e GAMMIE, 2002; OLAZÁBAL *et al.*, 2004). Experimentos demonstraram que as áreas envolvidas na emoção e recompensa e vias reguladoras do olfato são estimuladas pela ocitocina (FEBO *et al.*, 2005) demonstrando o envolvimento do complexo amigdaliano no circuito límbico de reconhecimento, importante para a modulação de comportamento agressivo.

As substâncias neurotransmissoras e moduladoras como serotonina, vasopresina, prolactina, fator liberador de corticotropina, opióides e ocitocina, atuam nos comportamentos protetores modulando a agressividade e ansiedade. O comportamento materno especificamente parece estar mais relacionado a vias dopaminérgicas e ao neurotransmissor GABA.

No Sistema Nervoso, as áreas responsáveis pela manifestação comportamental são moduladas internamente por variações nos níveis de neurotransmissores e hormônios e externamente pela experiência de aprendizado e informações sensoriais aferentes.

#### 4.2.5 Características das crias relacionadas à conduta materna

As crias fornecem uma série de estímulos sensoriais que são responsáveis tanto por iniciar como por manter a conduta materna de cuidado e proteção nas fêmeas. Para que se mantenha o comportamento maternal, as fêmeas devem ter sido expostas recentemente às suas crias, período de separação de cinco horas já causa diminuição do comportamento materno de proteção (LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

O principal estímulo tátil em roedores ocorre na interação entre crias e mães durante a amamentação, e parece ser esse o fator mais importante para a manutenção do comportamento materno. Nas ratas a estimulação tátil ventral é a mais importante, sendo que em fêmeas de camundongo há necessidade do estímulo de sucção durante a amamentação (LONSTEIN e VRIES, 2000; LONSTEIN e GAMMIE, 2002; FEBO *et al.*, 2005). A pele delicada dos filhotes e a sua umidade também são pistas táteis sinalizadoras e mantenedoras de cuidados maternos (HOUPY, 2000).

Estímulos olfatórios são de extrema importância na comunicação entre crias e fêmeas e podem ser oriundos tanto de substâncias voláteis ou de feromônios, e permitem a distinção pelas mães entre crias e intrusos (LONSTEIN e GAMMIE, 2002) e geram comportamentos de cuidados com as ninhadas, lambidas na região ano-genital das crias para estimular micção e defecação. Este último cuidado é mais intenso em crias do sexo masculino devido à presença de feromônio na urina e é determinante para que essas crias apresentem comportamento reprodutor e sexual na vida adulta, a aferência tátil gerada pelo cuidado materno desenvolve vias neuronais eferentes para comportamento motor de monta durante a cópula (CARLSON, 2002).

O comportamento materno diminui nas fases tardias da lactação, talvez as modificações das crias crescidas levem a alterações nas pistas olfatórias e táteis que não mais conseguem manter o estímulo para atitudes protetoras e de cuidados. Ocorre também uma diminuição da frequência dos contatos entre mães e filhotes com o passar do tempo e crescimento destes, o que acarretaria um decréscimo dos estímulos sensoriais.

A vocalização ultrassônica das crias é identificada pela mãe e é importante para a busca dos filhotes perdidos e recuperação para junto da ninhada, a vocalização dos intrusos é diferenciada e permite localização e ataque mais precisos. As pistas visuais geram identificação do tamanho das crias e parecem importantes na manutenção de cuidados maternos com animais de menor porte do que um adulto (HOUPY, 2000), contato com coespecíficos menores, desperta cuidados maternos e intrusos de menor porte despertam menos agressividade em adultos (LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

Alterações na capacidade de captar pistas advindas das crias ou de anormalidades nas funções cerebrais associativas podem gerar comportamentos maternos anômalos, bem como crias com comportamento ou morfologia anormais podem desencadear na mãe comportamentos para eliminação dessas crias (HOUPY, 2000; CHRISTIAN, 2001)

### **4.3 Comportamento parental aberrante**

Comportamentos parentais não comuns podem ter sua origem em fenômenos fisiológicos e ecológicos como controle populacional, sobrevivência durante período de carência de recursos e eliminação de competidores sexuais. Mesmo as atitudes maternas que aparentemente não parecem ser de cuidados, como o infanticídio, podem ser uma



manifestação de proteção das crias saudáveis e eliminação de filhotes que não seriam viáveis.

Comportamentos aberrantes como sintomas de disfunção neurológica ou endócrina materna são cada vez mais abordados em trabalhos experimentais e o conhecimento sobre as bases neurais e endócrinas do comportamento materno em modelos animais (LONSTEIN e GAMMIE, 2002) pode favorecer a compreensão das alterações comportamentais pós-parto em mulheres com padrões elevados de agressividade.

#### **4.3.1 Canibalismo**

O ato de um animal devorar outro da mesma espécie é um comportamento intrigante que atrai estudos de várias áreas, desde a biologia até a sociologia, passando por questionamentos éticos e religiosos quando este fenômeno é observado em comunidades humanas.

A descrição do canibalismo como “um corte na própria carne” parece sugerir uma idéia de auto-eliminação, porém este comportamento apresenta uma vantagem evolucionária individual e populacional, canibalizar jovens crias é uma estratégia de sobrevivência de adultos durante períodos de limitação de comida. A morte da vítima não só fornece energia para o adulto como é uma tática de eliminação de um competidor pelos mesmos recursos e o nível populacional poderá até ser positivo quando as crias se tornam uma estratégia alimentar dos adultos (GETTO *et al.*, 2005).

Quando ocorre aumento da densidade populacional, este comportamento tem sua importância no controle demográfico, e nesses casos não está relacionado a necessidade

alimentar individual dos adultos. O canibalismo promove a regulação populacional, processo densidade dependente, quando a relação do número de vítimas por predador for alta, tendo efeito dinâmico sobre o nível populacional e promovendo a sobrevivência dos adultos frente à adversidade alimentar. Optar por um comportamento não canibalístico seria uma condenação à extinção, e esta estratégia promove a sobrevivência individual e populacional (CLAESSEN *et al.*, 2003; GETTO *et al.*, 2005).

### **4.3.2 Infanticídio**

No infanticídio a morte da vítima não tem como objetivo a alimentação do adulto que o praticou, diferentemente do canibalismo (CLAESSEN *et al.*, 2003).

Entre roedores é comum quando praticado por não parentes, camundongos machos praticam infanticídio, e a agressividade materna aumentada durante a lactação tem como objetivo a proteção das próprias crias contra esse comportamento, bem como defesa de território. Camundongos suíços machos juvenis são mais vítimas de infanticídio do que animais do sexo feminino, talvez por que suas pistas olfatórias sejam mais estimulantes sobre fêmeas lactantes que não suas mães (LONSTEIN e GAMMIE, 2002).

O infanticídio praticado pelo macho tem como substrato neural e motivacional uma competição sexual e social. É uma estratégia adaptativa para aumentar recursos de acasalamento e não um ataque predatório, a utilização de medicação antiagressiva serotoninérgica diminui o infanticídio sem alterar o comportamento predatório. As fêmeas são comumente descritas como menos agressivas do que os machos, sendo este comportamento alterado durante prenhez e principalmente lactação. O infanticídio por fêmeas lactantes é

praticado contra crias de outras fêmeas, basicamente motivado por defesa de território e competição intrasexual por alimentos e recursos para construção de ninhos, como nos machos, não está relacionado a um comportamento predatório (FERRARI *et al.*, 1996).

Infanticídio sobre crias próprias pode ocorrer quando estas não apresentam as características perinatais esperadas como normais. Os filhotes malformados, fracos, com temperatura menor e vocalizando pouco, são identificados como os de menor probabilidade de sobrevivência, e podem ser canibalizados pelas próprias mães logo ao nascerem (HOUP, 2000). Nos modelos experimentais de estudos toxicológicos, com a expectativa de malformações, o sacrifício das fêmeas prenhes deve ocorrer antes da data prevista para o parto, caso contrário o infanticídio materno eliminará as chances de observação das deformidades (CHRISTIAN, 2001).

#### **4.4 Radiação Ionizante**

Os efeitos toxicológicos da radiação dependem da dose total absorvida e são influenciados pelo tempo de exposição. Os efeitos imediatos apresentam sinais clínicos resultantes da morte celular, tardiamente, o efeito estocástico, devido à lesão de material nuclear pode induzir ao aparecimento de câncer ou mutação gênica transmissível às próximas gerações (SANTIS *et al.*, 2005). Além disso, as lesões podem ser causadas indiretamente pela formação de radicais livres reacionais (VERHEYDE e BENOTMANE, 2006).

A citopatologia devido à radiação é semelhante aos outros tipos de injúrias celulares e a lesão molecular, ampliada pelos processos biológicos após injúria, pode levar de segundos a anos para se expressar (COCKERHAM, 2001).

A interação da radiação com os organismos vivos gera efeitos biológicos como as quebras das ligações químicas que degradam as estruturas das moléculas, alterando ou eliminando a atividade bioquímica normal. Proteínas e aminoácidos têm a sua função prejudicada após irradiação devido às quebras nas pontes de hidrogênio, na maioria das vezes irreversíveis. Quando as bases dos ácidos nucléicos são rompidas, anormalidades tanto no DNA como RNA mensageiro são observadas, e o dano interrompe o ciclo celular, diminui a capacidade de reparo do organismo e provoca morte celular por necrose ou apoptose induzida e o câncer aparece secundariamente à lesão do material protéico nuclear (COCKERHAM, 2001; SANTIS *et al.*, 2005; VERHEYDE e BENOTMANE, 2006).

A apoptose induzida pela radiação é inicialmente causada pela lesão no DNA e posteriormente mantida por um segundo mensageiro, a ceramida (COCKERHAM, 2001). É um fenômeno receptor dependente e não secundário ao dano de material nucléico (VERHEYDE e BENOTMANE, 2006).

Durante o ciclo celular, as células em mitose (síntese de DNA e divisão celular) são as mais radiosensíveis, e tecidos com maiores velocidades nos ciclos celulares têm maior chance de serem alterados durante exposição à radiação como os tecidos em formação durante a fase de organogênese.

Os sistemas reprodutivos e endócrinos respondem à irradiação com sinais de deficiência com queda da produção de melatonina na pineal, de hormônios hipofisários e ovarianos como o estrogênio e progesterona. O aumento da secreção de TSH (fator de liberação) é compensatório à diminuição da produção hormonal tireoidiana (COCKERHAM, 2001) e o hipotireoidismo secundário à irradiação diagnóstica dentária leva ao nascimento de

fetos de baixo peso (SANTIS *et al.*, 2005).

Na fase pré-implantação, até a placenta se tornar um órgão funcional, o conceito em divisão celular é extremamente sensível e normalmente ocorrerá morte após irradiação. Após a implantação e no período de organogênese a irradiação causará patologia estrutural, com anormalidades nos órgãos e malformações externas grosseiras. No período perinatal as lesões serão mais funcionais do que anatômicas, com alterações nas atividades enzimáticas teciduais, produção hormonal e hematopoiese (COCKERHAM, 2001; VERHEYDE e BENOTMANE, 2006).

A radiação ionizante é potencialmente teratogênica e apesar da correlação entre dose e efeito não estar bem definida, o período gestacional mais suscetível em humanos compreende da segunda à oitava semana, e seus efeitos são dependentes do período em que ocorre a exposição e não apenas da dose absorvida pelo feto (SANTIS *et al.*, 2005).

#### **4.4.1 Efeito da radiação ionizante sobre o Sistema Nervoso**

O tecido nervoso adulto era considerado relativamente resistente à radiação, porém o período longo de latência para o aparecimento das lesões dificulta as avaliações, como a desmielinização que é iniciada duas semanas após a irradiação. Em animais de laboratório, adultos, expostos a uma dose única acima de 15 Gy, há o surgimento de necrose no tecido branco e é possível observar alterações morfológicas com dose única acima de 10 Gy (COCKERHAM, 2001).

A apoptose em neurônios maduros se deve ao dano no receptor ou canal iônico com aumento do influxo de cálcio o que não é encontrado durante apoptose de neurônios imaturos. Leucoencefalopatia, microangiopatia, atrofia cortical e necrose cerebral que surgem após irradiação no tecido nervoso já formado parecem ter como principal causa alterações vasculares e não morte celular direta (VERHEYDE e BENOTMANE, 2006).

Áreas subcorticais são mais sensíveis, como hipotálamo e hipocampo. Ratos irradiados mesmo com doses baixas, 0,005 a 0,5 Gy , apresentam diminuição da densidade sináptica em CA1 hipocampal e as alterações vasculares, com quebra de barreira hematoencefálica, edema vasogênico e aumento da pressão intracraniana surgem tardiamente em animais irradiados com doses mais altas (10 – 30 Gy) (COCKERHAM, 2001).

As lesões em hipocampo manifestam-se com alterações de aprendizado, memória e orientação espacial, mesmo com exposição em doses baixas e em pacientes adultos (VERHEYDE e BENOTMANE, 2006).

#### **4.4.2 Irradiação pré-natal – alterações na neurogênese**

Durante a oitava e a décima quinta semanas de gestação em humanos o tecido nervoso se encontra mais vulnerável á ação da radiação ionizante devido ao alto índice de proliferação e migração neuronal para formação das camadas corticais (GOLDMAN-RAKIC, 1995; GAZZANIGA, 1999; SANTIS *et al.*, 2005).

Há uma diminuição da radiosensibilidade do tecido nervoso ao longo do período gestacional e apesar de ser mais raro o aparecimento de lesões morfológicas ou funcionais

após a vigésima quinta semana de gestação em humanos (SANTIS *et al.*, 2005), mudanças comportamentais sem alterações histológicas podem surgir após exposição em fases tardias do desenvolvimento ou na fase perinatal (HALL *et al.*, 2004; VERHEYDE e BENOTMANE, 2006).

A apoptose induzida durante o desenvolvimento neuronal pode ter início seis horas após a exposição e atinge principalmente as áreas germinativas periventriculares e camada externa granular e mesmo a utilização precoce do Fator Neurotrófico cerebral (BDNF) não previne este fenômeno (FERRER *et al.*, 1998).

Em cultura de células corticais de ratos em idade gestacional de quinze dias, neurônios pós-mitóticos se tornam suscetíveis a apoptose devido à diminuição da velocidade de reparo do DNA (GOBBEL *et al.*, 1998). Alterações no funcionamento de receptores e apoptose são encontradas nas culturas de neurônios hipocâmpais de ratos em fases tardias (SHIRAI *et al.*, 2006).

A exposição à radiação ionizante em altas doses (>1Gy) leva ao atraso no desenvolvimento do Sistema Nervoso com aparecimento de microcefalia principalmente quando esta ocorre antes da décima sétima semana de gestação em humanos, e após a vigésima semana não há anomalias congênitas (SANTIS *et al.*, 2005; VERHEYDE e BENOTMANE, 2006).

Em ratos irradiados no período pré-natal (D-15 e D-16) ocorre alto índice de microcefalia, principalmente devido à morte celular nas regiões neocorticais, bem como alterações na formação sináptica com desequilíbrio entre número de neurônios secretores de

GABA e GLUTAMINA (NAKANISHI, 2004).

O retardo mental é uma das mais importantes alterações após a irradiação em altas doses intra-útero e não pode ser creditado apenas à diminuição da circunferência craniana já que é encontrado sem estar associado à microcefalia (SANTIS, 2005; VERHEYDE e BENOTMANE, 2006). A alteração cognitiva devido à queda da função cortical após a irradiação ionizante indica provável anormalidade nas conexões neurais ou alteração gênica semelhante a desordens genéticas que se expressam com semelhante decréscimo cognitivo (VERHEYDE e BENOTMANE, 2006).

A irradiação ionizante pré-natal, como técnica para provocar lesão no desenvolvimento do sistema nervoso já foi utilizada por autores que evidenciaram alterações do desenvolvimento cerebral em roedores (SOUZA, 1995; SCHMIDT *et al.*, 2001a b; VITRAL, 2001; VITRAL *et al.*, 2005).

Roedores submetidos à irradiação durante o 15<sup>o</sup> dia (D-15) gestacional apresentam alterações como as descritas por Souza em 1995: destruição de células nas regiões anteriores, redução da espessura e densidade celular nas camadas supragranulares e nódulos de células entre áreas rarefeitas de população celular nestas mesmas camadas, as ectopias neuronais no hipocampo, nas regiões periventriculares e na camada I podem estar acompanhadas de agenesia do corpo caloso.

Ratos irradiados no D-16 ou D-18 apresentam desenvolvimento falho das camadas II, III e IV, mas há evidências de que as células progenitoras sobreviventes do neocortex proliferem após exposição (NAKANISHI *et al.*, 2004). Em períodos tardios da organogênese



cerebral pode ocorrer diminuição da formação das camadas corticais, e o efeito sobre a migração neural pode levar a alterações moleculares e morfológicas regionais como ectopias (VERHEYDE e BENOTMANE, 2006).

A desorganização no hipocampo irradiado tardiamente evidencia dispersão das células de CA1 e CA3, além da agenesia do corpo caloso e diminuição do tecido cortical e cerebelar. Lesões na glia podem ocorrer com doses baixas de RX, em torno de 0,2 Gy, e por sua importância funcional poderá acarretar anormalidades funcionais ainda não esclarecidas (COCKERHAM, 2001).

#### **4.4.3 Alterações funcionais e comportamentais após irradiação do sistema nervoso**

A exposição à radiação ionizante pode levar a alterações funcionais sem lesões radiogênicas morfológicas, nestes casos os testes comportamentais e eletrofisiológicos são mais sensíveis.

Alterações metabólicas no tecido nervoso, disfunção hipotalâmica sem necrose, podem ser observadas após exposição a doses baixas entre 0,11 a 0,24 Gy e (COCKERHAM, 2001).

Ocorre aumento do fluxo de sódio após irradiação ionizante, o que acarreta uma hiperatividade cerebral com mudanças do padrão cortical no eletroencefalograma de animais e humanos após exposição a 0,05 Gy, e anormalidades significativas associadas a alterações hipocampais com doses em torno de 2 Gy (COCKERHAM, 2001). Neurônios maduros apresentam aumento do influxo de cálcio devido à lesão no canal iônico (VERHEYDE e

BENOTMANE, 2006).

A função dopaminérgica está diminuída com irradiação de altas doses (100Gy), mas ocorre aumento da síntese de acetilcolina no hipotálamo de ratas após exposição a doses baixas como 0,02Gy. O surgimento de grânulos neurosecretórios na hipófise e hipotálamo nos dois primeiros dias após irradiação de RX na dose de 3 Gy é transitório e a ingestão menor de água e comida, diminuição do comportamento sexual e agressividade são alterações de comportamentos inatos dose dependente. A exacerbação da agressividade surge com doses acima de 10 Gy, sendo que doses baixas (0,05 a 0,15 Gy) levam à inibição deste comportamento de defesa (COCKERHAM, 2001).

Ratos e camundongos irradiados por volta do 15<sup>o</sup> dia de vida intra-uterina apresentam anormalidades no comportamento motor como locomoção saltitante, hiperatividade, respostas motoras em sucessões rápidas e eventualmente tônus muscular diminuído e os camundongos irradiados nesta mesma data, com dose de 2Gy, desenvolvem agressividade na vida adulta (COCKERHAM, 2001). Diminuição da locomoção espontânea e da execução motora como nadar, alteração no aprendizado de labirintos com diminuição do aprendizado, memória operacional e memorização espacial são comportamentos inatos alterados com a exposição à irradiação (COCKERHAM, 2001; NAKANISHI *et al.*, 2004; VITRAL *et al.*, 2005).

#### 4.4.4 Radiação ionizante em modelos animais

A irradiação pré-natal de modelos animais é um método efetivo para eliminar uma população neuronal específica, principalmente as indiferenciadas e ainda em desenvolvimento (SCHMIDT *et al.*, 2001 a; SCHMIDT *et al.*, 2001b; VITRAL *et al.*, 2005). Conhecer as etapas de desenvolvimento embrionário de cada área e sistema cerebral permite a eliminação seletiva destas. As células em mitose são as mais radiosensíveis, logo a área em desenvolvimento na época da irradiação será a lesada especificamente. A não manipulação direta do cérebro e a eliminação de neurônios pós-mitóticos não indiferenciados por apoptose tornam esta técnica bastante seletiva e de alta especificidade nos estudos neurobiológicos.

O córtex cerebral é a estrutura responsável pela capacidade cognitiva, inteligência, criatividade e padrões comportamentais. A mais importante característica desta estrutura é a sua arquitetura distribuída em camadas e laminas e suas divisões em áreas de dominância com suas conexões (GOLDMAN-RAKIC, 1995; GAZZANIGA, 1999). A irradiação pré-natal ionizante permite estudar alterações na laminação cortical, na migração de neurônios e nas conexões de áreas cerebrais. Esta técnica possibilita também apreciar respostas comportamentais de reação plástica de lesões precoces do tecido nervoso e o uso de roedores como cobaias têm se mostrado de utilidade já que o grau de maturidade cerebral de um rato recém nascido pode ser comparado ao de um feto humano durante os três últimos meses de gestação (BONSIGNORE *et al.*, 2006).

Camundongos *Swiss* apresentam comportamento agressivo semelhante tanto na vida selvagem como em laboratório, e são bons modelos experimentais para estudar as causas e mecanismos da agressão (FERRARI *et al.*, 1996).

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Procedimento experimental.**

#### **5.1.1 Modelo experimental e alojamento**

Foram utilizados camundongos *Swiss* adultos, 20 machos e 60 fêmeas entre dois e quatro meses de idade e peso ao redor de 30 gramas, obtidos do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde todo o experimento foi realizado.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com camas de maravalha de pinho branco, em armários climatizados onde a temperatura ambiente é mantida em torno de 23<sup>0</sup> C, ventilação com fluxo de ar de 15 renovações/hora através de filtros HEPA. Controle de ciclo claro-escuro automático de 12 horas por 12 horas. Ração comercial apropriada peletizada e mamadeira de água filtrada foram disponibilizadas *ad libitum*.

#### **5.1.2 Indução do Cio e Acasalamento**

Através do método de indução de cio, onde fêmeas são colocada em gaiolas anteriormente ocupadas por machos, foi obtida a sincronização do cio (LOMBARDI *et al.*, 1976; GANGRADE e DOMINIC, 1984; FRANCO, 2004; BARINO,2006).

As fêmeas foram colocadas com os machos em caixas individualizadas, na

proporção de três fêmeas para cada macho, durante o período escuro (de 18hs às 7hs). Foi considerado como primeiro dia pós-inseminação (D-1) aquele da observação de tampão vaginal.

### **5.1.3 Procedimento para a irradiação dos modelos experimentais**

Fêmeas no 15<sup>o</sup> ou no 16<sup>o</sup> dia pós-inseminação, escolhidas aleatoriamente entre as fêmeas prenhes, foram transportadas em micro isoladores, em carro com ar condicionado com temperatura em torno de 23<sup>o</sup>C, do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução até o Hospital ASCOMCER, aonde foram submetidas à irradiação.

As fêmeas foram colocadas individualmente em caixas de acrílico de 10,0 cm X 5,0 cm X 2,0 cm e submetidas à exposição de raios X de corpo inteiro através de aparelho acelerador linear de elétrons de energia fotônica de 6 MeV. A permanência nas caixas para exposição à irradiação não ultrapassou três minutos.

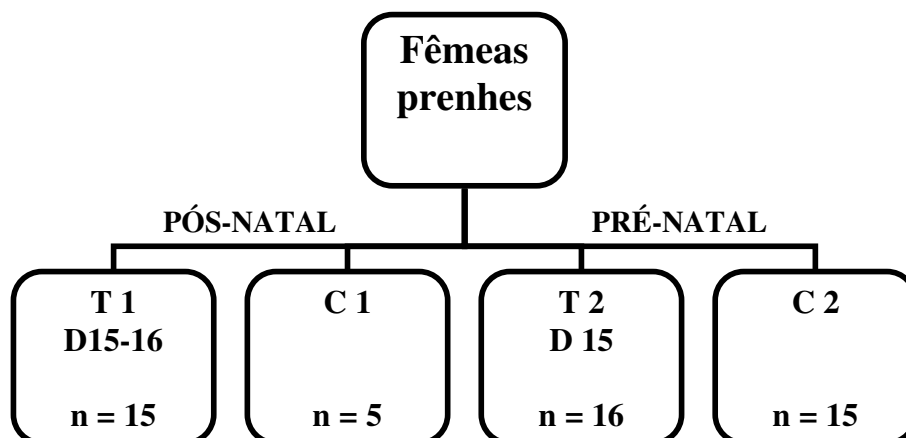
A dose no monitor foi de 139 UM, com uma distância fonte- alvo de 100 cm. O tamanho do campo de abertura do colimador foi de 10 X 6 cm e profundidade de 2,0 cm. Foi gerada uma dose total absorvida de 3 Gy (300cGy). A dose total irradiada foi dividida em dois campos, paralelos e opostos, de 150 cGy, para que houvesse maior uniformidade na exposição de toda a superfície corpórea.

O procedimento de irradiação foi sempre acompanhado pelo Físico responsável pelo Serviço de Radioterapia do Hospital ASCOMCER e a dosimetria calculada de acordo com as normas da Agência Internacional de Energia Atômica.

### 5.1.4 Distribuição dos grupos experimentais

As fêmeas irradiadas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais: [a] formado por 15 fêmeas irradiadas em D-15 ou D-16 para observação após o parto denominado T1-D15 e T1-D16 e [b] formado por 16 fêmeas irradiadas em D-15 que foram submetidas à eutanásia no décimo nono dia de prenhez, chamado de T2.

As fêmeas que geraram o grupo controle não foram manipuladas durante todo o período gestacional e foram separadas também aleatoriamente em dois grupos constituídos de: [a] cinco fêmeas para observação do período pós-natal que recebeu o nome de C1e [b] 15 fêmeas para a observação pré-natal, denominado de C2.



### 5.1.5 Avaliação Pós-natal

Fêmeas irradiadas e as controles foram colocadas em gaiolas individuais, dois dias antes da data provável para o parto, recebendo água e ração *ad libitum*, com o objetivo de avaliar a incidência de canibalismo e o índice de sobrevivência das crias.

Diariamente as gaiolas eram inspecionadas e verificados comportamento materno padrão, como construção de ninho e lambida de mamilos e indícios clínicos de toxicidade como: [a] piloereção [b] atividade motora na gaiola, [c] movimentos estereotipados como coçar o focinho, lamber as patas e morder-se a si própria, [d] alterações gastro-intestinais como diarreia [e] cromodacriorréia, [f] sangramentos, [g] alteração na diurese, e para registrar a ocorrência do parto (KHERA, 1984; KHERA, 1987; HOOD e MILLER, 2006).

Constatado o parto, diariamente, pela manhã, as crias eram observadas, contadas e identificados os animais canibalizados ou mortos, até o 21<sup>o</sup> dia, correspondente ao período neonatal e infantil (BECK, 2006). Calculada a proporção de canibalismo precoce (Crias canibalizadas até o quarto dia de vida pós-natal/crias nascidas vivas X 100); canibalismo tardio (Crias canibalizadas após o quarto dia de vida pós-natal/crias sobreviventes no quarto dia X 100). Calculado o índice de sobrevivência previamente à separação (Crias vivas no 21<sup>o</sup> dia de vida pós-natal/crias nascidas vivas X 100).

### 5.1.6 Avaliação Pré-natal

As fêmeas irradiadas e as controles foram pesadas em D-1, D-15 e D-19, sendo neste último anotados os pesos corporais total e peso corrigido.

As fêmeas de camundongos foram eutanasiadas por deslocamento cervical no 19<sup>o</sup> dia após inseminação e o procedimento sempre realizado por técnicos comprovadamente experientes em tal intervenção. Não foi possível submeter as fêmeas à sedação prévia devido à necessidade de se avaliar a atividade motora das crias ao nascimento, a qual poderia ser afetada pela sedação materna.

Após laparotomia os ovários foram removidos da bursa ovárica, pesados e seus corpos lúteos foram contados sob microscópio estereoscópico. Posteriormente foram fixados. Procedeu-se a seguir a craniectomia e retirada do tecido cerebral materno, tendo como pontos de referência o cerebelo, inclusive, e o bulbo olfatório, excluído. Seguida de pesagem e fixação. A hipófise foi pesada separadamente e fixada.

Os cornos uterinos foram seccionados longitudinalmente, sendo contados os fetos vivos e mortos, número de implantes e de reabsorções.

Nos fetos verificou-se a presença de malformações externas e classificou-se a atividade motora (hiper ou hipoatividade).

O método para classificação de atividade fetal para a avaliação da vitalidade e atividade motora fetal foi realizado por consenso entre dois experimentadores



simultaneamente, sendo que um deles não conhecia a que grupo experimental a fêmea pertencia.

A atividade motora espontânea foi observada passivamente durante 30 segundos após abertura da cavidade amniótica, caso não ocorresse movimentação espontânea, os fetos eram estimulados pelo toque gentil de uma pinça. Os animais foram classificados conforme definido abaixo:

Grau I – Presença de movimentos espontâneos dentro de 30 segundos após abertura da cavidade amniótica.

Grau II – Presença de atividade motora semelhante ao Grau I obtida após estímulo tátil.

Grau III – Presença de atividade motora de menor intensidade e amplitude comparada à observada no Grau I, obtida após estímulo tátil.

Grau IV – Hiperreflexia aos movimentos espontâneos ou após o estímulo tátil.

Os fetos e placentas foram pesados por ninhada. Fetos com malformações ou alterações na atividade motora foram pesados à parte, bem como as respectivas placentas.

Para o estudo histopatológico, de cada ninhada foram escolhidos aleatoriamente dois fetos de Grau I e suas respectivas placentas. Fetos mortos, com alterações morfológicas externas ou da atividade motora, foram fixados separadamente e identificados, bem como as respectivas placentas.

### 5.1.7 Processamento histológico

Como solução fixadora para a preservação do material destinado ao estudo histopatológico foi usada o formol cálcio de Baker (MICHALANY, 1998), numa proporção mínima de nove partes de fixador para cada volume correspondente à peça anatômica.

Os cérebros dos fetos e das fêmeas foram dissecados sob lupa cirúrgica e seccionados em cortes coronais nas regiões pré-ópticas, na altura dos globos oculares, sobre a sutura coronal e cerebelo, conforme explicitado na figura 1.

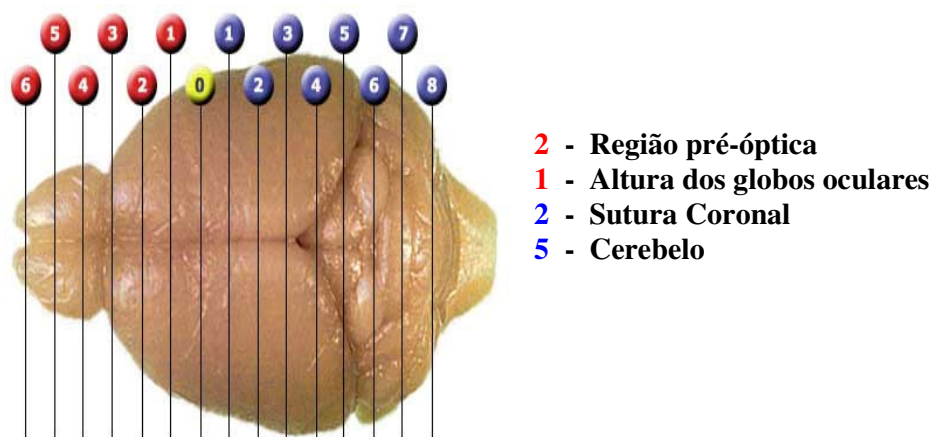


Figura 1. Vista superior do cérebro de camundongo (*Mus musculus*) com marcações para cortes coronais. Fonte: Brain Maps. Org -< <http://brainmaps.org>>

As hipófises e ovários foram processados inteiros, as placentas clivadas transversalmente ao hilo de implantação e os fetos foram seccionados sagitalmente.

O material foi processado para inclusão em parafina em processador automático histológico, sendo cortado na espessura de 3  $\mu$ m e corados pelo método hematoxilina-eosina.

Estes procedimentos foram realizados nas dependências do Laboratório CITO,

com supervisão da Dra Ângela Gollner e seguindo protocolos padrões (MICHALANY, 1998; THE JACKSON LABORATORY, 2005).

Para as localizações das estruturas cerebrais dos animais foi utilizado atlas estereotáxico (PAXINOS e WATSON, 1986). Nas fêmeas foram analisadas as áreas pré-óptica medial, amígdala e acumbens e nos fetos o córtex motor.

## **5.2 Análise estatística**

Os dados contínuos e as amostras homocedásticas foram analisados através do teste t- Student. Proporções foram analisadas pelo testes Qui- quadrado e Fisher exato. Dados com distribuição não-normal foram processados pelos métodos de Kruskal- Wallis e Mann-Whitney.

Nível de significância dos testes  $\alpha = 0.05$

## **5.3 Comissão de Ética na Experimentação Animal**

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora sob o número 056/2006CEEA

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Avaliação Pós-natal

As fêmeas dos dois grupos apresentaram comportamento anterior ao parto semelhante, como construção de ninho e preparação dos mamilos, semelhantes entre eles.

Não houve sinal de toxicidade precoce ou tardia em relação à exposição à radiação, não tendo nenhuma fêmea do grupo tratado ou controle desenvolvido piloereção, diarreia, sangramento vaginal, cromodaciorrêia ou movimentos estereotipados.

As crias das fêmeas do grupo T1 apresentavam-s ao nascimento, visivelmente menores e menos ativas do que as do grupo controle. Não foram pesadas e nem avaliadas através de manipulação para que não houvesse interferência na observação do comportamento.

Em 15 ninhadas de fêmeas do grupo T1 ocorreram 13 episódios de canibalismo representando incidência de 86,67 % de canibalismo. As nove fêmeas irradiadas no D15 praticaram oito episódios de canibalismo (88,89%) e as seis expostas à radiação no D16 apresentaram cinco ocorrências do mesmo comportamento (83,33%). Considerando os episódios de canibalismo imediato, até o quarto dia pós-natal, 11 crias foram canibalizadas de um total de 72 nascidas vivas (15,28% de ocorrência). Tardamente, após o quarto dia, 11 de um total de 61 sobreviventes foram canibalizados pelas fêmeas (18,03%). Duas crias com 14 e 16 dias de vida foram canibalizadas e, dado que camundongos *swiss* podem ser desmamados no 20<sup>o</sup> dia de vida, observou-se um comportamento materno bastante aberrante, com eliminação de crias juvenis.

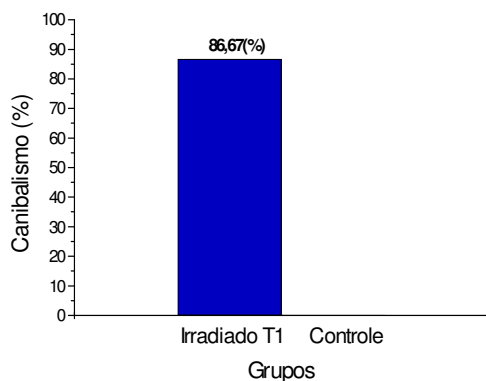


Figura 2. Gráfico com proporção de comportamento canibalístico em fêmeas de camundongo irradiadas em D-15 ou D16 de prenhez e em fêmeas controles.

A proporção de sobrevivência no momento da separação no 30º dia após nascimento foi de 44,21 %, sendo dois casos com 0 de sobrevivência no grupo T1 D-15 e 52,70 %, com um caso de 0 de sobrevivência no grupo T1 D-16. As três fêmeas de camundongos que praticaram canibalismo total de suas crias foram eutanasiadas e necropsiadas, logo após a morte de todas as crias, notando-se discrepância numérica entre os leitoss placentários e o número de crias recém nascidas observadas (21 implantes para 10 crias recém nascidas).

Nas fêmeas do grupo C1 não foi observada ocorrência de canibalismo.

As crias sobreviventes do grupo irradiado (T1-D15 e T1-D16) apresentaram comportamento anormal na vida adulta. Foram observados após 60 dias de vida hiperatividade e movimentos saltitantes ou com padrões repetitivos circulares e agressividade exacerbada, mesmo entre as fêmeas.

Do grupo T1D15 (n= 9) sobreviveram 12 machos e 12 fêmeas, sendo

visivelmente menores quando comparados com controle. Entre os sobreviventes observou-se agressividade e movimentos anormais.

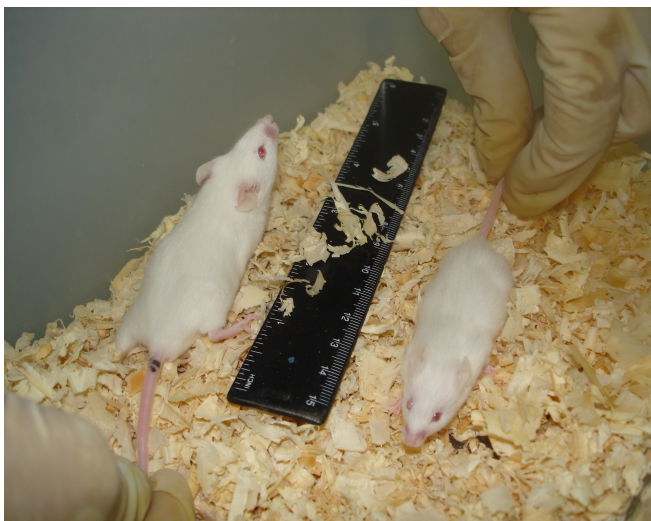


Figura 3. Filhotes de camundongo de mães irradiadas [T1] à direita e controle [C1] à esquerda com 40 dias de vida evidenciando a diferença de tamanho entre eles

Nove machos e quatro fêmeas sobreviveram no grupo T1 D16 (n= 6), e apresentaram as mesmas alterações do grupo T1-D15.

No grupo controle (n= 5) 15 machos e 16 fêmeas sobreviveram e todos apresentaram comportamento típico de sua espécie.

## 6.2 Avaliação Pré-natal

### 6.2.1 Variáveis Maternas

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade materna durante a exposição à radiação ionizante. A variação do peso corporal materno durante a gestação não apresentou diferença significativa e não houve variação no ganho de peso final entre o grupo controle e o exposto à radiação conforme demonstrado no gráfico 4.

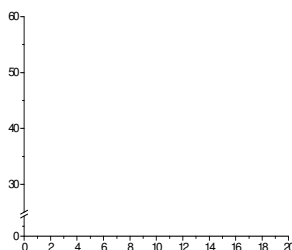


Figura 4. Gráfico do peso corporal materno (g) em animais do grupo controle (C) e irradiados (T2).

\* Peso corporal corrigido. Barras representam o desvio padrão.

Fonte dos dados – Tabela 2 do anexo 1

Não foram encontradas alterações significativas nas variáveis relacionadas ao desempenho reprodutivo materno: pesos de ovários, média de corpos lúteos, de implantes, de fetos vivos, mortos e de reabsorções, quando os grupos controles e irradiados foram comparados (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis relacionadas ao desempenho reprodutivo materno em fêmeas de camundongo irradiadas no D-15 e controles.

	Grupo Tratado 2*	Grupo Controle 2*
Peso dos Ovários (mg)	20,91 ± 3,43 (16)	22,26 ± 2,73 (15)
Média de Corpos Lúteos	9,8 ± 2,7 (16)	10,1 ± 2,0 (15)
Média de Implantes Totais	9,7 ± 2,6 (16)	9,6 ± 2,4 (15)
Média de Fetos Vivos	6,4 ± 2,5 (16)	6,7 ± 2,7(15)
Média de Reabsorções	3,4 ± 2,5 (16)	2,8 ± 1,5 (15)
Média de Fetos Mortos	1,3 ± 0,6 (16)	1,3 ± 0,6 (15)

Resultados expressos em média ± desvio padrão. (n) = número de fêmeas  
p > 0,05

Nos ovários de animais dos grupos controle e irradiados não foram encontradas alterações morfológicas significativas exceto por células lúteas grandes com evidência de apoptose mais freqüentes entre os corpos lúteos de animais irradiados (Figura 5)



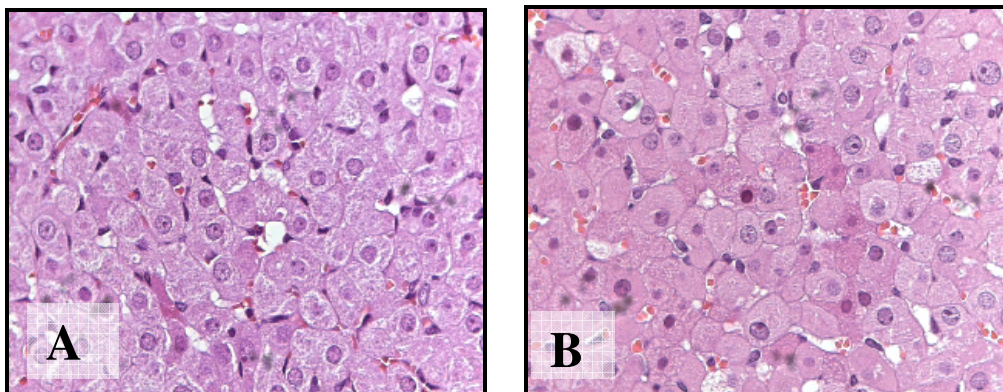


Figura 5. Corpos lúteos de fêmeas de camundongo controle (A) e irradiada (B). 40x. HE

As hipófises de mães controles e irradiadas não evidenciaram diferenças morfológicas conforme pode ser observado na Figura 6.

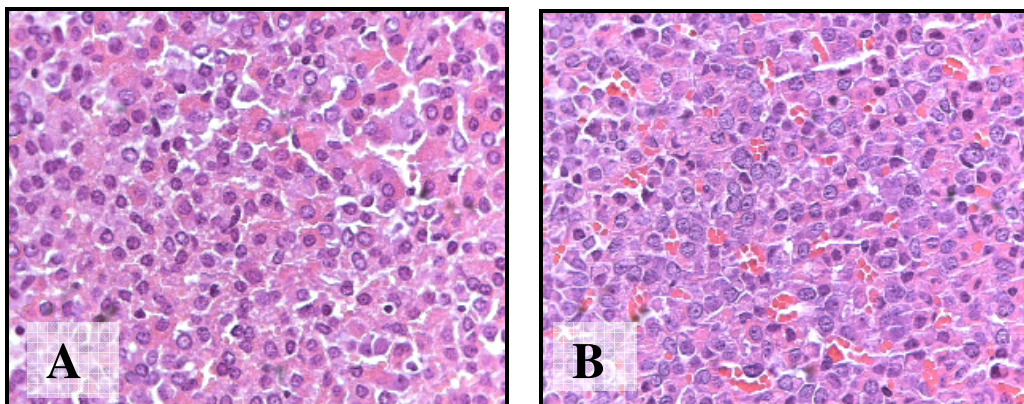


Figura 6. Hipófises de fêmeas de camundongo dos grupos controle (A) e irradiado (B) .40x. HE.

Não foi constatada diferença de peso dos cérebros maternos entre os dois grupos conforme evidenciado no gráfico 7.

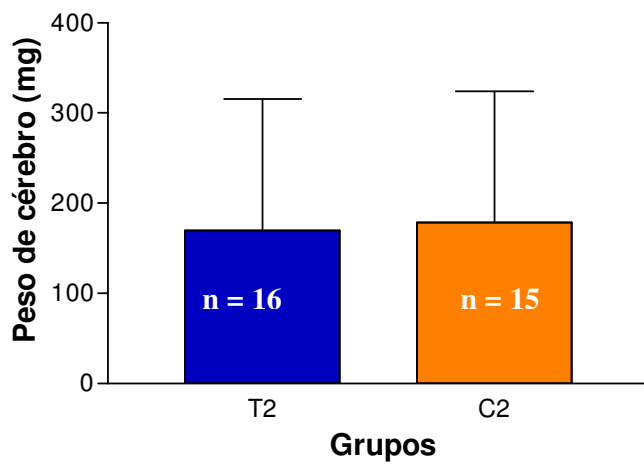


Figura 7. Gráfico do Peso de cérebro materno (mg) de camundongos controle (C2) e irradiados (T2).

Fonte dos dados – Tabela 2 do Anexo 1

A Figura 8 mostra cortes histológicos de áreas cerebrais maternas, relacionadas com comportamento.

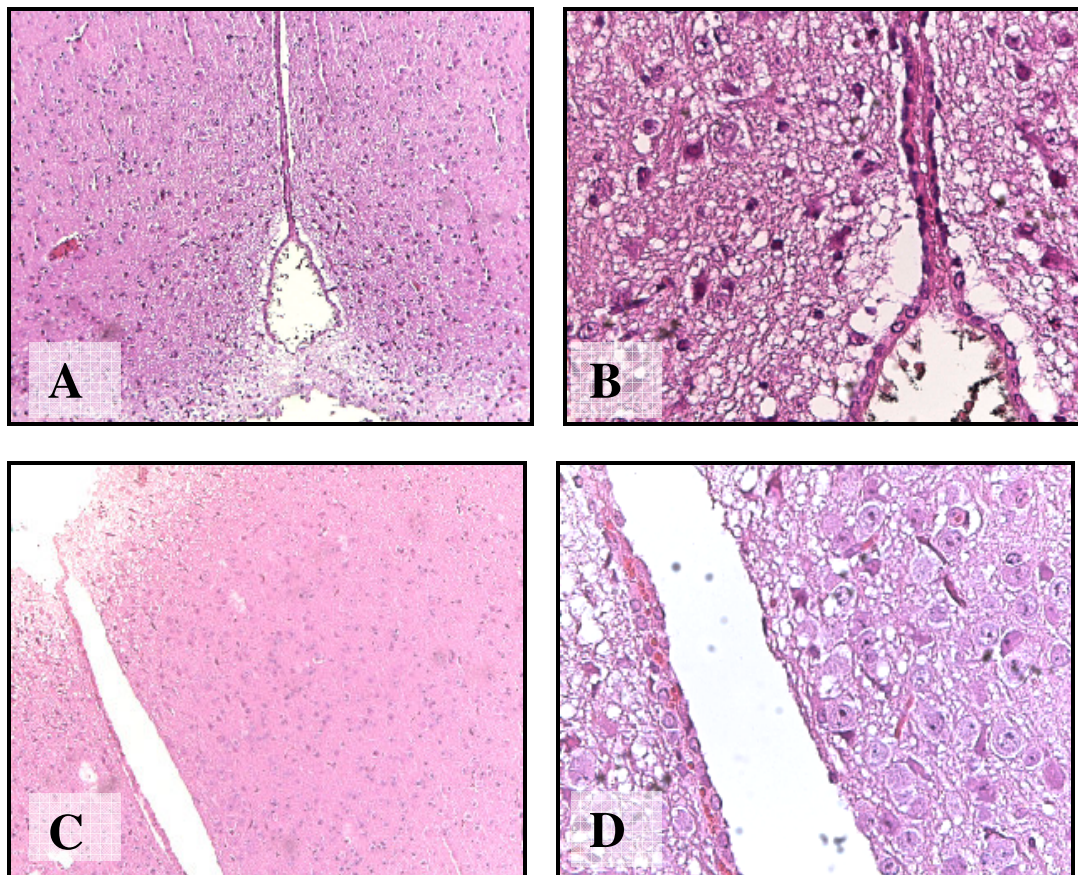


Figura 8. Área pré-óptica medial de fêmeas de camundongo dos grupos controle (A, B) e irradiadas (C, D). A, C 10X; B, D 40X. HE.

Verifica-se que a irradiação materna não causou alterações morfológicas evidenciáveis nas áreas cerebrais relacionadas com comportamento, além de edema na região hipotalâmica em torno do terceiro ventrículo semelhante nos dois grupos experimentais, melhor evidenciado nas fotos B e D da figura 8.

### 6.2.2 Variáveis Fetais

Não foram verificadas malformações externas nos fetos de mães controles ou irradiadas.

No gráfico 9 encontra-se a proporção de crias conforme o grau de atividade motora apresentada. A proporção de recém nascidos com hipoatividade foi significativamente maior no grupo irradiado, sendo que apenas 2% dos animais do grupo controle apresentaram algum distúrbio na atividade motora.

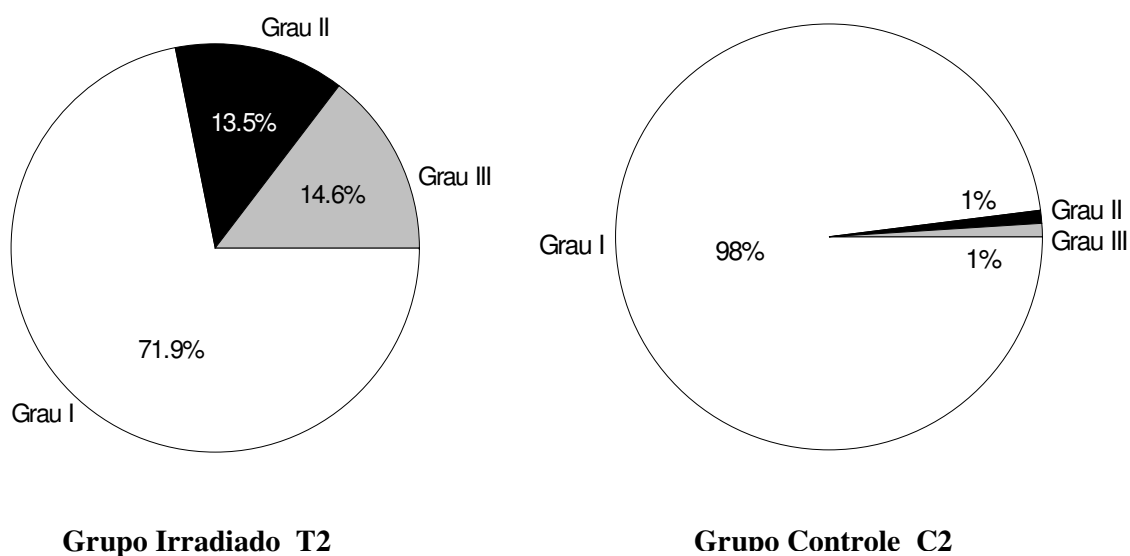


Figura 9 – Gráfico com a proporção de recém nascidos conforme o grau de atividade motora exibida em cada grupo experimental.

O peso corporal fetal do grupo irradiado ( $1077,1 \text{ mg} \pm 152,6 \text{ n}=16$ ) foi significativamente menor ( $p < 0,001$ ) quando comparado com o do grupo controle ( $1241,2 \text{ mg} \pm 64,2 \text{ n}=15$ ) como ilustrado no gráfico 10.

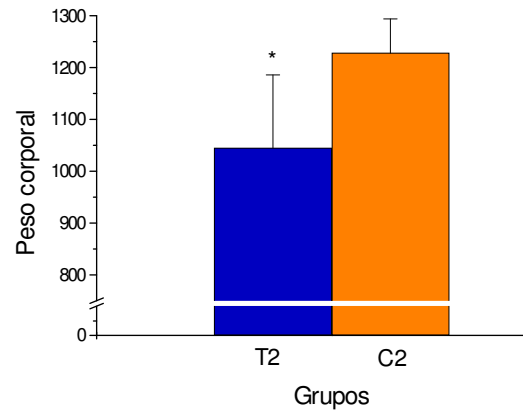


Figura 10. Gráfico com peso (mg) corporal de fetos (média  $\pm$  desvio padrão) obtidos de mães irradiadas (T2) e controle (C2) \*  $p < 0,001$ . Fonte de dados Tabela 3 no anexo

Não houve diferença de peso entre crias das mães irradiadas quando comparados em relação aos graus de variação de atividade motora (Figura 11).

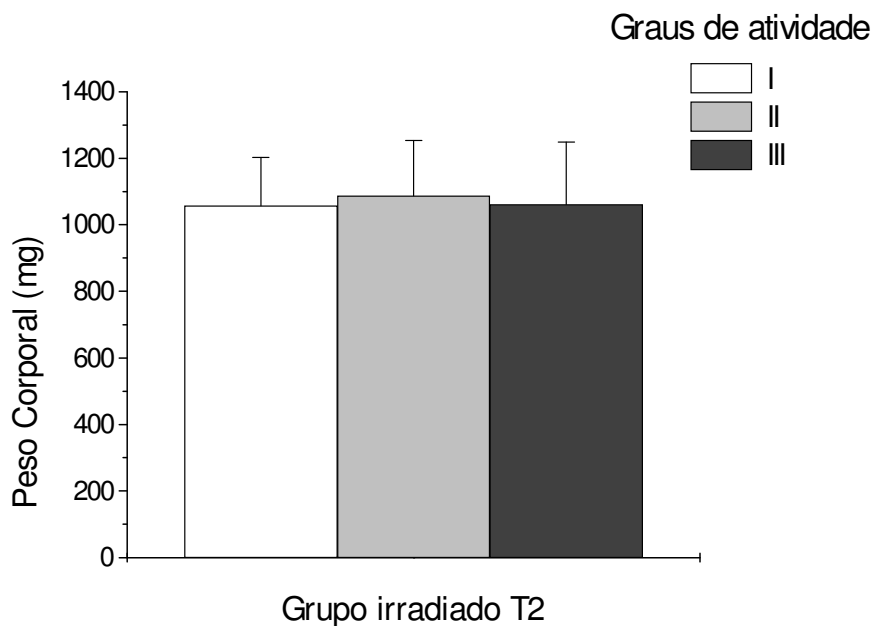


Figura 11. Peso corporal fetal de acordo com graus de atividade motora no grupo irradiado.

As placentas de animais do grupo irradiado pesaram  $111,4\text{mg} \pm 14,8$  (16) e não tiveram diferença significativa em relação às do grupo controle  $115,3\text{mg} \pm 18,5$  (15).

Embora com peso corporal significativamente menor, os fetos irradiados não apresentaram alterações significativas na maturação de órgãos vitais como pulmão, fígado e rins e nem indícios de alterações em órgãos imuno-relacionados como o timo. As figuras 12 e 13 mostram cortes histológicos de pulmão e rim, respectivamente, de animais do grupo controle e do irradiado.



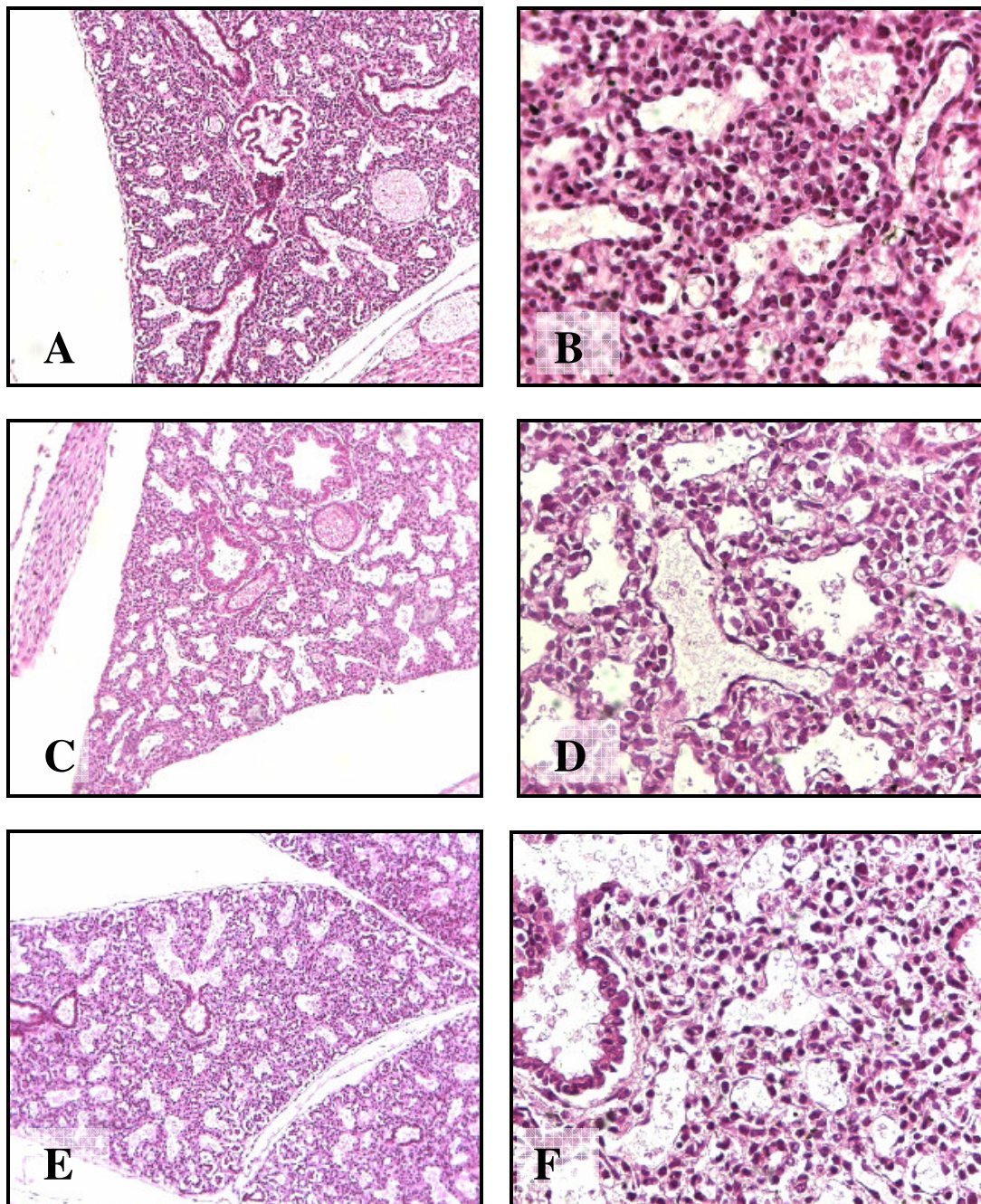


Figura 12. Pulmões de fetos de camundongo dos grupos controle (A, B) e irradiados (C, D, E, F). Fetos com atividade Grau II (C, D) e grau III (E, F). A, C, E 10X; B, D, F 40X. HE.



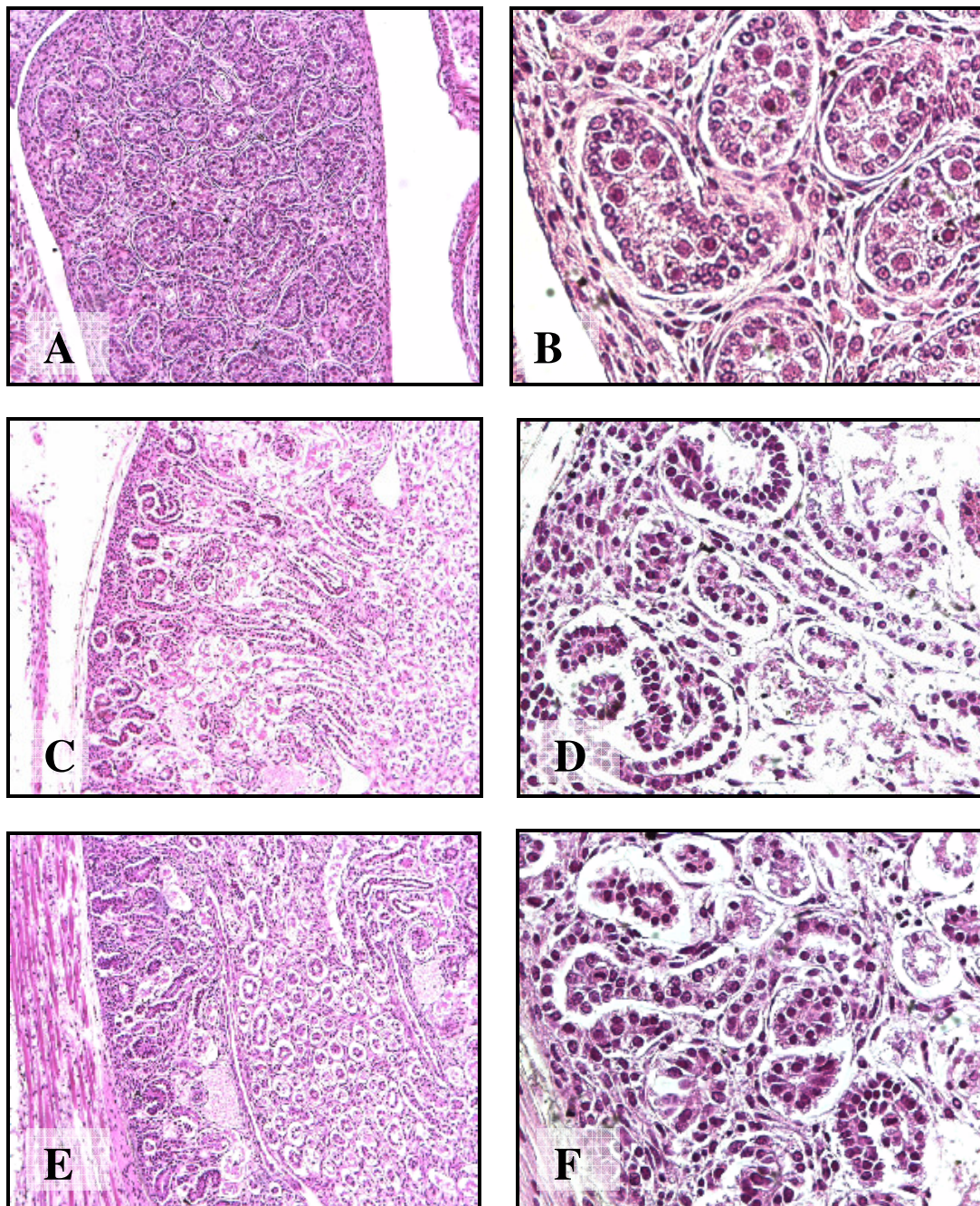


Figura 13. Rins de fetos de camundongo. grupo controle (A, B) e irradiado (C, D, E, F).

Atividade motora Grau II (C e D), Grau III (E, F). A, C, E 10X ; B, D, F 40X. HE.



A laminação cortical dos cérebros dos fetos foi avaliada quanto à celularidade e padrão de organização estrutural de suas camadas. Das 50 lâminas do grupo T2 avaliadas 39 (70,9%) continham menor celularidade e algum grau de desorganização de camadas ou estas estavam mais delgadas. Das lâminas com alterações laminares 64,1% eram de fetos hipoativos. No grupo controle, das 46 lâminas avaliadas nenhuma apresentou anormalidades na laminação cortical (Figura 14).

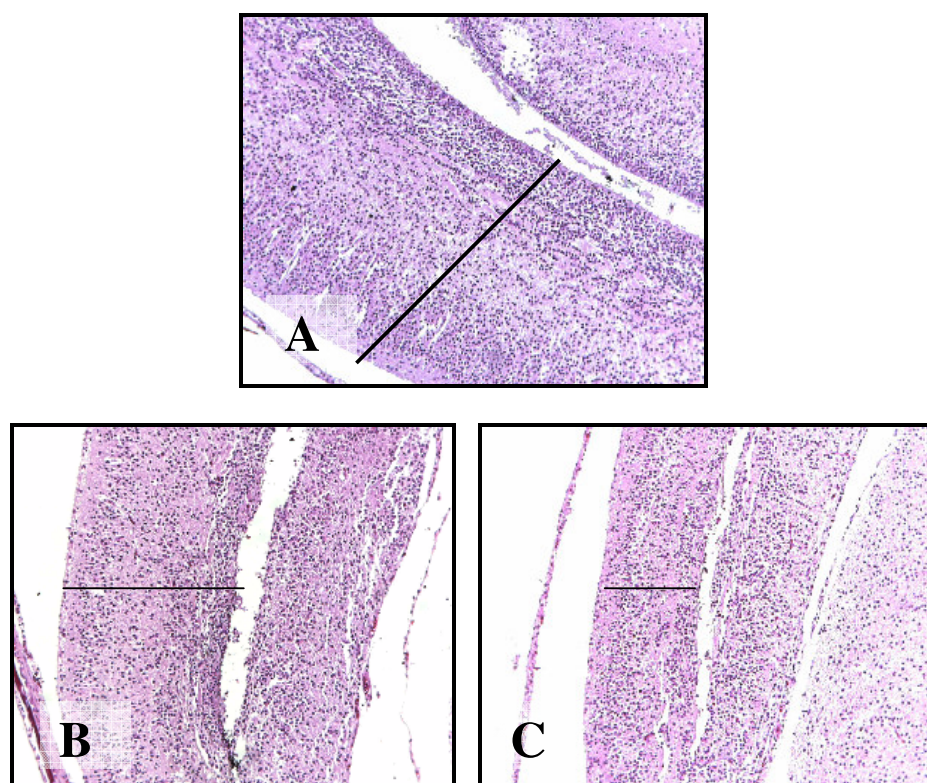


Figura 14. Córtex de fetos de camundongo. Fetos controles (A) e com grau de atividade motora II (B) e III (C). A linha indica a espessura da região cortical. 10X. HE.

O tecido cerebral sofre degradação rapidamente e foi dada prioridade à avaliação do grau de atividade motora e fixação do encéfalo fetal, por estes motivos não foi realizada a pesagem deste órgão nas crias.

## 7 DISCUSSÃO

Comportamento parental aberrante como o canibalismo pode se manifestar em condições de superpopulação, privação de alimentos e eliminação competitiva (FERRARI *et al.*, 1996; CLAESSEN *et al.*, 2003; GETTO *et al.*, 2005), o que não foi o caso do presente trabalho já que as condições ambientais permaneceram sob controle.

Em situações em que as mães são submetidas a estresse ou intoxicação ou são portadoras de alterações endócrinas podemos observar comportamentos maternos anormais.

Avalia-se o estresse de um animal através de manifestações clínicas como movimentação estereotipada, alteração de deambulação no interior da gaiola, pelos eriçados entre outros (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2003). No presente trabalho tais indícios clínicos não foram observados nas mães irradiadas, sugerindo que a irradiação não foi estímulo ansiogênico capaz de interferir com o comportamento do animal.

Não só o estresse, mas a toxicidade materna também pode interferir com o desempenho do comportamento materno (KHERA, 1984; KHERA, 1985; KHERA, 1987; NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2003), o que não parece ter ocorrido uma vez que as observações clínicas dos grupos experimentais não foram diferentes.

É comum ser observada pequena redução de peso corporal após irradiação (COCKERHAM, 2001), sendo que esta redução de peso corporal quando ocorre em valores maiores é indicativo de toxicidade (KHERA, 1987; PINTO *et al.*, 2007). Embora o grupo de mães irradiadas tenha apresentado discreta redução de peso, em valores absolutos, quando

comparado às mães controles, essa diferença não foi significativa, corroborando com os demais indicativos de ausência de toxicidade materna após irradiação.

Entre as causas de comportamento materno anormal são citadas alterações hormonais, já que os hormônios participam da gênese e manutenção do comportamento materno observável no período pré-parto e período de amamentação (LONSTEIN e VRIES, 2000; LONSTEIN e GAMMIE, 2002; D'AMATO *et al.*, 2006). As fêmeas observadas durante o período pré-natal apresentaram comportamento normal como construção do ninho e preparo dos mamilos e os dados histológicos e de pesagem dos ovários indicam não ter havido flutuações hormonais importantes.

A irradiação ionizante pode causar queda na produção hormonal ovariana e hipofisária (COCKERHAM, 2001; SANTIS *et al.*, 2005), levando à alterações no comportamento materno já que são glândulas essenciais à reprodução e ao comportamento (BRIDGES *et al.*, 1990; FEBO *et al.*, 2005) A hipófise é o local de armazenamento e liberação de ocitocina e de secreção de prolactina, importantes também na lactação. Os ovários são responsáveis pela produção de estrogênios e progesterona, indiretamente inferida através do número e aspectos dos corpos lúteos e peso ovariano já que o peso de um órgão secretor hormonal é uma medida indireta da sua capacidade funcional e é utilizado para demonstração da mesma (CALAMANDREI *et al.*, 2006).

No presente trabalho o exame histopatológico das hipófises das fêmeas irradiadas não evidenciou diferenças significativas histomorfológicas com relação ao grupo controle, o que poderia indicar funcionamento semelhante nos grupos experimentais. Dessa forma a produção de hormônios relacionados ao comportamento materno como prolactina e ocitocina

não devem diferir entre controles e irradiados.

O número de corpos lúteos por fêmea e a média do peso ovariano não diferiram entre os grupos, sugerindo que possivelmente não houve alterações hormonais importantes. Foi notada com maior frequência no grupo irradiado, a presença de células lúteas grandes, produtoras de progesterona no corpo lúteo, com núcleos picnóticos que é indicativo de morte celular. Lesões vasculares após exposição à radiação como vasculites, edema e necrose tecidual, também não foram verificadas nos ovários de animais irradiados. O conjunto dos dados obtidos sugere que não ocorreram alterações hormonais significativamente importantes que pudessem justificar modificações do comportamento materno por tais causas.

O Sistema Nervoso Central de animais adultos é afetado pela radiação ionizante apresentando perda de tecido por apoptose causada por alterações em canais iônicos e alterações na barreira hematoencefálica com alterações celulares e vasculares (VERHEYDE e BENOTMANE, 2006; YUAN *et al.*, 2006). Tais lesões, se atingirem áreas cerebrais relacionadas ao comportamento materno como área pré-óptica medial no hipotálamo, núcleo acumbens e região amigdaliana (BRIDGES *et al.*, 1990; OLAZÁBAL, 2004; CALAMANDREI, 2006) podem causar comportamento anormal como o canibalismo de crias.

A observação do peso dos cérebros maternos irradiados mostra que não foi diferente dos controles, o que pode indicar indiretamente não ter havido perda significativa deste tecido por lesão pós-irradiação e nem aparecimento de edema volumoso a ponto de elevar o peso do órgão. Na avaliação histopatológica não foram evidenciadas diferenças entre os dois grupos, indicando que as áreas relacionadas ao comportamento materno não foram

afetadas pela radiação ionizante. O edema em torno do terceiro ventrículo, na região hipotalâmica da área pré-óptica medial, ocorreu nos dois grupos e parece se dever a congestão dos vasos sanguíneos do pescoço, causado pela eutanásia por deslocamento cervical.

A análise global de comportamento, aspectos físicos e de órgão maternos leva à sugestão de que a irradiação não causou alterações maternas fisiológicas ou morfológicas capazes de explicar o comportamento canibalístico observado.

As crias induzem o comportamento materno através de estímulos táteis, olfativos e sonoros (HOUP, 2000; LONSTEIN e VRIES, 2000; CARLSON, 2002; LONSTEIN e GAMMIE, 2002). A presença de crias malformadas, hipotérmicas, hipoativas ou com problemas de vocalização pode induzir às mães a comportamento anormais como o não recolhimento das crias que se afastaram do ninho, a ausência de postura de amamentação e o canibalismo (HOUP, 2000; CHRISTIAN, 2001). Durante o experimento de observação do comportamento pós-natal os filhotes foram manipulados pelo mesmo cuidador e somente quando as gaiolas foram higienizadas de modo a não induzir qualquer modificação comportamental ou olfativa dos filhotes que gerasse canibalismo pelas fêmeas por não reconhecimento (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2003).

No grupo de crias irradiadas intra-útero observou-se na vida adulta comportamento anormal em relação à espécie, como alterações motoras, agressividade e baixo crescimento que talvez possa se dever à redução de celularidade neuronal após irradiação ionizante, que repercute no comportamento dos animais adultos e pode ser comparado com doenças neurológicas em humanos (ALTMAN, 1987; MINAMISAWA *et al.*, 1992; HALL, 2004; ).

Não tendo sido observadas crias malformadas, não é possível atribuir a tal fator a canibalização por parte das mães, fato que havia sido suspeitado quando se observou que em três mães que canibalizaram toda ninhada os leitos placentários eram em maior número do que o de crias contadas ao nascimento.

A exposição à radiação ionizante durante gestação está relacionada ao nascimento de fetos de baixo peso, até mesmo em humanos, e este efeito parece estar mediado por lesões vasculares e estruturais (SANTIS *et al.*, 2005). Crias de fêmeas de camundongo prenhes irradiadas apresentam atraso no ganho de peso pós- natal (MINAMISAWA *et al.*, 1992; GAO *et al.*, 2002) do mesmo modo que foi observado no presente trabalho. As placentas dos grupos não apresentaram diferenças significativas quanto ao peso e histologicamente não foram evidenciadas alterações vasculares que pudessem gerar trocas nutricionais insuficientes entre feto e mãe que levassem à perda ponderal (ORNOY *et al.*, 1981; BURGOYNE *et al.*, 1983).

Apesar de serem menores, as crias de mães irradiadas não apresentaram alterações morfológicas em seus órgãos vitais como pulmão, fígado, rins e timo o que indicaria interferência da radiação ionizante no processo de multiplicação celular.

Embora não tenha sido objeto de mensurações, observou-se que as crias pouco ativas eram preferencialmente canibalizadas pelas mães do grupo T1, o que parece ser corroborado pelo fato de se observarem 28,1% de fetos hipoativos no grupo T2 em contraste com os 2% notados no grupo controle C2.

O substrato morfológico para esta alteração do comportamento motor observado ao nascimento foi a desorganização das camadas laminares corticais e na diminuição da

população celular das mesmas, esta redução da massa neuronal cortical acompanha-se de distúrbios de aprendizado, memória e motores (GOLDMAN-RAKIC , 1995; MINAMISAWA e HIROKAGA, 1996; GAZZANIGA, 1999; GAO, 2002; BONSIGNORE, 2006 ; VERHEYDE e BENOTMANE, 2006).

O presente trabalho permite o questionamento sobre o uso deste modelo experimental em testes de memória e aprendizado com labirintos. O comportamento canibalístico poderia estar promovendo seleção natural de crias mais aptas à vida adulta gerando uma homogeneização de amostras indesejável para trabalhos com animais irradiados. Os resultados nos testes que utilizam labirintos e testes de fuga podem estar alterados não somente por distúrbios na memória e aprendizado, mas também devido a problemas motores dos animais.

## 8 CONCLUSÃO

1. Houve baixa sobrevivência de crias entre as mães irradiadas, com elevada proporção de canibalismo.
2. Não ocorreram alterações morfofisiológicas maternas.
3. Fetos de mães irradiadas apresentaram peso reduzido, hipoatividade e redução da espessura cortical cerebral.

O comportamento canibalístico de fêmeas de camundongo *Swiss* expostas à irradiação ionizante durante a prenhez provavelmente é induzido por alterações na atividade motora fetal.



## 9 REFERÊNCIAS

ALSTON-MILLS, B. et al. Factors influencing maternal behavior in the *hubb/hubb* mutant mouse. **Physiology e Behavior**, v.68, p.3- 8, 1999.

ALTMAN, J. Morphological and behavioral markers of environmentally induced retardation of brain development: an animal model. **Environmental Health Perspectives**, v.74, p. 153-168, 1987.

BARINO, G.T.M. **Interferência de Ferormônios na Indução do Cio em Camundongos *Mus musculus* Swiss**. 2006. 24f. Monografia (Departamento de Biologia). Universidade Federal de Juiz de Fora.

BECK *et al.*. Non clinical juvenily toxicity testing. In:TAYLOR e FRANCES (Editores). **Developmental and Reproductive toxicology a practical approach**. Flórida, 2006. p. 263-327.

BRAIN MAPS. ORG. Disponível em: < <http://www.brainmaps.org>>. Acesso em: 01 de Julho de 2006.

BONSIGNORE, L.T. et al. Acute perinatal asphyxia at birth has long-term effects on behavioural arousal and maternal behaviour in lactating rats. **Behavioural Brain Research**, v.172, p.54-62, 2006.

BRIDGES, R. S. et al..Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.87, p.8003-8007,1990.

BUCHAN, J.C. et al.. True paternal care in a multi-male primate society. **Nature**, v. 425, p.179-181, 2003.

BURGOYNE, P.; TAM, P.P.L.; EVANS, E.P. Retarded development of XO conceptuses during early pregnancy in the mouse. **J Reprod Fertil**, v.68, p.387-393, 1983.

CALAMANDREI, G. *et al.*. Efficient testing strategies for evaluation of xenobiotics with neuroendocrine activity. **Reproductive Toxicology**. V.22, p.164-174, 2006.

CARLSON, N. R. Fisiologia do comportamento. São Paulo: Manole, 2002. 699 p. Tradução de: Physiology of behavior. ISBN 85-204-1161-4.

CARTHY, J.D. **Comportamento animal**. Tradução da segunda edição inglesa revista por HOWSE, P.E. Tradução de Isaias Pessotti e Sílvia Morato de Carvalho. **São Paulo: EDUSP**, 1980. 79 p. 17 CDD-591.518.

CHRISTIAN, M. S. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: HAYES, TAYLOR e FRANCIS (Editores). **Principles and Methods of Toxicology**. Philadelphia, 2001. p.1334.

CLAESSEN D.; ROOS A.M.; PERSSON L. Population dynamic theory of size-dependent cannibalism. **The Royal Society**, v. 271, p. 333-340, 2003.

COCKERHAM, L.G. et al. Ionizing Radiation. In : HAYES, TAYLOR e FRANCIS (Editores). **Principles and Methods of Toxicology**. Philadelphia, 2001. p.699-771.

COMPLETE MOUSE NECROPSY. Hutchinson Câncer Research Center. Disponível em: <[http:// www.fhrc/science/labs/fero/Protocols/necropsy.html](http://www.fhrc/science/labs/fero/Protocols/necropsy.html)>. Acesso em: 10 dez. 2005.

D'AMATO, F.R.; RIZZI, R.; MOLES, A. Aggression and anxiety in pregnant mice are modulated by offspring characteristics. **Animal Behaviour**, v. 72, p. 773-780, 2006.

DEL-CLARO, K.; PREZOTO, F. **As distintas faces do comportamento animal. Juiz de Fora:** 2003 ISBN – 85-8987-01 X

ENNACEUR, A.; MELIANI, K. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats.III. Spatial vs non-spatial working memory. **Behavioural Brain Research**, v.1, n.1, p.83- 92, 1992.

FRANCO, M.G. Animais de Laboratório - O camundongo. São Paulo: Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais, 2004. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/animais.htm>>. Acessado em: 15 Fev. 2006 21:45:00.

FEBO, M., NUMAN M., FERRIS C. F. Funcional magnetic resonance imaging shows oxytocin activates brain regions associated with mother-pup bonding during suckling. **The Journal of Neuroscience**, v.25, n.50, p. 11644-11637, 2005.

FERRARI, P.F. et al. Comparing different forms of male and female aggression in wild and laboratory mice : an ethopharmacological study. **Physiology e Behavior**, v. 60, n. 2, p.549-553, 1996.

FERRER, I. et al. Brain-derived neurotrophic factor does not prevent ionizing radiation-induced apoptosis in the developing rat brain. **Neuroscience Letters**, n. 257, p. 85-88, 1998.

GANGRADE, B.K.; DOMINIC, C.J. Studies of the male-originating pheromones involved in the Whitten effect and Bruce effect in mice. **Biology of reproduction**, v. 31, p.89-96, 1984.

GAO, W.M, *et al.*. Postnatal growth, neurobehavioral and neurophysiologic changes of prenatal low-dose  $\beta$ -radiation from tritiated water in mice. **Neurotoxicology and teratology**, n.24, p.247-254, 2002.

GAZZANIGA, M. S. **The New Cognitive Neurosciences**. 2ed. Ed. Bradford Books, 1999. 1276 p. ISBN: 0-262-07195-9.

GETTO, Ph.; DIEKMANN, O.; ROOS, A.M. On the (dis) advantages of cannibalism. **Mathematical Biology**, v.51, p. 695-712, 2005.

GOBBEL, G. T. et al. Response of postmitotic neurons to X-irradiation: implications for the role of DNA damage in neuronal apoptosis. **The Journal of Neuroscience**, n.18, v.1, p. 147-155, 1998.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Cellular basis of working memory. **Neuron**, v.14, p.477-485, 1995.

HALL, P.A., et al. Effect of low doses of ionizing radiation in infancy on cognitive function in adulthood: Swedish population based cohort study. **British Medical Journal**, n. 328, p.1-5, 2004.

HOUPT, K.A. Conduta maternal y sus aberraciones en pequeñas espécies. **Recent advances in companion animal behavior problems**. Ithaca, Internacional veterinary information service. 2000. < [http:// www.ivis.org](http://www.ivis.org) > Acessado em: 18/08/2006.

HOOD, RD; MILLER, DB. Maternally mediated effects on development. In: Taylor e Francis Editores. **Developmental and reproductive toxicology - a practical approach**. Londres, 2006. P. 93-124.

KESLEY, J. E.; VARGAS, H. Medial septal lesion disrupt spatial, but not nonspatial, working memory in rats. **Behavioral Neuroscience**, v.107, n.4, p.565-574, 1993.

KHERA, K. S. Maternal toxicity – a possible factor in fetal malformation in mice. **Teratology**, n.29, p.411-416, 1984.

\_\_\_\_\_. Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. **Teratology**, n.31, p.129 - 153, 1985.

\_\_\_\_\_. Maternal toxicity of drugs and metabolic disorders – a possible etiologic factor in the intrauterine death and congenital malformation: a critique on human data. **Crit. Rev. Toxicol.**, n.17, p.345-375, 1987.

KREBS, J. R.; DAVIES, N. B., **Introdução à ecologia comportamental**. Tradução de Mauro Ramalho e Cynthia Pinheiro. **São Paulo**: Atheneu, 1996. 420 p. CDD-591.51

LAVI-AVNON, Y.; YADID, G.; OVERSTREET, D. H.; WELLER, A. Abnormal patterns of maternal behavior in a genetic animal model of depression. **Physiology e Behavior**, v. 84, p. 607-615, 2005

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios, conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2004. 698 p. ISBN: 85-7379-383-X

LOMBARDI, J.R.; VANDENBERGH, J.G.; WHITSETT, J.M. Androgen controlo of the sexual maturation pheromone in house mouse urine. **Biology of reproduction**, v. 15, p.179-186, 1976.

LONSTEIN, J. S.; GAMMIE, S. C. Sensory, hormonal and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 869-888, 2002.

LONSTEIN, J. S.; STERN, J. M. Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: c-fos and electrolytic lesion studies in lactating rats. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.9, p. 3364-3378, 1997.

LONSTEIN, J. S.; VRIES, G. J. Sex differences in the parental behavior of rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, p.669-686, 2000.

LORENZ, K. **Os fundamentos da Etologia**. Tradução por Pedro Mello Cruz e Carlos C. Alberts. **São Paulo**: Editora Unesp, 1995. 466 p. ISBN 85-7139-096-7

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. **São Paulo**: Editora Michalany, 1998. 295 p. CDD- 616.07583028.

MINAMISAWA, T. *et al.*. Effects of fetal exposure to gamma rays on aggressive behavior in adult male mice. **J. Radiot. Res.**, v.33, n.3, p.243-249, 1992.

MINAMISAWA, T.; HIROKAGA, K. long- term changes in open field activity of male mice irradiated with low levels of gamma rays at late stage of development. **J. Radiot. Res.**, n.37, p.117-124, 1996.

MOTTA, S. **Comportamento materno e desenvolvimento das crias de ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout,1769) tratadas com lobeira (*Solanum lycocarpum*, St.Hil) no período de lactação** 2000. 60 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

MOOSMANG, S. Role of hippocampal Ca<sub>v</sub>1.2 Ca<sup>2+</sup> channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity an spatial memory. **The Journal of Neuroscience**. V.25, n.43, p. 9883-9892, 2005.

NAKANISHI, K. et al. Altered synaptic activities in cultures of neocortical neurons from prenatally X-irradiated rats. **Neuroscience Letters**, v. 355, p.61-64, 2004.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research**. The national academies press, 2003. 223p. ISBN 03 09505 87-9.

OLAZÁBAL et al. The content of dopamine, serotonin, and their metabolites in the neural circuit that mediates maternal behavior in juvenile and adult rats. **Brain Research Bulletin**, v. 63, p. 259-268, 2004.

ORNOY A.; SALAMON-ARNON J.; BEN-ZUR Z.; KOHN G. .Placental findings in spontaneous abortions and stillbirths. **Teratology**, v.24, p.243-252, 1981.

PAXINOS, G. e WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Austrália: Academic Press Austrália, 1986. Library of Congress Catalog Card Number: 86-71486.

PINKER, S. **Tábula rasa, a negação contemporânea da natureza humana**. Tradução de Laura Teixeira Motta. **São Paulo**: Companhia das Letras, 2002. 684p. ISBN: 85-359-0494-8. Tradução de : The blank slate: the modern denial of human nature.

PINTO, R. M. *et al.*. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of Ginkgo biloba to rats. **Reproductive Toxicology**, 2007. In press.

THE JACKSON LABORATORY. General NMF Histology protocols. Disponível em: <<http://www.nmf.jax.org/protocols/histology-standardfullworkup.html>>. Acessado em: 10 dez. 2005.

RAWLINS, J. N. P. *et al.* Critical determinants of nonspatial working memory deficits in rats with conventional lesions of the hippocampus or fornix. **Behavioral Neuroscience**, v.107, n.3, p.420-433, 1993.

SANTIS, M. D. *et al.* Ionizing radiations in pregnancy and teratogenesis. A review of literature. **Reproductive Toxicology**, n 20, p.323-329, 2005.

SCHMIDT, S.L.; VITRAL, R.W.F.; LINDEN, R. Effects of prenatal ionizing irradiation on the development of the ganglion cell layer of the mouse retina. **International Journal of Developmental Neuroscience**, n.19, p.469-473, 2001a.

\_\_\_\_\_. Depletion of cortical target induced by prenatal ionizing irradiation: effects on the lateral geniculate nucleus and on the retinofugal pathways. **International Journal of Developmental Neuroscience**, n.19, p. 475-483, 2001b.

SHIRAI, K., *et al.* Differential effects of X-irradiation on immature and mature hippocampal neurons in vitro. **Neuroscience Letters**, n. 399, p. 57-60, 2006.

SIENKIEWICZ, Z.J.; SAUNDERS, R. D.; BUTLAND, B. K. Prenatal irradiation and spatial memory in mice: investigation of critical period. **International Journal of Radiation Biology**, n. 62. p. 211-219, 1992 apud VITRAL, R. W. F.; VITRAL, C. M.; DUTRA, M. L. Callosal agenesis and absence of primary visual cortex induced by prenatal X rays impair navigation's strategy and learning in tasks involving visuo-spatial working but not reference memory in mice. **Neuroscience Letters**, v. 395, n.3, p.230-234, 2006.

SOUZA, M. H. F. **Utilização da radiação ionizante pré-natal em camundongos, visando a modelagem de aspectos neuropatológicos da agenesia do corpo caloso** 1995. 92 f. Tese (Mestrado em Biologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

VERHEYDE, J.; BENOTMANE, M. A. Unraveling the fundamental molecular mechanisms of morphological and cognitive defects in the irradiated brain. **Brain Research Reviews**, 2006

VITRAL, R. W. F.; VITRAL, C. M.; DUTRA, M. L. Callosal agenesis and absence of primary visual cortex induced by prenatal X rays impair navigation's strategy and learning in tasks involving visuo-spatial working but not reference memory in mice. **Neuroscience Letters**, v. 395, n.3, p.230-234, 2006.

VITRAL, R. W. F. **Plasticidade visual morfofuncional após dano cerebral precoce por irradiação ionizante pré-natal** 2001. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

WAN, R. Q.; PANG, K.; OLTON, D. S. Hippocampal and amygdaloide involvement in nospatial and spatial working memory in rats: effects of delay and interference. **Behavioral Neuroscience**, v.108, n.5, p.866- 882, 1994.

YUAN, H. *et al.*. Effects of fractionated radiation on the brain vasculature in a murine model: blood-brain barrier permeability, astrocyte proliferation, and ultrastructural changes. **Int. J. radiation Oncology Biol. Phys**, v. 66, n.3, p.860-866, 2006.

## ANEXO 1 – Tabelas com as variáveis Maternas e Fetais

Tabela 2 Variáveis Maternas

	Grupo Irradiado X ± DP (n)*	Grupo Controle X ± DP (n)*
Peso I- 1	30,8 ± 2,5 (16)	30,0 ± 2,8 (15)
Peso I- 15	40,3 ± 4,2 (16)	41,1 ± 4,4 (15)
Peso I- 19	46,4 ± 5,0 (16)	48,6 ± 6,0 (15)
Peso Pós- histerectomia	36,4 ± 3,7 (16)	37,5 ± 2,7 (13)
Ganho de Peso - gestação	5,60 ± 2,6 (16)	6,83 ± 2,1 (13)
Peso dos Ovários	20,9 ± 3,4(16)	23,0 ± 3,8 (15)
Peso dos Cérebros	461,1 ± 32,3 (16)	469,4 ± 51,0 (15)
Total de Corpos Lúteos	9,8 ± 2,7 (16)	10,1 ± 2,0 (15)
Implantes Totais	9,7 ± 2,6 (16)	9,6 ± 2,4 (15)
Número de Fetos Vivos	6,4 ± 2,5 (16)	6,7 ± 2,7 (15)
Reabsorções	3,4 ± 2,5 (16)	2,8 ± 1,5 (15)
Fetos Mortos	1,3 ± 0,6 (16)	1,3 ± 0,6 (15)
Fetos Grau I	5,7 ± 2,6 (13)	6,6 ± 2,7 (15)
Fetos Grau II	2,0 ± 1,8 (14)	1,0 (1)
Fetos Grau III	2,14 ± 1,1 (15)	1,0 (1)
Proporção Grau I	71,80%	98%
Proporção Grau II	13,50%	1%
Proporção Grau III	14,60%	1%

\* n = número de fêmeas

Medida do peso - mg

Tabela 3. Variáveis Fetais

	Grupo Irradiado X ▪ ± DP (n)*	Grupo Controle X ▪ ± DP (n)*
Peso Fetal	1077,1 ± 152,6 (15)	1241,2 ± 64,2 (15)
Peso Grau I	1056,9 ± 145,4 (12)	1248,0 ± 61,3 (15)
Peso Grau II	1087,2 ± 165,9 (14)	961,8 (1)
Peso Grau III	1061,1 ± 187,1 (15)	876 (1)
Peso dos Fetos Mortos	1088,0 (2)	802,4 (3)
Peso das Placentas dos Fetos Vivos	111,4 ± 14,8 (15)	115,3 ± 18,5 (15)
Peso das Placentas dos Fetos Mortos	99,4 (1)	93,9 (3)

▪ Média por ninhada

\* n = número de fêmeas

Peso em mg

## **ANEXO 2 -Artigo Enviado para a Revista Behavioral Neuroscience**

Cannibalism in female Swiss mice exposed to ionizing irradiation during pregnancy.

Juiz de Fora, 8<sup>th</sup> July, 2007

### **Abstract**

Irradiated female Swiss mice presented unexpected cannibalistic behaviors during an experiment involving tests for operational memory and reference assessment. This finding is not mentioned in previous works, which lead us to a more detailed study of the incidence and the possible causes related to that abnormal behavior. One group of 31 pregnant Swiss mice was exposed to whole body ionizing irradiation of X-rays (300cGy). Those animals were divided into two groups, one for the analysis of prenatal and another for postnatal periods. The data indicate that irradiation did not induce stress, intoxication or endocrine changes in mothers, however, irradiated female showed a high incidence (86.67%) of cannibalism. Fetuses from irradiated mothers had a decreased body weight ( $1077.1 \text{ mg} \pm 152.6 \text{ n}=16$ ) when compared to the control group ( $1241.2 \text{ mg} \pm 64.2 \text{ n}=15$ ) and also presented 28.1% of hypo activity, what probably contributed to maternal cannibalism. The cannibalism, as a selective behavior of most apt pups, may generate a homogenizing of samples, which is undesirable for experiments regarding memory and learning tests.

**Keywords:** Ionizing radiation, cannibalism, maternal behavior, memory, learning.



## Introduction

Maternal behavior is considered a complex of sequences of stereotyped behaviors, such as lactation posture, pups licking, nest care, getting litter grouped and pups defense against invaders (Bonsignore et al., 2006; Lonstein e Vries, 2000). In litter defense, malformed or weak pups are considered a threat to the litter survival and those pups can be cannibalized by mothers (Christian, 2001).

During an experiment for comparing the operational and reference memory tests performance to brain cortical laminar disorganization, adult male Swiss mice from mothers who were exposed to ionizing radiation on 15<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> post insemination days would have their performance on Lashley labyrinth and escape to aquatic test assessed and compared to histological alterations. However, in the beginning of the experiment, it was observed that irradiated mothers showed a high incidence of cannibalism, a fact that has not been mentioned in previous works with the same goal (Minamisawa et al., 1992; Schmidt, Vitral e Linden, 2001a,b; Vitral, Vitral e Dutra, 2005).

The abnormal behavior of irradiated mothers was preventing a sufficient number of animals for the tests; this fact evidenced the necessity of a detailed analysis of the cannibalism incidence in irradiated animals, as well as to identify the causes of this behavior. So, the present work aimed to assess the pups survival index during neonatal and infancy periods, and also the alterations of fetal development, of pups from Swiss mice exposed to ionizing radiation during pregnancy.

## **Material e Methods**

### ***Animals***

Twenty male and 60 female Swiss mice, 2-4 months old, weighing around 30g from the Center of Reproductive Biology vivarium, were used. The mice were housed in plastic cages, kept in light-darkness cycles of 12 hours in ventilated stands with controlled temperature (23°C) and humidity. They were fed on rat chow pellets and received filtered water *ad libitum*.

Animal care and the experimental protocol followed the principles and guidelines suggested by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the Ethical Committee of the Federal University of Juiz de Fora (UFJF) which follows the international rules (EEC Directive – 86/609/EEC) (Protocol number 056/2006 – CEA).

### ***Mating***

Females and males were housed together (3:1) overnight (from 6 pm to 7 am). Everyday at 8 am females were checked for the presence of vaginal plugs. The presence of vaginal plugs indicated the beginning of gestation (post insemination 1, D-1).

### ***Experimental groups***

The pregnant mice were randomly divided into four experimental groups: [T1] consisting of 15 females irradiated on D-15 for post birth observation and [C1] five no irradiated control female; [T2] with 16 females irradiated on D-15 for the analysis of prenatal period, and [C2] 15 no irradiated control females.

### ***Irradiation of animals***

Females on the 15<sup>th</sup> post insemination day were transported in micro isolators, in a car with air conditioning (23°C), from the laboratory until the irradiation place, which was around three kilometers distant (ASCOMCER Hospital, Juiz de Fora, MG).

For irradiation, animals were individually placed into small acrylic containers (10.0 X 5.0 X 2.0 cm). Mice were exposed to whole body X-irradiation using a linear accelerator apparatus of 6 MeV electron photonic energy. Permanency in cages for irradiation exposure was no longer than three minutes.

The dose at the monitor was 139 UM, with a source-target distance of 100cm. The opening field of the collimator was 10 X 6 cm and the profundity was 2 cm. The total absorbed dose was of 3 Gy (300cGy). The total irradiated dose was divided into two parallel and opposite 150 cGy fields, so that the whole body surface was uniformly exposed.

The irradiation procedure was always carried out together with the physique responsible for the Radiotherapy Service from ASCOMCER Hospital, and the radiation procedure had its dosimetry calculated according to the rules of the International Atomic Energy Agency.

The females from control group were not exposed to any treatment during the whole pregnancy.

### ***Postnatal development assessment***

Irradiated [T1] and control [C1] females were housed in individual cages two days before the probable delivery day, receiving food and water *ad libitum*.

The cages were observed daily for the checking of behaviors of nest

construction, nipples licking and clinical signs of toxicity, such as: piloerection, hyper or hypo activity inside the cage, stereotyped movements as muzzle scratching, paw licking and biting, diarrhea, polyuria, oliguria, chromodacryorrhea, bleeding (Hood e Miller, 2006; Khera, 1984; Khera, 1987) and also for delivery date registration.

After delivery, daily until 21<sup>st</sup> day – corresponding to neonatal and infancy period (Beck, 2006) – in the morning, pups were observed, counted, the cannibalized or dead animals were identified.

It was calculated the early cannibalism ratio (number of pups cannibalized until 4<sup>th</sup> postnatal day / number of live pups X 100); late cannibalism (number of pups cannibalized after 4<sup>th</sup> postnatal day / number of live pups X 100) and the survival index at separation's day (number of live pups on 21<sup>st</sup> postnatal day / number of live pups X 100).

#### *Prenatal development assessment*

Irradiated [T2] and control [C2] females were weighed on D-1, D-15 and D-19, on the latter, it was recorded the total body weight and the corrected weight (body weight – weight of uterus and its contents, uterine horns and ovaries).

Mice were killed through cervical dislocation on D-19 (this procedure was accomplished by experienced technicians). It was not possible to sedate the female before the procedure due to the necessity of assessment of pups motor activity at birth, which could be affected by maternal sedation (National Academy of Sciences, 2003).

After laparotomy, the ovaries were removed, weighed and the corpora lutea were counted under stereomicroscope.

The uterine horns were longitudinally sectioned, and the number of live and dead fetuses, of implantations and resorptions was recorded.

The presence of external malformations was verified and motor activity was classified (hyper or hypo activity).

The fetal activity classification method for assessment of fetal vitality and motor activity was carried out by two different observers at the same time, and one of them did not know from what experimental group the female belonged.

The spontaneous motor activity was passively observed during 30 seconds after amniotic cavity opening, and if there was not spontaneous activity, the fetuses were stimulated by a gentle touch with a tweeze. Animals were classified as:

Degree I – Presence of spontaneous movements in 30 seconds after amniotic cavity opening.

Degree II – Presence of motor activity similar to degree I after tactile stimulus.

Degree III – Presence of less intense and amplitude motor activity when compared to degree I, obtained after tactile stimulus.

Degree IV – Hyper reflexes to spontaneous movements or after tactile stimulus.

Fetuses and placenta were weighed per litter. Fetuses with malformations or with alterations in motor activity were weighed separately, so were their respective placentae.

### ***Statistical analysis***

The continuous data and the homocedastic samples were analyzed using

Student t test. The ratios were analyzed using Chi-square and Fisher's exact test. Data with a non normal distribution were processed by Kruskal- Wallis and Mann-Whitney tests ( $\alpha = 0.05$ )

## **Results**

### ***Postnatal development assessment***

Female from both groups presented similar pre-delivery behaviors, such as nest construction and nipple preparation,

There were no signs of early or late toxicity related to the radiation.

Newborns from irradiated mothers (T1) were visible smaller and less active than those from control group. These animals were not weighed nor assessed through manipulation in order not to interfere with behavior observation.

In 15 litters from group T1, there were 13 cases of cannibalism, corresponding to 86.67% (Fig. 1). Considering the immediate cannibalism cases until 4<sup>th</sup> postnatal day, 11 pups were cannibalized from a total number of 72 born alive (15.28%). Lately, 11 from 61 survivors were cannibalized by mothers (18.03%). Two pups, on 14<sup>th</sup> and 16<sup>th</sup> postnatal days, were cannibalized. As Swiss mice are separated from their mothers on 20<sup>th</sup> postnatal day, this was a very anomalous maternal behavior, with the elimination of young pups.

The survival rate at the moment of separation, on 21<sup>st</sup> postnatal day was of 44.21%, from which, in three cases there was 0 survivals in group T1 (20%). The three female that cannibalized the whole litter were killed and underwent necropsy, soon after the death of all pups. It was observed a numerical discrepancy between placental and the number of observed newborns (21 implantations for 10 newborns).

In group C1 it was not observed the occurrence of cannibalism.

The survivors pups from irradiated group (T1) showed abnormal behavior in adulthood. After 60 days postnatal, it was observed hyperactivity movements, or with circular repetitive patterns and excessive aggressive behavior, even among females.

In control group (n = 5) all mice survived and presented behaviors typical of its species.

### ***Prenatal development assessment***

#### *Maternal variables*

There were no clinical signs for maternal toxicity during ionizing radiation exposition. Changes in maternal body weight during pregnancy did not show significant differences and there was also no variation in final weight gain between control group and the one exposed to ionizing radiation, as is depicted in figure 1.

There were no significant alterations between control and irradiated groups regarding variables related with maternal reproductive performance: weight of ovaries, mean number of corpora lutea, of implantations, of live and dead fetuses, and of resorptions (table 1)

#### *Fetal variables*

No external malformations were detected in fetuses from control or irradiated mice.

The ratio of hypoactive pups was significantly increased in irradiated group (28.1%), while only 2% of animals from control group showed any disturbance on motor activity.

Fetal body weight of irradiated group (1077.1 mg  $\pm$  152.6) was significantly

smaller than control group (1241.2 mg  $\pm$  64.2) as is shown in figure 2.

There were no differences in newborns body weight from irradiated mothers regarding the degrees of motor activity

Placenta weights from irradiated (111.4mg  $\pm$  14.8 n = 16) and control (115.3mg  $\pm$  18.5 n = 15).groups did not present significant differences.

## **Discussion**

Anomalous parental behavior, such as cannibalism can occur in conditions of super population, food deprivation and competitive elimination (Claessen, Roos e Persson, 2003; Getto, Diekmann e Roos, 2005; Ferrari et al., 1996), what was not the case of the present work, since the animals were kept under controlled environmental conditions

When submitted to stress, intoxication, or when mothers have endocrinal alterations, they can present abnormal behaviors (Bridges et al., 1990; D'amato, Rizzi e Moles, 2006; Febo, Numan e Ferris, 2005; Khera, 1984; Khera, 1985; Khera, 1987; Lonstein e Vries, 2000; Lonstein e Gammie, 2002; Guidelines, 2003; Pinto et al., 2007). In the present work there were no signs of stress or maternal intoxication (Hood e Miller, 2006) in irradiated mothers, suggesting that irradiation was not an important ansiogenic stimulus, nor caused any important toxic effect. It is common to have a slight weight decrease after irradiation (Cockerham, 2001) and irradiated mothers showed a slight decrease in body weight, although it was not significant.

Hormones participate in the genesis and maintenance of maternal behavior observed during prenatal and weaning periods (Lonstein e Vries, 2000;



Lonstein e Gammie, 2002). Ionizing radiation causes diverse lesions, particularly in cells during mitotic division and can cause a decrease in ovarian and hypophysis's hormone production (Cockerham, 2001; Santis et al., 2005). In the present experiment, it seems that there were no reduction in hormonal levels, since the number of corpora lutea and ovaries' weight were not different between the groups. The weight of a hormone secretor organ is an indirect measure of its functional capacity, being frequently used for this proposal (Calamandrei et al., 2006).

The similar number of corpora lutea indicates that the number of ovulations was similar; therefore, the hormonal production was also similar between groups. On the other hand, the similar number of implantations and of live fetuses, and the weight of placenta is also an indicative that hormonal conditions, necessary for keeping pregnancy was similar between groups.

Pups induce maternal behavior through tactile, smelling and sound stimulus (Lonstein e Vries, 2000; Lonstein e Gammie, 2002). The presence of malformed, hypothermic, hypoactive or pups with vocalization problems can induce abnormal maternal behaviors such as no gathering the pups, absence of weaning posture and cannibalism (Christian, 2001). During the experiment of postnatal observation, the pups were manipulated by the same person and only the cages were clean, in order not to induce any behavioral or smelling change in pups that could induce mothers' cannibalism (National Academy of Sciences, 2003).

In the group of pups irradiated intra-uterus it was observed abnormal behaviors in adulthood for the species, such as, motor changes, aggressiveness, and low body weight, possibly due to neuronal cellular reduction after ionizing radiation, what is reflected in adult animals' behavior and can be compared to humans neurological diseases (Altman, 1987; Hall, 2004; Minamisawa et al., 1992).

As malformed pups were not observed, it was not possible to link malformations to maternal cannibalization. But it is suspected to have happened, since mothers that cannibalized the whole litter, had more placental stream beds than pups counted at birth.

Exposition to ionizing radiation during pregnancy is related to the birth of low weight fetuses, and even in humans, this effect seems to be due to vascular and structural lesions (Santis et al., 2005). In the present work, pups from irradiated mothers showed a decreased postnatal weight gain, what is in accordance with previous works (Gao et al., 2002; Minamisawa et al., 1992).

Although it was not measured, it was observed that low active pups were preferentially cannibalized by mothers, indeed, there were 28.1% hypoactive fetuses in irradiated mothers while only 2% of fetuses from control mothers were hypoactive.

## **Conclusion**

The cannibalistic behavior of Swiss mice exposed to ionizing radiation during pregnancy was probably due to changes in fetal motor activity.

The findings of this work generate a doubt regarding the use of survivors of irradiated animals for memory and learning assessment in labyrinth and Morris water maze, since it could constitute a homogenized sample pre selected by maternal cannibalism. In other hand, the results of these tests could be altered not only by memory and learning disturbances, but also due to motor problems in animals.

## References

Altman, J. (1987). Morphological and behavioral markers of environmentally induced retardation of brain development: an animal model. *Environmental Health Perspectives*, 74,153-168.

Beck et al..(2006). Non clinical juvenily toxicity testing. In:Taylor e Frances (Eds). *Developmental and Reproductive toxicology a practical approach* (pp. 263-327). Flórida.

Bonsignore, L.T. et al.. (2006). Acute perinatal asphyxia at birth has long-term effects on behavioural arousal and maternal behaviour in lactating rats. *Behavioural Brain Research*, 172, 54-62.

Bridges, R. S. et al.. (1990). Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 8003-8007.

Calamandrei, G. et al..(2006). Efficient testing strategies for evaluation of xenobiotics with neuroendocrine activity. *Reproductive Toxicology*, 22, 164-174.

Christian, M. S. (2001). Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In Hayes, Taylor e Francis (Ed), *Principles and methods of toxicology* (pp 1334). Philadelphia.

Claessen D.; Roos A.M. e Persson L. (2003). Population dynamic theory of size-dependent cannibalism. *The Royal Society*, 271, 333-340.

Cockerham, L.G. (2001). Ionizing radiation. In Hayes, Taylor e Francis (Ed.), *Principles and methods of toxicology* (pp. 699-771). Philadelphia.

D'Amato, F.R.; Rizzi, R. e Moles, A. (2006). Aggression and anxiety in pregnant mice are modulated by offspring characteristics. *Animal Behaviour*, 72, 773-780.

Febo, M., Numan M. e Ferris C. F.(2005). Funcional magnetic resonance imaging shows oxytocin activates brain regions associated with mother-pup bonding during suckling. *The Journal of Neuroscience*, 25, 11644-11637.

Ferrari, P.F. et al.. (1996). Comparing different forms of male and female aggression in wild and laboratory mice : an ethopharmacological study. *Physiology e Behavior*, 60, 549-553.

Gao, W.M, et al..(2002). Postnatal growth, neurobehavioral and neurophysiologic changes of prenatal low-dose  $\beta$ -radiation from tritiated water in mice. *Neurotoxicology and teratology*, 24, 247-254.

Getto, P.; Diekmann, O. e Roos, A.M. (2005). On the (dis) advantages of cannibalism. *Mathematical Biology*, 51, 695-712.

Hall, P. et al.. (2004). Effect of low doses of ionizing radiation in infancy on cognitive function in adulthood: Swedish population based cohort study. *British Medical Journal*, 328, 1-5.

Hood, R.D e Miller, D.B.(2006). Maternally mediated effects on development. In: Taylor e Francis (Eds). *Developmental and reproductive toxicology - a practical approach* (pp 93-124) Londres.

Khera, K. S. (1984). Maternal toxicity – a possible factor in fetal malformation in mice. *Teratology*, 29, 411-416.

Khera, K. S.(1985). Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratology*, 31, 129 – 153.

Khera, K. S.(1985). Maternal toxicity of drugs and metabolic disorders – a possible etiologic factor in the intrauterine death and congenital malformation: a critique on human data. *Crit. Rev. Toxicol.*, 17, 345-375.

Lonstein, J. S. e Vries, G. J. (2000). Sex differences in the parental behavior of rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24, 669-686.

Lonstein, J. S. e Gammie, S. C. (2002). Sensory, hormonal and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26, 869-888.

Minamisawa, T. et al..(1992). Effects of fetal exposure to gamma rays on aggressive behavior in adult male mice. *J. Radiot. Res.*, 33, 243-249.

Minamisawa, T. e Hirokaga, K. (1996). Long- term changes in open field activity of

male mice irradiated with low levels of gamma rays at late stage of development. *J. Radiat. Res.*, 37, 117-124.

National Academy of Sciences. (2003) *Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research*. The national academies press.

Pinto, R. M. et al.. (In press). Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of Ginkgo biloba to rats. *Reproductive Toxicology*.

Santis, M. D. et al. (2005). Ionizing radiations in pregnancy and teratogenesis. A review of literature. *Reproductive Toxicology*, 20, 323-329.

Schmidt, S. L., Vitral, R. W. F. e Linden,R. (2001a). Effects of prenatal ionizing irradiation on the development of the ganglion cell layer of the mouse retina. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19, 469-473.

Schmidt, S.L., Vitral, R.W.F.e Linden, R. (2001b). Depletion of cortical target induced by prenatal ionizing irradiation: effects on the lateral geniculate nucleus and on the retinofugal pathways. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19, 475-483.

Vitral, R. W. F., Vitral, C. M. e Dutra, M. L. Callosal agenesis and absence of primary visual cortex induced by prenatal x rays impair navigation's strategy and learning in tasks involving visuo-spatial working but not reference memory in mice. (2006). *Neuroscience Letters*, 395, n.3, 230-234.

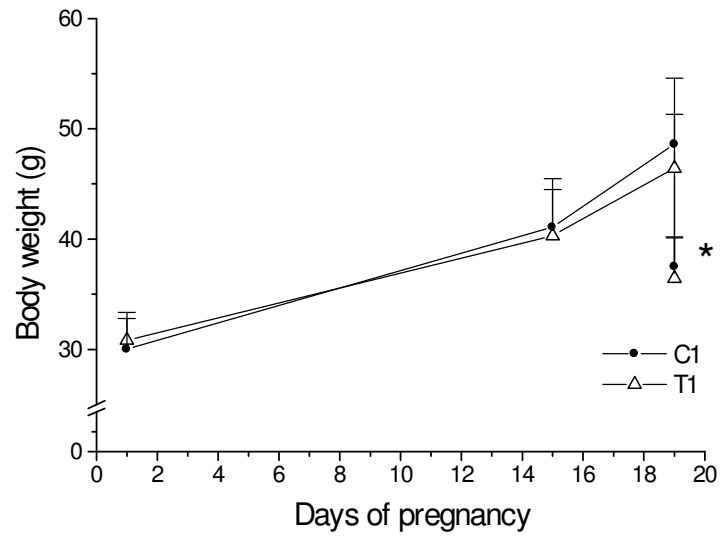


Figure 1. Maternal body weight in animals from control (C1) and irradiated (T1) groups. \* Corrected body weight. Bars represent standard deviation.

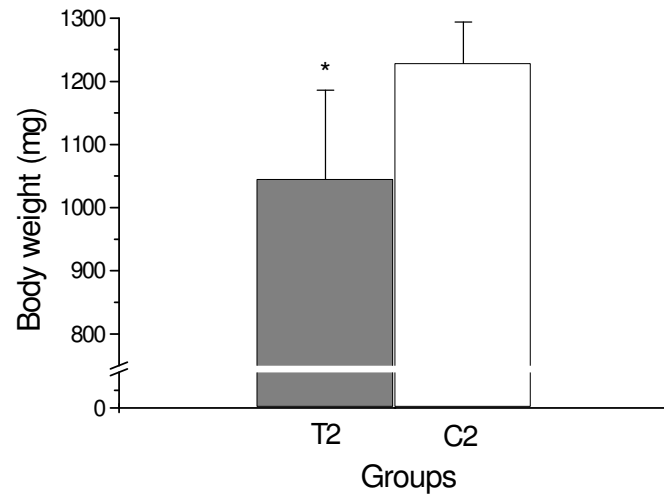


Figure 2. Fetal body weight (mg) of irradiated (T2) and control (C2) mothers. Bars represent standard deviation. \*  $p < 0.001$ .



Table 1. Maternal variables of T2 and C2 mice irradiated on D-15

Variables	Groups	
	Treated 2	Control 2
Ovaries' weight (mg)	20.91 ± 3.43 (16)	22.26 ± 2.73 (15)
Mean number of corpora lutea	9.8 ± 2.7 (16)	10.1 ± 2.0 (15)
Mean number of implantations	9.7 ± 2.6 (16)	9.6 ± 2.4 (15)
Mean number of live fetuses	6.4 ± 2.5 (16)	6.7 ± 2.7(15)
Mean number of resorptions	3.4 ± 2.5 (16)	2.8 ± 1.5 (15)
Mean number of dead fetuses	1.3 ± 0.6 (16)	1.3 ± 0.6 (15)

Results are expressed as mean ± standard deviation (number of mice). p>0.05.

Table 2. Fetal body weight in accordance with the degrees of motor activity of irradiated group.

<b>Degrees of motor activity</b>	<b>Body weight (mg) *</b>
Degree I	1056.9 ± 145.4 (12)
Degree II	1087,2 ± 165.9 (14)
Degree III	1061.1 ± 187.1 (15)

Results are expressed as mean ± standard deviation (number of females). \*p>0.05.

---

Behavioral Neuroscience

Manuscript:  
Cannibalism in  
female

## Manuscript Submission Portal

Swiss mice exposed to ionizing irradiation during pregnancy.

Dr. Piroma:

Your manuscript has been sent to the editorial office. The manuscript coordinator will send an electronic confirmation, with your manuscript number, when the manuscript file is formally opened in the editorial office.

---

Journals Back Office is a product of the American Psychological Association, Copyright © 2005.  
If you have questions or comments about this site, please send them to [jbo@apa.org](mailto:jbo@apa.org).  
Questions regarding specific manuscripts should be directed to the editorial office of the journal to which it was submitted.

Dear Dr. Piroma-

We are in receipt of your manuscript titled Cannibalism in female Swiss mice exposed to ionizing irradiation during pregnancy.. You should receive some notice of the status of your manuscript within 60 to 90 days. During this period you should not submit your manuscript to another journal. If your manuscript is accepted for publication, you will be required to transfer your copyright to APA, provide full disclosure of any conflict of interest, and certify compliance with APA ethical principles.

Your manuscript number is 2007-0163. To receive an e-mail detailing the history of your manuscript visit [http://www.jbo.com/jbo3/dsp\\_checkhistory.cfm?journal\\_code=bne2](http://www.jbo.com/jbo3/dsp_checkhistory.cfm?journal_code=bne2) and enter your lastname as username and your manuscript number as password.

If your manuscript is accepted for publication, you will be required to transfer your copyright to APA, provide full disclosure of any conflict of interest, and certify compliance with APA ethical principles. Also, please read the APA's Open Letter to Authors located at <http://www.jbo.com/jbo3/OpenLetterToAuthors.doc>.

Sincerely,  
Behavioral Neuroscience Editorial Office

Esta mensagem foi verificada pelo E-mail Protegido Terra.  
Scan engine: McAfee VirusScan / Atualizado em 16/07/2007 / Verso:  
5.1.00/5075 Proteja o seu e-mail Terra: <http://mail.terra.com.br/>