ESTHER LOPES RICCI ADARI CAMARGO

Exposição perinatal de ratos ao glifosato (roundup®): efeitos sobre o comportamento materno e sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta

São Paulo

2014

ESTHER LOPES RICCI ADARI CAMARGO

Exposição perinatal de ratos ao glifosato (roundup®): efeitos sobre o comportamento materno e sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta

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

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa

São Paulo
2014

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2983
FMVZ

Camargo, Esther Lopes Ricci Adari

Exposição perinatal de ratos ao glifosato (roundup®): efeitos sobre o comportamento materno e sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta / Esther Lopes Ricci Adari Camargo. -- 2014.
117 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Helenice de Souza Spinosa.

1. Glifosato-Roundup®. 2. Perinatal. 3. Desenvolvimento. 4. Comportamento. 5. Neurotransmissores.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Exposição perinatal de ratos ao glifosato (Roundup®): efeitos sobre o comportamento materno e sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta", protocolado sob o nº 2010/2010, utilizando 60 (sessenta) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29/9/2010.

We certify that the Research "Perinatal exposure of rats to glyphosate (Roundup®): effects on maternal behavior and the physical and neurobehavioral development of the offspring from birth to adulthood", protocol number 2010/2010, utilizing 60 (sixty) rats, under the responsibility Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/29/2010.

São Paulo, 28 de maio de 2014.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente no exercício

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CAMARGO, Esther Lopes Ricci

Título: Exposição perinatal de ratos ao glifosato (roundup®): efeitos sobre o comportamento materno e sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta

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

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a duas das pessoas que mais amo
e que infelizmente não está mais comigo.
Vô Salvador e Vó Flora, obrigada por todo o amor,
vocês sempre estarão vivos em meu coração!
Tenho certeza que ainda vamos nos reencontrar.
Amo muito vocês!!!!

Agradecimentos

À Deus, que é a minha força, minha alegria e meu porto seguro. Nunca me abandonou e não me abandonará jamais. Obrigada Jesus!

A Universidade de São de Paulo, por me proporcionar o privilégio de estudar.

A professora Helenice de Souza Spinosa, obrigada por mais esta jornada juntas, com você aprendi muito não só cientificamente, mas também muitas coisas que vou levar para o resto da minha vida. Foi uma honra conviver com você todos esses anos. Muito Obrigada!!!

A minha sempre orientadora Maria Martha Bernardi, desde a graduação você tem sido não apenas minha orientadora, mas também amiga, conselheira, uma mãezona!!!! Agradeço muito a Deus por te colocado você na minha vida! Obrigada!!!!

Ao meu marido Diogo, obrigada por não me deixar desistir, obrigada pelo companheirismo, só nos dois sabemos o trabalho que te dei. Esta conquista também é sua! Te amooooo!!

Aos meus pais, posso passar o resto da minha vida agradecendo e assim mesmo não será o suficiente por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim. Tudo o que eu alcançar sempre será graças a vocês! Amo vocês!!!

Aos meus irmãos Rachel e Rodrigo, e minha linda sobrinha Rafaela, obrigada por fazerem parte da minha vida, sei que sempre posso contar com vocês. Amo vocês!!!

A minha família toda, em especial Sula, Ronaldo, André e tia Lourdes. Obrigada por sempre me apoiarem e me incentivarem, vocês são muito especiais para mim! Amo vocês!!!

A sempre amiga Dani, obrigada pelas muitas conversas, risadas e almoços que já fazem parte da minha vida. Amo você e sua família!

Aos amigos do VPT, que contribuíram com alguma etapa deste trabalho: Thaisa, Natalia, Virgínia, Sayuri, Thiago Marinho, Thiago Kirsten, e em especial André Fukushima pelas muuuuitas ajudas!

As amigas queridas, Maria Lucila e Miriam Ribeiro, por todo apoio e incentivo. Vocês fizeram parte diretamente desta conquista. Obrigada!

Ao professor Antônio Carlos Bianco, por me receber em seu laboratório e abrir meu olhos para outras perspectivas científicas.

Aos meus queridos alunos do Mackenzie, obrigada por participarem da minha pesquisa, por me apoiarem e me incentivarem, aprendi muito com cada um de vocês.

A Universidade Presbiteriana Mackenzie, por apoiar meus sonhos! Em especial ao meu chefe Adriano Monteiro, pois sempre que precisei pude contar com seu apoio e compreensão.

Aos funcionários do biotério, pelos cuidados dispensados aos animais utilizados nos experimentos.

A todos os funcionários da secretaria, laboratório e biblioteca do VPT, por toda ajuda sempre que necessário.

Por último, mas não menos especial a minha filha Maria Eduarda, que ainda está no meu ventre, mas já é a grande alegria da minha vida e o motivo que me faz querer sempre mais da vida. Filha, ainda não pude ver seu rostinho nem te tocar, mas meu amor por você já é incondicional. Te amooo!

Toda honra e toda glória sejam dadas a Jesus Cristo.

RESUMO

CAMARGO, E.L.R.A. Exposição perinatal de ratos ao glifosato (Roundup®): efeitos sobre o comportamento materno e sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta. [Perinatal exposure of rats to glyphosate (Roundup ®): effects on maternal behavior and the physical and neurobehavioral development of the offspring from birth to adulthood]. 2014. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O glifosato é um herbicida utilizado na agricultura para o controle de plantas daninhas. No Brasil o glifosato é comercializado com vários nomes, dentre eles Roundup®; esses produtos são acrescidos de ingredientes ditos inertes que permitem a penetração do glifosato através da membrana plasmática da planta, potencializando a sua ação, além de propiciar maior estabilidade e potencial de bioacumulação. Considerando que a presença de certas substâncias químicas em formulações comerciais de glifosato pode aumentar sua toxicidade e que há carência de estudos sobre a toxicologia do desenvolvimento com essas formulações, o presente estudo investigou os efeitos da exposição perinatal de ratos ao Roundup®, a fim de avaliar o comportamento e neuroquímica cerebral materna, bem como o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole, desde o nascimento até a idade adulta. Para tanto, ratas prenhes receberam 50, 100 e 150 mg/kg do 15^o dia de gestação até o 7^o dia da lactação. Os resultados mostraram que o glifosato-Roundup® não alterou o peso materno durante os períodos de exposição ao herbicida e tampouco o consumo de água e ração das ratas, sugerindo ausência de toxicidade materna. Por outro lado, observou-se que o número de filhotes vivos de todos os grupos de ratas expostas ao herbicida foi menor do que aquele das fêmeas do grupo controle. Nas ratas expostas ao glifosato-Roundup® observou-se redução de atividade geral no campo aberto na maior dose, prejuízo no comportamento materno (CM) e no comportamento materno agressivo (CMA), bem como no hipotálamo aumento da atividade do sistema dopaminérgico e redução da atividade do sistema serotoninérgico, enquanto no hipocampo e estriato houve diminuição da atividade do sistema dopaminérgico. Esses achados sugerem que o aumento da atividade do sistema dopaminérgico hipotalâmico, por reduzir a liberação de

prolactina, um hormônio essencial para a expressão do CM, prejudicou a manifestação desse comportamento. No mesmo sentido, a serotonina e dopamina por modularem os efeitos da ocitocina, um peptídeo importante no controle e na eliciação do CM e CMA, podem ter contribuído para os presentes achados. Quanto ao estudo dos parâmetros de desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole, não foram modificados pela administração do herbicida. No presente trabalho foi avaliada também a atividade geral da prole na infância e na idade adulta, mostrando que as alterações foram pontuais tanto na prole masculina como na feminina, não caracterizando alterações motoras ou emocionais. Quanto ao comportamento de brincar de luta, a administração do glifosato-Roundup® reduziu apenas o *pinning* tanto de ratos machos como de fêmeas, sem alterar outros parâmetros deste comportamento. A duração e frequência do *pinning* são consideradas como parâmetros que expressam o início do comportamento social do rato. Desta forma, nestes animais não foram estabelecidos os padrões de comportamento social durante o desenvolvimento, porém aqueles relacionados com o comportamento de luta e sexual foram preservados. Na idade adulta, não foram observadas alterações na interação social de ratos e ratas expostos ao herbicida, ou seja, não promoveu efeitos em longo prazo no comportamento social. Quanto aos achados de neuroquímica cerebral da prole adulta exposta ao herbicida, foram encontradas alterações nos diferentes sistemas de neurotransmissão, contudo a ausência de alterações relevantes na atividade geral e na interação social das proles masculina e feminina adultas, não foi possível especular sobre o envolvimento desses sistemas de neurotransmissão com esses comportamentos. Esses achados em conjunto, mostraram que a exposição perinatal a diferentes doses de glifosato-Roundup® promoveu prejuízo no comportamento materno, os quais foram associados aos sistemas de neurotransmissão cerebrais, e na prole, embora não tenham sido observados efeitos no desenvolvimento físico e neurocomportamental, ocorreram alterações comportamentais na infância que se estenderam até a idade adulta.

Palavras-chave: Glifosato-Roundup®. Perinatal. Desenvolvimento. Comportamento. Neurotransmissores.

ABSTRACT

CAMARGO, E.L.R.A. **Perinatal exposure of rats to glyphosate (Roundup ®): effects on maternal behavior and the physical and neurobehavioral development of the offspring from birth to adulthood.** [Exposição perinatal de ratos ao glifosato (Roundup®): efeitos sobre o comportamento materno e sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta]. 2014. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Glyphosate is a herbicide used in agriculture to control weeds. In Brazil glyphosate is marketed under several names, including Roundup ®. Ingredients considered inert are added to these products in order to allow the penetration of glyphosate across the plasma membrane of the plant, increasing its action, as well as providing greater stability and bioaccumulation potential. Considering that the presence of certain chemicals in commercial formulations of glyphosate may increase its toxicity and that there are insufficient data on the toxicology of development using these formulations, the present study investigated the effects of perinatal exposure of rats to Roundup®, to assess behavior and maternal brain neurochemistry, as well as physical and neurobehavioral development of the offspring from birth to adulthood. To this end, pregnant rats received 50, 100 and 150 mg/kg from the 15th gestation day to the 7th lactation day. The results showed that glyphosate-Roundup® did not alter maternal weight during neither periods of exposure to the herbicide nor the consumption of water and feed the rats, suggesting the absence of maternal toxicity. On the other hand, it was observed that the number of living offspring of all groups of rats exposed to herbicide was smaller than that of the female control group. In rats exposed to glyphosate-Roundup® it was possible to observe a reduction in general activity in the open field at the highest dose, impairment in maternal behavior (CM) and maternal aggressive behavior (CMA), as well as in the hypothalamus there was an increase in the dopaminergic system activity and a reduction of the serotonergic system activity, whereas the hippocampus and striatum showed decreased activity of the dopaminergic system. These findings suggest that the increased activity of the hypothalamic dopaminergic system by reducing the release of prolactin, an essential hormone for the expression of CM, damaged the manifestation of this behavior. Similarly, serotonin and dopamine, which modulate the effects of oxytocin, an

important peptide in the control and elicitation of the CM and CMA, may have contributed to the present findings. Regarding the study of the parameters of physical and neurobehavioral offspring's development, no modification was caused by the administration of the herbicide. The present study also evaluated the overall activity of the offspring in childhood and adulthood, showing that the changes were punctual in both male and female offspring in not characterizing motor or emotional changes. Regarding the behavior of play fighting, the presence of glyphosate-Roundup® reduced only the pinning from both male and female rats, without changing other parameters of this behavior. The duration and frequency of pinning are considered parameters which express the beginning of the social behavior of the rats. Thus, during the development of these animals, the patterns of social behavior have not been established, but those related to fighting and sex behavior were preserved. In adulthood, no changes were observed in the social interaction of male and female rats exposed to the herbicide, i. e., it did not promote long-term effects on social behavior. In the present study, considering the findings of brain neurochemistry of adult offspring exposed to the herbicide, it was possible to observe in the hypothalamus an increase in dopamine turnover in both male and female adult offspring and an increased turnover of serotonin only in male offspring. In the hippocampus, the most relevant findings were increased turnover of serotonin in males and in females the opposite effect. In the striatum an increased turnover of serotonin was found in both males and females, and dopamine only in females. Taking these data together and considering the absence of material changes in general activity measured in the open field and social interaction of male and female adult offspring, it is not possible to speculate about the relation of these neurotransmitter systems with these behaviors.

Keywords: Glyphosate-Roundup®. Perinatal. Development. Behavior.
Neurotransmitters.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 SOBRE O GLIFOSATO	17
1.2 SOBRE A TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO	26
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 PRAGUICIDA.....	33
3.2 ANIMAIS	33
3.3 PROCEDIMENTOS	33
3.3.1 DIAGNÓSTICO DE PREENHEZ	33
3.3.2 AVALIAÇÃO MATERNA	35
3.3.3 AVALIAÇÃO DA PROLE	39
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	47
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4 RESULTADOS	50
4.1 AVALIAÇÃO MATERNA.....	50
4.2 AVALIAÇÃO DA PROLE	67
5 DISCUSSÃO.....	89
6 CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS.....	10

1 INTRODUÇÃO

O uso dos praguicidas orgânicos e sintéticos na agricultura teve início nas décadas de 1920 e 1930, época que havia pouco conhecimento a respeito da sua toxicologia. Os estudos sobre os efeitos nocivos de praguicidas em seres vivos se expandiu durante a Segunda Guerra Mundial (1939 a 1945) quando se aventou a possibilidade do seu uso também como arma química (OPAS, 1996; SPINOSA; XAVIER, 2008). Com o término da Segunda Guerra Mundial o enfoque dos praguicidas voltou a se direcionar ao combate das pragas causadoras da quebra da produção agrícola (MORAGAS; SCHNEIDER, 2003).

Moragas e Schneider (2003), dentre outros autores, enfatizaram que o crescimento populacional do pós-guerra tornou maior a demanda por alimentos e com isso a necessidade do uso de praguicidas para aumentar a produtividade agrícola. No Brasil, os praguicidas foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de parasitas, passando a ser utilizados mais intensivamente na agricultura a partir da década de 1960 (OPAS, 1996).

Santos (2006) destaca que nas décadas de 1960 e 1970 houve a extensão da produção agrícola no Brasil e teve como fundamentação a Revolução Verde; esta, por sua vez, se refere à introdução e disseminação de novas sementes e práticas agrícolas, permitindo um vasto aumento da produção em países menos desenvolvidos. O modelo da Revolução Verde baseia-se na intensificação da utilização de sementes melhoradas, insumos industriais, mecanização, tecnologia e plantio, e diminuição dos custos de manejo. A introdução destas técnicas em países menos desenvolvidos provocou aumento abrupto na produção agrícola de destes países, bem como o aumento no número de uso de insumos industriais (SANTOS, 2006). Dentre esses insumos industriais encontram-se os praguicidas, os quais são utilizados para exterminar pragas que causam doenças ou danos nas plantações.

Deve ser destacado que vários outros termos são também usados como sinônimo de praguicida, como, por exemplo, agrotóxico, pesticida, defensivo químico, defensivo agropecuário, defensivo domissanitário, produto fitossanitário, agroquímico, produto domifitossanitário, biocida, dentre outros. O termo defensivo é

mais empregado pela indústria produtora destas substâncias químicas, enquanto os ambientalistas preferem o termo agrotóxico, ressaltando a polêmica que existe no uso destes termos (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007).

A legislação brasileira refere-se aos praguicidas como agrotóxicos. Assim, a Lei Federal nº 7.802, publicada no Diário Oficial da União em 11 de julho de 1989, e posteriormente o Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta essa lei, conceituam agrotóxicos e afins como:

[...] produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

O Codex Alimentarius (Programa das Nações Unidas sobre Harmonização de Normas Alimentares, gerenciado pela FAO/OMS – *Food and Agriculture Organization/Organização Mundial da Saúde*) conceitua praguicida (*pesticide*) como qualquer substância utilizada para prevenir, destruir, atacar, repelir ou controlar pragas, incluindo espécies de plantas ou animais que não devem estar presentes durante a produção, estocagem, transporte, distribuição ou processamento de alimentos, cereais e ração animal, ou deve ser administrada a animais para o controle de ectoparasitos. O termo inclui substâncias como reguladores de crescimento para plantas, desfolhantes, dessecantes, agentes promotores de amadurecimento de frutos, inibidores de germinação e substâncias que são aplicadas aos grãos antes e depois da colheita para evitar a deterioração do alimento durante a estocagem e transporte. São excluídos deste conceito os fertilizantes, nutrientes animais ou vegetais, aditivos alimentares e medicamentos de uso veterinário (XAVIER; RIGHI; SPINOSA, 2007).

Há várias maneiras de se classificar os praguicidas. A ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2009) e a OPAS (OPAS, 1996) classificam os praguicidas de três formas: a) quanto a sua ação e grupo químico; b) seu poder tóxico segundo a dose letal 50% (DL50); e c) classe toxicológica e cor da faixa no rótulo do praguicida.

Quando classificados quanto a sua ação e grupo químico, os praguicidas são categorizados em inseticidas, fungicidas e herbicidas. Os inseticidas são utilizados no combate aos insetos, exterminando-os por ingestão ou contato, sendo quatros os principais grupos químicos: organofosforados, carbamatos, organoclorados (a maioria, atualmente, de uso bastante restrito) e piretróides. Os fungicidas agem somente sobre os fungos, impedindo sua colonização e germinação; os principais grupos químicos são os ditiocarbamatos (maneb, zineb, mancozeb), ftalimídicos (captan, captafol) e imidazólicos (tiabendazol, benomil). Já os herbicidas, pré ou pós-emergente, atuam sobre as ervas daninhas, tendo como seus principais representantes: glifosato, bipiridílios (paraguat e diquat), pentaclorofenol, derivados do ácido fenoxiacético (2,4-D, 2,4,5-T) e dinitrofenóis (dinoseb) (OPAS, 1996; ANVISA, 2009;).

Os praguicidas são classificados, ainda, segundo seu potencial tóxico. Esta qualificação considera principalmente os seus efeitos tóxicos agudos (OPAS/OMS, 1996; EMBRAPA, 2003). Geralmente, se emprega a DL50 para classificar os praguicidas segundo a toxicidade, devido à facilidade de identificar esse efeito (letalidade).

A rotulagem dos praguicidas obedece a Lei Federal nº 7.802 (de 11 de julho de 1989) que foi regulamentada pelo Decreto nº 4.074 (de 4 de janeiro de 2002), o qual “dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências”. Assim, considerando a classificação toxicológica embasada na DL50, a embalagem dos praguicidas deve conter no rótulo uma faixa proporcional ao seu tamanho com cores associadas a sua classe toxicológica, visando estabelecer uma comunicação entre fabricante e agricultor. O quadro I apresenta essa classificação.

Quadro 1. Classe toxicológica, toxicidade associada à dose letal 50% (DL50) e cor da faixa no rótulo do praguicida de uso agrícola

Classe toxicológica	Toxicidade	DL50 (mg/kg de peso vivo)	Cor da faixa
Classe I	Extremamente tóxico	<50	Vermelho vivo
Classe II	Altamente tóxico	50 – 500	Amarelo intenso
Classe III	Medianamente tóxico	500 – 5.000	Azul intenso
Classe IV	Pouco tóxico	>5.000	Verde intenso

No Brasil, o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) – que tem como principal atribuição coordenar a coleta, a compilação, a análise e a divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento notificados no país – mostrou que no ano de 2010 os “agrotóxicos” de uso agrícola somados aos de uso domésticos ocupam o quarto lugar dentre os casos registrados de intoxicação humana, enquanto em animais estão em primeiro lugar (SINITOX, 2014).

Neste trabalho empregou-se o glifosato, que é classificado como um herbicida, estudando-se os seus efeitos sobre o comportamento materno e sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole de ratas expostas durante o período perinatal.

1.1 SOBRE O GLIFOSATO

O glifosato é um herbicida pós-emergente (aplicado após a planta ter emergido do solo) largamente utilizado na agricultura para o controle de ampla variedade de plantas daninhas em áreas cultivadas.

O glifosato foi sintetizado por um químico suíço, Enri Martin, que trabalhava para uma pequena indústria farmacêutica, chamada Cilag (NANDULA, 2010). O produto não tinha aplicação farmacêutica e nunca havia sido relatado na literatura. Foi descrito como um cristal sólido branco, sem odor, composto de uma função básica de amino e três sítios ácidos ionizáveis. Em 1959, a Cilag ao ser adquirido pela Johnson & Johnson, vendeu parte de suas pesquisas, incluindo o glifosato, para a Aldrich Química. Já em 1960, a Aldrich Química vendeu pequenas

quantidades do composto para várias indústrias farmacêuticas. De posse deste composto, a divisão de inorgânicos da Companhia Monsanto desenvolveu mais de cem compostos análogos ao ácido aminometilfosfônico (AMPA) sintético, principal metabólito do glifosato. Estes compostos foram testados pelo Dr. Phil Hamm que comprovou a atividade sobre as plantas daninhas perenes (NANDULA, 2010).

A primeira vez que a Companhia Monsanto sintetizou o glifosato foi em maio de 1970 e o testou em estufa, em julho do mesmo ano. Com a demonstração dos avanços moleculares através das telas de estufas e dos testes de campo, rapidamente o glifosato foi introduzido ao mercado pela Monsanto, em 1971 (TONI; SANTANA; ZAIA, 2006; NANDULA, 2010).

Desde que foi relatado como herbicida, três tipos de glifosato vêm sendo comercializados, glifosato-isopropilamônio, glifosato-sesquisódio (patenteados por Monsanto e vendido como Roundup®), e glifosato-trimesium (patenteado por ICI, atual Syngenta) (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). No Brasil é comercializado com vários nome, como Glifosato®, Direct®, Gliato®, Glifos®, Glyphogan®, Gliz®, Pilarsato®, Rodeo, Roundup®, Scout® e Zapp Qi® (COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 2009), os quais são acrescidos de ingredientes ditos inertes que permitem a penetração do glifosato através da membrana plasmática da planta, potencializando a sua ação, além de propiciar maior estabilidade e potencial de bioacumulação (AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

O glifosato é um herbicida de fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ e nome químico N-(fosfonometil) glicina, seja como sal de amônio ou sódio, muito solúvel em água e praticamente insolúvel em solventes orgânicos (acetona e etanol). Pertence ao grupo químico dos aminoácidos fosfonados, classificado como não seletivo (elimina todas as ervas daninhas), de ação sistêmica (se movimenta internamente na planta atuando em locais diferentes), pós-emergente (utilizado após o crescimento da erva daninha) e inibidor enzimático (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Apresenta largo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle de plantas daninhas anuais (completam seu ciclo de vida em uma estação de crescimento) ou perenes (apresentam ciclo de vida longo), tanto de folhas largas como estreitas (GALLI; MONTEZUMA, 2005). A fórmula estrutural do glifosato é mostrada na figura 1.

Figura 1 - Fórmula estrutural do glifosato

O modo de atuação do glifosato consiste na inibição do crescimento das plantas através da interferência na produção de aminoácidos aromáticos essenciais pela inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), a qual é responsável pela biossíntese de corismato, um intermediário na biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano. A via para a biossíntese dos aminoácidos aromáticos é exclusiva das plantas, logo nenhum membro do reino animal é capaz de expressá-la (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; ROMANO et al., 2008).

A fim de detalhar mais este processo, diversos são os autores que enfatizam a atuação do glifosato como inibidor enzimático. Estes afirmam que a inibição enzimática das plantas, ocorre através da enzima EPSPS; em condições normais, esta enzima catalisa a transferência do fosfoenolpiruvato (PEP) de enolpiruvil para o chiquimato-3-fosfato (S3P), formando 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato e fosfato inorgânico (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; COUTINHO; MAZO, 2005; NANDULA, 2010), o que pode ser observado na figura 2. Esse é o passo fundamental e responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais, como a fenilalanina, tirosina e triptofano, os quais são precursores de outros produtos, como lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos.

Figura 2 - Via do ácido chiquímico indicando o local de atuação do glifosato

O modo de ação do glifosato altera diferentes processos bioquímicos vitais nas plantas, sendo absorvido pelo tecido vivo e translocado via floema para raízes e rizomas, e sua ação inibe enzimas específicas como EPSPS suspendendo a síntese de aminoácidos aromáticos (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; ZAIA et al., 2006).

Coutinho e Mazo (2005) reforçam a ideia dos demais autores quando sustentam que o glifosato forma preferencialmente um complexo ternário estável com a enzima EPSPS e o ácido chiquímico 3-fosfato, estabelecendo o complexo EPSPS-S3P-glifosato. O provável complexo ternário é a forma atualmente aceita como responsável pela atividade do herbicida.

O glifosato manifesta a sua ação herbicida mais eficaz através do contato direto com a região clorofilada das plantas (folhas e tecidos) e subsequente translocação, preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos (BRADBERRY, 2004; GALLI; MONTEZUMA, 2005). Desta forma, o tratamento agrícola com o glifosato mata as plantas lentamente em poucos dias ou semanas; devido ao transporte por todo o sistema vascular nenhuma parte da planta sobrevive (COUTINHO; MAZO, 2005).

Sob o aspecto da atuação do glifosato na penetração pelo sistema radicular, esta é dita como insignificante. Williams (2000) fortalece sua afirmação exemplificando que a aplicação de glifosato em ervas daninhas ao redor de árvores frutíferas não a prejudica, desde que as folhas não sejam expostas ao herbicida.

Dependendo da finalidade, produtos agrícolas como o herbicida glifosato podem ser empregados em áreas industriais, florestais, residenciais e também na água para controle de ervas aquáticas. Tem indicação de uso em monocotiledôneas ou dicotiledôneas, em culturas de arroz irrigado, cana-de-açúcar, citros, maçã, café, milho, soja (plantio direto e indireto), pastagens, uva, fumo, ameixa, banana, pera, pêssigo, seringueira e plantio direto do algodão (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; COUTINHO; MAZO, 2005; ALONZO; CORREIA, 2008).

A degradação do glifosato no solo é inicialmente rápida, seguida por prolongada e lenta decomposição e é realizada por uma grande variedade de microrganismos que usam o produto como fonte de energia (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998). A meia-vida de degradação do glifosato pelos microrganismos do solo é de aproximadamente 28 dias, chegando a 90% em 90 dias; portanto, a persistência do produto no solo é de 30 a 90 dias (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998). Quando em contato com o solo, é rapidamente adsorvido pelos minerais formando complexos quelatos de ligação covalente forte, sendo então degradado pelos microrganismos presentes (HANEY; SENSEMAN; HONS, 2002; TONI; SANTANA; ZAIA, 2006). É uma substância não volátil, sofrendo pouca fotólise e sua biodegradação não é influenciada pelo baixo pH do solo, condição frequente em solos brasileiros (ABREU JR. et al., 2003; TONI; SANTANA; ZAIA, 2006).

A persistência do herbicida no solo é resultado de processos de transformação como a degradação da molécula e a formação de metabólitos, além de remoção (volatilização, escoamento superficial, entre outros), enquanto sua intensidade é fortemente influenciada pelas condições ambientais, tais como

temperatura, umidade, matéria orgânica e atividade microbiana, e pela tecnologia de aplicação (método usado, dose aplicada e formulação) (FORLANI; LEJCZAK; KAFARSKI, 1999).

Quando o glifosato entra em contato com a microbiota do solo este é rapidamente inativado perdendo sua ação herbicida, podendo ser mineralizado, produzindo água, dióxido de carbono e fosfato (FORLANI; LEJCZAK; KAFARSKI, 1999). A degradação é feita por meio de duas vias catabólicas, produzindo o ácido aminometilfosfônico (AMPA) como o principal metabólito, posteriormente dióxido de amônio e carbono, e sarcosina como metabólito intermediário e alternativo (Figura 3).

Figura 3 - Vias de degradação do glifosato

Quanto à toxicidade deste herbicida, é considerada relativamente baixa; o quadro 2 reúne alguns dos dados sobre sua toxicidade. A dose diária aceitável (IDA) do glifosato é de 0,042 mg/kg de peso corpóreo (ANVISA, 2009).

Quadro 2. Toxicidade do glifosato.

Estudo	Achados
Toxicidade Aguda	DL50 ^a oral aguda em ratos > 4.320 mg/kg
	DL50 oral aguda em camundongos > 10.000 mg/kg
	DL50 oral aguda em caprinos > 3.530 mg/kg
	DL50 dérmica em coelho > 2.000 mg/kg
	Baixa toxicidade para a irritação dos olhos
	Muito baixa toxicidade para a irritação dérmica
	Não detectada sensibilização dérmica
	CL50 ^b inalatória aguda em ratos > 4,43 mg/L, num estudo de <i>nose-only</i> de 4 horas
	Sinais clínicos geralmente aparecem dentro de 30 minutos a 2 horas após a ingestão. Os animais podem apresentar inicialmente excitabilidade e taquicardia, seguida por ataxia, depressão e bradicardia. Os casos graves podem evoluir para colapso e convulsões
Exposição prolongada	Cães Beagle receberam 20, 100 ou 500 mg/kg/dia de glifosato durante um ano, não sendo observados efeitos deletérios. A NOEL ^c para toxicidade sistêmica foi $\geq$ 500 mg/kg/dia
	Ratos machos receberam na dieta 89, 362 ou 940 mg/kg/dia de glifosato e as fêmeas 113, 457 ou 1.183 mg/kg/dia durante 2 anos. No grupo das fêmeas da maior dose observou-se diminuição do ganho de peso corporal. No grupo dos machos da maior dose observou-se diminuição do pH urinário, aumento da ocorrência de catarata e anormalidades do cristalino, e aumento do peso do fígado. Nenhum efeito foi observado nos grupos da dose menor e intermediária. A LOEL ^d de toxicidade sistêmica foi de 940 e 1.183 mg/kg/dia para machos e fêmeas, respectivamente. O NOEL ^c para toxicidade sistêmica é 362 mg/kg/dia para homens e de 457 mg/kg/dia para mulheres.
Desregulador	Ratos e camundongos foram alimentados com uma dieta contendo

endócrino	0, 3.125, 6.250, 12.500, 25.000, ou 50.000 ppm de glifosato 99% por 13 semanas. As duas maiores doses do grupo de ratos machos tiveram redução significativa nas concentrações de esperma, embora estas ainda estavam dentro da faixa histórica para aquela linhagem de ratos. O grupo das ratas de maior dose tiveram um ciclo estral ligeiramente mais longo do que o grupo controle.
	O glifosato foi incluído na lista preliminar de produtos químicos do <i>U.S. EPA^e Endocrine Disruptor Screening Program</i> (EDSP), com base no potencial de exposição, e não pelo provável do efeito endócrino.

(continua)

(conclusão)

Estudo	Achados
Carcinogenicidade	Ratos machos foram alimentados com uma dieta contendo 89, 362 ou 940 mg/kg/dia de glifosato e as fêmeas com 113, 457 ou 1.183 mg/kg/dia por dois anos. Em machos, a menor e a maior dose mostraram ligeiro aumento da incidência de adenomas de células das ilhotas pancreáticas e adenomas hepatocelulares. Tanto em machos como em fêmeas, a dose intermediária mostraram ligeiro aumento da incidência de adenomas das células-C da tireoide. A EPA concluiu que os adenomas não estavam relacionados com o tratamento.
	Camundongos foram alimentados com uma dieta contendo 150, 750 ou 4500 mg/kg/dia de glifosato por 18 meses. Na menor dose e na intermediária não foi observado nenhum efeito. Na maior dose observou redução do ganho de peso em machos e fêmeas. Nos machos da maior dose observou-se ligeira maior incidência de adenomas tubulares renais, aumento da incidência de hipertrofia hepatocelular, necrose hepatocelular e nefrite intersticial. Nas fêmeas, observou-se aumento da incidência de basofilia epitelial e hipertrofia nos túbulos proximais do grupo da maior dose. O EPA ^e e um grupo independente de patologistas concluíram que a ocorrência de adenomas não foi causado pelo glifosato. Com base neste estudo, a NOEL ^c sistêmica e LOEL ^d foram determinadas como sendo de 750 e 4500 mg/kg/dia, respectivamente.
Genotoxicidade	O glifosato tem sido objeto de inúmeros testes de genotoxicidade e os resultados são todos negativos
Efeitos na reprodução e teratogênicos	Ratas prenhes receberam glifosato por gavagem do 6º ao 19º dia de gestação, nas doses de 300, 1000 ou 3500 mg/kg/dia. Na dose mais alta, observaram-se diminuição do ganho de peso da mãe e dos fetos, aumento da mortalidade materna e maior número de anormalidades esqueléticas fetais. A NOEL ^c para a toxicidade materna e do desenvolvimento foi de 1.000 mg/kg/dia e a LOEL ^d de 3.500 mg/kg/dia.
	Coelhas prenhes foram expostas ao glifosato por gavagem do 6º ao 27º dia de gestação, nas doses de 75, 175 ou 350 mg/kg/dia. Não foram detectados efeitos no desenvolvimento. Na dose maior dose,

	os animais exibiram diarreia, corrimento nasal e aumento da mortalidade, não sendo possível avaliar os efeitos no desenvolvimento nesta dose. O NOEL ^c para efeitos maternos foi de 175 mg/kg/dia.
	As concentrações na dieta de até 10.000 ppm ou 293 mg/kg/dia de glifosato administrado a ratos em duas gerações não causaram nenhum efeito sobre a sexualidade e fertilidade de macho ou fêmea. O NOAEL ^f para toxicidade dos pais e filhos foi de 3.000 ppm, com base na redução do peso corporal na concentração de 10.000 ppm.

Fonte: *National Pesticide Information Center* (2014).

^aDL 50 = dose letal 50%; ^bCL50 = concentração letal 50%; ^cNOEL = *no effect level* = nível sem efeito observado; ^dLOEL = *lowest observed effect level* = menor dose com efeito observado; ^eEPA = *Environmental Protection Agency* = Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos; NOAEL^f = *no observed adverse effect level* = nível de efeito adverso não observado.

É comum acrescentar às formulações comerciais de glifosato ingredientes surfactantes, para conferir maior efeito herbicida, como, por exemplo, as etilaminas (composto orgânico com atuação em tecidos vivos, que acelera e inibe processos fisiológicos e bioquímicos das plantas), os quais podem aumentar significativamente a toxicidade do produto contendo o glifosato (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; COX; SURGAN, 2006).

É difícil diferenciar a toxicidade do glifosato e dos surfactantes utilizados nas formulações comerciais. Mottier, Pini e Costil (2014) mostraram que a toxicidade do surfactante polioxietilamina (POEA), utilizado para facilitar a solubilização e favorecer a entrada na célula, foi maior do que a do glifosato *per si*; assim, esses autores sugeriam que este surfactante foi responsável pela potencialização do efeito tóxico do glifosato.

No mesmo sentido, Gasnier et al. (2009) ressaltaram que a questão da toxicidade das formulações contendo glifosato ainda está em aberto, em particular, relacionada ao meio ambiente. Esses autores relataram que as misturas formuladas com glifosato e adjuvantes não são ambientalmente seguras, em especial para a vida aquática. Neste trabalho foram avaliados a citotoxicidade, a genotoxicidade e os efeitos tóxicos para a reprodução de quatro formulações de herbicidas contendo glifosato. Os resultados mostraram que todos os parâmetros foram alterados pelas formulações testadas em doses menores que aquelas empregadas na agricultura; são aceitos resíduos de até 400 µg/mL em alguns alimentos e foram encontradas

alterações com 0,5 µg/mL, ou seja, os efeitos foram mais dependentes da formulação do que na concentração de glifosato.

Estes dados corroboram aqueles observados na placenta humana e em células embrionárias do cordão umbilical (RICHARD et al., 2005; BENACHOUR et al., 2007; BENACHOUR; SERALINI, 2009), mostrando que o glifosato *per si* é pouco tóxico, mas suas formulações comerciais, devido a presença de sinergistas e coadjuvantes, aumentam a toxicidade deste herbicida.

Richard et al. (2005) mostraram que o Roundup® (formulação contendo glifosato) em concentrações consideradas baixas, não tóxica, para o glifosato *per si* (0,02% e 0,04%) alterou a atividade da enzima aromatase em células de placenta humana *in vitro*. Esses autores sugeriram que, a partir do momento que o glifosato penetrou na célula, sendo este efeito facilitado pelos adjuvantes presentes no Roundup®, houve redução da atividade da enzima aromatase, responsável pela síntese de estrógenos.

Dallegrave et al. (2003) realizaram estudos com ratas e utilizando doses orais diárias de 0, 500, 750 ou 1.000 mg/kg Roundup®, entre o 6º e 15º dia de gestação; foi observado mortalidade de 50% das fêmeas que receberam a dose de 1.000 mg/kg e o retardo no desenvolvimento do esqueleto fetal em todas as dose empregadas.

Em um estudo com ratos realizado pela Monsanto, empresa que produz e comercializa o Roundup®, foi apontado que a NOAEL para a reprodução nesta espécie é maior que 30 mg/kg e nesta dose não foram observados efeitos adversos na mãe e nem em sua prole (MONSANTO, 2002).

Dallegrave et al. (2007) realizaram estudos com ratas prenhes que receberam Roundup® nas doses de 50, 150 ou 450 mg/kg durante toda a gestação (21-23 dias) e lactação (21 dias), no qual observaram que as doses empregadas não induziram toxicidade materna, porém causou vários efeitos adversos dose-dependente na sua prole, como diminuição no nível sérico de testosterona em macho durante a puberdade, bem como diminuição do número de espermatozoides e aumento na porcentagem de espermatozoides anormais na prole adulta, enquanto na prole feminina observou-se atraso na abertura vagina.

Romano et al. (2012) mostraram que a dose de 50 mg/kg *per os* Roundup® administrada do 18º dia de gestação ao dia 5º dia de lactação da rata não produziu toxicidade materna, porém causou vários efeitos adversos na sua prole, como

alterações no processo de masculinização, no comportamento sexual e na histologia de órgãos do aparelho reprodutor de machos, bem como a diminuição da expressão de receptores estrogênicos e androgênicos.

1.2 SOBRE A TOXICOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

A toxicologia do desenvolvimento é um termo relativamente recente encontrado dentro da toxicologia reprodutiva, com raízes na teratologia (GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008).

A toxicologia do desenvolvimento estuda os efeitos adversos que ocorrem nos organismos em desenvolvimento, expostos a diferentes agentes químicos antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal e pós-natal até a puberdade. A toxicologia do desenvolvimento engloba a teratologia e a toxicologia da reprodução (BERNARDI, 2006). Antigamente a teratologia estava relacionada apenas com alterações de ordem morfológica, atualmente, é o estudo do desenvolvimento anormal do feto, incluindo malformações estruturais, retardo no crescimento, dano no desenvolvimento e até mesmo morte (HANSEN; YANKOWITZ, 2002; GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008). Estas alterações podem ser causadas pela ação direta de um agente tóxico sobre o feto ou através da ação no organismo materno (DE SOUZA et al., 1999; GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008).

O efeito tóxico de uma substância pode ocorrer durante todo o desenvolvimento embriofetal de um mamífero, no entanto, as consequências podem variar conforme o período de exposição. O desenvolvimento embriofetal de mamíferos pode ser dividido em quatro períodos: implantação, organogênese ou organogenético, desenvolvimento fetal e período neonatal. A exposição a agentes tóxicos no período inicial do desenvolvimento (implantação) pode variar conforme o número de células atingidas pelo agente tóxico, ou seja, quanto maior o número de células atingidas, maior será a chance de ocorrer uma embrioletalidade. O período de organogênese abrange desde a proliferação e migração celular até a formação de órgãos rudimentares; nesta fase ocorre maior suscetibilidade à ação do agente tóxico, podendo acarretar em malformações estruturais. Após a organogênese, segue-se o período fetal e neonatal; exposições que se iniciam durante estes

períodos podem apresentar anormalidades celulares e teciduais, podendo interferir em funções normais de importantes sistemas, tais como o sistema nervoso central, o sistema imune e o sistema endócrino, além de causar retardo geral do desenvolvimento (GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008).

As categorias de risco teratogênico incluem fármacos, agentes químicos, infecciosos e físicos, alterações maternas e/ou metabólicas (WILSON; DAVIES, 2007; GÓRNIAK; SPINOSA; BERNARDI, 2008).

Recentemente, tem ganhado interesse o estudo do comportamento materno no contexto da toxicologia do desenvolvimento. Em mamíferos, o conjunto de cuidados que a mãe oferece aos filhotes é denominado comportamento materno ou maternal (CM). O CM é um comportamento complexo, instintivo com características específicas para cada espécie e que consiste em uma série de cuidados que as fêmeas maduras realizam em torno dos indivíduos imaturos para auxiliar na propagação de sua espécie sendo determinante no desenvolvimento neurológico da prole (NUMAN, 1994; BODENSTEINER; GHIRALDI; MINER, 2012).

Os cuidados maternos, em particular nos roedores, se expressam desde a preparação da mãe para o nascimento da prole e se mantém por todo o período de lactação dos filhotes. Esse comportamento vai se modificando de acordo com o tempo e crescimento dos filhotes. Durante este período o principal objetivo da fêmea é garantir a sobrevivência dela e dos seus filhotes (NUMAN, 1994; TEODOROV et al., 2002; LENZ; SENGELAUB, 2010). Na preparação para o parto, a mãe prepara o ninho para acolher os filhotes na hora do parto. Nos primeiros dez dias após o parto as mães permanecem mais tempo no ninho e, à medida que os filhotes crescem, se tornam mais independentes em relação à mãe. Os cuidados maternos tendem a decrescer gradativamente, e a mãe se torna menos responsiva em relação aos filhotes. Com o ganho de independência dos filhotes e a diminuição da responsividade materna, o desmame tende a acontecer naturalmente.

Usualmente, em roedores, a avaliação do CM é realizada na primeira semana após o parto, pelo fato da prole neste período ser dependente exclusivamente do cuidado materno (TEODOROV et al., 2005). Em ratas, os cuidados maternos podem ser agrupados didaticamente em duas categorias: diretos e indiretos (NUMAN, 1994; LENZ; SENGELAUB, 2005). Os primeiros são aqueles dirigidos aos filhotes, como a busca, o agrupamento, ficar sobre os filhotes aquecendo-os e alimentando-os. Os

comportamentos indiretos são a agressividade voltada a intrusos e a construção do ninho.

Numan (1994) cuidadosamente descreveu alguns parâmetros típicos do CM em ratas, como a busca e o agrupamento dos filhotes, a postura de amamentação em que a coluna vertebral fica arqueada facilitando a amamentação (cifose fisiológica ou *crouching*) e o comportamento maternal total, caracterizado pela cifose fisiológica sobre os filhotes em amamentação. Além da manifestação desses comportamentos, a mãe passa um tempo significativo lambendo os filhotes para limpá-los, pois a lambedura, em particular, da área genital estimula a defecação e micção, bem como facilita a descida dos testículos para a bolsa escrotal (LENZ; SENGELAUB, 2010).

O CM ocorre e é controlado pela interação de diversos fatores neuroendócrinos (TEODOROV et al., 2002). Assim, considerando esses fatores, as mudanças hormonais, principalmente os níveis de estrógeno, prolactina, progesterona, vasopressina, colecistocinina e β -endorfina estão diretamente relacionadas à preparação pré- e pós-parto e no CM (TEODOROV et al., 2002; MOURA, 2010). A ocitocina, também está envolvida no processo, porém relacionada ao reflexo de ejeção de leite (LEE et al., 2009).

Em relação às estruturas neurais envolvidas no CM, são descritas na literatura, sobretudo a área pré-óptica (POA) do hipotálamo, área tegmental ventral (ATV) e substância cinzenta periaquedutal (PAG) (NEUMANN et al., 2001). Essas estruturas são responsáveis pela motivação, controle motor, modulação da transmissão proprioceptiva entre outras (TEODOROV et al., 2002).

O CM é, portanto, resultado da interação destes diversos fatores e é fundamental para o desenvolvimento e sobrevivência da prole (NUMAN, 1994; MOURA, 2010; BODENSTEINER; GHIRALDI; MINER, 2012).

O CM pode tornar-se agressivo quando há o reconhecimento de um intruso ou uma ameaça a prole. A agressão da fêmea contra um intruso que se aproxime do ninho, está relacionada exclusivamente com proteção e defesa da prole (BOSCH et al., 2005). A agressão é parte natural das respostas comportamentais que os animais utilizam para viver em seu nicho ecológico (HUNTINFORD, 1989). É fundamental para a sobrevivência do animal, permitindo melhor acesso aos alimentos e companheiros e, em geral, transmitindo aptidão evolutiva.

Em fêmeas a forma de ataque a um intruso difere da apresentada por machos dominantes em seu território (BLANCHARD et al., 1984); as fêmeas apresentam ataques laterais, investigação com o focinho (farejar) e pequenas mordidas, comportamento que não é visto em machos dominantes contra intrusos (LEYHAUSEN, 1973). As fêmeas também podem apresentar agressividade contra outras fêmeas, porém muito menos feroz do que a demonstrada contra um macho intruso (PARMIGIANI et al., 1988).

Vários fatores influenciam o comportamento materno agressivo em fêmeas lactantes, como mudanças fisiológicas (grande variação na concentração de hormônios durante a lactação), neuroquímicas (alterações nos neurotransmissores do sistema límbico) e ambientais (sinais olfatórios), dentre outros (GAMMIE; LOSTEIN, 2006).

Vale comentar aqui, ainda, o envolvimento da dopamina (DA) na manifestação do CM, uma vez que esse neurotransmissor controla várias funções fisiológicas, como atividade motora, comportamento sexual e comportamento de ingestão de alimentos, além do CM (CARVALHO-FREITAS, 2008).

A DA é uma amina biogênica sintetizada a partir da tirosina, um aminoácido não essencial sintetizado nos animais a partir da fenilalanina, e é o ponto de partida para a síntese das catecolaminas (isto é, dopamina, norepinefrina e epinefrina). Atuando como neurotransmissores, as catecolaminas causam efeitos excitatórios e inibitórios no sistema nervoso periférico, bem como no sistema nervoso central. (BODENSTEINER; GHIRALDI; MINER, 2012). A conversão da tirosina em DA ocorre com a participação da enzima tirosina hidroxilase, dando origem a L-di-hidroxfenilalanina (L-DOPA), sendo esta convertida em DA pela dopa-descarboxilase. Sua degradação ocorre a partir da ação das enzimas catecol-O-metiltransferase (COMT) e monoamino oxidase (MAO), dando origem ao ácido 3,4 di-hidrofenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) (BODENSTEINER; GHIRALDI; MINER, 2012).

A DA atua no controle tônico da síntese e secreção de prolactina; a atividade rítmica semi-circadiana dos neurônios dopaminérgicos do sistema túbero-infundibular determina os picos diurno e noturno de secreção de prolactina (TIMMERMAN et al., 1995). Esta, por sua vez, desempenha um papel importante na estimulação do cuidado materno, bem como participa da manutenção deste comportamento (BRIDGES; RUSSELL, 1981; BRIDGES et al., 1997). Stern (1966)

ressalta que a DA é de fundamental importância para a expressão do CM, já que ao controlar a síntese e secreção de prolactina, atua na manifestação do vínculo mãe-filhote, necessário para despertar os cuidados da mãe no desenvolvimento da prole.

A participação da DA na modulação do CM foi estudada também por meio dos níveis de seus metabólitos; observou-se que os níveis de DOPAC no final da gestação encontram-se mais baixos quando comparados com aqueles da lactação (OLAZÁBAL et al., 2004).

Lesões no sistema dopaminérgico nigro-estriatal reduzem drasticamente o CM e antagonistas de receptores da DA também o fazem (TEODOROV et al., 2011).

Numan e Nagle (1983) mostraram em ratos que lesões eletrolíticas na substância negra, região do sistema nervoso central rica em corpos celulares de neurônios dopaminérgicos, interrompem o comportamento de busca de filhote para o ninho, sendo este um parâmetro que consiste em uma sequência motora repetitiva, dependente da DA (STERN, 1966; SJOEHOLM et al., 2011)

Considerando que a presença de substâncias químicas em formulações comerciais de glifosato pode aumentar sua toxicidade e que há carência de estudos sobre a toxicologia do desenvolvimento com essas formulações, o presente estudo investigou os efeitos da exposição perinatal de ratos a uma formulação comercial de glifosato amplamente usada no país, a fim de avaliar o comportamento materno e a neuroquímica cerebral, bem como o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole, desde o nascimento até a idade adulta. Para tanto, ratas prenhes receberam 50, 100 e 150 mg/kg do herbicida (considerando que a NOAEL para reprodução é superior a 30 mg/kg – Monsanto, 2002) do 15^o dia de gestação até o 7^o dia da lactação; este período de exposição foi escolhido por abranger o período de maturação e diferenciação do cérebro de ratos (MEISEL; SACHS, 1994; BERNARDI, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar os efeitos da exposição perinatal de ratas (do 15^o ao 21^o dia da gestação e até o 7^o dia da lactação) a uma formulação comercial do glifosato (Roundup®) no comportamento e neuroquímica cerebral materna, bem como no desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da exposição perinatal ao glifosato (Roundup®) no comportamento materno das ratas;
- Avaliar os efeitos da exposição perinatal ao glifosato (Roundup®) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no cérebro materno;
- Estudar na prole os efeitos da exposição perinatal ao glifosato (Roundup®) no desenvolvimento físico e neurocomportamental;
- Avaliar o comportamento de brincar da prole de ratas expostas perinatalmente ao glifosato (Roundup®);
- Estudar os efeitos da exposição perinatal ao glifosato (Roundup®) no comportamento sexual da prole de machos e fêmeas;
- Avaliar a interação social na idade adulta da prole de ratas expostas perinatalmente ao glifosato (Roundup®);
- Determinar os níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no cérebro da prole de ratas expostas perinatalmente ao glifosato (Roundup®).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PRAGUICIDA

Foi utilizado Roundup Transorb® (Monsanto Co., St. Louis, MO) cuja composição é de 648 g/L de sal de isopropilamina de glifosato, 480 g/L de equivalente ácido de N-fosfonometilglicina (glifosato) e 594 g/L de ingredientes inertes. A partir dessa formulação comercial foram preparadas as soluções para administração aos animais, as quais foram diluídas em água. Como solução controle empregou-se a água. A administração de todas as soluções aos animais foi feita por gavagem.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, fêmeas virgens, sexualmente maduras, com aproximadamente 80 dias de idade, pesando aproximadamente 180 g e machos da mesma espécie, pesando em torno de 250 g, provenientes do biotério do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (40 x 50 x 20 cm) mantidas em uma sala com temperatura controlada por meio de equipamento de ar condicionado ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e com ciclo de doze horas claro-escuro, sendo a luz acesa às 6:00 horas. Água e comida foram fornecidas *ad libitum* aos animais durante todo procedimento experimental. Os animais foram mantidos nestas condições por um período de adaptação de no mínimo cinco dias antes do início do experimento. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da FMVZ/USP, sob protocolo nº 2010/2010, em 29 de setembro de 2010.

3.3 PROCEDIMENTOS

3.3.1 Diagnóstico de prenhez

Para o acasalamento as fêmeas foram distribuídas duas a duas em gaiolas de polietileno, onde no final da tarde foi colocado um macho sabidamente fértil. Na manhã subsequente, os machos foram retirados da gaiola, e os lavados vaginais coletados. Para tanto, foi introduzido na vagina de cada fêmea 10 μ L de solução salina (NaCl 0,9%) e, a seguir, coletado esse material. A figura 4 ilustra a coleta do lavado vaginal.

Figura 4 - Coleta do lavado vaginal em rata Wistar, com 10 μ L de solução salina (NaCl 0,9%)

O diagnóstico de prenhez foi feito considerando, no esfregaço do lavado vaginal observado por microscopia óptica, a presença de espermatozoides e de células indicativas de estro (caracterizada como a fase estrogênica máxima, na qual se encontram apenas células queratinizadas) – figura 5. Este foi considerado como o dia 0 de gestação (GD0). Durante a gestação foi mantida uma fêmea por gaiola e durante a lactação, uma fêmea e sua respectiva prole. O peso corpóreo e o consumo de água e ração das fêmeas foram medidos durante a gestação e a lactação.

Figura 5 - Lavado vaginal de rata, indicando a presença de espermatozoides. Microscopia óptica em aumento de 20x (A) e 40x (B)

3.3.2 Avaliação Materna

3.3.2.1 *Peso materno, consumo de água e de ração e número de filhotes nascidos*

As fêmeas prenhes foram pesadas durante a gestação (GD0, GD4, GD8, DG11, DG15, DG19, DG20 e GD21) e também foi medido o consumo de água e de ração. Após o nascimento dos filhotes, o peso materno foi medido nos dias de lactação (DL) 1º ao 7º e, posteriormente, no 7º, 14º e 21º dia (DL1, DL2, DL3, DL4, DL5, DL6, DL7, DL14 e DL21), sendo medido também o consumo de água e de ração. A prole foi desmamada no DL21.

3.3.2.2 *Atividade geral no campo aberto*

A atividade geral das ratas foi avaliada no campo aberto nos dias DG5, DG15, DG19 e DL5, sempre durante o mesmo período do dia (tarde). O campo aberto consiste de uma arena circular (97 cm de diâmetro) delimitada por uma placa de metal (28 cm de altura), pintada de preto, e o chão de madeira dividido em 25 partes

aproximadamente iguais (Figura 6). Cada fêmea foi colocada individualmente no centro da arena e observada por 5 minutos. Entre um animal e outro o aparelho foi limpo com solução de álcool a 5% para evitar-se a interferência do odor do animal anterior. A observação comportamental foi feita intercalando-se animais dos grupos controle e experimentais.

Os parâmetros observados no campo aberto foram: frequência de locomoção e de levantar, e a imobilidade. Definiu-se uma unidade de locomoção o ato de o animal penetrar com as quatro patas em uma das unidades de divisões do chão da arena. Uma unidade de levantar corresponde à postura de o animal permanecer apoiado sobre as patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima, podendo ou não tocar as patas dianteiras nas paredes do campo aberto. A imobilidade foi medida pelo tempo (em segundos) em que o animal ficou parado sem realizar qualquer atividade.

Figura 6 - Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual de ratas

3.3.2.3 Comportamento materno (CM)

O CM, que melhor se expressa em ratas entre o DL5 e DL6 (ARRATI et al., 2006), foi avaliado na caixa moradia, conforme descrito por Arrati et al. (2006) com modificações. Assim, no DL5, os filhotes foram separados das mães por uma hora,

sendo mantidos aquecidos em uma caixa. Após esse período, a mãe foi retirada brevemente da caixa moradia e o ninho foi desmanchado. A seguir, os filhotes foram recolocados na caixa, porém um em cada um dos quatros cantos da caixa e os outros dois no ponto médio de cada lado do maior comprimento da caixa, sendo, então, reintroduzida a mãe ao centro. Inicia-se, a seguir, a avaliação do CM, o qual foi filmado, por 60 minutos, para melhor quantificação dos parâmetros, a saber:

- recuperação de filhotes: número de mães que buscam sua prole dispersa na caixa moradia e a leva para o ninho;
- número de filhotes recolhidos: número total de filhotes levados para o ninho durante o período de observação;
- latência (em segundos) para a fêmea recolher os três primeiros filhotes;
- tempo (em segundos) que a rata lambe os filhotes (*grooming* de filhotes);
- frequência com que a rata lambe os filhotes (*grooming* de filhotes);
- confecção de ninho: score dado à confecção do ninho, variando de 0 (quando não há ninho) até 5 (ninho completo e bem elaborado);
- presença de filhotes no ninho ao final do teste: número total de filhotes que permaneceram no ninho ao final do teste;
- latência para a fêmea adquirir postura de amamentação (cifose fisiológica): postura na qual a fêmea apresenta curvatura da coluna vertebral, côncava no sentido dorso-ventral, e estende os membros locomotores (Figura 7);
- cifose sobre todos os filhotes: posição de cifose fisiológica da mãe sobre todos os filhotes.

Figura 7 - Posição de cifose fisiológica de rata amamentando a ninhada com cerca de 9 dias de idade

3.3.2.4 Comportamento materno agressivo (CMA)

O CMA foi avaliado no DL6; esse comportamento se manifesta em ratas lactantes quando na presença de um intruso. Assim, o CMA foi avaliado na caixa moradia da rata com sua prole, colocando-se um macho intruso, virgem, de peso similar à rata mãe nesta caixa. Imediatamente após isso, o comportamento foi filmado por 10 minutos, sempre se tendo o cuidado para manter a integridade dos filhotes. Os parâmetros analisados foram:

- latência para a primeira luta: tempo (em segundos) para que os animais apresentem o primeiro contato agressivo;
- número de lutas: número de vezes que a fêmea e o macho têm contatos agressivos;
- tempo total de luta: soma da duração total (em segundos) das lutas;
- número de vezes que o intruso fareja os filhotes: número de vezes que o intruso fareja o ninho ou um único filhote;

- número de vezes que a fêmea fareja o intruso: número de vezes que a fêmea fareja o intruso;
- número de vezes que a mãe transporta o filhote dentro da gaiola moradia;
- número de mães com pelo menos 80% dos filhotes no ninho ao término do experimento.

3.3.3 Avaliação da prole

3.3.3.1 Peso corpóreo

O dia de nascimento dos filhotes foi considerado zero (DPN0). Todos os filhotes de cada fêmea foram pesados, individualmente, nas primeiras horas de vida. Além disso, foram avaliados fisicamente para observação da ocorrência ou não de malformações visíveis e foram sexados pelo método da medição da distância anogenital. No DPN1, a ninhada foi padronizada para oito filhotes em proporções iguais de sexo, sempre que possível (Figura 8). O peso corporal foi avaliado também nos DPN2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28, 75 e 90. O ganho de peso foi calculado, tanto dos animais do grupo controle como dos experimentais para avaliação indireta da toxicidade. O desmame foi feito no DPN21, sendo alocados machos e fêmeas em caixas distintas, em número de quatro por caixa moradia.

Figura 8 - Ninhada de rata com quatro machos e quatro fêmeas

3.3.3.2 Desenvolvimento físico

A avaliação do desenvolvimento físico foi feita observando, em cada filhote (macho e fêmea) previamente escolhido ao acaso e identificado como representante da ninhada, o aparecimento dos seguintes parâmetros:

- desdobramento de orelha: observado entre o DPN1 e DPN5, quanto a sua ocorrência;
- erupção dos dentes incisivos: observada pela abertura da boca do filhote entre o DPN6 e DPN12, sendo registrado o dia exato do aparecimento do esmalte dos dentes superiores e também dos inferiores;
- abertura dos olhos: registrado o dia da ocorrência da primeira fresta da abertura dos dois olhos. Esta observação foi realizada entre o DPN10 e DPN15;
- aparecimento de pelos: ocorre usualmente do DPN5 ao DPN8. O pelo difere da penugem, que aparece no DPN1 ou DPN2, pelo seu maior comprimento e espessura;

- descida de testículo: foi observado o dia em que os dois testículos desceram para o escroto. Esta observação iniciou-se entre o DPN18 e DPN30 dos filhotes machos;

- abertura vaginal: foi registrado o dia da ocorrência da fresta vaginal. Esta observação foi realizada a partir do DPN30 dos filhotes do sexo feminino.

A figura 9 mostra em um filhote com 10 dias de vida (DPN10) apontando alguns desses parâmetros do desenvolvimento físico avaliados.

Figura 9 - Rato no dia pós-natal 10 (DPN10), quando é possível observar (A) olho ainda fechado, (B) pelos já nascidos e (C) orelha já desdobrada

3.3.3.3 Desenvolvimento neurocomportamental

A avaliação do desenvolvimento neurocomportamental da prole foi feita em um macho e uma fêmea de cada ninhada escolhidos ao acaso e identificados (marca de tinta hidrográfica no dorso) para representar a prole, sendo avaliados os seguintes parâmetros:

- reflexo de preensão palmar: o animal é contido em uma das mãos do(a) pesquisador(a) e, uma das patas do filhote é tocada com a ponta de um clipe, sendo considerado presente quando o animal fecha a pata ao contato físico com o clipe. Este teste foi realizado no DPN2, DPN4, DPN6, DPN8 e DPN10, sendo que este é o único teste em que o reflexo desaparece ao longo do tempo;

- reflexo de endireitamento de postura: o animal é colocado em decúbito dorsal, sendo medida a ocorrência ou não da resposta de virar o corpo para a posição de decúbito ventral, com as quatro patas espalmadas na superfície. O período de latência máximo para este teste é de 30 segundos. Este reflexo foi observado do DPN5 ao DPN10;

- reflexo de geotaxia negativa: o animal é colocado em uma rampa de aproximadamente 45° de inclinação, a 5 cm da base dessa superfície, com a cabeça direcionada para baixo. Anota-se a latência (não superior a 30 segundos), para o animal se voltar para a posição oposta, ou seja, com a cabeça para cima (Figura 10). Quando o animal não apresenta o reflexo na primeira tentativa, ele é testado mais duas vezes com a mesma latência. A ocorrência na 1°, 2° ou 3° tentativa também foi registrada. Este reflexo foi observado no DPN5, DPN7, DPN9, DPN11 e DPN13.

Figura 10 - Plataforma com inclinação de aproximadamente 45° para a observação da geotaxia negativa do filhote

- dia de andar adulto: o animal é colocado sobre uma superfície plana e observa-se se ele se apoia sobre as quatro patas sem encostar o ventre na superfície plana. Quando isto é observado anota-se, então, o dia de andar adulto.

Este parâmetro foi observado do DPN10 ao DPN18 ou até o dia que o animal o apresentasse;

- reflexo de sobressalto: o filhote é colocado separado dos seus irmãos e é exposto a um estalido curto e seco (movimento de um molho de chaves). Observa-se quando o animal apresenta um tremor generalizado logo após o ruído, o que indica que o conduto auditivo está aberto. Foi registrado o dia em que o animal apresenta pela primeira vez este reflexo. Este teste foi realizado do DPN11 ao DPN14 dia, ou até o dia que o animal o apresentasse;

- atividade motora: foi avaliada no campo aberto adaptado para filhotes (40 cm de diâmetro) do DPN15 ao DPN21, e quando adulto (campo aberto com 97 cm de diâmetro) no DPN60, sempre durante o mesmo período do dia (tarde), conforme descrito no item 3.3.2.2.

3.3.3.4 Comportamento de brincar de luta (*play fighting*)

O comportamento de brincar foi avaliado no DPN30 ou DPN31, pois neste período o rato exibe esse comportamento com maior intensidade (PLETNIKOV et al., 1999) e quando o animal é isolado previamente, há exacerbação dos episódios dessa interação social, quando é feito o subsequente pareamento de animais (FILE; SETH, 2003). Assim, no DPN25 os ratos foram mantidos em duas condições de alojamento: um isolado (sozinho na caixa moradia, mas na mesma sala com outros animais) e outro em grupo de dois animais por caixa moradia (da mesma ninhada). Esses animais isolados ou agrupados permaneceram nessas condições até o DPN30.

No DPN30 foi realizado o teste que consiste na introdução de um animal agrupado (intruso) na caixa moradia do animal isolado (residente), tomando-se o cuidado para que os indivíduos possuísem pesos similares (diferença de até 10 g). O pareamento sempre foi realizado com animais do mesmo tratamento, ou seja, controles eram confrontados com controles e experimentais foram confrontados com experimentais.

Imediatamente antes do início do experimento, entre as 9h00 e as 11h00, as caixas de um animal isolado e de uma dupla agrupada foram levadas para a sala de observação comportamental, por 5 minutos, para a aclimatação. Após este período, um intruso foi colocado na caixa de um residente, dando início a filmagem que durou 10 minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- *pinning* ou comportamento de brincar propriamente dito: foi avaliada a frequência com que um animal fica em decúbito dorsal, expondo seu ventre para o outro, que, por sua vez, se posiciona sobre ele (Figura 11);

- rotação-parcial: foi avaliada a frequência com que um animal não faz o *pinning* completo;

- ataque: foi avaliada a frequência com que um animal inicia a luta;

- contra-ataque: foi avaliada a frequência com que o animal revida o ataque inicial do seu parceiro;

- esquiva: foi avaliada a frequência com que o animal atacado consegue desviar ou fugir da luta;

- imobilidade: tempo (em segundos) que o animal fica parado sem realizar nenhuma atividade.

Figura 11. Ilustração do *pinning* ou comportamento de brincar propriamente dito (vista superior e lateral), realizado entre dois filhotes de ratos jovens (Fonte: Kirsten, T. B., 2008)

3.3.3.5 Interação Social

A interação social foi avaliada entre DPN90 e DPN95, durante o período da manhã, entre as 9:00 e 11:00 h. Esse comportamento foi avaliado em um aparato descrito anteriormente (CRAWLEY, 2007; YANG, 2011; NOVAES, 2012), que consiste de uma caixa retangular de acrílico (41 x 26 x 39 cm), dividida em três compartimentos iguais, separados por portinholas retráteis 122 x 37 x 78 cm (Figura 12). Nos dois compartimentos laterais são colocadas, em cada um deles, uma gaiola de metal (30 x 15 x 19 cm), sendo que num compartimento há uma gaiola com o rato “desconhecido” (isto é, animal que não é irmão do rato teste) e no outro uma gaiola vazia; no compartimento central é colocado o rato teste.

A observação da interação social é precedida por um período de habituação de 10 minutos, que consiste da introdução do rato teste no compartimento central, sendo mantidas as portinholas fechadas. Depois deste período, a gaiola contendo o rato desconhecido é colocada em um dos dois compartimentos laterais, enquanto o outro compartimento recebe uma gaiola de metal vazia. A seguir, as portinholas são abertas, dando-se o início ao teste (o qual foi filmado), que consiste da observação do rato teste por 10 minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: número de vezes que o rato teste entra em cada compartimento (compartimento vazio e compartimento com animal desconhecido); o tempo (em segundos) em que o rato permanece em cada compartimento (compartimento vazio e compartimento com animal desconhecido); e o número de vezes em que o rato teste interage com o rato desconhecido, realizando o comportamento de *nose poking* (focinho – focinho).

O aparato e as gaiolas de metal foram limpos com álcool 5% depois da avaliação de cada animal, para retirada de odores.

Figura 12 - Aparato para observação da interação social

3.3.3.6.1 Níveis de neurotransmissores e metabólitos cerebrais

Os ratos foram decapitados no DPN96 em guilhotina e o encéfalo foi rapidamente retirado, colocado sobre uma placa de gelo, formando, assim, um micro-ambiente mais frio possível para então realizar a coleta das estruturas de interesse. Essas estruturas (hipotálamo, hipocampo e estriato) foram acondicionadas em eppendorfs, pesadas e rapidamente colocadas em gelo seco, para um rápido congelamento e após foram estocadas em freezer -80°C para a posterior homogeneização num período de 20 dias. O procedimento de coleta das estruturas nunca ultrapassou o tempo de 3 minutos.

As estruturas retiradas do encéfalo do animal foram homogeneizadas com o auxílio de uma caneta sonicadora de alta frequência com solução de 15 vezes do seu peso para hipotálamo e hipocampo e de 20 vezes para o estriato com solução diluente gelada de ácido perclórico (HClO_4) 0,1M (Merck®) contendo 0,02% de metabissulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA (ácido 3,4-dihidroxibenzilamina), utilizado como padrão interno para as dosagens de monoaminas. O critério de escolha pela utilização do DHBA como padrão interno foi que este, apresenta as mesmas características físico-químicas que as monoaminas dosadas.

Para uma melhor precipitação das proteínas e ácidos nucleicos, deixou-se os homogenatos *overnight* em refrigerador (0°C). Na manhã seguinte, o material foi centrifugado a 10.000 rpms, por um período de 30 minutos (centrífuga Harrier 18/80 MSE da Sanyo® - refrigerada a 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta automática e armazenado em frascos plásticos de polipropileno da marca eppendorfs, estocado em freezer -80°C para a realização da quantificação pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.3.3.6.2. Aparelho

Utilizou-se um cromatógrafo líquido (modelo LC-20A Prominence – da marca Shimadzu®) acoplado a um detector eletroquímico da marca Decade® (HPLC-ED), O aparelho é possui um sistema de bombas binárias de entrega de solvente, sistema de injeção automática com um auto-amostrador com capacidade para 76 amostras que podem ser refrigeradas a 4 graus Celsius por meio de um sistema peltier e um injetor variável com capacidade de até 100µL. O conjunto possui um forno para manutenção da temperatura da coluna. A coluna utilizada possui fase reversa contendo octadecilsilano (modelo Shim-pack C18 - Shimadzu®) com as seguintes dimensões 150 x 4,6 mm, e 5 µm de tamanho de partícula.

3.3.3.6.3 Preparo das soluções

A fase móvel, ou seja, o meio de arraste neste tipo de cromatografia foi constituída de: 4,20 g/L de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), 7,16 g/l de fosfato de sódio dibásico (NaH_2PO_4), 556,0 mg/l de ácido heptanossulfônico ($C_7H_{15}NaO_3S$), 40,0 mg/l de EDTA e 80,0 ml/l de metanol absoluto. O pH desta solução foi ajustado para 3,0 com auxílio de ácido ortofosfórico (H_3PO_4).

A fase móvel foi filtrada em um sistema a vácuo e deareado por 30 minutos com um fluxo de hélio antes de ser instalada no cromatógrafo. Após sua instalação no sistema cromatográfico, permaneceu por uma noite (*overnight*) circulando em

sistema fechado para estabilização do aparelho, com um fluxo constante de 1,2 ml/min. As condições utilizadas no detector eletroquímico foram o potencial +0,83 V no eletrodo do trabalho. O forno foi mantido em temperatura constante de 45°C.

As soluções-padrão foram preparadas utilizando-se 1 nM de cada um dos padrões: ácido 3,4 dihidroxibenzilamina (DHBA), cloridrato de dopamina (DA), ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), cloridrato de serotonina (5HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) e noradrenalina (NOR), todos da Sigma®. Estes foram diluídos em uma solução padrão contendo ácido clorídrico 0,1M e 0,02% de metabissulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), distribuídos em tubos de eppendorf (1,5 ml), e em seguida estocados em freezer -80°C por um período de até 3 meses. No momento da análise, os padrões foram descongelados e diluídos em 5.000, 10.000 e 20.000 em ácido perclórico 0,1M e filtrados em filtros descartáveis de 0,25 µm antes de serem injetados no cromatógrafo.

Segundo a técnica cromatográfica, as substâncias foram reconhecidas a partir do seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, comparando-as com os padrões. O limite de detecção foi de 0,2 ng para DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIVAA, e NOR.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Trinta e duas fêmeas prenhes foram separadas aleatoriamente em quatro grupos iguais (N=8 animais/grupo), sendo três grupos experimentais e um controle. As fêmeas experimentais receberam, por gavagem, o glifosato-Rondup® do DG15 ao DL7, as doses de 50, 100 ou 150 mg/kg; as fêmeas do grupo controle foram tratadas da mesma forma, porém com água potável (1ml/kg). No DPN2 as ninhadas foram padronizadas em 4 filhotes machos e 4 fêmeas, quando possível. Um filhote macho e uma fêmea dos grupos experimental e do controle foram empregados para as avaliações na infância; os outros filhotes destes grupos foram empregados para os estudos comportamentais na idade adulta. O desmame foi feito no DPN21, quando as proles foram separadas por sexo e tratamento e mantidas nas mesmas condições que seus pais. A avaliação materna e a da prole foram feitas conforme descrito no item 3.3.

Toda a sequencia dos experimentos realizados nos animais está esquematizada na figura 13.

Figura 13 - Delineamento dos experimentos realizados nas progenitoras e na prole. Nas progenitoras foi determinado o dia zero de gestação (GD0) da rata através do lavado vaginal, feito o tratamento com glifosato (Roundup®) ou seu veículo, avaliação da atividade motora e do comportamento materno, bem como a determinação dos níveis de neurotransmissores e metabólitos maternos. A prole foi padronizada, sempre que possível, em 8 filhotes e foram avaliados parâmetros do desenvolvimento físico e neurocomportamental, sendo o desmame no dia pós-natal 21 (DPN21), seguido pela avaliação do comportamento de brincar de luta, interação social e determinação dos níveis de neurotransmissores e metabólitos.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Empregou-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) para a realização das análises estatísticas. Para verificar a homocedasticidade dos dados utilizou-se o teste de Bartlett. Para dados paramétricos foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via ou, quando existiam dois fatores (tempo e tratamento) para serem avaliados empregou-se a ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de

Bonferroni. Para análise não paramétrica foi utilizado Kruskal-Wallis, seguida pelo Qui-quadrado.

Em todas as análises efetuadas, as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO MATERNA

Peso materno, consumo de água e de ração e número de filhotes nascidos

A tabela 1 e a figura 14 mostram os efeitos da exposição perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®) no peso materno de ratas durante a gestação e a lactação. Quanto ao peso materno durante a gestação, a ANOVA de duas vias indicou diferenças significantes entre os grupos nos dias de observação [$F(24/252)=76,23$, $p<0,0001$], não havendo diferenças entre o tratamento ($F(24/252)=0,16$, $p=0,617$) e interação entre os fatores ($F(24/252)=0,81$, $p=0,997$). Assim, pode-se notar que há aumento no peso materno à medida que progride a gestação.

Quanto ao peso materno durante a lactação, a ANOVA de duas vias indicou diferenças significantes entre os grupos nos dias de observação [$F(24/252)=13,37$, $p<0,0001$] e no tratamento ($F(24/252)=6,03$, $p=0,003$), mas sem interação entre os fatores ($F(24/252)=4,20$, $p=0,944$). O teste de Bonferroni indicou que apenas no DL1 as fêmeas expostas a maior dose de glifosato (Roundup®) tiveram menor peso corporal, em relação às fêmeas do grupo controle.

A tabela 2 mostra o consumo médio diário de ração e de água de ratas durante a gestação (DG1 – DG21) e lactação (DL1 – DL7) expostas durante o período perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®). Quanto ao período de gestação, a ANOVA de uma via não indicou diferenças significantes entre os grupos, tanto no consumo de ração [$F(3/31)=0,468$, $p=0,706$]], como no de água [$F(3/31)=0,005$, $p=0,999$]]. Fato semelhante foi observado na lactação, em que a ANOVA de uma via não indicou diferenças significantes entre os grupos, tanto no consumo de ração [$F(3/31)=0,129$, $p=0,268$]], como no de água [$F(3/31)=1,001$, $p=0,1001$]].

Tabela 1 - Peso materno (em g) de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato, por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=número de animais por grupo

dia	Grupo controle (N=8)	Glifosato (mg/kg)		
		50 (N=8)	100 (N=8)	150 (N=8)
gestação				
0	230,37±3,79	230,75±4,99	229,30±4,40	236,62±6,90
4	243,25±4,90	241,75±4,78	238,82±3,34	235,75±7,16
8	251,62±4,74	253,25±4,53	253,53±5,82	238,50±7,70
11	259,00±5,20	264,12±5,82	260,86±5,00	237,50±7,25
15	269,25±4,43	264,87±9,00	265,31±5,32	242,00±7,71
18	296,25±5,17	299,37±6,70	297,87±8,00	243,12±7,52
19	305,25±4,53	308,62±6,10	305,87±8,31	245,87±7,41
20	316,75±5,71	318,75±6,54	312,00±8,40	260,50±8,02
21	325,50±5,19	328,00±7,25	319,12±9,31	263,99±8,00
lactação				
1	264,12±13,37	252,50±9,30	244,60±5,32	236,62±6,90*
4	245,25±4,63	247,75±5,01	230,71±7,11	235,75±7,16
8	247,00±4,56	251,37±4,89	249,00±6,21	238,50±7,70
11	246,62±3,40	253,00±5,34	244,51±7,25	237,50±7,25
15	250,62±5,30	257,75±5,41	250,01±5,10	242,00±7,71
18	252,87±3,97	263,00±5,66	252,20±7,00	243,12±7,52
19	255,75±4,47	263,00±5,66	254,81±5,69	245,87±7,41
20	253,37±9,11	275,25±6,44	263,53±7,35	260,50±8,02
21	259,33±8,75	268,26±5,44	265,90±8,02	263,99±8,00

*p<0,05, ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni, em relação ao grupo controle

Figura 14 - Peso materno (em g) de ratas durante a gestação e lactação dos grupos controle e de ratas expostas a diferentes doses de glifosato (Roundup®) (50, 100 e 150 mg/kg) durante 15^o gestação ao 7^o dia de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão; N=8 animais por grupo. *p<0,05, ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni, em relação ao grupo controle

Tabela 2 - Consumo médio diário de ração e de água durante a gestação (DG0 – DG21) e a lactação (DL1 – DL7) de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=número de animais por grupo

Consumo	Grupo controle (N=8)	Glifosato (mg/kg)		
		50 (N=8)	100 (N=8)	150 (N=8)
	gestação			
Ração (g)	22,80±0,53	22,61±0,47	22,86±0,30	23,28±0,30
Água (ml)	25,52±1,60	25,33±1,95	25,19±2,00	25,23±1,97
	lactação			
Ração (g)	19,85±0,65	18,99±0,23	19,32±1,06	17,98±0,44
Água (ml)	22,87±1,23	21,89±0,36	21,44±0,90	20,99±0,36

p>0,05 ANOVA de uma via

A tabela 3 mostra os efeitos da exposição perinatal ao glifosato (Roundup®) no número de filhotes nascido. São apresentados o número total de filhotes nascidos de cada fêmea e o total de filhotes nascidos por grupo, bem como as médias e os respectivos erros-padrão do número de filhotes nascidos por grupo. Considerando esses últimos dados, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos ($F(3/31)=10,84$, $p<0,0001$) e o teste de Bonferroni mostrou redução no número de filhotes nascidos de todos os grupos experimentais, em relação ao grupo controle (Tabela 3 e Figura 15). Não foi constatado morte perinatal em nenhum dos grupos.

A tabela 3 mostra, ainda, que dentre as ratas do grupo controle, todas as ninhadas nascidas foram utilizadas para realização dos experimentos de desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta. Já em relação às ninhadas das ratas dos grupos experimentais, aquelas que apresentaram menos de cinco filhotes foram descartadas, não sendo empregadas para os experimentos subsequentes. É apresentado também o número de filhotes empregados por grupo nos experimentos subsequentes.

Tabela 3 - Filhotes nascidos de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato, por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentados o número total de filhotes nascidos de cada fêmea, o total de filhotes nascidos por grupo, as médias e os respectivos erros-padrão do número de filhotes nascidos por grupo, o número total de ninhadas nascidas/número de ninhadas usadas nos experimentos e o número de filhotes usados

	Grupo controle	Glifosato (mg/kg)		
		50	100	150
rata	Número de filhotes nascidos			
1	12	2	10	1
2	10	9	9	6
3	11	8	7	1
4	14	1	10	8
5	13	8	3	9
6	12	7	8	5
7	13	10	8	8
8	13	9	8	5
Nº total de filhotes nascidos	98	54	63	43
Média ± EPM do nº de filhotes nascidos	12,25±0,45	6,75±1,19*	8,0±0,68*	5,37±1,08*
Nu/Nt^a	8/8	6/8	7/8	6/8
Nf^b	64	47	55	40

^aNu/Nt = número de ninhadas usadas nos experimentos/número total de ninhadas nascidas;

^bNf = número de filhotes usados nos experimentos

*p<0,05 ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Figura 15 - Número de filhotes nascidos de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. * $p < 0,05$ ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Atividade geral no campo aberto durante a gestação e lactação

A tabela 4 e a figura 16 mostram os efeitos da exposição perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®) na atividade geral de ratas observadas no campo aberto (DG5, DG15, DG19 e DL5).

Nos DG5 e DG15 a ANOVA de uma via não indicou diferenças significantes entre os grupos na locomoção [($F_5(3/31)=1,57$, $p=0,217$), ($F_{15}(3/31)=0,155$, $p=0,155$)], no levantar [($F_5(3/31)=0,273$, $p=0,846$); ($F_{15}(3/31)=0,338$, $p=0,797$)] e na duração da imobilidade [($F_5(3/31)=0,211$, $p=0,887$); ($F_{15}(3/31)=0,993$, $p=0,410$)].

No DG19 a ANOVA de uma via não indicou diferenças significantes entre os grupos tanto para a locomoção ($F(3/31)=0,028$, $p=0,993$), quanto na duração da imobilidade ($F(3/31)=0,688$, $p=0,566$), mas para o levantar houve diferenças significante entre os grupos ($F(3/31)=1,518$, $p=0,231$). O teste de Bonferroni mostrou redução do levantar dos animais do grupo 150 mg/kg em relação àqueles do grupo controle.

No DL5 a ANOVA mostrou diferenças significantes entre os grupos na locomoção ($F(3/31)=3,201$, $p=0,032$), no levantar ($F(3/31)=4,624$, $p=0,009$) e na imobilidade ($F(3/31)=3,44$, $p=0,030$). O teste de Bonferroni mostrou redução na

locomoção e no levantar, e aumento da imobilidade das ratas do grupo 150 mg/kg em relação ao grupo controle.

Tabela 4 - Atividade geral, avaliada no campo aberto em diferentes momentos da gestação e lactação, de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato, por via oral, durante o 15º dia de gestação (DG) ao 7º de lactação (DL). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=número de animais por grupo

Parâmetros ^a	Grupo controle (N=8)	Glifosato (mg/kg)		
		50 (N=8)	100 (N=8)	150 (N=8)
	DG5			
locomoção	35,1±5,2	47,1±4,5	47,4±4,8	41,0±4,0
levantar	18,5±5,6	24,0±7,8	22,5±4,3	17,0±6,9
imobilidade	75,4±14,6	70,3±17,5	68,9±9,3	83,4±14,4
	DG15			
locomoção	31,1±8,7	40,7±5,5	37,3±4,5	40,0±6,7
levantar	10,8±5,2	16,4±4,4	12,5±6,5	9,3±4,7
imobilidade	100,8±11,4	83,6±14,9	110,6±14,3	120,9±21,4
	DG19			
locomoção	22,4±11,6	19,3±8,7	20,6±10,7	23,1±9,6
levantar	6,8±1,3	4,0±1,2	4,5±2,6	2,0±0,6*
imobilidade	163,0±22,6	168,6±26,9	184,3±15,9	180,2±15,9
	DL5			
locomoção	23,6±3,6	19,4±3,2	17,5±2,4	11,1±2,2*
levantar	7,2±1,3	4,1±0,9	4,3±0,8	2,0±0,9*
imobilidade	120,6±32,4	130,5±21,6	135,6±17,9	210,4±11,7*

^afreqüências de locomoção e de levantar e duração, em segundos, de imobilidade

*p<0,05 ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni

Figura 16 - Atividade geral, avaliada no campo aberto em diferentes momentos da gestação e lactação, de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato, por via oral, durante o 15º dia de gestação (DG) ao 7º de lactação (DL). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=8 animais/grupo. * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Atividade geral

Comportamento Materno

A tabela 5 e a figura 17 mostram os efeitos da exposição perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®) no comportamento materno de ratas.

Considerando o número de mães que recolheram os filhotes, a análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) não mostrou diferenças significantes entre os grupos [$df= 3,306$, $p=0,3468$].

No número de filhotes recolhidos, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos [$F(3/26)= 3216$, $p<0,0001$] e o teste de Bonferroni revelou redução desse parâmetro em todos os grupos expostos ao glifosato (Roundup®) no período perinatal em relação àqueles do grupo controle.

Na latência para recolher os 3 primeiros filhotes, a ANOVA de uma mostrou diferenças significantes entre os tratamentos [$F(6/69)= 28,49$, $p<0,001$] e os filhotes, [$F(6/69)= 20,01$, $p<0,001$], porém não houve interação entre os fatores [$F(6/69)= 3,69$, $p=0,579$].

No tempo e na frequência do *grooming* de filhotes a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos [respectivamente $F(3/26)= 4,0$, $p<0,0001$; $F(3/26)= 4,0$, $p<0,0001$], e o teste de Bonferroni revelou que as mães que receberam o glifosato (Roundup®) realizaram o *grooming* por menos tempo e menor frequência que as mães controles.

A ANOVA de uma via e o Kruskal-Wallis não indicaram diferenças significantes entre os grupos na construção do ninho [$df= 0,0$ $p=1$], na presença de filhotes no ninho ao final do teste [$F(3/26)= 1,85$, $p=0,375$] e para a latência realização de cifoze [$F(3/26)= 1,39$, $p=0,269$].

Na realização de cifoze em todos os filhotes, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos [$F(3/26)= 12,85$, $p<0,0001$], e o teste de Bonferroni revelou que nenhuma mãe que recebeu glifosato (Roundup®) realizou a cifoze para todos os filhotes.

Tabela 5 - Comportamento materno de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato, por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão, exceto para os escores de construção do ninho que são apresentadas as medianas e os respectivos limites

Parâmetros		Grupo controle	Glifosato (mg/kg)		
			50	100	150
Nº de mães que recolheram os filhotes/Nº total de mães (%) ^b		8/8 (100%)	4/6 (67%)	5/7 (71%)	2/6 (33%)
Nº de filhotes recolhidos ^a		8,0±0	6,1±0,4*	5,20±0,30*	4,5±0,6*
Latência para recolher os 3 primeiros filhotes ^a (s)	1º	500,3±82,5	1819,0±649,3	2010,5±522,0*	2758,5±609,8*
	2º	1332,8±480,4	3600,0±0,0*	2471,0±136,9	3409,5±190,5*
	3º	2240,1±618,2	3600,0±0,0*	3600,0±0,0*	3600,0±0,0*
Tempo de <i>grooming</i> de filhotes ^a (s)		14,0±0,35	10,0±0,5*	11±0,4*	10,0±0,5*
Frequência de <i>grooming</i> de filhotes ^a		4,66±0,3	3,0±0,0*	2,8±0,2*	2,5±0,28*
Construção do ninho (escore) ^b		5,0±0,0	5,0±0,0	5,0±0,0	5,0±0,0
Nº de filhotes no ninho ao final do teste ^a		1,6±0,4	1,2±0,2	1,7±0,4	0,9±0,1
Latência para cifo ^a (s)		186,0±25,5	245,0±36,2	240,9±22,3	259,0±36,0
Nº de ratas com cifo sobre todos os filhotes no ninho ^a		5,05±1,21	0±0	0±0	0±0

^aANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni, *p<0,05

^bAnálise de Variância não paramétrica (Kruskal-Wallis)

Figura 17 - Avaliação do comportamento materno em ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato, por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=8 mães no grupo controle, N=6 mães nos grupos experimentais 50 mg/kg e 150 mg/kg e N=7 mães no grupo 100 mg/kg. * $p < 0,05$ ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni para dados paramétricos e a análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) para porcentagem

Comportamento Materno

Comportamento materno agressivo

A tabela 6 figura 18 mostram os efeitos da exposição perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®) no comportamento materno agressivo de ratas.

Considerando a latência para a 1ª luta, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos ($F(3/26)=8,740$, $p=0,0005$) e o teste de Bonferroni mostrou aumento desse parâmetro nas ratas do grupo 150 mg/kg em relação àquelas do grupo controle.

Na frequência de lutas a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos ($F(3/26)=3,036$, $p=0,049$) e o teste de Bonferroni mostrou redução neste parâmetro nas ratas do grupo 150 mg/kg em relação àquelas do grupo controle.

No tempo total de lutas a ANOVA de uma via mostrou não haver diferenças significantes entre os grupos ($F(3/26)=1,287$, $p=0,302$).

No número de vezes que o intruso farejou os filhotes, a ANOVA de uma via mostrou que houve diferenças significantes entre os grupos ($F(3/26)=8,436$, $p=0,0006$) e o teste de Bonferroni mostrou redução deste parâmetro em ratas de todos os grupos expostos ao glifosato (Roundup®), em relação àquelas do grupo controle.

No número de vezes que a mãe farejou o intruso, a ANOVA de uma via mostrou que não haver diferenças significantes entre os grupos ($F(3/26)=0,529$, $p=0,666$).

Na frequência que a mãe transporta os filhotes, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos ($F(3/26)=6,273$, $p=0,0029$) e o teste de Bonferroni mostrou aumento deste parâmetro em mães dos grupos de 100 mg/kg e 150 mg/kg em relação àquelas do grupo controle.

No número de mães com pelo menos 80% dos filhotes no ninho ao término do experimento, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos ($F(3/26)=75,01$, $p<0,0001$) e o teste de Bonferroni revelou que redução desse parâmetro em todos os grupos expostos ao glifosato (Roundup®) em relação àquelas do grupo controle.

Tabela 6 - Comportamento materno agressivo de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N = número de animais por grupo

Parâmetros	Grupo controle (N=8)	Glifosato (mg/kg)		
		50 (N=6)	100 (N=7)	150 (N=6)
Latência para 1ª luta (s)	104,3±23,5	168,4±38,7	160,3±35,5	387,5±67,1*
Nº de lutas	5,8±1,0	4,1±1,2	4,2±1,1	1,5±0,6*
Tempo total de lutas (s)	12,5±3,7	8,6±2,1	8,0±1,8	5,2±1,9
Nº de vezes que o intruso fareja os filhotes	14,0±0,35	10,0±0,5*	11±0,40*	10,0±0,5*
Nº de vezes que a mãe fareja o intruso	7,5±1,0	9,0±1,6	8,0±1,0	7,0±0,8
Nº de vezes que a mãe transporta o filhote	0,1±0,1	1,0±0,3	1,2±0,3*	1,5±0,3*
Nº de mães com pelo menos 80% dos filhotes no ninho	8,0±0	3,5±0,3*	3,5±0,4*	1,5±0,5*

*p<0,05 ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Figura 18 - Comportamento materno agressivo de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N = número de animais por grupo. N=8 grupo controle, N=6 grupos 50 mg/kg e 150 mg/kg e N=7 mães no grupo 100 mg/kg. * $p < 0,05$ ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Comportamento materno agressivo

Níveis de neurotransmissores e metabólitos cerebrais

As tabelas 7 e a figura 19 mostram os efeitos da exposição perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®) nos níveis de neurotransmissores e metabólitos cerebrais bem como das relações metabólito/neurotransmissor das ratas mães.

No hipotálamo, a ANOVA de uma via indicou diferenças significantes entre os grupos para a DA [$F(3/23)=7,93$, $p=0,0006$] e NOR [$F(3/23)=7,09$, $p=0,002$] e o teste de Bonferroni revelou que as mães expostas a todas as doses de glifosato-Roundup® apresentaram diminuição de DA em relação às mães controles e ainda que apenas as mães expostas a dose de 150 mg/kg apresentaram aumento da NOR em relação as mães controles.

No hipocampo a ANOVA de uma via indicou diferenças significantes entre os grupos para a 5-HT [$F(3/23)=4,94$, $p=0,0100$] e NOR [$F(3/23)=7,56$, $p=0,0014$], e o teste de Bonferroni revelou que apenas as mães expostas a dose 50 mg/kg apresentaram diminuição da 5-HT e NOR em relação as mães controles.

No estriato a ANOVA de uma via indicou diferenças significantes entre os grupos para a DA [$F(3/23)=5,74$, $p=0,0053$], DOPAC [$F(3/23)=23,56$, $p<0,0001$] e 5-HT [$F(3/23)=31,55$, $p<0,0001$]. O teste de Bonferroni revelou que as mães expostas as doses de 100 e 150 mg/kg apresentaram diminuição da DA em relação àquelas do grupo controle, quanto a DOPAC todas as mães expostas as doses de glifosato-Roundup® apresentaram diminuição em relação àquelas do grupo controle, e apenas as mães expostas as doses de 150 mg/kg apresentaram aumento da 5-HT em relação àquelas do grupo controle.

Tabela 7 - Níveis de neurotransmissores e metabólitos cerebrais (ng/g de tecido), bem como a relação metabólito/neurotransmissor de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação, avaliados no primeiro dia pós-desmame. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=número de animais por grupo

Parâmetros	Grupo controle (N=6)	Glifosato (mg/kg)			F (df)
		50 (N=6)	100 (N=6)	150 (N=6)	
	Hipotálamo				
DA	454,9±33,5	335,6±15,8*	300,8±35,0*	274,7±14,7*	F(3/23)=7,93
DOPAC	105,4±21,5	121,5±17,0	120,8±23,9	175,7±36,8	F(3/23)=1,47
HVA	40,8±3,5	47,6±2,6	50,9±3,9	32,7±1,6	F(3/23)=7,05
DOPAC/DA	0,25±0,001	0,34±0,01*	0,38±0,01*	0,62±0,03*	F(3/23)=90,68
HVA/DA	0,09±0,002	0,20±0,04	0,2±0,01	0,1±0,03	F(3/23)=0,92
5-HT	3348,1±578	4411,2±687	4008,3±469	5568,4±598	F(3/23)=2,51
5-HIAA	3654,9±345	2540,2±321	2978,6±499	3455,9±433	F(3/23)=1,51
5-HIAA/5-HT	1,10±0,09	0,63±0,03*	0,70±0,01*	0,62±0,02*	F(3/23)=21,85
NOR	932,6±87,6	1229,6±152	1431,3±155	1778,3±128*	F(3/23)=7,09
	Hipocampo				
DA	37,1±4,5	33,4±1,3	29,6±2,9	27,1±1,6	F(3/23)=2,33
DOPAC	6,5±2,1	4,6±1,7	3,7±0,9	3,7±0,5	F(3/23)=0,83
HVA	12,3±3,5	9,8±1,1	11,8±3,2	10,5±1,0	F(3/23)=0,21
DOPAC/DA	0,16±0,006	0,12±0,005*	0,14±0,005	0,12±0,005*	F(3/23)=13,21
HVA/DA	0,33±0,01	0,27±0,04	0,34±0,03	0,34±0,02	F(3/23)=1,45
5-HT	3126,2±50	2660,8±78*	2978,3±119	2783,2±108	F(3/23)=4,94
5-HIAA	1154,9±95	879,6±59	1008,6±77	931,4±64	F(3/23)=2,55
5-HIAA/5-HT	0,32±0,01	0,33±0,07	0,32±0,05	0,33±0,01	F(3/23)=0,01
NOR	1009,6±88	658,1±52*	933,1±33	854,6±23	F(3/23)=7,56
	Estriato				
DA	5985,7±791	3399,9±1001	2747,0±644*	1790,9±450*	F(3/23)=5,74
DOPAC	2781,6±325	1008,4±115*	887,0±128*	841,0±118*	F(3/23)=23,56
HVA	1142,0±300	790,1±89	900,0±101	961,8±59	F(3/23)=0,77
DOPAC/DA	0,40±0,008	0,30±0,005*	0,32±0,01*	0,41±0,005	F(3/23)=57,79
HVA/DA	0,19±0,08	0,21±0,09	0,30±0,04	0,51±0,09	F(3/23)=3,31
5-HT	2688,2±274	3055,9±163	2105,9±228	4948,1±195*	F(3/23)=31,55
5-HIAA	1351,1±148	1870,0±253	808,6±105	1239,6±311	F(3/23)=3,93
5-HIAA/5-HT	0,50±0,01	0,61±0,02*	0,42±0,02	0,27±0,03*	F(3/23)=45,48
NOR	349,0±62	272,7±59	316,4±87	300,4±65	F(3/23)=0,21

*p<0,05 ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Figura 19 - Níveis de neurotransmissores e metabólitos cerebrais (ng/g de tecido), bem como a relação metabólito/neurotransmissor de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=6 animais por grupo. *p<0,05 ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Níveis de neurotransmissores e metabólitos cerebrais

4.2 AVALIAÇÃO DA PROLE

Peso dos filhotes

A tabela 8 figura 20 mostram os efeitos da exposição perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®) no peso da prole de ratas. Em machos, a ANOVA de duas vias indicou diferenças significante entre os grupos para o tratamento [$F(30/1133)=0,03$, $p<0,0001$) e dias de observação [$F(30/1133)=99,69$, $p<0,0001$, havendo interação entre os fatores ($F(30/1133)=0,06$, $p<0,0001$]. O teste de Bonferroni revelou redução do peso corpóreo de machos oriundos dos grupos 100 e 150 mg/kg aos 75 e 90 dias de vida, em relação àqueles do grupo controle.

Para as fêmeas, a ANOVA de duas vias indicou diferenças significantes entre os grupos para o tratamento [$F(30/1045)=0,03$, $p<0,0001$) e nos dias de observação [$F(30/1045)=99,41$, $p<0,0001$, havendo interação entre os fatores ($F(30/1045)=0,04$, $p<0,0001$]. O teste de Bonferroni revelou redução do peso corpóreo de fêmeas oriundas de ratas de todos os grupos expostos ao glifosato (Roundup®) somente aos 90 dias de vida, em relação àquelas do grupo controle.

Tabela 8 - Peso corpóreo (em g) dos filhotes (machos e fêmeas) de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N = número de animais por grupo

Dias de vida	Grupo controle	Glifosato (mg/kg)		
		50	100	150
	machos			
	(N=32)	(N=27)	(N=23)	(N=25)
2	7,6±0,2	7,5±0,3	7,6±0,2	7,0±0,3
3	9,0±0,4	9,3±0,4	8,7±0,3	7,5±0,5
4	11,0±0,2	10,3±0,5	11,1±0,2	8,5±0,5
5	12,2±0,2	12,4±0,5	12,0±0,2	10,8±0,6
6	13,8±0,1	13,6±0,6	13,4±0,1	12,3±0,7
7	14,7±0,1	15,0±0,6	14,4±0,1	13,2±0,9
14	27,9±0,5	28,4±1,2	27,3±0,4	26,3±1,0
21	46,1±0,6	46,8±1,8	45,9±0,5	45,0±1,0
28	53,4±0,6	52,9±1,9	53,0±0,6	50,2±1,4
75	310,2±1,1	300,9±2,0	298,6±1,4*	288,0±1,0*
90	332,5±1,4	319,5±2,8	318,6±2,0*	311,5±2,5*
	fêmeas			
	(N=32)	(N=20)	(N=32)	(N=15)
2	7,3±0,2	7,3±0,2	7,2±0,3	6,0±0,3
3	9,0±0,4	9,3±0,4	8,8±0,5	6,2±0,5
4	10,8±0,2	10,0±0,5	10,0±0,5	7,3±0,5
5	11,9±0,2	12,0±0,5	10,9±0,6	8,9±0,6
6	13,6±0,1	13,6±0,6	13,0±0,7	10,5±0,7
7	14,6±0,1	15,0±0,6	14,5±0,9	13,0±0,
14	27,8±0,5	28,0±1,2	27,0±1,3	24,3±1,0
21	44,7±0,6	44,8±1,8	43,2±1,0	43,0±1,0
28	50,4±0,6	51,9±1,9	49,6±1,5	48,2±1,4
75	230,0±1,2	229,5±2,0	227,6±1,1	225,3±1,1
90	252,0±2,6	240,0±2,1*	240,0±2,6*	235,0±2,5*

*p<0,05 ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Figura 20 - Peso corpóreo (em g) dos filhotes (machos e fêmeas) de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato, por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. * $p < 0,05$ ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Desenvolvimento físico

A tabela 9 e a figura 21 mostram os efeitos da exposição perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®) no desenvolvimento físico da prole de ratas. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados [erupção dos dentes incisivos - $F(3/53) = 0,109$, $p=0,954$; abertura dos olhos - $F(3/53) = 0,543$, $p=0,654$; desdobramento de orelha - $F(3/53) = 0,562$, $p=0,642$; aparecimento de pelos - $F(3/53) = 0,442$, $p=0,721$; descida dos testículos - $F(3/53) = 0,182$, $p=0,908$; abertura vaginal - $F(3/53) = 2,190$, $p=0,100$].

Tabela 9 - Desenvolvimento físico (dia de vida de ocorrência do parâmetro) da prole de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N = número de animais por grupo

Parâmetros	Grupo controle (N=16)	Glifosato (mg/kg)		
		50 (N=12)	100 (N=14)	150 (N=12)
Erupção dos dentes incisivos	10,0±0,6	10,4±0,5	10,0±0,2	10,1±1,4
Abertura dos olhos	13,5±0,3	13,0±0,3	13,3±0,2	13,2±0,2
Desdobramento de orelhas	2,5±0,1	2,3±0,2	2,5±0,1	2,7±0,2
Aparecimento de pêlos	6,5±0,2	6,3±0,2	6,0±0,5	6,2±0,3
Descida dos testículos	19,8±0,2	20,0±0,3	19,7±0,2	19,7±0,2
Abertura vaginal	34,37±0,5	32,3±0,9	34,1±0,6	34,5±0,5

p>0,05 ANOVA de uma via

Figura 21 - Desenvolvimento físico (dia de vida de ocorrência do parâmetro) da prole de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato, por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. $p>0,05$ ANOVA de uma via

Desenvolvimento neurocomportamental

A tabela 10 e a figura 22 mostram os efeitos da exposição perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®) no desenvolvimento neurocomportamental da prole de ratas. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados [reflexo de preensão palmar - $F(3/53) = 0,034$, $p=0,991$; reflexo de endireitamento - $F(3/53) = 0,089$, $p=0,965$; reflexo de geotaxia negativa - $F(3/53) = 0,079$, $p=0,971$; reflexo de sobressalto - $F(3/53) = 2,301$, $p=0,088$], exceto no andar adulto, no qual observou-se diferenças

significantes entre os grupos [$F(3/53) = 4,328$, $p=0,008$]. O teste de Bonferroni revelou atraso no dia de andar adulto na prole oriunda de ratas expostas a 50 mg/kg de glifosato (Roundup®) em relação a prole do grupo controle.

Tabela 10 -Desenvolvimento neurocomportamental (dia de vida de ocorrência do parâmetro) da prole de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N = número de animais por grupo

Parâmetros	Grupo controle (N=16)	Glifosato (mg/kg)		
		50 (N=12)	100 (N=14)	150 (N=12)
Preensão palmar	5,8±0,2	5,7±0,1	5,7±0,3	5,8±0,4
Endireitamento	5,1±0,1	5,1±0,1	5,2±0,3	5,2±0,2
Geotaxia negativa	6,1±0,2	6,2±0,2	6,1±0,3	6,0±0,1
Andar adulto	10,7±0,2	12,5±0,5*	11,2±0,2	11,6±0,3
Sobressalto	12,2±0,1	13,1±0,2	12,3±0,2	12,3±0,3

* $p<0,05$ ANOVA de uma seguida do teste de Bonferroni

Figura 22 - Desenvolvimento neurocomportamental (dia de vida de ocorrência do parâmetro) da prole de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. * $p < 0,05$ ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Desenvolvimento neurocomportamental

Comportamento de brincar de luta (*play fighting*)

A tabela 11 e a figura 23 mostram os efeitos da exposição perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®) no comportamento de brincar de luta da prole de ratas.

Na prole masculina, em relação ao *pinning*, a ANOVA de uma via indicou diferenças significantes entre os grupos [$F(3/23)=14,20$, $p<0,001$] e o teste de Bonferroni revelou menor frequência de ocorrência desse parâmetro em filhotes oriundos de mães expostas as doses de 100 mg/kg e 150 mg/kg, em relação aos filhotes do grupo controle. Quanto aos demais parâmetros avaliados, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos [rotação parcial - $F(3/23)= 2,106$, $p=0,131$; ataque - $F(3/23)= 0,668$, $p=0,581$; contra-ataque - $F(3/23) = 1,730$, $p=0,193$; esquiva - $F(3/23)= 0,398$, $p=0,755$; imobilidade - $F(3/23)= 3,337$, $p=0,037$].

Na prole feminina, em relação ao *pinning*, a ANOVA de uma via indicou diferenças significantes entre os grupos [$F(3/23)= 24,01$, $p<0,001$] e o teste de Bonferroni revelou que os filhotes de mães submetidas as doses de 50, 100 e 150 mg/kg apresentaram menor frequência de brincar quando comparados com os filhotes de mães do grupo controle. Na imobilidade a ANOVA de uma via indicou diferenças significantes entre os grupos ($F(3/23)= 7,752$, $p=0,001$) e o teste de Bonferroni revelou que a prole de ratas expostas a dose de 50 mg/kg permaneceu mais tempo imóvel que a prole do grupo controle. Quanto aos demais parâmetros avaliados, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos [rotação parcial - $F(3/23)= 0,094$, $p=0,962$; ataque - $F(3/23)= 0,132$, $p=0,939$; contra-ataque - $F(3/23) = 0,058$, $p=0,981$; esquiva - $F(3/23) = 1,460$, $p=0,255$].

Tabela 11 - Comportamento de brincar de luta (play fighting) da prole de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato, por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão das frequências de ocorrência dos diferentes parâmetros, exceto a imobilidade que foi avaliada em segundos. N = número de duplas

Parâmetros	Grupo controle	Glifosato (mg/kg)		
		50	100	150
	machos			
	(N=6)	(N=6)	(N=6)	(N=6)
<i>Pinning</i>	1,0±0,1	0,6±0,2	0,1±0,1*	0±0*
Rotação parcial	0,8±0,1	1,3±0,2	1,0±0,1	1,1±0,4
Ataque	18,5±2,1	22,7±3,1	22,9±3,3	24,1±3,3
Contra-ataque	4,1±1,6	5,2±1,3	3,3±0,5	1,6±0,9
Esquiva	6,8±2,0	8,9±2,0	9,0±1,5	9,1±1,4
Imobilidade	4,1±1,6	9,3±1,8	5,7±1,1	3,6±0,9
	fêmeas			
	(N=6)	(N=6)	(N=6)	(N=6)
<i>Pinning</i>	0,5±0,1	0±0*	0±0*	0±0*
Rotação parcial	0,8±0,1	0,9±0,2	1,0±0,3	1,0±0,5
Ataque	14,3±4,4	17,0±2,3	15,6±3,1	16,3±2,4
Contra-ataque	1,4±1,1	1,9±1,0	1,5±0,8	1,6±0,6
Esquiva	5,1±2,0	7,9±0,3	8,1±0,8	7,8±0,9
Imobilidade	8,0±1,5	14,5±0,7*	10,4±0,9	5,8±1,9

*p<0,05 ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Figura 23 - Comportamento de brincar de luta (play fighting) da prole de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato, por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão das frequências de ocorrência dos diferentes parâmetros, exceto a imobilidade que foi avaliada em segundos. N = 6 duplas por grupo. *p<0,05 ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Comportamento de brincar de luta (*play fighting*)

Atividade motora da prole machos adultos medida em campo aberto

As tabelas 12 e 13 e a figura 24 mostram os efeitos da exposição perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®) na atividade geral da prole de ratas medida em campo aberto.

Na prole masculina:

Na locomoção a ANOVA de duas vias indicou diferenças significantes entre os tratamentos [$F(3/224)=3,36$, $p=0,0021$] e nos dias de observação [$F(7/224)=38,62$, $p<0,0001$], havendo interação entre os fatores [$F(21/224)=8,28$, $p=0,0224$]. O teste de Bonferroni revelou apenas que os filhotes de mães expostas a dose de 50 mg/kg no DPN21 apresentaram aumento da locomoção em relação àqueles do grupo controle.

No levantar a ANOVA de duas vias indicou não haver diferenças significantes entre os tratamentos [$F(3/224)=1,74$, $p=0,1628$], porém houve diferenças significantes nos dias de observação [$F(7/224)=17,38$, $p<0,0001$], mas não houve interação entre os fatores [$F(21/224)=5,35$, $p=0,7709$].

Na duração da imobilidade a ANOVA de duas vias indicou não haver diferenças significantes entre os tratamentos [$F(3/224)=1,74$, $p=0,0772$], porém houve diferenças significantes nos dias de observação [$F(7/224)=39,22$, $p<0,0001$], mas não houve interação entre os fatores [$F(21/224)=2,71$, $p=0,9633$].

No *grooming* a ANOVA de duas vias indicou não haver diferenças significantes entre os tratamentos [$F(3/224)=0,53$, $p=0,3888$], porém houve diferenças significantes nos dias de observação [$F(7/224)=53,32$, $p<0,0001$] e houve interação entre os fatores [$F(21/224)=6,32$, $p=0,3333$]. O teste de Bonferroni revelou que os filhotes de mães expostas as doses de 50 e 100 mg/kg no DPN21 apresentaram maior frequência de *grooming* em relação àqueles do grupo controle.

No número de bolos fecais a ANOVA de duas vias não indicou diferenças significantes entre os grupos no tratamento [$F(3/224)=0,69$, $p=0,0208$], porém houve diferenças nos dias de observação [$F(7/224)=54,35$, $p<0,0001$], e houve interação entre os fatores [$F(21/224)=11,07$, $p<0,0001$]. O teste de Bonferroni revelou que os filhotes de mães expostas a todas as doses do glifosato (Roundup®) no DPN60 apresentaram maior número de bolos fecais em relação àqueles do grupo controle.

Na prole de fêmeas:

Na locomoção a ANOVA de duas vias não indicou diferenças significantes entre os grupos no tratamento [$F(3/224)=0,25$, $p=0,7109$], porém houve diferenças nos dias de observação [$F(7/224)=54,04$, $p<0,0001$], mas não houve interação entre os fatores [$F(21/224)=4,40$, $p=0,3114$]. O teste de Bonferroni revelou apenas que os filhotes de mães expostas a dose de 50 mg/kg no DPN16 apresentaram aumento da locomoção em relação àqueles do grupo controle.

No levantar a ANOVA de duas vias não indicou diferenças significantes entre os grupos no tratamento [$F(3/224)=1,79$, $p=0,1083$], porém houve diferenças nos dias de observação [$F(7/224)=26,39$, $p<0,0001$], mas não houve interação entre os fatores [$F(21/224)=7,49$, $p=0,2182$]. O teste de Bonferroni revelou apenas que os filhotes de mães expostas a dose de 150 mg/kg no DPN60 apresentaram diminuição do levantar em relação àqueles do grupo controle.

Na imobilidade a ANOVA de duas vias não indicou diferenças significantes entre os grupos no tratamento [$F(3/224)=0,39$, $p=0,4717$], porém houve diferenças nos dias de observação [$F(7/224)=62,63$, $p<0,0001$], mas não houve interação entre os fatores [$F(21/224)=2,53$, $p=0,7333$].

No *grooming* a ANOVA de duas vias indicou diferenças significantes entre os grupos no tratamento [$F(3/224)=3,08$, $p=0,0053$] e nos dias observação [$F(7/224)=38,74$, $p<0,0001$], mas não houve interação entre os fatores [$F(21/224)=5,40$, $p=0,3578$]. O teste de Bonferroni revelou apenas que os filhotes de mães expostas a dose de 150 mg/kg no DPN18 apresentaram aumento do *grooming* em relação àqueles do grupo controle.

No número de bolos fecais a ANOVA de duas vias não indicou diferenças significantes entre os grupos no tratamento [$F(3/224)=0,43$, $p=0,4985$], porém houve diferenças nos dias de observação [$F(7/224)=53,89$, $p<0,0001$], mas não houve interação entre os fatores [$F(21/224)=5,30$, $p=0,1197$]. O teste de Bonferroni revelou que os filhotes de mães expostas a todas as doses do glifosato (Roundup®) no DPN21 apresentaram diminuição no número de bolos fecais em relação àqueles do grupo controle e, no DPN60, apenas os filhotes de mães expostas a dose de 50 mg/kg apresentaram aumento no número de bolos fecais em relação àqueles do grupo controle.

Tabela 12 - Atividade geral, avaliada no campo aberto, em diferentes dias pós-natais (DPN), da prole masculina, de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=número de animais por grupo

Parâmetros	Grupo controle (N=8)	Glifosato (mg/kg)		
		50 (N=8)	100 (N=8)	150 (N=8)
DPN5				
locomção	12,8±4,0	22,8±5,0	17,4±2,2	19,2±3,6
levantar	10,0±2,5	8,7±2,2	6,7±2,5	9,5±1,6
imobilidade	25,4±1,1	20,3±0,7	28,9±1,2	33,4±2,3
<i>grooming</i> (s)	8,3±2,2	7,3±0,9	6,3±2,0	9,3±2,0
bolos fecais	0,5±0,3	0,0±0,0	0,4±0,01	0,0±0,0
DPN16				
locomção	13,2±2,5	18,3±4,3	17,3±2,1	17,7±5,0
levantar	8,1±2,0	10,3±4,4	6,8±3,4	7,6±1,9
imobilidade	26,2±2,1	32,6±1,5	39,0±2,4	36,9±4,8
<i>grooming</i>	7,8±1,8	7,7±1,8	9,8±2,7	8,2±2,7
bolos fecais	0,5±0,2	0,0±0,0	0,4±0,1	0,0±0,0
DPN 17				
locomção	19,6±3,2	18,0±2,5	21,6±3,2	20,8±5,4
levantar	10,7±1,3	17,6±2,3	11,2±3,3	9,5±2,4
imobilidade	31,5±3,6	41,6±3,8	32,9±4,5	39,5±3,4
<i>grooming</i>	9,6±0,7	10,7±1,7	11,6±2,8	11,0±2,9
bolos fecais	0,6±0,2	0,0±0,0	0,1±0,0	0,2±0,1
DPN18				
locomção	14,3±2,4	24,7±3,9	22,5±2,4	23,5±4,8
levantar	7,6±1,1	10,2±2,4	14,6±3,5	11,1±2,2
imobilidade	39,4±4,9	44,7±3,7	46,9±2,9	47,0±3,5
<i>grooming</i>	13,7±2,4	13,2±1,3	13,0±1,9	11,3±1,7
bolos fecais	0,1±0,1	0,1±0,1	0,1±0,0	0,0±0,0
DPN19				
locomção	10,7±2,3	14,3±2,1	13,2±2,0	12,6±2,3
levantar	4,7±1,4	13,5±4,1	10,8±4,1	15,0±5,4
imobilidade	45,8±2,6	40,6±4,2	47,2±3,6	52,3±2,9
<i>grooming</i>	14,0±1,8	15,8±1,1	13,2±1,7	17,7±1,7
bolos fecais	0,5±0,2	0,1±0,1	0,1±0,0	0,1±0,1
DPN20				
locomção	13,5±1,9	18,6±3,1*	17,4±2,9	11,5±2,3
levantar	12,0±3,0	13,6±3,5	11,2±3,5	10,0±3,9
imobilidade	35,0±4,6	48,6±3,6	40,1±3,9	45,6±3,9
<i>grooming</i>	16,5±1,0	20,0±2,2*	26,5±2,2*	22,3±2,2
bolos fecais	0,3±0,2	0,0±0,0	0,1±0,0	0,2±0,1
DPN21				
locomção	18,3±2,2	43,7±5,3	19,3±2,2	19,3±4,0
levantar	10,1±2,0	17,7±3,3	9,2±3,3	8,6±2,3
imobilidade	48,0±4,4	51,1±5,0	43,6±4,1	50,6±3,5
<i>grooming</i>	25,5±5,4	46,7±9,0	39,5±6,0	34,5±6,4
bolos fecais	0,8±0,3	0,2±0,1	0,2±0,2	0,3±0,1
DPN60				
locomção	46,6±4,8	42,5±4,9	39,5±4,3	37,6±5,3
levantar	22,5±4,5	20,8±2,3	21,3±2,3	22,6±4,3
imobilidade	75,4±14,6	70,3±17,5	68,9±9,3	83,4±14,4
<i>grooming</i>	35,2±3,2	30,7±4,1	22,6±3,6	32,6±3,0
bolos fecais	1,2±0,1	2,5±0,3*	3,3±0,2*	3,6±0,1*

*p<0,05 ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni

Tabela 13 - Atividade geral, avaliada no campo aberto, em diferentes dias pós-natais (DPN), da prole feminina, de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=número de animais por grupo

Parâmetros	Grupo controle (N=8)	Glifosato (mg/kg)		
		50 (N=8)	100 (N=8)	150 (N=8)
DG5				
locomotoção	14,8±3,5	9,75±1,3	10,8±3,5	9,5±1,6
levantar	6,5±2,1	9,6±1,7	7,7±2,3	10,7±2,3
imobilidade	14,3±3,5	9,7±1,3	11,8±3,5	10,5±1,6
<i>grooming</i>	5,3±1,8	6,8±0,9	7,2±1,9	10,2±1,8
bolos fecais	0,2±0,1	0,1±0,1	0,2±0,01	0,1±0,001
DPN16				
locomotoção	10,8±1,9	26,8±3,6*	16,6±2,9	19,1±5,8
levantar	8,1±2,0	10,2±2,4	10,4±1,9	9,3±2,5
imobilidade	11,5±1,9	16,8±1,6	16,6±2,9	19,1±5,8
<i>grooming</i>	8,1±1,5	11,0±1,3	11,0±1,6	11,7±1,5
bolos fecais	0,6±0,2	0,1±0,0	0,1±0,1	0,1±0,1
DPN17				
locomotoção	9,8±2,0	12,6±2,1	11,0±1,8	16,0±3,4
levantar	6,0±1,0	10,8±1,5	8,7±1,8	9,3±1,8
imobilidade	9,8±2,0	12,6±2,1	8,4±1,8	16,0±3,4
<i>grooming</i>	18,0±3,4	12,0±1,3	13,3±0,9	11,7±1,5
bolos fecais	0,5±0,2	0,1±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1
DPN18				
locomotoção	15,5±2,3	13,8±5,9	9,5±2,3	12,5±2,3
levantar	11,7±2,1	11,0±2,5	9,3±1,5	7,3±1,5
imobilidade	15,5±2,3	13,8±5,9	12,5±2,3	12,5±2,9
<i>grooming</i>	8,6±1,4	11,5±1,8	13,0±1,6	23,1±5,9*
bolos fecais	0,1±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1
DPN19				
locomotoção	16,0±3,4	9,3±1,5	12,0±2,4	9,5±1,4
levantar	7,8±1,5	7,7±2,0	6,9±1,8	6,21±2,3
imobilidade	21,0±3,4	19,3±1,5	18,3±2,4	19,5±1,4
<i>grooming</i>	15,8±4,2	21,5±5,8	19,7±2,9	22,7±3,0
bolos fecais	0,5±0,2	0,2±0,2	0,5±0,2	0,7±0,3
DPN20				
locomotoção	11,6±2,2	11,1±1,6	10,0±2,2	11,6±3,4
levantar	10,5±2,1	11,3±2,7	9,4±2,1	8,1±3,2
imobilidade	11,6±2,2	9,1±1,6	10,0±2,2	11,6±3,4
<i>grooming</i>	9,8±2,4	18,5±3,3	11,0±4,0	21,0±4,7
bolos fecais	0,6±0,3	0,6±0,3	0,9±0,1	0,2±0,1
DPN21				
locomotoção	18,1±2,0	17,6±1,7	18,3±2,0	19,0±3,8
levantar	12,0±2,0	9,3±1,2	10,1±1,9	7,6±1,7
imobilidade	18,1±2,0	17,6±1,7	18,3±2,0	19,0±3,8
<i>grooming</i>	21,5±5,2	18,3±3,4	18,6±3,3	21,2±3,8
bolos fecais	1,3±0,5	0,3±0,2*	0,3±0,2*	0,3±0,3*
DPN60				
locomotoção	41,5±3,6	39,8±4,1	39,5±2,9	38,6±3,6
levantar	25,5±3,5	20,6±4,5	22,6±1,7	11,9±2,3*
imobilidade	41,5±3,6	39,8±4,2	49,5±2,9	48,6±2,9
<i>grooming</i>	33,6±2,6	29,6±4,5	27,9±3,4	38,9±4,1
bolos fecais	2,1±0,1	3,2±0,5*	2,5±0,3	2,7±0,4

*p<0,05 ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni

Figura 24 - Atividade geral da prole de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão das frequências de ocorrência dos diferentes parâmetros, exceto a imobilidade que foi avaliada em segundos. N=8 animais por grupo. *p<0,05 ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni

Atividade geral da prole

Interação Social

A tabela 14 e a figura 25 mostram os efeitos da exposição perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®) na interação social da prole adulta de ratas.

Na prole masculina

Em relação aos parâmetros avaliados, a ANOVA de uma via não indicou diferenças significantes entre os grupos para o número de vezes que o animal teste entrou pela porta onde havia o compartimento vazio [$F(3/31)=0,3345$, $p=0,8005$], número de vezes que o animal teste entrou pela porta onde havia o compartimento com o animal desconhecido [$F(3/31)=0,6600$, $p=0,5835$], tempo que o animal teste permaneceu onde havia o compartimento vazio [$F(3/31)=0,4957$, $p=0,6882$], tempo que o animal teste permaneceu onde havia o compartimento com o animal desconhecido [$F(3/31)=0,0987$, $p=0,9601$] e *nose poking* [$F(3/31)=0,9509$, $p=0,429$].

Na prole feminina

Em relação aos parâmetros avaliados, a ANOVA de uma via não indicou diferenças significantes entre os grupos para o número de vezes que a fêmea teste entrou pela porta onde havia o compartimento vazio [$F(3/31)=0,0097$, $p=0,9986$], número de vezes que a fêmea teste entrou pela porta onde havia o compartimento com o animal desconhecido [$F(3/31)=0,4013$, $p=0,7531$], tempo que a fêmea teste permaneceu onde havia o compartimento vazio [$F(3/31)=0,3293$, $p=0,8042$], tempo que a fêmea teste permaneceu onde havia o compartimento com o animal desconhecido [$F(3/31)=0,6786$, $p=0,5725$] e *nose poking* [$F(3/31)=2,449$, $p=0,0844$].

Tabela 14 - Interação social das proles adultas masculina e feminina de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=número de animais por grupo

Parâmetros	Grupo controle	Glifosato (mg/kg)		
		50	100	150
machos				
	(N=8)	(N=8)	(N=8)	(N=8)
No. de vezes compartimento vazio	3,5±0,8	2,7±0,6	2,6±0,8	2,3±1,1
No. de vezes compartimento desconhecido	3,3±0,4	3,5±0,2	4,8±1,2	3,6±1,0
Tempo compartimento vazio (s)	146,5±48,4	88,0±15,3	103,8±33,9	97,6±40,7
Tempo compartimento desconhecido (s)	239,3±46,0	258,5±34,6	246,3±61,5	221,9±48,6
<i>Nose poking</i>	3,7±1,0	2,9±0,6	2,0±0,9	1,8±0,9
fêmeas				
	(N=8)	(N=8)	(N=8)	(N=8)
No. de vezes compartimento vazio	3,6±1,1	3,6±0,8	3,4±0,8	3,5±1,5
No. de vezes compartimento desconhecido	4,1±0,5	5,1±0,1	4,9±0,8	5,0±1,0
Tempo compartimento vazio (s)	119,8±41,1	166,3±37,8	183,9±57,4	155,2±49,6
Tempo compartimento desconhecido (s)	279,3±41,1	220,0±64,5	200,4±31,1	207,0±28,7
<i>Nose poking</i>	3,7±0,8	2,0±0,2	1,9±0,5	1,6±0,7

p>0,05 ANOVA de uma via

Figura 25 - Interação social das proles adultas masculina e feminina de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=8 animais por grupo ($p>0,05$ ANOVA de uma via)

Interação Social

Número de vezes em que o macho entrou pela porta onde havia o compartimento vazio

Número de vezes em que a fêmea entrou pela porta onde havia o compartimento vazio

Número de vezes em que o macho entrou pela porta onde havia o compartimento com o desconhecido

Número de vezes em que a fêmea entrou pela porta onde havia o compartimento com o desconhecido

Tempo em que o macho permaneceu onde havia o compartimento vazio

Tempo em que a fêmea permaneceu onde havia o compartimento vazio

Tempo em que o macho permaneceu onde havia o compartimento com o estranho

Tempo em que a fêmea permaneceu onde havia o compartimento com o estranho

Nose poking macho

Nose poking fêmea

Níveis de neurotransmissores e metabólitos cerebrais

A tabela 15 e a figura 26 mostram os efeitos da exposição perinatal a diferentes doses de glifosato (Roundup®) nos níveis de neurotransmissores e metabólitos cerebrais das ratas mães e sua prole masculina e feminina adulta.

Na prole masculina

No hipotálamo, a ANOVA de uma via indicou diferenças significantes entre os grupos para DA [$F(3/23)=4,64$, $p=0,0128$], 5-HIAA [$F(3/23)=6,93$, $p=0,0022$] e NOR [$F(3/23)=3,32$, $p=0,0406$]. O teste de Bonferroni revelou que os filhotes de mães expostas a dose de 50 e 100 mg/kg apresentaram diminuição da DA em relação àqueles do grupo controle, enquanto apenas os filhotes de mães expostas a dose de 50 mg/kg apresentaram aumento da 5-HIAA relação àqueles do grupo controle e ainda que apenas que os filhotes de mães expostas a dose de 50 mg/kg apresentaram diminuição da NOR relação àqueles do grupo controle.

No hipocampo, a ANOVA de uma via indicou diferenças significantes entre os grupos somente para 5-HT [$F(3/23)=4,37$, $p=0,0160$]. O teste de Bonferroni revelou que os filhotes de mães expostas as doses de 50 mg/kg apresentaram diminuição da 5-HT em relação àqueles do grupo controle.

No estriato a ANOVA de uma via indicou diferenças significantes entre os grupos para a DA [$F(3/23)=3,28$, $p=0,0422$], DOPAC [$F(3/23)=5,22$, $p=0,079$], 5-HT [$F(3/23)=14,58$, $p<0,0001$] e 5-HIAA [$F(3/23)=8,29$, $p=0,0009$]. O teste de Bonferroni revelou que os filhotes de mães expostas as doses de 50 mg/kg apresentaram aumento das DA e DOPAC em relação àqueles do grupo controle, os filhotes de mães expostas as doses de 50 e 100 mg/kg apresentaram diminuição da 5-HT e os filhotes de mães expostas as doses de 150 mg/kg apresentaram aumento da 5-HIAA em relação àqueles do grupo controle.

Na prole feminina

No hipotálamo a ANOVA de duas vias indicou diferenças significantes entre os grupos para DA [$F(3/23)=23,46$, $p<0,0001$], HVA [$F(3/23)=3,15$, $p=0,0473$] e 5-HT [$F(3/23)=7,63$, $p=0,2634$]. O teste de Bonferroni revelou que os filhotes de mães expostas a dose de 50, 100 e 150 mg/kg apresentaram diminuição da DA em relação àqueles do grupo controle, os filhotes de mães expostas as doses de 50 e apresentaram aumento da HVA em relação àqueles do grupo controle e os filhotes

de mães expostas as doses de 100 e 150 mg/kg apresentaram aumento da 5-HIAA em relação aos filhotes das mães controles.

No hipocampo a ANOVA de uma via indicou diferenças significantes entre os grupos para DA [$F(3/23)=175,0$, $p<0,0001$] e DOPAC [$F(3/23)=3,68$, $p=0,0291$]. O teste de Bonferroni revelou que os filhotes de mães expostas as doses de 50, 100 e 150 mg/kg apresentaram diminuição da DA em relação àqueles do grupo controle e apenas o filhotes das mães expostas a dose de 150 mg/kg apresentaram diminuição da DOPAC em relação aos filhotes do grupo controle.

No estriato a ANOVA de uma via indicou diferenças significantes entre os grupos para DA [$F(3/23)=8,81$, $p=0,0005$], 5-HT [$F(3/23)=5,78$, $p=0,0051$], e NOR [$F(3/23)=14,43$, $p<0,0001$]. O teste de Bonferroni revelou que os filhotes de mães expostas a dose 150 mg/kg apresentaram diminuição da DA, os filhotes de mães expostas a dose de 50 e 150 mg/kg apresentaram diminuição de 5-HT em relação àqueles do grupo controle e ainda que apenas os filhotes de mães expostas a dose 150 mg/kg apresentaram diminuição da NOR em relação aos filhotes de mães controle.

Tabela 15 - Níveis de neurotransmissores e metabólitos cerebrais das proles adultas masculina e feminina de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=número de animais por grupo

Parâmetros	Grupo controle (N=6)	Glifosato (mg/kg)			F (df)
		50 (N=6)	100 (N=6)	150 (N=6)	
Prole masculina-hipotálamo					
DA	441,3±25,6	323,9±19,6*	313,7±36,9*	358,3±22,1	F(3/23)=4,64
DOPAC	81,2±24,3	77,5±11,3	75,9±15,6	82,6±25,7	F(3/23)=0,02
HVA	52,9±7,4	59,4±6,6	50,3±3,1	47,2±1,9	F(3/23)=0,96
DOPAC/DA	0,21±0,01	0,22±0,09	0,23±0,02*	0,22±0,01	F(3/23)=3,06
HVA/ DA	0,10±0,05	0,15±0,07*	0,15±0,02*	0,13±0,01*	F(3/23)=28,27
5-HT	2697,2±334	3463,5±722	2996,1±500	1703,9±298	F(3/23)=2,28
5-HIAA	3506,9±448	6834,8±756*	4061,1±501	5088,9±459	F(3/23)=6,93
5-HIAA/ 5-HT	1,20±0,03	2,00±0,01*	1,36±0,03*	2,99±0,05*	F(3/23)=593,1
NOR	1687,1±114	1107,3±150*	1425,6±158	1578,5±127	F(3/23)=3,32
Prole masculina-hipocampo					
DA	41,2±2,0	43,7±2,6	31,9±3,1	47,6±3,4	F(3/23)=5,58
DOPAC	5,0±0,7	4,3±1,7	4,7±1,4	4,0±0,5	F(3/23)=0,13
HVA	9,4±1,0	9,0±2,6	9,2±1,1	7,8±1,5	F(3/23)=0,18
DOPAC/DA	0,12±0,01	0,10±0,02	0,3±0,01	0,15±0,02	F(3/23)=0,19
HVA/ DA	0,22±0,01	0,20±0,01	0,30±0,02*	0,16±0,01*	F(3/23)=19,81
5-HT	3426,1±55	2197,9±169*	2574,3±127	3426,1±551	F(3/23)=4,37
5-HIAA	1203,6±105	1142,6±87	1374,9±131	1301,6±139	F(3/23)=0,77
5-HIAA/ 5-HT	0,35±0,001	0,51±0,002*	0,53±0,003*	0,37±0,001*	F(3/23)=244
NOR	1194,3±87	972,7±152	1145,3±109	1431,2±203	F(3/23)=1,70
Prole masculina-estriato					
DA	3264,6±210	5206,9±778*	4356,1±198	4092,0±304	F(3/23)=3,28
DOPAC	1590,1±110	2781,6±265*	2005,1±188	2247,7±268	F(3/23)=5,22
HVA	759,3±200	1149,4±201	913,6±127	808,1±116	F(3/23)=1,09
DOPAC/DA	0,48±0,02	0,53±0,04	0,46±0,02	0,52±0,06	F(3/23)=0,72
HVA/ DA	0,23±0,06	0,22±0,01	0,21±0,02	0,19±0,05	F(3/23)=0,17
5-HT	3102,5±334	1905,1±103*	1393,3±109*	3055,9±255	F(3/23)=14,58
5-HIAA	3597,5±224	4387,1±182	3697,2±247	5765,4±581*	F(3/23)=8,29
5-HIAA/ 5-HT	1,15±0,2	2,31±0,3*	2,60±0,3*	1,92±0,2	F(3/23)=6,06
NOR	272,0±125	70,8±3,6	149,5±5,4	354,3±28,1	F(3/23)=3,86
Prole feminina-hipotálamo					
DA	391,4±35,2	244,6±17,1*	203,9±27,3*	98,6±15,2*	F(3/23)=23,46
DOPAC	51,2±11,3	77,8±9,6	65,1±12,6	62,9±12,5	F(3/23)=0,83
HVA	32,1±2,6	49,4±6,6	41,6±0,9	37,6±4,0	F(3/23)=3,15
DOPAC/DA	0,13±0,02	0,31±0,07	0,21±0,04	0,37±0,05*	F(3/23)=4,80
HVA/DA	0,08±0,001	0,20±0,002*	0,20±0,009*	0,34±0,007*	F(3/23)=334
5-HT	1106,9±209	2131,7±144	2478,6±255*	2710,9±365*	F(3/23)=7,63
5-HIAA	3122,6±112	4583,9±589	4789,3±987	4987,6±594	F(3/23)=1,70
5-HIAA/ 5-HT	2,82±0,6	2,15±0,5	1,93±0,3	1,84±0,2	F(3/23)=1,06
NOR	1283,6±257	978,6±87	1005,6±49	879,6±99	F(3/23)=1,40
Prole feminina-hipocampo					
DA	51,2±1,6	23,1±0,9*	21,1±0,6*	17,9±1,3*	F(3/23)=175,0
DOPAC	6,2±0,9	3,3±0,7	3,9±0,9	2,9±0,5*	F(3/23)=3,68
HVA	8,8±0,9	9,6±1,6	8,2±1,2	9,0±1,0	F(3/23)=0,22
DOPAC/DA	0,12±0,03	0,14±0,02	0,35±0,01*	0,17±0,05	F(3/23)=11,38
HVA/ DA	0,17±0,03	0,31±0,02	0,39±0,04*	0,52±0,08*	F(3/23)=9,24
5-HT	3001,1±126	3195,9±203	2444,3±204	2907,7±339	F(3/23)=1,90
5-HIAA	2503,1±247	1742,6±181	1300,1±522	1220,6±248	F(3/23)=3,23
5-HIAA/ 5-HT	0,83±0,05	0,52±0,02*	0,50±0,03*	0,41±0,01*	F(3/23)=34,36
NOR	887,9±102	1072,3±250	1241,3±219	997,1±154	F(3/23)=0,61
Prole feminina-estriato					
DA	4464,0±215	3211,9±981	3297,1±167	1092,0±268*	F(3/23)=8,81
DOPAC	1995,7±79	1786,2±104	2040,8±108	1987,6±387	F(3/23)=0,28
HVA	831,0±117	1019,4±101	1158,3±117	902,8±106	F(3/23)=1,67
DOPAC/DA	0,44±0,07	0,55±0,02	0,61±0,01	1,81±0,06*	F(3/23)=183,3
HVA/ DA	0,18±0,04	0,31±0,01	0,35±0,05	0,82±0,09*	F(3/23)=25,42
5-HT	3702,1±486	2005,1±145*	2393,1±210	2051,4±369*	F(3/23)=5,78
5-HIAA	2897,8±208	2360,1±203	2093,9±179	1795,4±487	F(3/23)=2,47
5-HIAA/ 5-HT	0,78±0,06	1,17±0,1*	0,87±0,07	0,87±0,05	F(3/23)=5,52
NOR	171,6±23	175,5±17,6	109,5±4,0	54,1±8,1*	F(3/23)=14,43

*p<0,05 ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni

Figura 26 - Níveis de neurotransmissores e metabólitos cerebrais das proles adultas masculina e feminina de ratas expostas ou não (grupo controle) a diferentes doses de glifosato (Roundup®), por via oral, durante o 15º dia de gestação ao 7º de lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N=6 animais por grupo. * $p < 0,05$ ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni

Níveis de neurotransmissores e metabólitos cerebrais

5 DISCUSSÃO

No presente estudo escolheu-se as doses de glifosato-Roundup® considerando dados da Monsanto que apontaram ser a NOAEL para reprodução superior a 30 mg/kg (MONSANTO, 2002). Assim, empregou-se as doses de 50, 100 e 150 mg/kg, as quais foram administradas às ratas do 15^o dia de gestação até o 7^o dia da lactação. Este período de exposição foi escolhido, levando em consideração que a implantação do embrião no útero da rata ocorre até o 5^o dia de gestação, descartando-se a possibilidade de toxicidade pré-implantação, e o período de organogênese, que ocorre do 6^o ao 14^o de gestação, permitindo, desta maneira, que os efeitos do glifosato-Roundup® abrangessem apenas o período de maturação e diferenciação do cérebro de ratos, que se expande até o final da lactação (BERNARDI, 2006).

A avaliação dos parâmetros peso, consumo de água e de ração são índices empregados para indicar possíveis efeitos tóxicos de uma determinada substância administrada prolongadamente aos animais (CHIAVEGATTO; OLIVEIRA; BERNARDI, 1997). A administração de 50, 100 e 150 mg/kg de glifosato-Roundup® não alterou o peso materno (exceto no grupo 150 mg/kg, no DL1) durante os períodos de exposição ao herbicida (gestação e lactação) e tampouco o consumo de água e ração das ratas, sugerindo ausência de toxicidade materna. Tal fato é importante, pois alterações na homeostase materna, promovidas por um agente tóxico, podem se refletir na prole de maneira indireta; assim, não fica evidente se os efeitos tóxicos se devem a intoxicação materna ou ao efeito direto nos filhotes. Por outro lado, observou-se que o número de filhotes vivos de todos os grupos de ratas expostas ao herbicida foi menor do que aquele das fêmeas do grupo controle.

Dallegrave et al. (2007) observaram que as doses de 50 e 150 mg/kg, bem como a maior dose de 450 mg/kg de glifosato-Roundup®, administrado durante a gestação e lactação de ratas, não promoveram toxicidade materna avaliada pelo peso e mortalidade das mães. Ainda, nestas doses não se verificou alterações significantes no peso da prole, na sua viabilidade, no número de filhotes vivos/mortos e na razão sexo macho/fêmea. Esses achados são semelhantes

àquele encontrados no presente estudo, diferindo apenas na redução no tamanho da ninhada.

O modelo comportamental de observação da atividade geral em campo aberto foi proposto por Calvin Hall, em 1934, para avaliação da emocionalidade de ratos frente a um ambiente novo (WALSH; CUMMINS, 1976). A exposição ao campo aberto para medida de emocionalidade foi feita em condições de alta intensidade de luz e, por vezes, de altos níveis de som, tendo, portanto, conotações aversivas. Modificações na contingência experimental foram propostas, em 1981, por Bernardi e colaboradores, retirando-se o estímulo sonoro e reduzindo a luminosidade ambiental, o que permitiu que os ratos emitissem comportamento exploratório em detrimento àqueles de natureza emocional.

Estudo prévio realizado em camundongos sobre a toxicidade aguda do glifosato-Roundup® mostrou que, em fêmeas, houve redução da atividade geral observada em campo aberto após a administração de 25, 50 e 100 mg/kg do herbicida (JOAQUIM et al., 2012). No presente trabalho, avaliou-se o efeito do herbicida na atividade geral das ratas em diferentes períodos da gestação (DG5, DG15 e DG19) e na lactação (DL5) com o intuito de ampliar a avaliação da toxicidade materna; como a exposição foi prolongada, os dados da atividade geral poderiam revelar um eventual acúmulo do herbicida no organismo materno. No entanto, durante a prenhez não se observou alteração nos diferentes parâmetros da atividade geral no GD 5 e GD 15; já no GD 19 verificou-se redução na frequência de levantar. Somente na lactação a exposição ao glifosato-Roundup® promoveu redução na atividade geral das ratas. É importante lembrar que o herbicida foi administrado do GD15 ao DL7 e, portanto, os presentes resultados podem sugerir que o herbicida acumulou-se no organismo das fêmeas, reduzindo sua atividade geral.

O controle do CM envolve fatores neuroendócrinos (NUMAN, 2004). Os hormônios gestacionais preparam o animal para cuidar da prole, enquanto os neurotransmissores regulam o CM durante a fase de gestação e lactação. A primeira fase da regulação do CM determina o início rápido deste no pós-parto, sendo controlada por hormônios relacionados com a gestação e lactação (estrógeno, progesterona, prolactina e ocitocina). A segunda fase, a de manutenção durante a lactação, é controlada principalmente por fatores não hormonais, sendo que o estímulo proveniente do filhote se mostra o mais importante (NUMAN, 2004).

A respeito do CM é importante distinguir entre o comportamento de recolher os filhotes e de amamentá-los. O comportamento de recolher os filhotes é iniciado pela mãe e classificado como uma resposta materna ativa (HANSEN et al., 1991), enquanto o de amamentação é tido como passivo desde que é primariamente iniciado pela estimulação ventral e sucção da superfície ventral materna pelo filhote. Esta distinção foi feita por Stern (1966) e Hansen et al. (1991), os quais classificaram o comportamento de recolher os filhotes como apetitivo (refere à variável da fase inicial de busca em uma sequência de comportamento) e os de amamentação como consumatórios. Assim, a busca dos filhotes ou seu recolhimento após um período de ausência dos mesmos é um CM pró-ativo dependente da atividade do sistema nervoso central, enquanto a amamentação seria primariamente um reflexo ou uma resposta materna automática à estimulação eliciada pela proximidade da prole (NUMAN, 2004; NUMAN; STOLZENBERG, 2009).

Os presentes resultados mostraram que as ratas que foram tratadas com glifosato apresentaram maior latência total para recolher e agrupar os filhotes. Além disto, a latência para recolher os filhotes foi significativamente maior para o primeiro e segundo filhote, indicando que o início do CM foi alterado, mas a sua manutenção não foi prejudicada. Observou-se, ainda, redução no número de mães que recolheram todos os filhotes, bem como na frequência e duração de limpeza dos filhotes. Por outro lado, a cifose e os escores do ninho permaneceram em valores similares aos do grupo controle.

Estes resultados em conjunto sugerem que os parâmetros apetitivos do CM e não os consumatórios foram reduzidos nas ratas expostas ao glifosato. Além disto, o estímulo maternal promovido pelo lambe dos filhotes também foi reduzido nestas ratas, o que pode ter levado a alterações a longo prazo nesta prole.

Neste trabalho, não se pode descartar totalmente que a exposição ao herbicida não tenha promovido prejuízo motor nos animais, uma vez que no DL5 foi observada redução significativa na frequência de locomoção e aumento da imobilidade de ratas tratadas com a maior dose do herbicida. No entanto, nas menores doses estes parâmetros não foram diferentes daqueles do grupo controle. Desde que as alterações no CM foram específicas para alguns parâmetros, pode-se aventar a hipótese de que a redução no desempenho motor das mesmas não tenha sido crítica para a inibição do CM das ratas tratadas com as três doses do herbicida.

Outro aspecto relevante para explicar os presentes resultados pode advir dos achados de Bridges e Russel (1981). Esses autores observaram que ratas virgens tratadas com andrógenos, estradiol e progesterona para induzir CM, quando tratadas com um inibidor da aromatase, o 1,4,6-androstatriena-3,17-diona, apresentaram redução significativa do CM. O mecanismo proposto para explicar este efeito baseou-se na inibição de testosterona da fêmea que contribuiria para a expressão do CM. Neste sentido, o glifosato-Roundup® é um inibidor da aromatase (RICHARD, MOSLEMI et al., 2005), explicando, assim, a redução do CM nas fêmeas expostas ao herbicida.

No mesmo sentido que o CM, o comportamento maternal agressivo (CMA) foi prejudicado em ratas expostas ao herbicida. Nota-se que estas ratas defenderam menos sua prole permitindo a aproximação do rato intruso e apresentaram menores níveis de agressão contra este intruso.

O CMA de fêmeas é um tipo de agressão com um componente importante de medo (HALPERN; MARTINEZ, 2003; BOSCH et al., 2005); diferente dos machos, o CMA de ratas fêmeas lactantes compreende, além do padrão ofensivo, o padrão defensivo. Assim, em ratas lactantes do presente estudo, observou-se aumento da latência para a primeira luta e menor número de lutas após a maior dose do herbicida, sugerindo diminuição do comportamento agressivo contra o intruso. Este fato poderia estar correlacionado com a redução na atividade motora em campo aberto, uma vez que somente após a maior dose foi notada redução na frequência de locomoção. No entanto, em todas as doses administradas do herbicida, a fêmea permitiu que o intruso cheirasse mais seus filhotes, fato que reforça a ideia de que o herbicida tenha reduzido a agressão materna independente de seu desempenho motor. Ainda, pode-se aventar a possibilidade de menor cuidado materno, pois ao final do experimento existia menor número de filhotes no ninho das fêmeas dos grupos experimentais, em relação aquelas do grupo controle.

A atividade do sistema dopaminérgico (considerando a relação DOPAC/DA) no hipotálamo mostrou-se aumentada, enquanto no hipocampo e no estriado notou-se redução da mesma. Sabe-se que a dopamina modula o CM (PEÑA et al., 2014). No hipotálamo os neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares inibem a liberação de prolactina (LYONS; BROBERGER, 2014). Por sua vez, a prolactina promove o CM (BRIDGES et al., 1997; LARSEN; GRATTAN, 2012). Desta forma, pode-se correlacionar a redução da atividade do sistema dopaminérgico estriatal com a

redução do CM observada neste trabalho. Assim, o aumento da atividade do sistema dopaminérgico hipotalâmico, por reduzir a liberação de prolactina, um hormônio essencial para a expressão do CM, inibiu o CM após a administração do glifosato-Roundup®.

Já foi demonstrado que a redução da atividade do sistema dopaminérgico estriatal também está envolvido com a redução do CM (LONSTEIN; DOMINGUEZ et al., 2003; SOTO et al., 2013). Neste trabalho, a redução da atividade do sistema dopaminérgico estriatal está em consonância com a inibição do CM observado. Pode-se ainda aventar que esta redução na atividade do sistema dopaminérgico estriatal explique também a menor atividade geral observada em campo aberto (BERNARDI; NETO, 1979; BERNARDI, DE SOUZA et al., 1981).

A respeito da serotonina, existem evidências de que esta amina modularia a atividade do sistema dopaminérgico hipotalâmico e o controle da liberação de prolactina; a serotonina reduz os níveis de dopamina e seus metabólitos (PILOTTE; PORTER, 1981; MATHIASSEN; ARBOGAST; VOOGT, 1992). Lyons e Broberger (2014) observaram que é possível causar uma rápida hiperpolarização dos neurônios dopaminérgicos por meio de heterorreceptores serotoninérgicos. Desta forma, a redução da atividade do sistema serotoninérgico hipotalâmico (relação 5-HIAA/5-HT) agiria sinergicamente ao aumento da dopamina na mesma área, reduzindo a liberação de prolactina e, assim, inibindo o CM.

Portanto, a administração do glifosato-Roundup® às fêmeas durante a gestação e início da lactação pode ter afetado o CM, tanto pelos seus efeitos na aromatase como em neurotransmissores centrais.

Após o parto, as ratas são altamente agressivas com outros animais que entram nas proximidades de seu ninho e filhotes, com a função de proteger sua prole de intrusos (LONSTEIN; GAMMIE, 2002). A agressão materna está sob o controle de vários fatores. Assim, fatores hormonais que ocorrem na fêmea durante a gestação e no parto associadas à estimulação exteroceptiva da prole são fundamentais para a eliciação e manutenção do CMA (FERREIRA; HANSEN, 1986; MAYER et al., 1987). O CMA é provocado pela percepção de pistas polimodais emitidas pelo intruso em que a via olfatória é crucial para a intensidade do CMA (MAYER; ROSENBLATT, 1993; KOLUNIE; STERN, 1995). Além disso, a estimulação somatossensorial promovida pela estimulação perioral quando a fêmea investiga o intruso é crítica para a eliciação do ataque (STERN; KOLUNIE, 1991).

Motta et al (2013) mostram que o núcleo pré-mamilar ventral do hipotálamo modula as vias que controlam a agressão maternal.

Tratamentos que afetam o cuidado materno, em geral, modificam também o CMA. Vários estudos envolvem a serotonina e seus receptores na modulação do CMA (IENI; THURMOND, 1985; DE ALMEIDA et al., 2005; JOHNS et al., 2005; HEIMING et al., 2013); outras evidências também indicam que os sistemas dopaminérgico (JOHNS et al., 2005) e GABAérgico (LEE; GAMMIE, 2010) tem papel relevante no controle do CMA.

A administração de glifosato-Roundup® às fêmeas durante a gestação e início da lactação reduziu o CMA apenas na maior dose, caracterizado pelo aumento da latência para ataques e redução do número de ataques. Por outro lado, em todas as doses a fêmea permitiu que o intruso farejasse seus filhotes.

Por outro lado, nas análises neuroquímicas observou-se redução na atividade do sistema serotoninérgico hipotalâmico e aumento na atividade do sistema dopaminérgico em todas as doses estudadas. No estriado verificou-se menor atividade dopaminérgica nas doses de 50 e 100 mg/kg. A atividade da serotonina estriatal aumentou após a dose de 50 mg/kg e reduziu após a dose de 150 mg/kg.

A serotonina e a dopamina têm impacto relevante em vários aspectos dos efeitos da ocitocina, um peptídeo importante no controle e na eliciação do CM e na agressão pós-parto (FAHRBACH; MORRELL; PFAFF, 1985; LUBIN et al., 2003). A serotonina regula a atividade da ocitocina e a redução nos níveis deste neurotransmissor aumenta a agressão materna. A estimulação do sistema dopaminérgico, pelo uso de agonistas, libera ocitocina (AMICO et al., 1992; AMICO et al., 1993) e a administração pós-parto de ácido anfonélico, um inibidor da recaptura de dopamina, aumenta o CM e reduz o CMA (PEDERSEN et al., 1995). Portanto, a redução da atividade do sistema serotoninérgico e aumento da disponibilidade de dopamina na fenda sináptica aumentam o CMA.

Neste trabalho a redução do CMA nas fêmeas expostas a maior dose do glifosato-Roundup® durante a gestação e início da lactação não pode ser explicada pelas suas ações em sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos hipotalâmicos e estriatais. Os mecanismos que envolvem esta ativação devem ainda merecer estudos adicionais, bem como a participação do sistema noradrenérgico central, onde poucas alterações nos níveis deste neurotransmissor foram encontradas.

No presente estudo observou-se redução do número de filhotes nascidos em ratas expostas a todas as doses de glifosato-Roundup®; uma possível explicação para esse achado é a presença de canibalismo materno. O comportamento agressivo em direção à cria, sem causar sérias injúrias físicas, é considerado normal em muitas espécies animais como cães e primatas, tido como um comportamento de apaziguamento, visando “ensinar etiqueta social” ao infante, uma vez que a mãe deve mostrar e estabelecer dominância (HOUPY, 2000). Quando a injúria ao filhote é mais séria, este comportamento pode se enquadrar em comportamento materno anormal, rejeição ou, algumas vezes, canibalismo (HOUPY, 2004). No entanto, em condições “normais”, este fenômeno de canibalismo materno, comum em animais de laboratórios, ainda não é totalmente compreendido (WEBER; OLSSON, 2008).

Broom e Johnson (1993) comentaram que o estresse é um efeito ambiental sobre um indivíduo que coloca uma sobrecarga sobre o seu sistema de controle e reduz o seu vigor físico, o que acarretaria aumento de mortalidade e insucesso no crescimento ou na reprodução. O termo estresse também pode ser definido como um sintoma resultante da exposição do animal a um ambiente hostil, com consequentes prejuízos para a homeostase. Os agentes estressores podem ser de natureza mecânica (traumatismos cirúrgicos ou não), física (calor, frio, som), química (drogas) ou biológica (agentes infecciosos, fatores psíquicos, estado de nutrição, etc.). Em outras palavras, as condições ambientais adversas ao bem-estar animal podem ser climáticas, como calor ou frio extremo; nutricionais, como privação de alimentos ou de água; sociais, como ocupação de posições hierarquicamente inferiores dentro de um grupo; ou fisiológicas, causadas por patógenos ou toxinas (PEREIRA; BERNARDI; GERARDIN, 2006). Assim, no presente trabalho, considerando a ocorrência de canibalismo este pode ter tido a contribuição do estresse na sua eliciação, com a ativação suplementar do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, levando ao CMA exacerbado e ao canibalismo.

No presente estudo os parâmetros de desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole não foram modificados pela administração perinatal de glifosato-Roundup® (exceto o retardo no andar adulto, na dose de 50 mg/kg). No entanto, cabem aqui alguns comentários à cerca da natureza de cada um destes parâmetros.

A abertura dos olhos e a erupção dos dentes incisivos, que são parâmetros do desenvolvimento físico, dependem basicamente da presença do fator de

crescimento epidérmico (EGF). Foi Cohen, em 1962, quem isolou o EGF, sendo caracterizado como um polipetídeo com potente ação promotora da divisão e diferenciação celular dos tecidos epidérmicos. Foi demonstrado que o EGF pode acelerar a abertura dos olhos e a erupção dos incisivos quando administrado em ratos, camundongos e hamsters, bem como o crescimento de pelo e penugem e o desdobramento das orelhas (HOATH, 1986; SMART et al., 1989).

A descida dos testículos e a abertura vaginal foram outros parâmetros do desenvolvimento físico avaliados. A maturação sexual em machos é resultado de interações entre o hipotálamo, a hipófise anterior, os testículos e os órgãos sexuais secundários (NEGRO-VILLAR; OJEDA; MCCANN, 1973). Sugere-se que a iniciação da puberdade tem, como primeiro evento, alteração sensitiva no eixo hipotálamo-hipófise com *feedback* negativo para os andrógenos (SMITH; DAMASSA; DAVISON, 1989). Uma vez que o início da puberdade se estabeleceu, há aumento no nível e/ou liberação do padrão de gonadotrofina, resultando no aumento da secreção de testosterona pelas células de Leydig, até que um novo estado de equilíbrio seja alcançado (SODERSTEIN; ENEROTH, 1984). Nas ratas, o único sinal externo da puberdade é a canalização da vagina, a qual é inicialmente imperfurada e mais tarde torna-se patente em consequência da estimulação estrogênica. A abertura vaginal ocorre um dia depois do primeiro surto pré-ovulatório de gonadotrofinas (SODERSTEIN; ENEROTH, 1984). Um fenômeno importante evolucionário pelo qual a mãe regula o desenvolvimento gonadal da sua ninhada é o controle da canalização da vagina pelo GnRH do leite materno (SODERSTEIN; ENEROTH, 1984). Este deprime a função ovariana impedindo sua maturação e, na medida em que os filhotes começam a comer regularmente, os episódios de amamentação tornam-se menos frequentes, levando a redução natural do aporte de GnRH pelo leite materno, permitindo, assim, o desenvolvimento ovariano, que culmina na puberdade da fêmea ao redor do 30º dia de vida (SODERSTEIN; ENEROTH, 1984).

Quando ao desenvolvimento neurocomportamental, vários parâmetros foram avaliados. Os reflexos e as respostas de um recém-nascido permitem que ele reaja ao ambiente em que vive. Esses reflexos são instintivos, servem para protegê-lo e todos os filhotes da mesma espécie nascem com os mesmos reflexos. Por outro lado, as respostas são totalmente individuais. Os reflexos são respostas específicas, previsíveis e involuntárias a um tipo específico de estímulo. Fox (1965), já descrevia que os seguintes reflexos podiam ser testados no início da vida, em ratos: preensão

palmar, endireitamento ou recuperação do decúbito, geotaxia negativa e andar adulto.

Durante a ontogenia, o desenvolvimento do controle da postura depende de vários processos neurobiológicos e da percepção do mundo externo. Tem sido proposto que o desenvolvimento postural é pré-requisito para o desenvolvimento motor (ALTMAN; SUDARSHAN, 1975) e, mais ainda, o desenvolvimento postural interfere intimamente com o desenvolvimento cognitivo e da comunicação verbal e não verbal (SILVA et al., 1987). De acordo com Altman e Sudarsham (1975) três sistemas periféricos podem estar envolvidos com a regulação da postura, o sistema vestibular, o exteroceptivo e o proprioceptivo; além disso, estímulos do sistema visual têm importância na aquisição da postura. As funções do sistema vestibular começam logo após o nascimento, embora sejam dificultadas pela imaturidade do sistema motor. O estudo do sistema vestibular atrai pouca atenção nas investigações do desenvolvimento da postura, possivelmente, porque as deficiências precoces destes sistemas são em geral compensadas durante a adolescência (CHIAVEGATTO; OLIVEIRA; BERNARDI, 1997). O reflexo de endireitamento, a geotaxia negativa e o andar adulto em filhotes de ratos ocorrem pela ação do desenvolvimento motor e também é guiado pelo sistema vestibular (CHIAVEGATTO; OLIVEIRA; BERNARDI, 1997).

Em relação ao reflexo de preensão palmar, também conhecido como reflexo de Babinski, vale comentar alguns aspectos históricos. No ano de 1896, Joseph Felix Babinski apresentou na *Biological Society* de Paris um artigo sobre a resposta cutânea plantar em alguns pacientes humanos com desordens orgânicas do SNC, tendo feito a descrição definitiva deste fenômeno em 1898 (BARRAQUER-BORDAS, 1968). Este sinal (de Babinski) corresponde à flexão dorsal ou à extensão do polegar desencadeada pela estimulação do tegumento de uma zona qualquer da planta dos pés, exceto na região plantar do próprio polegar (BARRAQUER-BORDAS, 1968). O reflexo de preensão palmar, também chamado de reflexo de Babinsk é um dos reflexos do bebê; é normal em crianças abaixo de 2 anos de idade, mas desaparece à medida que a criança cresce e o sistema nervoso se desenvolve (ALDER; ZBINDEN, 1977). Em seres humanos com mais de 2 anos de idade, a presença do reflexo de Babinski indica danos nos nervos que conectam a medula espinhal ao cérebro (o trato corticoespinhal) (BARRAQUER-BORDAS, 1968). Uma vez que este trato se apresenta do lado esquerdo e direito, o reflexo de Babinski pode ocorrer em

um dos lados ou nos dois. O reflexo de Babinski anormal pode ser temporário ou permanente (ALDER; ZBINDEN, 1977).

Quanto ao reflexo de sobressalto, este ocorre paralelo com abertura do ducto auditivo, iniciando-se o processo de percepção de sons do ambiente (ALTMAN; SUDARSHAN, 1975).

Portanto, todas essas considerações feitas em relação aos parâmetros do desenvolvimento físico e dos reflexos mostram a importância desse tipo de estudo e, considerando os presentes achados, fica evidente que a exposição perinatal ao glifosato-Roundup® não interferiu de forma significativa no desenvolvimento da prole.

No presente trabalho foi avaliada também a atividade geral da prole tanto na infância, como na idade adulta, mostrando que as alterações foram pontuais tanto na prole masculina como na feminina, não caracterizando alterações motoras ou emocionais. A atividade geral, também chamada de atividade motora ou espontânea, mensura a capacidade do animal de se movimentar em uma área desconhecida independente de estímulos ambientais.

O comportamento de brincar de luta (*play fighting*) é uma das formas mais comuns de comportamento social exibido por ratos jovens (POOLE; FISH, 1976). No rato, ele se inicia mais ou menos aos 18 dias pós-natal (WOODS; BOLLES, 1965) com pico entre os 30 e 40 dias de idade (WOODS; BOLLES, 1965), desaparecendo em torno de 50 a 60 dias de vida (PANKSEPP; BEATTY, 1980).

O comportamento de brincar de luta, aparentemente, não tem função explícita (SMITH et al., 1982; VIEIRA; SARTORIO, 2002). Os parâmetros apresentados pelos animais são similares aos padrões de comportamento adulto, porém sem as mesmas consequências. Por exemplo, embora muitos padrões de luta sejam exibidos pelos filhotes de ratos, não se observam lesões dolorosas ou traumáticas (SMITH et al., 1982). Sugere-se que os altos níveis de brincar na adolescência do rato sejam necessários para o estabelecimento do comportamento agressivo e sexual na idade adulta (THOR; FLANNELLY, 1976). Ainda, o comportamento de brincar de luta é muito mais frequente em machos que em fêmeas, o que indica a participação de andrógenos (MEANEY et al., 1983).

A administração das diferentes doses do glifosato-Roudup® reduziu o *pinning* tanto de ratos machos como de fêmeas. Nos outros parâmetros, não foram detectadas alterações importantes. A duração e frequência do *pinning* são

consideradas como parâmetros que expressam a brincadeira, ou seja, o início do comportamento social do rato (PANKSEPP; BEATTY, 1980). Desta forma, nestes animais não foram estabelecidos os padrões de comportamento social durante o desenvolvimento, porém aqueles relacionados com o comportamento de luta e sexual foram preservados. Nota-se, ainda, que os níveis do comportamento de brincar de luta foram maiores em machos que em fêmeas, concordando com os dados da literatura de dimorfismo sexual neste comportamento (VIEIRA; SARTORIO, 2002). Além disto, uma vez que foram observadas alterações pontuais na atividade geral de ratos jovens expostos às diferentes doses do glifosato-Roudup® no período perinatal, não se pode atribuir a déficits motores a redução do *pinning*.

Considerando que a exposição às substâncias químicas no período perinatal pode promover danos de diferentes níveis no organismo em longo prazo, neste trabalho foram examinados estes efeitos no comportamento e na neuroquímica cerebral da prole de ratas na idade adulta. Tendo em vista que os padrões de comportamento social e motores, embora pontuais, foram alterados na infância, observou-se na idade adulta a interação social e a atividade geral em campo aberto destes animais.

Assim, com relação à atividade geral na idade adulta, nota-se efeitos sexualmente dimórficos, ou seja, a frequência de defecação da prole masculina foi significativamente maior nos ratos expostos perinatalmente ao glifosato-Roundup®, enquanto nas fêmeas verificou-se redução no levantar após a exposição à maior dose do herbicida.

A defecação reativa observada em campo aberto foi o parâmetro inicial proposto no modelo do campo aberto como indicador de emocionalidade (WALSH; CUMMINS, 1976). Somente mais tarde é que outros parâmetros, como a locomoção e imobilidade, foram correlacionados com o aumento de emocionalidade (PRUT; BELZUNG, 2003).

Existem diferenças sexualmente dimórficas em diversos comportamentos não reprodutivos em roedores quando observados em campo aberto (BEATTY, 1979). Em particular, fêmeas apresentam maior atividade ambulatoria e de levantar e defecam menos que machos, indicando que estas apresentam menor emocionalidade, ansiedade e medo neste teste (ARCHER, 1973; BEATTY; FESSLER, 1976). Neste sentido, o aumento da defecação observado em ratos

machos na idade adulta sugere que a administração perinatal do herbicida tenha levado a um aumento da emocionalidade em ratos machos. Ao contrario, as fêmeas não apresentaram este efeito. Por outro lado, os maiores níveis de levantar observado em fêmeas expostas a maior dose do glifosato-Roundup® pode estar correlacionados com aumento da atividade exploratória das ratas (BEATTY; FESSLER, 1976).

Não foram observadas alterações na interação social de ratos e ratas na idade adulta expostos ao herbicida no período perinatal. Este modelo foi inicialmente estabelecido por File e Hyde (1979) e consiste em observar diferentes comportamento que pares de ratos machos realizam em uma arena, a qual já estão habituados. Os comportamentos podem ser classificados em duas categorias: agressivos (por exemplo, agarrar, chutar, boxear ou morder) e comportamentos não agressivos (por exemplo, cheirar, passar sobre/sob o outro animal e *grooming*). Neste trabalho permitiu-se que o rato escapasse da presença do intruso, refletindo ausência de interação social, enquanto o comportamento *nose poking* refletiria um comportamento agonístico. Portanto, a redução no comportamento social na infância dos animais expostos ao glifosato-Roundup® não promoveu efeitos em longo prazo no comportamento social observado na idade adulta. Quando se comparam os comportamentos de ratos e ratas também não se notam respostas sexualmente dimórficas.

Os efeitos em longo prazo nos níveis de neurotransmissores e respectivos metabólitos cerebrais foram examinados em três áreas cerebrais: hipotálamo, hipocampo e estriado.

O hipotálamo é constituído de diversos núcleos que controlam a homeostasia do organismo; tem participação também no controle do sono-vigília, da fome, temperatura, diurese, sede, comportamento sexual e maternal, produção de leite e liga-se ao sistema nervoso autônomo, participando do controle do estresse e ao sistema límbico controlando a emocionalidade (GUYTON; HALL, 2002).

O hipocampo é uma estrutura cerebral que está envolvida com a emoção, a memória e o aprendizado espacial. Esta estrutura pode ser dividida, de acordo com suas funções, em duas porções: o hipocampo ventral e o hipocampo dorsal (FANSELOW; DONG, 2010). No processamento de informações, o primeiro seria responsável pelas respostas ao estresse e emoções, enquanto o hipocampo dorsal seria responsável pela memória espacial (FANSELOW; DONG, 2010).

O estriato é composto por duas estruturas distintas: o núcleo caudado e o putâmen. O núcleo caudado controla movimentos intencionais grosseiros do corpo (em nível subconsciente e consciente) e auxilia no controle global dos movimentos do corpo. O putâmen funciona em conjunto com o núcleo caudado no controle de movimentos intencionais grosseiros. Ambos funcionam em associação com o córtex motor, para controlar diversos padrões de movimento (GUYTON; HALL, 2002). Essas estruturas também são parte dos núcleos da base, que desempenha um papel importante na aprendizagem, no controle motor, e em vários outros processos cognitivos. Muitas informações sensoriais são recebidas através do estriato e enviadas para outras estruturas nos núcleos da base para processamento (GUYTON; HALL, 2002).

No presente estudo, apreciando os achados de neuroquímica cerebral da prole adulta exposta ao herbicida, observou-se no hipotálamo aumento da atividade do sistema dopaminérgico tanto na prole adulta masculina como feminina e aumento da atividade do sistema serotoninérgico apenas na prole masculina. No hipocampo, os achados mais relevantes foram o aumento da atividade do sistema serotoninérgico em machos e o efeito oposto em fêmeas. No estriado constatou-se em machos e em fêmeas o aumento da atividade do sistema serotoninérgico e do sistema dopaminérgico apenas em fêmeas. Considerando esses achados da neuroquímica cerebral e a ausência de alterações relevantes na atividade geral avaliada no campo aberto e na interação social das proles masculina e feminina adultas, não é possível especular sobre o envolvimento desses sistemas de neurotransmissão com esses comportamentos.

Finalizando, esses achados em conjunto, mostraram que a exposição perinatal a diferentes doses de glifosato-Roundup® promoveu prejuízo no comportamento materno, os quais foram associados aos sistemas de neurotransmissão cerebrais, e na prole, embora não tenham sido observados efeitos no desenvolvimento físico e neurocomportamental, ocorreram alterações comportamentais na infância que se estenderam até a idade adulta.

6 CONCLUSÕES

- a) A exposição perinatal de ratas (do DG15 ao DG21 e até o DL7) a uma formulação comercial de glifosato-Roundup® (50, 100 e 150 mg/kg) promoveu nessas mães:
- ausência da toxicidade (não alterou o peso materno, o consumo e água e ração);
 - redução do número de filhotes vivos de todos os grupos de ratas expostas ao herbicida;
 - redução de atividade geral no campo aberto nas ratas submetidas a maior dose do herbicida;
 - prejuízo no comportamento materno e no comportamento materno agressivo;
 - no hipotálamo aumento da atividade do sistema dopaminérgico e redução da atividade do sistema serotoninérgico, enquanto no hipocampo e estriato houve diminuição da atividade do sistema dopaminérgico.
- b) A exposição perinatal de ratas (do DG15 ao DG21 e até o DL7) a uma formulação comercial de glifosato-Roundup® promoveu na prole:
- ausência de prejuízos no desenvolvimento físico e neurocomportamental;
 - ausência de alterações motoras ou emocionais;
 - na infância, reduziu o *pinning* tanto de ratos machos como de fêmeas, sem alterar outros parâmetros do comportamento de brincar de luta;
 - na idade adulta, não foram observadas alterações na atividade geral observada no campo aberto e na interação social;
 - nos sistemas de neurotransmissão cerebrais foram observadas alterações, contudo a ausência de achados relevantes nos comportamentos avaliados, não foi possível especular sobre o envolvimento desses sistemas de neurotransmissão com esses comportamentos.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. R.; HAMILTON, C.; MURAOKA, T.; LAVORANTE, A. F. Relationship between acidity and chemical properties of brazilian soils. **Scientia Agrícola**, v. 60, n. 2, p. 337-343, 2003.

ALDER, S.; ZBINDEN, G. Methods for the evaluation of physical, neuromuscular and behavior development of rats in early posnatal life. In: NEUBERT, D.; MERKER, H. J.; KWAIGROCH, T. E. **Evaluation of embriotoxic effects in animals**. Stuttgart: Georg Thieme, 1977. p. 175-185.

ALONZO, H. G. A.; CORREA, C. L. Praguicidas. In: OGA, S. **Fundamentos da toxicologia**. 2ª. Ed., São Paulo: Atheneu Editora, 2008. cap. 5.3, p. 437-458.
ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. Posnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Animal Behavior**, v. 23, p. 896-920, 1975.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, uso e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

AMICO, J. A.; LAYDEN, L. M.; POMERANTZ, S. M.; CAMERON, J. L. Oxytocin and vasopressin secretion in monkeys administered apomorphine and a D2 receptor agonist. **Life Sciences**, v. 52, n.15, p.1301-1309, 1993.

AMICO, J. A.; POMERANTZ S. M.; POMERANTZ, S. M.; CAMERON, J. L. The oxytocin secretory response to dopamine receptor agonists in male and female monkeys. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 652, p. 478-480, 1992.

ANVISA. **Agrotóxicos e toxicologia**. 2009. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicototoxicologia/>. Acesso em: 17 de Maio de 2011.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, n. 21, v. 2, p. 205-235, 1973.

ARRATI, P. G.; CARMONA, C.; DOMINGUEZ, G.; BEYER, C.; ROSENBLATT, J. S. GABA receptor agonists in the medial preoptic area and maternal behavior in lactating rats. **Physiol Behavior**, v. 87, n. 1, p. 51-65, 2006.

BARRAQUER-BORDAS, L. Neurologia fundamental. 2. ed. Barcelona: Ed. Tory, 1968.

BEATTY, W. W. Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors in rodents: organizational and activational influences. **Hormones and Behavior**, v. 12, n. 2, p. 112-163, 1979.

BEATTY, W. W.; FESSLER, R. G. Ontogeny of sex differences in open-field behavior and sensitivity to electric shock in the rat. **Physiology & Behavior**, n. 16, v. 4, p. 413-417, 1976.

BENACHOUR, N.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; SÉRALINI, G. E. Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 222, p. 129-140, 2007.

BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G. E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chemical Research Toxicology**, v. 22, p. 97-105, 2009.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 807-816.

BERNARDI, M. M.; DE SOUZA, H. Effects of single and long-term haloperidol administration on open field behavior of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 73, n. 2, p. 171-175, 1981.

BERNARDI, M. M.; NETO, J. P. Effects of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 65, n. 3, p. 247-250, 1979.

BLANCHARD, D. C.; FUKUNAGA-STINSON, C.; TAKAHASHI, L. K.; FLANNELLY, K. J.; BLANCHARD, R. J. Dominant aggression in social groups of male and female rats. **Behavioral Processes**, v. 9, p. 31-48, 1984.

BOSCH, O. J.; MEDDLE, S. L.; BEIDERBECK, D. I.; BRANTEN, A. J. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 6807-6815, 2005.

BODENSTEINER, K. J.; GHIRALDI, L. L.; MINER, S. S. Differential effects of short- and long-term early maternal separation on subsequent maternal behavior in rats. **Journal General Psychology**, v. 139, n. 2, p. 78-99, 2012.

BRADBERRY, S. M.; PROUDFOOT, A. T.; VALE, J. A. Glyphosate poisoning. **Toxicology Review**, v. 23, p. 159-167, 2004.

BRIDGES, R. S.; ROBERTSON, M. C.; SHIU, R. P.; STURGIS, J. D.; HENRIQUEZ, B. M.; MANN, P. E. Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. **Endocrinology**, v.138, n. 2, p. 756-763, 1997.

BRIDGES, R. S.; RUSSELL, D. W. Steroidal interactions in the regulation of maternal behaviour in virgin female rats: effects of testosterone, dihydrotestosterone, estradiol, progesterone and the aromatase inhibitor, 1,4,6-androstatriene-3,17-dione. **Journal of Endocrinology**, v. 90, n.1, p.31-40, 1981.

BROOM, D. M.; JOHNSON, K. G. **Stress and animal welfare**. London: Chapman & Hall, 1993. 211. P.

CARVALHO-FREITAS, M. I.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; NASELLO, A. G.; PALERMO-NETO, J.; FELICIO, L. F. In vitro macrophage activity: biphasic effect of prolactin and indirect evidence of dopaminergic modulation. **Neuroimmunomodulation**, n. 15, v. 2, p. 131-139, 2008.

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

COHEN S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, p. 1555-1562, 1962.

COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola. 8. ed., revisão atual. São Paulo: Andrei, 2009. 1378 p.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. **Química Nova**, v. 28, p. 1038-1045, 2005.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. **Environ Health Perspectives**, v. 114, p. 1803-1806, 2006.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 45-52, 2003.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; OLIVEIRA, R. T.; ANDRADE, A. J. DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 9, p. 665-673, 2007.

DE ALMEIDA, R. M.; GIOVENARDI, M.; DA SILVA, S. P.; DE OLIVEIRA, V. P.; STEIN, D. J. Maternal aggression in Wistar rats: effect of 5-HT_{2A/2C} receptor agonist and antagonist microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter and medial septum. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 4, p. 597-602, 2005.

DE SOUZA, H. S.; SILVA, Y. M.; NICOLAU, A. A.; BERNARDI, M. M; LUCISANO, A. Possible anxiogenic effects of fenvalerate, a type II pyrethroid pesticide, in rats. **Physiology & Behavior**, v. 67, n. 4, p. 611-615, 1999.

EMBRAPA. **Cultura do algodão no cerrado**. 2003. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoCerrado/agrotoxicos.htm>. Acesso em: 17 de Setembro de 2011.

FAHRBACH, S. E.; MORRELL, J. I.; PFAFF, D. W. Possible role for endogenous oxytocin in estrogen-facilitated maternal behavior in rats. **Neuroendocrinology**, v. 40, n. 6, p. 526-532, 1985.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2010.

FERREIRA, A.; HANSEN, S. Sensory control of maternal aggression in *Rattus norvegicus*. **Journal of Comparative Psychology**, v. 100, n. 2, p. 173-177, 1986.

FILE, S. E.; HYDE, J. R. Evidence that piracetam has an anxiolytic action. **Journal of Affective Disorders**, v.1, n. 4, p. 227-235, 1979.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interactions test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 35-53, 2003.

FORLANI, G.; LEJCZAK, B.; KAFARSKI, P. The herbicidally active compound N-2-(6-Methyl-Pyridyl)-Aminomethylene bisphosphonic acid inhibits in vivo aromatic biosynthesis. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 18, n. 2, p. 73-79, 1999.

FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. **Animal Behavior**, v. 13, p. 234-241, 1965.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. ACADCOM Gráfica e Editora Ltda, 2005.

GAMMIE, S. C.; LOSTEIN, J. S. Maternal aggression. In: RANDY N, (ed.). **Biology of aggression**. Oxford: University Oxford, 2006, p. 74-250.

GASNIER, A. C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, A. N., CLAIR, E.; CHAGNONB, M. C.; SÉRALINI, G. E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, p. 184–191, 2009.

GÓRNIK, S. L.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Toxicologia do desenvolvimento. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri: Manole, 2008. p. 701-731.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Endocrinologia e reprodução. In: **Fundamentos de Guyton: tratado de fisiologia médica**. 10^a. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 74, p. 905-916.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. **Journal of Comparative Physiology**, v.18, n. 3, p. 385-403, 1934.

HALPERN, M.; MARTINEZ, M. A. Structure and function of the vomeronasal system. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 3, p. 245-318, 2003.

HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; HONS, F. M. Effect of roundup ultra on microbial activity and biomass from selected soils. **Journal Environ Quality**. v. 31, n. 3, p. 730- 735. 2002.

HANSEN, S.; HARTON, C.; WALLIN, E.; LÖFBERG, L.; SVENSSON, K. The effects of 6-OHDA-induced dopamine depletions in the ventral or dorsal striatum on maternal and sexual behavior in the female rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 39, n. 1, p. 71-77, 1991.

HANSEN, W. F.; YANKOWITZ, J. Pharmacologic therapy for medical disorders during pregnancy. **Clinical Obstetrics Gynecology Journal**, v. 45, n. 1, p. 136-152, 2002.

HEIMING, R. S.; MONNING, A.; JANSEN, F.; KLOKE, V.; LESCH, K. P.; SACHSER, N. To attack, or not to attack? The role of serotonin transporter genotype in the display of maternal aggression. **Behavioural Brain Research**, v. 242, p. 135-141, 2013.

HOATH, S. B. Treatment of the neonatal rat with epidermal growth factor: Differences in time and organ response. **Pediatric Research**, v. 20, p. 468-472, 1986.

HOUPT, K. A. Equine maternal behavior and its aberrations. In: **International Veterinary Information Science**. Recent advances in companion animal behavior problems. 2000. New York: Disponível em: <<http://www.ivis.org/>>. Acesso em: janeiro de 2013.

HOUPT, K. A. Small animal behaviour and its aberrations. In: **International Veterinary Information Science**. Recent advances in companion animal behavior problems. 2004. Disponível em: <<http://www.ivis.org/>>. Acesso em: janeiro de 2013.

HUNTINGFORD, F. A. Animals fight, but do not make war. Aggression and War- Their biological and social bases. Cambridge University, **Cambridge**, v. 1, p. 25-34, 1989.

IENI, J. R.; THURMOND, J. B. Maternal aggression in mice: effects of treatments with PCPA, 5-HTP and 5-HT receptor antagonists. **European Journal of Pharmacology**, v. 111, n. 2, p. 211-220, 1985.

JOAQUIM, A. J.; SPINOSA, H. S.; MACRINI, D. J.; RODRIGUES, P. A. ; RICCI, E. L.; ARTIOLLI, T. S.; MOREIRA, N.; SUFFREDINI, I. B.; BERNARDI, M. M. Behavioral effects of acute glyphosate exposure in male and female Balb/c mice. **Brazilian Journal Research in Animal Science**, v. 49, n. 5, p. 367-376, 2012.

JOHNS, J. M.; JOYNER, P. W.; MCMURRAY, M. S.; ELLIOTT, D. L.; HOFER, V. E.; MIDDLETON, C. L.; KNUPP, K.; GREENHILL, K. W.; LOMAS, L. M.; WALKER, C.H. The effects of dopaminergic/serotonergic reuptake inhibition on maternal behavior, maternal aggression, and oxytocin in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 81, n. 4, p. 769-785, 2005.

KIRSTEN, T. B. Avaliação comportamental e neuroquímica da prole masculina de ratas expostas pré-natalmente ao lipopolissacarídeo. 2008. 124 f. Dissertação (Mestrado em ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

KOLUNIE, J. M.; STERN, J. M. Maternal aggression in rats: effects of olfactory bulbectomy, ZnSO₄-induced anosmia, and vomeronasal organ removal. **Hormones and Behavior**, v. 29, n. 4, p. 492-518, 1995.

LARSEN, C. M.; GRATTAN, D. R. Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors. **Brain Behavior and Immunity**, v. 26, n. 2, p. 201-209, 2012.

LEE, G.; GAMMIE, S. C. GABAA receptor signaling in caudal periaqueductal gray regulates maternal aggression and maternal care in mice. **Behavioral Brain Research**, v. 213, n. 2, p. 230-237, 2010.

LEE, H. J.; MACBETH, A.; PAGANI, J.; YOUNG, W. Oxytocin: the great facilitator of life. **Program Neurobiology**, v. 88, p. 127–151, 2009.

LENZ, K. M.; SENGELAUB, D. R. Maternal care effects on the development of a sexually dimorphic motor system: the role of spinal oxytocin. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 4, p. 558-575, 2010.

LEYHAUSEN, P. On the functions of the relative hierarchy of moods. **Motivation of Human and Animal Behavior**, v. 2, p. 144-247, 1973.

LONSTEIN, J. S.; DOMINGUEZ, J. M. Intracellular preoptic and striatal monoamines in pregnant and lactating rats: possible role in maternal behavior. **Brain Research**, v. 970, n.1-2, p. 149-158, 2003.

LONSTEIN, J. S.; GAMMIE, S. C. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.26, n. 8, p. 869-888, 2002.

LUBIN, D. A.; ELLIOTT, J. C.; BLACK, M. C.; JOHNS, J. M. An oxytocin antagonist infused into the central nucleus of the amygdala increases maternal aggressive behavior. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, n. 2, p.195-201, 2003.

LYONS, D. J.; BROBERGER, C. Tidal waves: network mechanisms in the neuroendocrine control of prolactin release. **Frontiers in Neuroendocrinology**, n. 18, p. 320-345, 2014.

MATHIASSEN, J. R.; ARBOGAST, L. A.; VOOGT, J. L. Central administration of serotonin decreases tyrosine hydroxylase catalytic activity and messenger ribonucleic Acid signal levels in the hypothalamus of female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 4, n. 5, p. 631-639, 1992.

MAYER, A. D.; CARTER, L.; JORGE, W. A.; MOTA, M. J.; TANNU, S.; ROSENBLATT, J. S. Mammary stimulation and maternal aggression in rodents: thelectomy fails to reduce pre- or postpartum aggression in rats. **Hormones and Behavior**, v. 21, n. 4, p. 501-510, 1987.

MAYER, A. D.; ROSENBLATT J. S. Peripheral olfactory differentiation of the primary olfactory system in rats using ZnSO₄ nasal spray with special reference to maternal behavior. **Physiology & Behavior**, v. 53, n. 3, p. 587-592, 1993.

MEANEY, M. J.; STEWART, J.; POULIN, P. McEwen, B. S. Sexual differentiation of social play in rat pups is mediated by the neonatal androgen-receptor system. **Neuroendocrinology**, v. 37, n. 2, p. 85-90, 1983.

MEISEL, L.; SACHS, D. B. The physiology of male sexual behavior. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. [ed.], **PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION**. New York: Raven Press, 1994. p. 3–106.

MONSANTO. Glyphosate and Standard Toxicology Studies. Setembro de 2002. Disponível em: http://www.monsanto.com/products/documents/glyphosate-background-materials/gly_tox101_bkg.pdf. Acesso em: 10 de Fev. 2014.

MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos da Geografia**, v. 3, n.10, p. 26-40, 2003.

MOTTA, S. C.; GUIMARAES, C. C.; FURIGO, I. C.; SUKIKARA, M. H.; BALDO, M. V.; LONSTEIN, J. S.; CANTERAS, N. S. Ventral premammillary nucleus as a critical sensory relay to the maternal aggression network. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 35, p. 1438-1443, 2013.

MOTTIER, A.; PINI, J.; COSTIL, K. Effects of a POEA surfactant system (Genamin T-200®) on two life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Journal Toxicology Science**, v. 39, n. 2, p. 211-215, 2014.

MOURA, L. M.; CANTERAS, N. S.; SUKIKARA, M. H.; FELICIO, L. F. Morphine infusions into the rostralateral periaqueductal gray affect maternal behaviors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 899-905, 2010.

NANDULA, V. K. Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development and, management. **New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken**, 2010. cap. 1, p. 11-34.

NEGRO-VILLAR, A.; OJEDA, S. R.; MCCANN, S. M. Evidence for changes in sensitivity to testosterone negative feedback on gonadotropin release during sexual development in the male rat. **Endocrinology**, v. 93, p. 729-735, 1973.

NEUMANN, I. D.; TOSCHI, N.; OHL, F.; LANDGRAF, R. Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin. **European Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 1016-1024, 2001.

NUMAN, M. Maternal behavior. In: KNOBIL, E., NEILL, J. D. (Eds.), **The physiology of reproduction**, 2 ed. New York: Raven press, 1994. p. 221-302.

NUMAN, M.; NAGLE, D. S. Preoptic area and substantia nigra interact in the control of maternal behavior in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 97, n. 1, p. 120-139, 1983.

NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 46-64. 2009.

OLAZÁBAL, D. E.; ABERCROMBIE, E.; ROSENBLATT, J. S.; MORRELL, J. I. 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, n. 4, p. 259-268, 2004.

OPAS. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Representação do Brasil. Brasília, 1996.

PANKSEPP, J.; BEATTY, W. W. Social deprivation and play in rats. **Behavioral and Neural Biology**, v. 30, p. 197-206, 1980.

PARMIGIANI, S.; BRAIN, P. F.; MAINARDI, D.; BRUNONI, V. Different patterns of biting attack employed by lactating female mice in encounters with male and female conspecific intruders. **Journal Comparative Psychology**, v. 102, n. 3, p. 93-287, 1988.

PEDERSEN, C. A.; JOHNS, J. M.; PEREZ-DELGADO, M.; AYERS, G.; FAGGIN, B.; CALDWELL, J. D. Interfering with somatosensory stimulation from pups sensitizes experienced, postpartum rat mothers to oxytocin antagonist inhibition of maternal behavior. **Behavioral Neuroscience**, v. 109, n. 5, p. 980-990, 1995.

PEÑA, C. J.; NEUGUT, Y. D.; CALARCO, C. A.; CHAMPAGNE, F. A. Effects of maternal care on the development of midbrain dopamine pathways and reward-directed behavior in female offspring. **European Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 6, p. 946-956, 2014.

PEREIRA, O. C. M.; BERNARDI, M. M.; GERARDIN D. C. C. Could neonatal testosterone replacement prevent alterations induced by prenatal stress in male rats? **Life Sciences**, v. 78, p. 2767- 2771, 2006.

PILOTTE, N. S.; PORTER, J. C. Dopamine in hypophysial portal plasma and prolactin in systemic plasma of rats treated with 5-hydroxytryptamine. **Endocrinology**, v. 108, n. 6, p. 2137-2141, 1981.

PLETNIKOV, M. V.; RUBIN, S. A.; VASUDEVAN, K.; MORAN, T. H.; CARBONE, K. M. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. **Behavioral Brain Research**, v. 100, n. 1, p. 43-50, 1999.

POOLE, T. B.; FISH, J. An investigation of individual, age, and sexual differences in the play of *Rattus norvegicus* (Mammalia: Rodentia). **Journal of the Zoological Society**, v. 179, p. 249-260, 1976.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Neuroscience**, n. 463, v.1-3 p. 3-33, 2003.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G.E. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v.113, n. 6, p. 716–720, 2005.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA F. S. **Guia de herbicidas**. Londrina: IAPAR, 1998. p. 648.

ROMANO, M. A.; ROMANO, R. M.; SANTOS, L. D.; WISNIEWSKI, P.; CAMPOS, D. A.; DE SOUZA, P. B.; VIAU, P.; BERNARDI, M. M.; NUNES, M. T.; DE OLIVEIRA, C. A. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 4, p. 663-673, 2012.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; MOURA, M. O.; OLIVEIRA, C. A. A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 45, p. 481–487, 2008.

SANTOS, D. M. M. **Revolução Verde**. 2006. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br>. Acesso em: 17 maio 2011.

SILVA, V.; RIUL, T. R.; GOLOVATTEI, M. A. R.; PAUMGARTTER, F. J. R. Ethanol embryofetotoxicity in malnourished rats. **Nutrition Reports Internacional**, v. 36, n. 04, p. 887-895, 1987.

SINITOX. **Casos registrados de intoxicação e/ou envenenamento**. 2012. Texto disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox>. Acesso em: 20 Janeiro 2014.

SJOEHOLM, A.; BRIDGES, R. S.; GRATTAN, D. R.; ANDERSON, G. M. Region-, neuron-, and signaling pathway-specific increases in prolactin responsiveness in reproductively experienced female rats. **Endocrinology**, v. 152, n. 5, p. 1979-1988, 2011.

SMART, J. L.; SILVA, V. A.; MALHEIROS, L. R.; PAUMGARTEN, F. J. R.; MASSEY, R. F. Epidermal growth factor advances some aspects of development but retards others in both rats and hamsters. **Journal of Development Physiology**, v. 11, p. 153-158, 1989.

SMITH, E. R.; DAMASSA, D. A.; DAVIDSON, J. M. Feedback regulation and male puberty: testosterone-luteinizing hormone relationships in the developing male rat. **Endocrinology**, v. 101, p. 173-180, 1989.

SMITH, S. E.; LI, J.; GARBETT, K.; MIRNICS, K.; PATTERSON, P. H. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 40, p. 10695-10702, 2007.

SODERSTEIN, P.; ENEROTH, P. Effects of exposure to pups on maternal behavior, sexual behavior and serum prolactin concentrations in male rat. **Journal of Endocrinology**, v. 102, p. 115-119, 1984.

SOTO, A. M.; KIRSTEN, T. B.; REIS-SILVA, T. M.; MARTINS, M. F.; TEODOROV, E.; FLÓRIO, J. C.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M. M.; BONDAN, E. Single early prenatal lipopolysaccharide exposure impairs striatal monoamines and maternal care in female rats. **Life Sciences**, v. 92, n.14-16, p. 852-858, 2013.

STERN, J. Somatosensation and maternal care in Norway rats. In: RIVERS, J. S.; SMITH, C. T. (Ed.). **Parental care**: evolution, mechanisms, and adaptive significance. Advances in the study of behavior. New York: Academic Press, 1966. v. 25.

STERN, J. M.; KOLUNIE, J. M. Trigeminal lesions and maternal behavior in Norway rats: I. Effects of cutaneous rostral snout denervation on maintenance of nurturance and maternal aggression. **Behavioral Neuroscience**, v. 105, n. 6, p. 984-97, 1991.

TEODOROV, E.; BERNARDI, M. M.; FERRARI, M. F.; FIOR-CHADI, D. R.; FELICIO, L. F. Plasticity of opioid receptors in the female periaqueductal gray: multiparity-induced increase in the activity of genes encoding for mu and kappa receptors and a post-translational decrease in delta receptor expression. **Journal of Molecular Neurosciences**, v. 43, n. 2, p. 175-181, 2011.

TEODOROV, E.; MORAES, A. P.; FELICIO, L. F.; VAROLLI, F. M.; BERNARDI, M. M. 2005. Perinatal maternal exposure to picrotoxin: Effects on sexual behavior in female rat offspring. **Pharmacol Biochem Behavior**, v. 81, p. 935 -942, 2005.

TEODOROV, E.; SALZGEBER, S. A.; FELICIO, L. F.; VAROLLI, F. M. F.; BERNARDI, M. M. Effects of perinatal picrotoxin and sexual experience on heterosexual and homosexual behavior in male rats. **Neurotoxicology Teratology**, v. 24, p. 235-245, 2002.

TIMMERMAN, W.; POELMAN, R. T.; WESTERINK, B. H.; SCHUILING, G. A. Semicircadian rhythm of dopamine release in the mediobasal hypothalamus in awake rats during pseudopregnancy: evidence that a thyrotropin-releasing hormone analogue stimulates dopamine release and thereby inhibits prolactin secretion. **Neuroendocrinology**, v. 62, n. 5, p. 434-443, 1995.

THOR, D. H.; FLANNELLY, K. J. Age of intruder and territorial-elicited aggression in male long-evans rats. **Behavioral Biology**, v. 17, n. 2, p. 237-241, 1976.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 829-833, 2006.

VIEIRA, M. L.; SARTORIO, L. Análise motivacional, causal e funcional da brincadeira em duas espécies de roedores. **Estudos de Psicologia**, v. 7, n. 1, p. 189-196, 2002.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; SPINOSA, H. S. Toxicologia do praguicida aldicarb (chumbinho): aspectos gerais, clínicos e terapêuticos em cães e gatos. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1206-1211, 2007.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WEBER, E. M.; OLSSON, I. A. S. Maternal behavior in *Mus musculus* sp: an ethological review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, p. 1-22, 2008.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, p. 117-165, 2000.

WILSON, C. A.; DAVIES, D. C. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. **Reproduction**, v. 133, p. 331-359, 2007.

WOODS, P. J.; BOLLES, R. C. Effects of current hunger and prior eating habits on exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 59, p. 141-143, 1965.