

LORENA DE PAULA PANTALEON

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO À ATRAZINA DURANTE A PUBERDADE NA
ESFERA SEXUAL DE RATOS ADULTOS**

São Paulo

2021

LORENA DE PAULA PANTALEON

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO À ATRAZINA DURANTE A PUBERDADE NA
ESFERA SEXUAL DE RATOS ADULTOS**

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

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

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

Co-orientadora:
Prof^a. Dr^a. Esther Lopes Ricci

São Paulo

2021

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. 4143
FMVZ

Pantaleon, Lorena de Paula
Influência da exposição à atrazina durante a puberdade na esfera sexual de ratos adultos / Lorena de Paula Pantaleon. – 2021.
119 f. ; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.
Orientadora: Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa.
Coorientadora: Profa. Dra. Esther Lopes Ricci Adari Camargo.

1. Herbicida. 2. Comportamento sexual. 3. Comportamento animal. 4. Sistema monoaminérgico. 5. Neurotransmissores. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência da exposição à atrazina durante a puberdade na esfera sexual de ratos adultos", protocolada sob o CEUA nº 6095071020 (ID 008679), sob a responsabilidade de **Helenice de Souza Spinosa e equipe; Lorena de Paula Pantaleon** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 11/02/2021.

We certify that the proposal "Influence of atrazine exposure during puberty on the sexual sphere of adult rats", utilizing 96 Heterogenics rats (44 males and 52 females), protocol number CEUA 6095071020 (ID 008679), under the responsibility of **Helenice de Souza Spinosa and team; Lorena de Paula Pantaleon** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/11/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2021** a **10/2022**

Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Origem: **Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **80 a 90 dias**

N: **4**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **400 a 450 g**

Origem: **Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **80 a 90 dias**

N: **12**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **350 a 400 g**

Origem: **Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **1 a 120 dias**

N: **40**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **8 a 450 g**

Origem: **Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **1 a 120 dias**

N: **40**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **8 a 400 g**

Local do experimento: **Biotério do Departamento de Patologia/ FMVZ USP - Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia (LADTOX)**

Comentário da CEUA: **As pendências foram atendidas**

São Paulo, 11 de fevereiro de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PANTALEON, Lorena de Paula

Título: Influência da exposição à atrazina durante a puberdade na esfera sexual de ratos adultos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Estou defendendo minha dissertação 10 meses antes do meu prazo, mas isso só foi possível porque tive muito auxílio; estou aqui como representante, mas este trabalho não é só mérito meu.

Em primeiro, lugar agradeço a Professora Helenice por ter aceitado ser minha orientadora, mesmo durante o período de pandemia em que tudo estava tão caótico. Para mim ela uma referência, e uma honra poder carregar o seu nome como de minha orientadora.

Agradeço o Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade pela oportunidade de execução deste projeto e por toda a estrutura fornecida para que ele se concretizasse.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro fornecido durante todo o período do meu mestrado.

Agradeço a Julia Zaccarelli e Gabriel Ramos pelo auxílio na elaboração e execução do presente trabalho, bem como por todo o aprendizado fornecido desde minha graduação.

Agradeço ao Marcelo Mendonça e a Juliana Muñoz pelo auxílio da padronização e análise dos resultados do teste da marcha.

Agradeço a Natália Moreira pela disponibilidade e ajuda com os protocolos para execução do comportamento sexual.

Agradeço a Professora Miriam Ribeiro e o Professor Jan Carlo Delorenzi pelo aceite em participação em minha banca, tenho certeza de que suas contribuições serão muito enriquecedoras para o meu trabalho, além de serem grandes exemplos desde quando foram meus professores na graduação.

Agradeço as minhas amigas Ingrid Sinzinger, Gabriela Menezes e Gabriela Rio por todo o apoio, amparo e boas palavras de motivação durante todos esses meses.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Leonardo de Paula e Guilherme Ribeiro, eu reconheço o quanto eles foram importantes para mim, não só a ajuda física na execução dos experimentos do meu trabalho, mas também por terem sido meus fiéis companheiros que deram base e suporte emocional

diário. Graças a esse projeto construímos uma amizade muito legal e verdadeira, que espero levar para toda a minha vida, pessoal e profissional.

Agradeço a minha família, especialmente aos meus pais, Márcio e Jussara, e minha irmã, Marina, que são minha base e minha força. Eles são o meu maior incentivo e motivo para o caminho que estou trilhando, nunca mediram esforços para me ajudar e me apoiar no que fosse preciso, não só nesses meses de execução do mestrado, mas em toda a minha vida. Espero um dia ser tudo o que eles acreditam que eu seja.

À Esther Ricci e André Fukushima, deixo aqui minha extrema admiração a eles. Além de todo o auxílio, que foi imprescindível, para a concretização desse trabalho. Eles também são minhas principais referências de profissionais e de pessoas; com eles eu entendi quem um dia quero ser.

Cada uma dessas pessoas citadas tiveram uma parcela de contribuição importante nessa minha jornada. Deixo aqui, de forma simples, registrada toda a minha gratidão a todos vocês.

RESUMO

PANTALEON, L.P. **Influência da exposição à atrazina durante a puberdade na esfera sexual de ratos adultos**. 2021. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A atrazina é um dos herbicidas mais utilizados no Brasil e no mundo. Este praguicida e seus metabólitos são encontrados em águas superficiais e subterrâneas nas localidades em que seu uso é mais frequente. No organismo animal, a atrazina causa diversos efeitos tóxicos, que incluem alterações neuroendócrinas, comportamentais e no desenvolvimento de estrutura sexuais em machos, em fêmeas e na prole exposta. Porém, existe uma escassez de estudos em relação aos efeitos no indivíduo adulto que foi exposto na puberdade a atrazina. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da exposição à atrazina durante a puberdade e estudar na idade adulta o comportamento sexual de ratos machos e fêmeas, bem como analisar os efeitos nos níveis de monoaminas e seus metabólitos cerebrais. Para isso, os animais foram expostos à diferentes doses de atrazina (10, 30 ou 100 mg/kg) por via oral do dia pós-natal 22 ao 41 (período equivalente a adolescência) e foram avaliados o consumo de água e ração e o ganho de peso durante o tratamento e na idade adulta: o peso corporal e relativo de órgãos sexuais, rins, adrenais e fígado, o índice gonadossomático e os níveis de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no córtex pré-frontal, hipotálamo, no hipocampo e no corpo estriado em ambos os gêneros; em machos, a coordenação motora pelo teste da marcha, a motivação sexual, ereção peniana e o comportamento sexual; e em fêmeas, o comportamento sexual em estro fisiológico e farmacológico e a avaliação do ciclo estral. Os resultados mostraram comprometimento do comportamento sexual de machos evidenciados pelo aumento na latência para a primeira ereção peniana e diminuição no número de intromissões após a ejaculação; aumento do peso corporal em machos e fêmeas e do peso relativo dos rins em machos e do fígado em fêmeas; alterações nos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico em todas as estruturas analisadas e em ambos os sexos. Esses dados em conjunto sugerem que a atrazina tem efeitos deletérios e duradouros sobre os sistemas monoaminérgicos cerebrais em ambos os sexos; em machos

esses efeitos foram acompanhados por alterações no início e manutenção do comportamento sexual. A atrazina também mostrou causar comprometimentos metabólicos em ambos os sexos, evidenciados por influência direta sobre o peso corporal e peso relativo dos rins e fígado.

Palavras-chave: herbicida, comportamento sexual, comportamento animal, sistema monoaminérgico, neurotransmissores.

ABSTRACT

PANTALEON, L.P. **Influence of atrazine exposure during puberty on the sexual sphere of adult rats**. 2021. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Atrazine is one of the most used herbicides in Brazil and in the world. This pesticide and its metabolites are found in surface and underground water in places where its use is more frequent. In the animal organism, atrazine causes several toxic effects, which include neuroendocrine, behavioral and sexual structure development alterations in males, females and exposed offspring. However, there is a paucity of studies regarding the effects in adults who were exposed to atrazine during puberty. Thus, the aim of the present work was to evaluate the effects of exposure to atrazine during puberty and to study the sexual behavior of male and female rats in adulthood, as well as to analyze the effects on the levels of monoamines and their brain metabolites. For this, the animals were exposed to different doses of atrazine (10, 30 or 100 mg/kg) orally from postnatal day 22 to 41 (period equivalent to adolescence) and the consumption of water and feed and the weight gain during treatment and in adulthood: body and relative weight of sex organs, kidneys, adrenals and liver, gonadosomatic index and levels of cerebral monoamines and their metabolites in the prefrontal cortex, hypothalamus, hippocampus and in the striatum in both genders; in males, motor coordination by gait test, sexual motivation, penile erection and sexual behavior; and in females, sexual behavior in physiological and pharmacological estrus and evaluation of the estrous cycle. The results showed impairment of sexual behavior in males evidenced by the increase in latency for the first penile erection and decrease in the number of intromissions after ejaculation; an increase in body weight in males and females and in the relative weight of kidneys in males and of liver in females; alterations in the dopaminergic, noradrenergic and serotonergic systems in all analyzed structures and in both sexes. These data together suggest that atrazine has deleterious and long-lasting effects on the cerebral monoaminergic systems in both sexes; in males these effects were accompanied by changes in initiation and maintenance of sexual behavior. Atrazine has also been shown to cause

metabolic impairments in both sexes, evidenced by a direct influence on body weight and relative weight of the kidneys and liver.

Keywords: herbicide, sexual behavior, animal behavior, monoaminergic system, neurotransmitters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da atrazina.....	24
Figura 2: Estrutura química dos metabólitos da atrazina encontrados no ambiente.....	26
Figura 3: Classificação dos agrotóxicos utilizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).....	27
Figura 4: Foto de um rato no interior do aparato empregado para o teste da marcha. Note as pegadas patas deixadas sobre o piso da plataforma.....	42
Figura 5: Parâmetros do teste da marcha avaliados em ratos: A) comprimento da passada; B) comprimento do passo; C) ângulo do passo; D) área da passada; E) distância entre os pés.....	42
Figura 6: Ilustração do aparato de motivação sexual, onde: ZIM= Zona de incentivo do macho; ZN= Zona neutra; ZIF= Zona de incentivo da fêmea.....	44
Figura 7: Foto do aparato de motivação sexual, na qual pode ser visto, no compartimento central, o rato em avaliação e os dois compartimentos laterais como animais-incentivo.....	44
Figura 8: Ilustração do aparato empregado para avaliação da ereção peniana em rato.....	45
Figura 9: Foto do aparato empregado para avaliação da ereção peniana em rato.....	45
Figura 10: Ereção peniana induzida por apomorfina em rato.....	46
Figura 11: Foto do aparato utilizado para avaliação do comportamento sexual em rato (vista frontal)	47
Figura 12: Intensidade de lordose observada no comportamento sexual de ratas: A) ausência; B) moderada; C) normal; D) intensa.....	49
Figura 13: Fases do ciclo estral de ratas em microscopia de luz (40x): A) Proestro; B) Estro; C) Metaestro; e D) Diestro.....	51
Figura 14: Ganho de peso de machos e fêmeas que foram expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentados as médias e os respectivos erros padrões. N=10 machos ou 10 fêmeas por grupo. DPN: Dia pós-natal.....	55

Figura 15: Consumo médio de água e ração por machos e fêmeas que foram expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=10 machos ou 10 fêmeas por grupo. DPN: dia pós-natal.....	56
Figura 16: Parâmetros do teste da marcha em ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-10 animais por grupo.....	57
Figura 17: Parâmetros do comportamento de motivação sexual em ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6 animais por grupo.....	58
Figura 18: Parâmetros do comportamento de ereção peniana em ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7 animais por grupo.....	59
Figura 19: Parâmetros do comportamento sexual de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6 animais por grupo.....	60
Figura 20: Parâmetros do comportamento sexual de ratas adultas em ciclo estral fisiológico expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7 animais por grupo.....	61
Figura 21: Parâmetros do comportamento sexual de ratas adultas em ciclo estral farmacológicos expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7 animais por grupo.....	62
Figura 22: Acompanhamento do ciclo estral de ratas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8 animais por grupo.....	63

<p>Figura 23: Peso corporal de ratos machos e fêmeas adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo. DPN: dia pós-natal.....</p>	64
<p>Figura 24: Peso relativo de órgão de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8 animais por grupo.....</p>	65
<p>Figura 25: Peso relativo de órgão de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8 animais por grupo.....</p>	66
<p>Figura 26: Avaliação do sistema dopaminérgico do córtex pré-frontal de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-8 animais por grupo.....</p>	67
<p>Figura 27: Avaliação do sistema noradrenérgico do córtex pré-frontal de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo.....</p>	68
<p>Figura 28: Avaliação do sistema serotoninérgico do córtex pré-frontal de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo.....</p>	68
<p>Figura 29: Avaliação do sistema dopaminérgico do córtex pré-frontal de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8 animais por grupo.....</p>	69
<p>Figura 30: Avaliação do sistema noradrenérgico do córtex pré-frontal de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo.....</p>	70

Figura 31: Avaliação do sistema serotoninérgico do córtex pré-frontal de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo.....	70
Figura 32: Avaliação do sistema dopaminérgico do hipocampo de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8-9 animais por grupo.....	71
Figura 33: Avaliação do sistema noradrenérgico do hipocampo de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8-9 animais por grupo.....	72
Figura 34: Avaliação do sistema serotoninérgico do hipocampo de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-9 animais por grupo.....	72
Figura 35: Avaliação do sistema dopaminérgico do hipocampo de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8-9 animais por grupo.....	73
Figura 36: Avaliação do sistema noradrenérgico do hipocampo de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8-9 animais por grupo.....	74
Figura 37: Avaliação do sistema serotoninérgico do hipocampo de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8-9 animais por grupo.....	74
Figura 38: Avaliação do sistema dopaminérgico do hipotálamo de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-9 animais por grupo.....	75

Figura 39: Avaliação do sistema noradrenérgico do hipotálamo de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo.....	76
Figura 40: Avaliação do sistema serotoninérgico do hipotálamo de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-9 animais por grupo.....	76
Figura 41: Avaliação do sistema dopaminérgico do hipotálamo de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo.....	77
Figura 42: Avaliação do sistema noradrenérgico do hipotálamo de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo.....	78
Figura 43: Avaliação do sistema serotoninérgico do hipotálamo de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo.....	78
Figura 44: Avaliação do sistema dopaminérgico do corpo estriado de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-8 animais por grupo.....	79
Figura 45: Avaliação do sistema noradrenérgico do corpo estriado de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo.....	80
Figura 46: Avaliação do sistema serotoninérgico do corpo estriado de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo.....	80

Figura 47: Avaliação do sistema dopaminérgico do corpo estriado de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo..... 81

Figura 48: Avaliação do sistema noradrenérgico do corpo estriado de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo..... 82

Figura 49: Avaliação do sistema serotoninérgico do corpo estriado de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo..... 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Uso agrícola autorizado da atrazina no Brasil.....	24
Quadro 2: Os 10 ingredientes ativos mais vendidos no Brasil em 2019....	25
Quadro 3: Efeitos da exposição oral à atrazina em roedores fêmeas.....	29
Quadro 4: Efeitos da exposição oral à atrazina em roedores machos.....	32
Quadro 5: Descrição dos parâmetros analisados no teste da marcha.....	43
Quadro 6: Escores atribuídos às latências para primeira ereção peniana e bocejo de ratos tratados com apomorfina.....	47
Quadro 7: Escores atribuídos à intensidade de lordose no comportamento sexual de ratas.....	49
Quadro 8: Descrição das fases do ciclo estral de ratas.....	50
Quadro 9: Delineamento experimental de ratos machos e fêmeas.....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 PRAGUICIDAS.....	19
1.2 ATRAZINA.....	23
1.2.1 Efeitos da exposição à atrazina.....	27
1.2.1.1 <u>Efeitos em roedores fêmeas</u>	29
1.2.1.2 <u>Efeitos em roedores machos</u>	32
1.2.1.3 <u>Efeitos neuroendócrinos, neuroquímicos e comportamentais</u>	34
2 JUSTIFICATIVA	37
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 ANIMAIS.....	39
4.2 PRAGUICIDA E FÁRMACOS.....	40
4.2.1 Atrazina.....	40
4.2.2 Apomorfina.....	40
4.2.3 Primogyna®.....	40
4.3 PROCEDIMENTOS.....	41
4.3.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez.....	41
4.3.2 Nascimento, sexagem e padronização dos filhotes.....	41
4.3.3 Acompanhamento do ganho de peso.....	41
4.3.4 Consumo de água e ração.....	41
4.3.5 Teste da marcha.....	41
4.3.6 Avaliação da motivação sexual em machos.....	43
4.3.7 Avaliação da ereção peniana induzida por apomorfina.....	45
4.3.8 Avaliação do comportamento sexual em machos.....	47

4.3.9 Comportamento sexual feminino.....	48
4.3.10 Avaliação do ciclo estral.....	50
4.3.11 Avaliação do peso relativo dos órgãos e do índice gonadossomático.....	51
4.3.12 Dosagem de neurotransmissores cerebrais e seus metabólitos....	51
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	54
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Avaliação do ganho de peso, de machos e fêmeas, durante o tratamento com diferentes doses de atrazina.....	55
5.2 Avaliação do consumo médio individual de água e ração, por machos e fêmeas, durante o tratamento com diferentes doses de atrazina.....	56
5.3 Avaliação da marcha de ratos machos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	57
5.4 Avaliação da motivação sexual de ratos machos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	58
5.5 Avaliação da ereção peniana de ratos machos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	59
5.6 Avaliação do comportamento sexual de ratos machos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	60
5.7 Avaliação do comportamento sexual feminino, em ciclo estral fisiológico, de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	61
5.8 Avaliação do comportamento sexual feminino, em ciclo estral farmacológico, de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	62
5.9 Acompanhamento do ciclo estral de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	63
5.10 Avaliação do peso corporal no DPN120 de ratos machos e fêmeas adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	64

5.11 Avaliação do peso relativo de órgãos de ratos machos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	65
5.12 Avaliação do peso relativo de órgãos de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	66
5.13 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no córtex pré-frontal de ratos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	67
5.14 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no córtex pré-frontal de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	69
5.15 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no hipocampo de ratos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	71
5.16 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no hipocampo de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	73
5.17 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no hipotálamo de ratos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	75
5.18 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no hipotálamo de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	77
5.19 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no corpo estriado de ratos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	79
5.20 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no corpo estriado de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade.....	81
6 DISCUSSÃO.....	83
7 CONCLUSÃO.....	106
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
9 ANEXOS.....	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Praguicidas

Os agrotóxicos são produtos químicos sintéticos com funções, principalmente, herbicidas, fungicidas e inseticidas, utilizados no controle populacional de insetos, larvas, fungos, carrapatos e ervas daninhas, no manejo de vetores de diversas doenças e regulação do crescimento da vegetação, tanto no ambiente rural quanto urbano (INCA, 2021; BRASIL, 2020).

Estes produtos são utilizados em atividades agrícolas e não agrícolas. As atividades agrícolas estão relacionadas e destinadas ao uso nos setores de produção, limpeza do terreno e preparação do solo, na etapa de acompanhamento da lavoura, no depósito, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens e florestas plantadas. Já o uso não agrícola acontece para proteção de florestas nativas ou outros ecossistemas, como lagos e açudes e, também, de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação de seres vivos considerados nocivos (INCA, 2021; CARNEIRO et al., 2015).

O uso desses produtos está relacionado com o conceito de “Saúde Única” (*One Health*) que é a união indissociável entre saúde humana, animal e ambiental, que foi proposto no início deste século pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organizações das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). Outro ponto relevante nesse contexto está relacionado com o emprego dos praguicidas e seus benefícios para a produção de alimentos e para a saúde humana e animal, de tal forma que não é possível proibir a utilização desses agentes sem comprometer a produção de alimentos de origem animal e vegetal, pois esses são valorosas ferramentas no controle de pragas e de vetores responsáveis por doenças em seres humanos e animais (SPINOSA et al., 2020).

O amplo uso dos praguicidas pode acarretar resistência das pragas a esses produtos, bem como a bioacumulação e a biomagnificação na cadeia alimentar, ocasionando danos à saúde dos seres vivos e do meio ambiente. Para evitar que ocorra a presença de resíduos de praguicidas em produtos de origem vegetal e animal, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA – vinculada ao Ministério da Saúde)

realizam o monitoramento dos resíduos de praguicidas, estabelecendo os limites máximos de resíduos (LMR), bem como a avaliação de risco (SPINOSA et al., 2020).

Os praguicidas têm sido associados também à ocorrência de intoxicação, as quais podem ser acidentais ou intencionais (FUKUSHIMA et al., 2017); portanto, o conhecimento toxicológico sobre eles é fundamental para entender os quadros de intoxicação, tanto agudas quanto crônicas.

Dados da Organização Internacional do Trabalho (OIT) apontam que, anualmente em países subdesenvolvidos, os agrotóxicos são responsáveis por 70 mil casos de intoxicações agudas e crônicas que evoluem para óbito, além de outros mais de sete milhões de casos de doenças agudas e crônicas não fatais (INCA, 2021).

Em âmbito nacional, Carneiro et al. (2015) destaca que desde 2008 o Brasil é o país que mais consome agrotóxicos devido ao desenvolvimento econômico do agronegócio, além da ampliação da permissão do uso agrotóxicos já banidos em outros países e venda ilegal de agrotóxicos proibidos.

A população de risco, no que tange a exposição dos agrotóxicos, são agricultores, pecuaristas, agentes de controle de endemias e trabalhadores das indústrias de agrotóxicos, que sofrem diretamente os efeitos desses produtos durante a manipulação e aplicação (LONDRES, 2012).

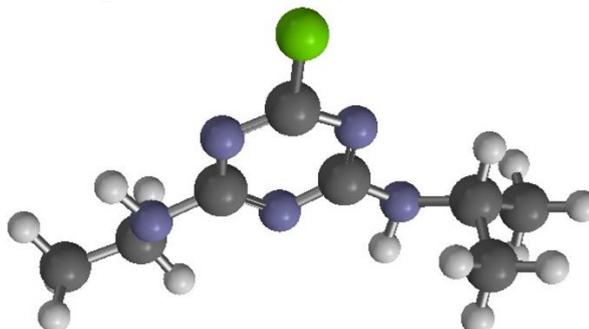
Contudo, toda a população está suscetível a exposições a agrotóxicos por meio de consumo de alimentos e água contaminados. Gestantes, crianças e adolescentes são considerados o grupo de maior risco devido às importantes alterações metabólicas, imunológicas e hormonais que acontecem nesses períodos da vida (CDC, 2021).

1.2 Atrazina

A atrazina (ATZ; 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) (Figura 1) é um herbicida da família clorotriazina, cujo uso agrícola acontece para o controle pré- e pós-emergente de ervas daninhas em culturas de milho, sorgo e cana-de-açúcar, dentre outras (Quadro 1), há mais de 50 anos. A molécula foi obtida em 1958 pelos laboratórios da Geigy e seu uso abrangente é devido ao baixo custo, capacidade de permanecer ativa no solo por longos períodos e eficácia na remoção de ervas daninhas, uma vez que a morte da planta resulta

da inanição e danos oxidativos causados pela ligação à proteína D1 localizada na membrana tilacóide dos cloroplastos, bloqueando, assim, o transporte de elétrons necessário para a fotossíntese, mecanismo inexistente nas células dos animais (RAYNER et al., 2004; HOVEY et al., 2011; ZIMMERMAN et al., 2021).

Figura 1: Estrutura química da atrazina.



Fonte: Spartan Wavefunction, Inc.

A atrazina também tem usos não agrícolas, como em pós-emergência de plantas daninhas em capinas químicas para erradicação de vegetação infestante ao longo de cercas, aceiros, margens de rodovias, oleodutos, leitos de ferrovias e faixa sob rede de alta tensão (ANVISA, 2021).

Quadro 1: Uso agrícola autorizado da atrazina no Brasil.

Culturas	Aplicação	LMR (mg/kg)
Abacaxi	Pré/Pós-emergência	0,02
Cana-de-açúcar	Pré/Pós-emergência	0,25
Milho	Pré/Pós-emergência	0,25
Milheto	Pré-emergência	0,25
Pinus	Pré/Pós-emergência	Uso não alimentar
Seringueira	Pré/Pós-emergência	Uso não alimentar
Sisal	Pré/Pós-emergência	Uso não alimentar
Soja	Pré/Pós-emergência	0,01
Sorgo	Pré/Pós-emergência	0,25

Fonte: (adaptado de ANVISA, 2021).

Os herbicidas correspondem a 59,56% - equivalente a 369.578 toneladas de ingrediente ativo - dos praguicidas consumidos no Brasil (BRASIL, 2020). A atrazina é um dos 10 ingredientes ativos mais utilizados nacionalmente como praguicida; no ano de 2019 ocupou o 5º lugar no *ranking* de vendas, sendo comercializadas 23.429 toneladas de ingrediente ativo (BRASIL, 2020) (Quadro 2). Seu uso é proibido na União Europeia, mas é de uso autorizado nos Estados

Unidos, Japão, China e nos demais países do Mercosul (MORAES, 2019; WIRBISKY; FREEMAN, 2015).

Quadro 2: Os 10 ingredientes ativos mais vendidos no Brasil em 2019.

Ingrediente Ativo (IA)	Vendas (toneladas de IA)	Ranking
Glifosato e seus sais	217.592,24	1º
2,4-D	52.426,92	2º
Mancozebe	49.162,59	3º
Acefato	28.432,5	4º
Atrazina	23.429,38	5º
Clorotalonil	16.653,05	6º
Dicloreto de paraquate	16.398,14	7º
Malationa	13.576,47	8º
Enxofre	11.882,33	9º
Clorpirifós	10.827,78	10º

Fonte: (BRASIL, 2020).

Davis e colaboradores (2011) relataram que o uso anual de atrazina foi de 70.000 a 90.000 toneladas em todo o mundo, e que esse herbicida e seus metabólitos foram detectados nas águas superficiais e subterrâneas no centro-oeste dos Estados Unidos, onde seu uso é mais abundante.

Devido a meia-vida longa da atrazina, que varia de 30 a 100 dias, alta solubilidade, mobilidade no solo e contaminação generalizada da água, esse composto foi encontrado em concentrações mais altas na urina dos agricultores e de suas famílias em comparação com as famílias não agrícolas (HE et al., 2019). A atrazina também pode estar presente no plasma do cordão umbilical, no leite materno e na urina da população em geral que é exposta a essa substância, principalmente pela água potável (LIN et al., 2014).

São diversas as formas pelas quais a atrazina chega ao meio ambiente, principalmente por processos de precipitação, escoamento e lixiviação, causando poluição do solo, das águas superficiais e subterrâneas, culminando em danos ao meio ambiente (HE et al., 2019).

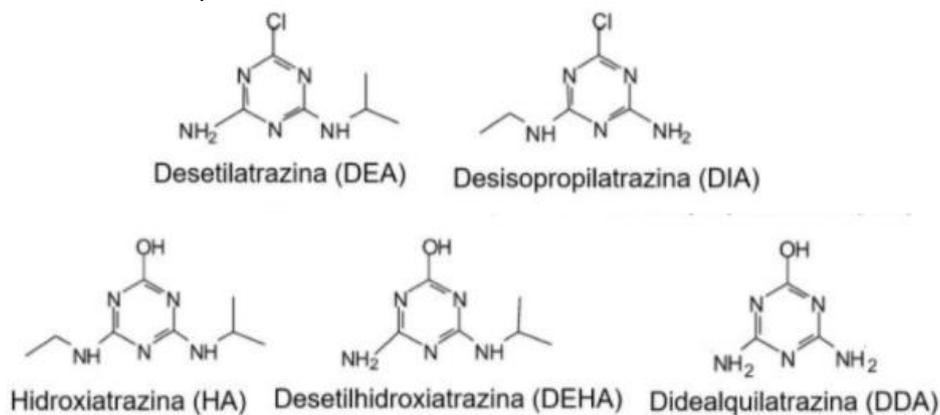
Sua alta capacidade de contaminar águas é consequência de ter pequena afinidade química pela fração orgânica do solo e apresentar hidrofiliabilidade intermediária, podendo ser facilmente lixiviada ou conduzida pelo escoamento superficial, atingindo os corpos d'água (DIAS et al., 2018).

As vias de exposição nos animais podem ser, oral, inalatória e dérmica. Em ratos, a meia-vida desse composto é de 1,3 dias e 95% da dose é eliminada

dentro de sete dias. Esse herbicida é biotransformado principalmente pelo fígado e sua excreção ocorre 75% pela urina e 20% pelas fezes (COUTINHO et al., 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a toxicidade e o modo de ação dos metabólitos da atrazina, no organismo humano, são semelhantes aos da própria atrazina (WHO, 2017). Os subprodutos da atrazina mais comumente encontrados no ambiente são: desetilatrazina - DEA, desisopropilatrazina - DIA, didealquilatrazina - DDA, desetilhidroxiatrazina - DEHA e hidroxiatrazina - HA (Figura 2).

Figura 2: Estrutura química dos metabólitos da atrazina encontrados no ambiente.



Fonte: (adaptado de DIAS et al., 2018).

A *United States Environmental Protection Agency* (US EPA, 2008) definiu o nível máximo permitido para atrazina no abastecimento de água potável em 3 µg/L; entretanto, durante o período de primavera e verão esse nível é frequentemente excedido (WIRBISKY; FREEMAN, 2015).

A ANVISA classificou a atrazina na categoria 3 de toxicidade em que se enquadram os compostos moderadamente tóxicos (Figura 3); dessa forma, foi estabelecido o seu valor máximo permitido (VMP) em águas de abastecimento humano (ANVISA, 2021). Assim, no Brasil o VMP para a atrazina em água potável é de 2 µg/L e a Ingestão Diária Aceitável (IDA) é de 0,02 mg/kg, porém em muitas regiões do país esse valor é excedido. Já a OMS definiu o VMP em 100 µg/L, correspondente à soma de atrazina e seus metabólitos (DIAS et al., 2018; ANVISA, 2021).

Figura 3: Classificação dos agrotóxicos utilizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

	CATEGORIA 1	CATEGORIA 2	CATEGORIA 3	CATEGORIA 4	CATEGORIA 5	NÃO CLASSIFICADO
	EXTREMAMENTE TÓXICO	ALTAMENTE TÓXICO	MODERADAMENTE TÓXICO	POUCO TÓXICO	IMPROVÁVEL CAUSAR DANO AGUDO	NÃO CLASSIFICADO
PICTOGRAMA					Sem símbolo	Sem símbolo
PALAVRA DE ADVERTÊNCIA	PERIGO	PERIGO	PERIGO	CUIDADO	CUIDADO	Sem advertência
CLASSE DE PERIGO						
ORAL	Fatal se ingerido	Fatal se ingerido	Tóxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
DÉRMICA	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
INALATÓRIA	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
COR DA FAIXA	VERMELHO	VERMELHO	AMARELO	AZUL	AZUL	VERDE

Fonte: (INCA, 2021).

1.2.1 Efeitos da exposição à atrazina

A exposição humana à atrazina ocorre principalmente pela ingestão de água potável, em que, geralmente, a concentração dessa substância está entre 0,01 e 5 µg/L (WHO, 2010).

Há detecção de atrazina em fluidos corporais humanos, incluindo fluido folicular, fluido espermático e muco cervical (WAGNER et al., 1990), bem como a associação com abortos espontâneos, partos prematuros e fetos pequenos para a idade gestacional (CHEVRIER et al., 2011; GENOVESE et al.; 2021), apoiam seu potencial em afetar negativamente a saúde reprodutiva humana.

Harper e colaboradores (2020) ressaltaram que os efeitos da atrazina sobre o sistema reprodutivo são sustentados por evidências em estudos no modelo animal, que mostram seus efeitos como desregulador endócrino em várias classes de animais, incluindo anfíbios, peixes, répteis e roedores.

Conhecendo-se a influência negativa da atrazina no sistema reprodutivo, esse agente foi incluído na lista de produtos químicos desreguladores endócrinos por algumas organizações e países, como Comunidade Europeia, Japão e Estados Unidos, uma vez que possui atividade estrogênica ambiental

com potencial carcinogênico e que pode persistir no ambiente por longos períodos (HE et al., 2019).

O mecanismo subjacente à interferência neuroendócrina causada pela atrazina ainda precisa ser elucidado, mas sabe-se que ela está envolvida na interrupção de muitas de vias, incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), sistemas monoaminérgicos no sistema nervoso central, alterações na via de sinalização dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), bem como em mecanismos epigenéticos, incluindo microRNAs e expressão de DNA metiltransferases (LAMB et al., 2020).

Resultados de uma revisão sistemática da literatura conduzida por Wirbisky e Freeman (2015) e estudo de Davis e colaboradores (2011) demonstraram que a atrazina afeta o eixo HHG, com efeitos sobre os sistemas reprodutivo e endócrino em ratos e com diferenças dependendo do estágio de vida, da dose, duração da exposição e linhagem de ratos utilizados. Almberg e colaboradores (2018) relataram que a atrazina é um desregulador endócrino que afeta o eixo HHG por meio da inibição da produção de hormônio luteinizante (LH), que acarreta aumento da produção de aromatase e interrupção da função ovariana.

Além disso, estudo de Lamb e colaboradores (2020) avaliou os efeitos na prole masculina de peixes-zebra expostos as doses de 0,3, 3 ou 3 partes por bilhão (ppb) de atrazina; seus achados mostraram que produtos químicos desreguladores endócrinos e neuroendócrinos podem alterar ou interromper alguns comportamentos do animal, principalmente comportamentos reprodutivos típicos, mas também pode levar a ansiedade, agressão e comportamento de risco, especialmente quando a exposição a esses agentes acontece no início da vida.

Assim, a literatura científica mostra que a exposição precoce à desreguladores endócrinos é capaz de modificar permanentemente os fenótipos comportamentais do animal até a idade adulta, interferindo em mecanismos moleculares, como expressão gênica, níveis de hormônios e níveis de neurotransmissores.

1.2.1.1 Efeitos em roedores fêmeas

Vários estudos foram realizados para avaliar, em fêmeas de roedores, os efeitos da exposição a atrazina. Esses estudos têm enfoque na análise do potencial desregulador endócrino estrogênico da atrazina e se concentraram principalmente na análise do desenvolvimento da glândula mamária, no tempo de abertura vaginal, na senescência reprodutiva, na diminuição do peso relativo de órgãos e nas alterações no ciclo estral (WIRBISKY; FREEMAN, 2015; DAVIS et al., 2011), como demonstrado resumidamente no Quadro 3 e detalhados a seguir.

Quadro 3: Efeitos da exposição oral à atrazina em roedores fêmeas.

Autores	Dose de atrazina	Período de exposição	Espécie animal	Resultados observados
RAYNER et al., 2005 e 2007	100 mg/kg	DG 13 a 19	Prole feminina de ratas	Atraso na abertura vaginal e no desenvolvimento mamário
ASHBY et al., 2002; LAWS et al., 2000	50, 100 ou 200 mg/kg	Período peripuberal	Ratas em período peripuberal	Atraso na abertura vaginal e diminuição do peso corporal, de órgãos reprodutivos e da glândula adrenal
ELDRIDGE et al., 1998 e 1999	25 e 200 mg/kg	Exposição crônica	Ratas adultas	Aumento da duração do ciclo estral, dos dias em estro e tumores mamários
COOPER et al., 1996	75 ou 300 mg/kg	14 a 23 dias	Ratas adultas	Maior duração do diestro e pseudo-prenhez
SHIBAYAMA et al., 2009	3, 30 ou 300 mg/kg	2 a 4 semanas	Ratas adultas	Alterações histológicas do ovário e ciclo estral prolongado
FRAITES et al., 2011	5 ou 25 mg/kg	DG 14 a 20	Prole feminina de ratas expostas na gestação e/ou lactação	Níveis mais altos de DDA no plasma, na glândula adrenal, no cérebro e nos tecidos mamários
QUIGNOT et al., 2012	200 mg/kg	14 dias	Ratas adultas	Acúmulo de atrazina no ovário

Fonte: Autoral. DG: dia gestacional; DDA: desetilhidroxiatrazina.

Rayner e colaboradores (2005 e 2007) analisaram a prole feminina de ratas expostas a 100 mg/kg de atrazina, por via oral, nos dias da gestação (DG) 13 a 19, sendo observado atraso significativo da abertura vaginal e no

desenvolvimento mamário, indicando que a exposição a atrazina no período gestacional retardou a puberdade de ratas.

Estudos nos quais foram feitas as exposições peripuberais de 50, 100 ou 200 mg/kg de atrazina por via oral, observou-se atraso superior a dois dias da abertura vaginal e diminuição significativa do peso corpóreo, bem como dos pesos de órgãos reprodutivos e das glândulas adrenais das ratas (ASHBY et al., 2002; LAWS et al., 2000).

Eldridge e colaboradores (1998 e 1999) mostraram em estudos crônicos, com doses de 25 e 200 mg/kg de atrazina administradas por via oral, causaram aumento da duração do ciclo estral e aumento do número de dias em estro, o que foi relacionado com o aumento do número de tumores mamários em ratas adultas.

Cooper e colaboradores (1996) observaram que ratas adultas que receberam 75 ou 300 mg/kg de atrazina por gavagem, durante 14 a 23 dias, passaram mais tempo no diestro sugestivo de pseudo-prenhez.

O impacto da atrazina na ciclicidade tem sido relacionado a diminuição da concentração de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que sinaliza para a hipófise, resultando na interrupção da secreção do LH e na supressão da ovulação subsequente (COOPER et al., 2007).

Davis e colaboradores (2011), num estudo sobre os efeitos da exposição pré-natal à atrazina nos índices reprodutivos puberais e pós-natais em ratas, observaram que a interrupção do ciclo estral induzida pela atrazina resultou em estro e exposição persistente ao estrogênio e a prolactina, indicativo de mudança endócrina semelhante à observada na senescência reprodutiva, comum em ratas por volta de um ano de idade.

Estudo conduzido por Shibayama e colaboradores (2009) tratou ratas com 3, 30 ou 300 mg/kg/dia de 2 a 4 semanas e demonstrou que a exposição à atrazina causou alterações histológicas do tecido ovariano. Os resultados revelaram perda de corpos lúteos, aumento nos folículos atrésicos, edema das células luteínicas e ciclo estral prolongado. Esses achados sugeriram que a atrazina pode provocar infertilidade, prejudicar a foliculogênese e alterar a função ovariana. Além disso, um mecanismo tóxico adicional ao aumento da progesterona após a exposição à atrazina foi a redução na expressão dos receptores de LH nas células granulosas, podendo provocar diminuição nas

funções do LH e do estradiol no ovário, incluindo o desenvolvimento do corpo lúteo, o tamanho dos ovários e a ciclicidade do estro (WIRBISKY; FREEMAN, 2015).

Fraites e colaboradores (2011) investigaram a distribuição da atrazina e de seus metabólitos nas proles após exposição gestacional e/ou lactacional; para isso, ratas prenhes foram expostas a 5 ou 25 mg/kg nos DGs 14 ao 20, e os resultados mostraram que suas proles apresentaram níveis mais altos do metabólito DDA no plasma, na glândula adrenal, no cérebro e nos tecidos mamários.

Estudo conduzido por Quignot e colaboradores (2012) mostrou que a exposição de ratas a 200 mg/kg de atrazina por 14 dias acarretou o acúmulo de atrazina no tecido ovariano.

Os resultados desses estudos fornecem suporte para a disfunção reprodutiva provocada pela exposição à atrazina e que essa substância, assim como seu metabólito DDA, estão presentes no tecido cerebral e no tecido mamário, apoiando os achados que demonstram que a exposição gestacional e lactacional é prejudicial ao desenvolvimento (RAYNER et al., 2005).

Além disso, a identificação de atrazina nas glândulas adrenais reforça que a atrazina também tem como alvo vias neuroendócrinas adicionais, incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA).

Quignot et al. (2012) relataram que os efeitos da atrazina nos eixos HHG e HHA podem culminar em impactos adversos em exposições *in vitro*, gestacionais, peripuberais e na idade adulta. Essas alterações variaram de atrasos na puberdade, ciclo estral alterado, folículos ovarianos atrésicos, redução de gonadotrofinas e alterações celulares e genéticas. Esses dados fornecem suporte para considerar a atrazina como um desregulador endócrino e sua capacidade de ocasionar disfunção reprodutiva em vários estágios da vida.

Nesse sentido, a literatura científica caminha de forma consensual para evidenciar os efeitos desreguladores endócrinos estrogênicos da atrazina. Esses efeitos podem gerar inúmeras situações no que tange a toxicidade reprodutiva e podendo levar a disfunções severas, quando esse agente entrar em contato com o ser humano e inúmeras perdas econômicas no que tange a área voltada a agropecuária.

1.2.1.2 Efeitos em roedores machos

Estudos com enfoque na exposição peripuberal da atrazina em ratos machos observaram atraso na separação prepucial, diminuição da testosterona sérica e intratesticular, aumento da concentração de estradiol, redução do peso corporal, da próstata, da vesícula seminal e da hipófise e variações no peso relativo dos testículos, também reduziu a contagem, a viabilidade e a motilidade de espermatozoides e levou a um decréscimo da fertilidade, como demonstrado resumidamente no Quadro 4 e detalhados a seguir (JIN et al., 2013; FRIEDMANN, 2002; TRENTACOSE, et al., 2001; STOKER et al., 2000).

Quadro 4: Efeitos da exposição oral à atrazina em roedores machos.

Autores	Dose de atrazina	Período de exposição	Espécie animal	Resultados observados
ROSENBERG et al., 2008.	100 mg/kg	DG 14 até o parto	Prole masculina de ratas expostas durante a gestação	Diminuição de testosterona e estrona; redução da distância anogenital e atraso na separação prepucial
ROSS et al., 2009.	5, 25, 125 ou 250 mg/kg	Dose única	Camundongos machos	Deteção da atrazina e do DDA na urina, plasma, cérebro, fígado, rim, baço e timo
HARPER et al., 2020.	5 mg/kg	DG 9,5 até 12 semanas de idade	Camundongos machos	Diminuição do peso do fígado, da concentração de espermatozoides epididimários e do número de células embrionárias geradas
TAN et al., 2021.	100 mg/kg	DG 12,5 a 16,5	Prole masculina de camundongos fêmeas expostas durante a gestação	Alteração na posição do meato uretral e da descida do testículo; redução da distância anogenital e do tamanho do pênis no DPN21

Fonte: Autoral. DG: dia gestacional; DDA: desetilhidroxiatrazina; DPN: dia pós-natal.

A exposição de 100 mg/kg de atrazina por via oral do DG14 até o parto alterou o desenvolvimento reprodutivo, diminuiu as concentrações séricas e testicular de testosterona e de estrona, reduziu a distância anogenital e atrasou a separação prepucial e a puberdade em ratos machos (ROSENBERG et al., 2008).

Sobre o atraso da puberdade, uma hipótese é de que os efeitos observados podem ser devido a alterações hormonais ou no desenvolvimento cerebral pós-natal precoce, especialmente na área da eminência mediana, que é crítica para o momento da separação prepucial (RAYNER et al., 2007).

Ojeda e colaboradores (2000), em seus achados, sugerem que a atrazina pode afetar fatores na eminência mediana que regulam a liberação de GnRH, níveis de grelina ou alterações na leptina levando a alterações de peso e composição corporal do rato macho.

Um estudo conduzido por Ross e colaboradores (2009) expôs camundongos machos a uma dose única de 5, 25, 125 ou 250 mg/kg de atrazina, por via oral, e mediu os níveis de atrazina e de seus metabólitos na urina, no plasma e em vários tecidos; nesses locais, foi observado aumento dependente da concentração de atrazina e de DDA, sendo este mais alto. A atrazina e o DDA também foram identificados no plasma, no cérebro, no fígado, no rim, no baço e no timo.

Estudo de Harper e colaboradores (2020) investigou como a exposição crônica à atrazina na dose de 5 mg/kg/dia na água potável do DG 9,5 até 12 semanas de idade afetou as características metabólicas e reprodutivas em camundongos machos. Foi evidenciado que essa exposição culminou em diminuição no peso do fígado e alterações na expressão gênica do fígado e testículo, especificamente em genes envolvidos na captação de lipídios e no metabolismo de ácidos graxos no fígado, bem como na conversão de andrógenos nos testículos, além disso, a exposição à atrazina diminuiu a concentração de espermatozoides epididimários e o número de células embrionárias geradas.

Em estudo de Tan e colaboradores (2021), fêmeas prenhes de camundongos receberam por via oral diferentes doses de atrazina dos DGs 12,5 a 16,5. Embora nenhum sinal de toxicidade sistêmica tenha sido observado em seus filhotes machos, a exposição pré-natal a 100 mg/kg/dia de atrazina afetou a morfologia peniana, a posição do meato uretral e a descida do testículo, reduziu a distância anogenital e o tamanho do pênis no dia pós-natal (DPN) 21.

A literatura científica mostra que, ao avaliarmos os efeitos sobre a toxicologia reprodutiva ou mesmo sobre o comportamento sexual de modelos animais machos, existem evidências que a atrazina apresenta um potencial

desregulador endócrino estrogênio que tem impacto direto sobre o sistema biológico masculino.

1.2.1.3 Efeitos neuroendócrinos, neuroquímicos e comportamentais

A ação tóxica da atrazina acontece pela perturbação do sistema neuroendócrino, em particular do eixo HHG, manifestada por meio da atenuação da secreção pulsátil do GnRH e do pico de LH. A interrupção do pico de LH induzida por esse composto em ratos é considerada o principal evento na cascata de mudanças que levam a resultados reprodutivos adversos após a exposição à atrazina (US EPA, 2018).

Estudo de Kuckaa e colaboradores (2012) mostrou que a atrazina é um inibidor de fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs) específicos de AMPc, o que leva ao acúmulo de AMPc intra- e extracelular e a ativação de proteína quinase (PKA). Os PEDs são uma grande família de enzimas responsáveis pela hidrólise de AMPc e guanosina monofosfato cíclico (GMPc), e por bombas de efluxo de nucleotídeos cíclicos que os transportam do citosol para o fluido extracelular. A elevação nos níveis intracelulares de AMPc foi suficiente para aumentar a liberação basal de prolactina nas células da hipófise e a produção de andrógenos nas células de Leydig (KUCKAA et al., 2012).

Assim, a atrazina atua como desregulador endócrino tanto nas células que secretam por exocitose hormônios pré-armazenados quanto nas células que secretam por síntese hormonal. Esses efeitos são rápidos e não necessitam de mudança na expressão proteica, isso porque AMPc/PKA está envolvida no controle da atividade transcricional (KUCKAA et al., 2012).

A atrazina também induz a expressão de aromatase em células do carcinoma adrenocortical humano após a exposição, causando aumento na conversão da testosterona em estrogênio e diminuição da síntese e atividade de andrógenos. Este efeito foi relatado em todas as classes de vertebrados, incluindo linhagens de células humanas. Os efeitos de desregulação endócrina da atrazina incluem atividade antiestrogênica, liberação alterada de prolactina e liberação aumentada de glicocorticoides pelas glândulas adrenais (VANDENBERG et al., 2012).

Estudo de Lin e colaboradores (2013b) mostrou que a atrazina tem como alvo os sistemas monoaminérgicos, especialmente o sistema dopaminérgico

nigrostriatal, acarretando em uma série de anormalidades celulares, moleculares e comportamentais, considerando que a exposição oral às doses de 125 a 250 mg/kg de atrazina por 10 dias induziu hipoatividade, déficits de memória e ansiedade, acompanhados de alteração nos níveis e/ou *turnover* de dopamina, serotonina e noradrenalina, principalmente, no estriado e córtex pré-frontal de camundongos.

A atrazina também reduziu os níveis de dopamina e seu metabólito, bem como o número de neurônios dopaminérgicos da *pars compacta* da substância *nigra* e da área tegmentar ventral de camundongos (COBAN; FILIPOV, 2007). A exposição prolongada de um ano a atrazina pela dieta alterou a atividade motora e diminuiu os níveis de dopamina estriatal em ratos (BARDULLAS et al., 2011).

A exposição oral a doses ambientalmente relevantes de atrazina do DG14 DPN21 alterou a atividade motora na prole juvenil e causou alterações neurodegenerativas no córtex, no corpo estriado, no hipocampo e em áreas hipotalâmicas da prole adulta de camundongos (BELLONI et al., 2011; GIUSI et al., 2006), sugerindo que o sistema nervoso em desenvolvimento é particularmente sensível a atrazina e que alguns efeitos são apenas observados ou presentes na idade adulta. Em seres humanos, a exposição ambiental a atrazina durante a gravidez tem sido associada a vários efeitos adversos ao nascimento, incluindo parto prematuro (OCHOA-ACUÑA et al., 2009).

Estudos farmacocinéticos sugerem que, após a exposição gestacional e/ou lactacional de roedores a atrazina, por via oral, o feto é exposto a atrazina e seus metabólitos em níveis semelhantes aos plasmáticos maternos e o neonato é exposto principalmente ao principal metabólito da atrazina, o DDA (FRAITES et al., 2011; LIN et al., 2013c).

Tanto a atrazina, quando o DDA, podem se ligar às proteínas do tecido cerebral (DOOLEY et al., 2010) e culminar em disfunção proteica (FAKHOURI et al., 2010). Além disso, essas substâncias podem interromper a diferenciação morfológica dos neurônios dopaminérgicos *in vitro* (LIN et al., 2013a), portanto, as anormalidades comportamentais observadas que envolvem, funções motoras, emocionais e/ou cognitivas na prole muito tempo após o término da exposição podem ocorrer porque a atrazina e/ou DDA afetam diretamente os principais processos de desenvolvimento neurológico, como a diferenciação neuronal.

Lin e colaboradores (2014) investigaram, em camundongos, os efeitos neurocomportamentais e neuroquímicos da exposição oral pela água a uma baixa dose de atrazina, estimada em 1,4 mg/kg por dia, do DG6 ao DPN23. Esses autores observaram que a exposição perinatal a atrazina tem como alvo a via dopaminérgica nigroestriatal das mães e, especialmente, da prole juvenil, concluindo que a exposição à atrazina durante a gestação e lactação pode causar efeitos adversos no sistema nervoso tanto na prole quanto nas mães.

Considerando os estudos aqui comentado, pode ser constatado que a atrazina causa efeitos deletérios no organismo animal, entre eles, alterações no comportamento e no desenvolvimento de estrutura sexuais em machos, em fêmeas e na prole exposta, bem como em sistemas monaminérgicos cerebrais, porém, existe escassez de estudos que avaliem os efeitos da exposição à atrazina durante a puberdade, período da vida em que acontecem mudanças fisiológicas relevantes, e suas consequências na idade adulta.

2 JUSTIFICATIVA

A atrazina é o quinto herbicida mais consumido no mundo. Sua ação eficaz como praguicida ocorre pelo bloqueio da fotossíntese. Esse praguicida também, possui uma alta mobilidade e solubilidade no solo e apresenta um período longo de carência, que varia de 30 a 100 dias. Esses fatores combinados com a acessibilidade econômica justificam o uso abrangente e mundial da atrazina em usos agrícolas e não agrícolas.

No Brasil, é utilizada predominantemente no controle pré- e pós-emergente de ervas daninhas em culturas como de cana-de-açúcar e milho. Entretanto, devido a sua baixa afinidade com a porção orgânica do solo, esse praguicida é facilmente conduzido pelo escoamento superficial, atingindo os abastecimentos de água para consumo humano.

A atrazina é classificada como um desregulador endócrino com atividade estrogênica, ou seja, atua interferindo, principalmente, nos mecanismos do eixo HHG e nos sistemas monoaminérgicos cerebrais, principalmente o sistema dopaminérgico estriatal.

Devido as suas características físico-químicas, esse xenobiótico sujeita a população de forma geral, à ingestão não intencional. Seus efeitos tóxicos são mais evidentes em gestantes, crianças e adolescentes, devido, em especial, às alterações hormonais que acontecem nessas fases de desenvolvimento.

Contudo, há carência de estudos a respeito das consequências da exposição a este herbicida durante a puberdade e suas consequências na função reprodutiva na idade adulta.

Assim, foi proposto neste trabalho avaliar os efeitos comportamentais e neuroquímicos da exposição peripuberal de diferentes doses de atrazina em ratos na idade adulta, uma vez que a puberdade é um período em que ocorre mudanças fisiológicas importantes no organismo animal, o que o torna mais vulnerável a ação de xenobióticos.

3 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da exposição à atrazina durante a puberdade e estudar na idade adulta o comportamento sexual de ratos machos e fêmeas, bem como analisar os efeitos nos níveis de monoaminas e seus metabólitos cerebrais.

3.1 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da exposição à diferentes doses de atrazina durante a puberdade de ratos:

- No ganho de peso e o consumo de água e ração durante o tratamento;
- Na coordenação motora, na motivação sexual, na ereção peniana e no comportamento sexual de ratos adultos;
- No comportamento sexual fisiológico e farmacológico e no ciclo estral de ratas adultas;
- No peso corporal e no peso relativo de órgãos sexuais, rins, adrenais e fígado de ratos machos e fêmeas adultos;
- No índice gonadosomático de ratos machos adultos;
- Nos níveis de monoaminas e seus metabólitos cerebrais de ratos machos e fêmeas adultos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 15 ratas e 5 ratos, da linhagem Wistar e adultos, de aproximadamente 60 dias de vida, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), os quais foram acasalados para obtenção de suas proles. Assim, foram obtidas, dessas proles, 40 fêmeas e 40 machos.

Os animais ficaram alojados em gaiolas de polipropileno (41 x 34 x 18 cm) com maravalha autoclavada como substrato e mantidos em uma sala com umidade relativa do ar de $55\% \pm 10$, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 h (luz acesa às 6 h), exceto para avaliação do comportamento sexual, quando o ciclo de luz foi parcialmente invertido (luz acesa às 20 h). Os animais receberam água e comida *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

O ciclo de luz foi invertido para facilitar as observações comportamentais, uma vez que o comportamento sexual de roedores acontece no período noturno. Para tanto, os animais ficaram alojados na sala com ciclo de luz parcialmente invertido por pelo menos 15 dias antes do início das avaliações comportamentais, período este para habituação e adaptação dos ciclos biológicos dos animais (RODRIGUES-ALVES, 2007). A iluminação necessária para a manipulação dos animais e realização dos testes comportamentais foi provida por uma luz infravermelha (25 W), comprimento de luz não visível aos roedores, que assim, não interfere no ciclo de luminosidade.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), sob o protocolo de número 6095071020.

4.2 Praguicida e fármacos

- Facero[®] Solução Concentrada (SC) (formulação comercial de atrazina - IHARABRAS S.A. Indústrias Químicas, Sorocaba/SP);
- Apomorfina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha): utilizada para indução da ereção peniana;
- Primogyna[®] (valerato de estradiol - Schering do Brasil, Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo/SP): empregado para indução do estro;

4.2.1 Atrazina

Na puberdade, do DPN22 ao 41 (Laws et al., 2000), os ratos receberam, por via oral (gavagem), 1 mL/kg de uma formulação comercial de atrazina diluída em água filtrada. Foi proposto o emprego de três diferentes doses, 10, 30 e 100 mg/kg de atrazina administradas por gavagem; doses idênticas a essas foram empregadas em ratas nos estudos de maturação sexual (ASHBY et al., 2002) e de avaliação hormonal (GOLDMAN et al., 2013). O grupo controle recebeu 1 mL/kg de água filtrada por gavagem, por idêntico período.

4.2.2 Apomorfina

A apomorfina foi diluída em água destilada e administrada por via subcutânea na dose 50 µg/kg. Esta solução foi preparada diariamente, mantida em gelo e ao abrigo de luz durante toda a sessão experimental a fim de evitar sua degradação.

4.2.3 Primogyna[®]

A formulação comercial de valerato de estradiol foi diluída em solução salina (NaCl 0,9%) e administrada por via subcutânea na dose de 0,5 mg/kg (FERRI et al., 2013).

4.3 Procedimentos

4.3.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

As fêmeas foram colocadas nas gaiolas dos machos ao fim da tarde para o acasalamento, na razão de três fêmeas para cada macho. Na manhã seguinte foi feito o esfregaço vaginal das fêmeas para o diagnóstico de prenhez. Esse procedimento consistiu na introdução de um *swab* umedecido com solução salina no orifício vaginal da fêmea para coleta de material. O diagnóstico de prenhez foi considerado positivo quando detectada presença de espermatozoide após observação em microscopia.

4.3.2 Nascimento, sexagem e padronização dos filhotes

As ratas gestantes foram observadas todos os dias para verificar o nascimento dos filhotes, e estas não foram manipuladas até o dia do nascimento de suas proles; o dia do nascimento foi considerado o DPN1. No DPN2 foi realizada a sexagem e padronização do número de filhotes para dez, sempre que possível foram deixados cinco fêmeas e cinco machos. Os filhotes excedentes foram eutanasiados por decapitação ainda no DPN2.

4.3.3 Acompanhamento do ganho de peso

Os animais do grupo controle e dos grupos experimentais, tanto machos como fêmeas, foram pesados diariamente durante o período do tratamento, do DPN22 ao 41, para acompanhamento de peso corporal.

4.3.4 Consumo de água e ração

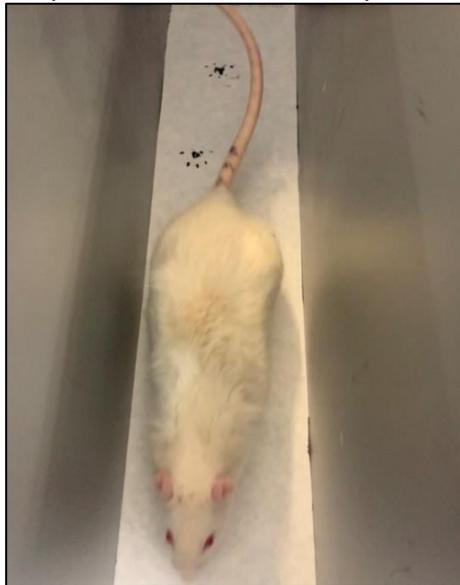
Duas vezes na semana, durante o período do tratamento, do DPN22 ao 41, foram pesadas as águas e a ração dos animais dos grupos controle e experimentais, de machos e de fêmeas, para cálculo do consumo médio durante esse período.

4.3.5 Teste da marcha

Para avaliar a coordenação motora e o equilíbrio do animal, foi efetuado o teste da marcha, por meio do registro direto de sua marcha, a partir das pegadas deixadas pelas patas dos membros pélvicos, conforme proposto por

Pinto et al. (2015) e Dunnet e Brooks (2018). Para a sua realização, foi utilizada uma plataforma horizontal plana com 30 cm de comprimento, 10 cm de largura, com parede de 15 cm, cujo piso foi forrado com papel de filtro branco, conforme ilustrado pela Figura 4.

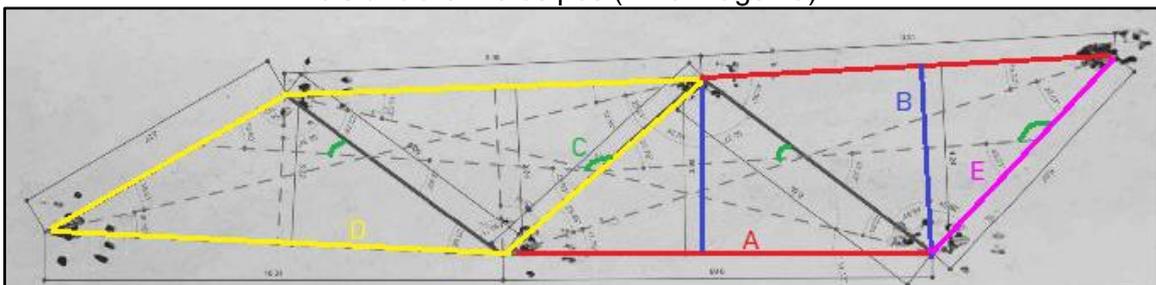
Figura 4: Foto de um rato no interior do aparato empregado para o teste da marcha. Note as pegadas das patas deixadas sobre o piso da plataforma.



Fonte: Autoral.

Para avaliar a marcha, cada animal, com os coxins plantares dos membros pélvicos pintados com tinta preta, foi colocado para caminhar no aparato. A partir das pegadas deixadas pelos coxins plantares, foram avaliados, conforme proposto por Jacobs et al. (2014) e Yamamoto et al. (2019), parâmetros ilustrados pela Figura 5 e descritos a seguir no Quadro 5. A quantificação dos parâmetros foi feita com auxílio do software AutoCAD® para melhor padronização e exatidão das medidas.

Figura 5: Parâmetros do teste da marcha avaliados em ratos: A) comprimento da passada (linha vermelha); B) comprimento do passo (linha azul); C) ângulo do passo (losango amarelo); D) área da passada (quadrilátero de linhas vermelhas e azuis); E) distância entre os pés (linha magenta).



Fonte: Autoral.

Quadro 5: Descrição dos parâmetros analisados no teste da marcha.

Parâmetro	Descrição
Comprimento da passada	Distância entre duas pegadas da mesma pata (Figura 5-A; em vermelho)
Comprimento do passo	Largura entre os membros direito e esquerdo (Figura 5-B; em azul)
Simetria	Comprimento do passo (Figura 5-B) dividido pelo comprimento da passada (Figura 5-A). Um passo simétrico deve ser igual a 0,5
Ângulo do passo	Ângulo de uma pegada em relação ao centro do passo (Figura 5-C; em verde)
Área da passada	Área do trapézio formado a cada dois passos (Figura 5-D; em amarelo)
Distância entre os pés	Distância entre os dois pés em um mesmo passo (Figura 5-E; em magenta)

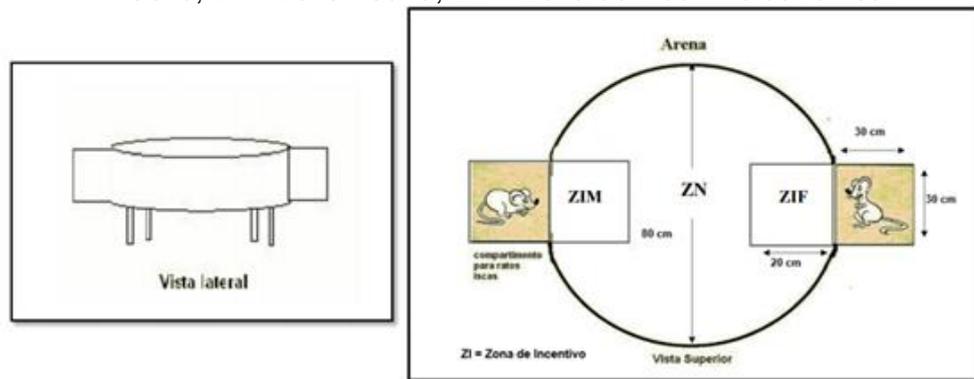
Ao término do teste de cada animal, o aparato foi limpo com álcool 70% e foram intercalados animais dos grupos controle e experimentais.

4.3.6 Avaliação da motivação sexual em machos

O teste da motivação sexual foi utilizado para avaliação da libido nos ratos machos adultos. Para tal, foi utilizado um aparato circular de madeira com 80 cm de diâmetro, circundada por uma parede metálica de 14,5 cm de altura e que fica apoiada sobre uma estrutura de metal a 60 cm do chão. Acoplado lateralmente a essa arena, há dois compartimentos de 30 cm² opostos um ao outro, denominados caixas de incentivo, separados por uma tela de arame de forma que permite somente o contato visual e olfativo entre os animais durante o teste.

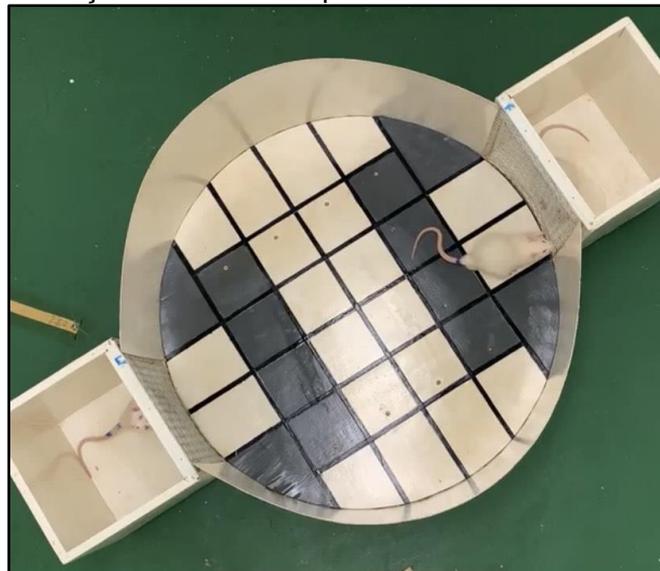
O chão da arena está dividido em 3 zonas: zona de incentivo do macho (ZIM), quadrante localizado a frente do compartimento onde estará o macho; zona de incentivo da fêmea (ZIF), quadrante localizado na frente do compartimento onde estará a fêmea; zona neutra (ZN), porção restante da arena, entre as demais zonas de incentivo (Figuras 6 e 7).

Figura 6: Ilustração do aparato de motivação sexual, onde: ZIM= Zona de incentivo do macho; ZN= Zona neutra; ZIF= Zona de incentivo da fêmea.



Fonte: (adaptado de RODRIGUES-ALVES, 2007).

Figura 7: Foto do aparato de motivação sexual, na qual pode ser visto, no compartimento central, o rato em avaliação e os dois compartimentos laterais como animais-incentivo.



Fonte: Autoral.

Para a observação da motivação sexual foi seguido o protocolo descrito por Moreira e colaboradores (2020); para isso foram empregados dois ratos “iscas”, sendo um rato macho sexualmente experiente e uma rata fêmea, cujo estro foi induzido farmacologicamente por 0,5 mg/kg de valerato de estradiol, por via subcutânea, administrado 24 h antes do início do teste. Os ratos foram familiarizados, individualmente, com o aparato por três dias consecutivos uma semana antes do teste durante 5 min. No dia do teste, os ratos “iscas” foram colocados na caixa de incentivo 20 min antes do início do teste para sua habituação e impregnação do odor. Cada rato foi testado por 20 minutos e os

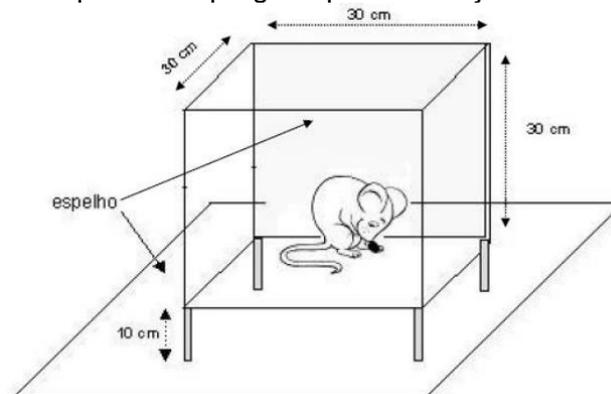
parâmetros analisados foram: tempo de permanência na ZIF, tempo de permanência na ZIM e frequência em cada uma das zonas de incentivo.

Ao término da observação de cada animal, o aparato foi limpo com álcool 70% e foram intercalados animais dos grupos controle e experimentais.

4.3.7 Avaliação da ereção peniana induzida por apomorfina

A ereção peniana foi observada utilizando uma caixa de vidro, medindo 30 x 30 x 30 cm, com espelhos localizados na parede posterior e no piso da caixa, para facilitar a observação do comportamento. A caixa fica apoiada em quatro pés de metal com 10 cm altura, sobre um espelho no piso medindo 40 x 40 cm, conforme ilustrado pelas Figuras 8 e 9.

Figura 8: Ilustração do aparato empregado para avaliação da ereção peniana em rato.



Fonte: (RODRIGUES-ALVES, 2007)

Figura 9: Foto do aparato empregado para avaliação da ereção peniana em rato.



Fonte: Autoral.

Para indução da ereção peniana foi seguido o protocolo descrito por Moreira e colaboradores (2017). Assim, foi administrado 50 µg/kg apomorfina, por via subcutânea, e o rato foi colocado imediatamente no aparato. Foi considerada a ereção peniana quando a glândula do pênis emergir da membrana prepucial, acompanhado por uma pequena verticalização dos membros pélvicos e limpeza genital (*grooming* genital), conforme mostrado na Figura 10.

Figura 10: Ereção peniana induzida por apomorfina em rato.



Fonte: Autoral.

Conforme proposto por Rodrigues-Alves et al. (2008) e Moreira et al. (2017), cada animal foi observado durante 60 min consecutivos e foram avaliados os seguintes parâmetros:

- 1) latência para a primeira ereção peniana;
- 2) número de ereções penianas;
- 3) latência para primeiro bocejo;
- 4) número de bocejos.

A latência para primeira ereção foi convertida em escores, conforme apresentado no Quadro 6.

Quadro 6: Escores atribuídos às latências para primeira ereção peniana e bocejo de ratos tratados com apomorfina.

Escore	Latência em minutos
1	0 a 10
2	11 a 20
3	21 a 30
4	31 a 40
5	41 a 50
6	51 a 60
7	Não apresentou ereção peniana

Fonte: (RODRIGUES-ALVES, 2007).

Ao término da observação de cada animal, o aparato foi limpo com álcool 70% e foram intercalados animais dos grupos controle e experimentais.

4.3.8 Avaliação do comportamento sexual em machos

A avaliação do comportamento sexual masculino foi realizada no período escuro do ciclo de luz invertido dos animais, iniciando-se a partir das 11 h (pelo menos três horas após a luz se apagar).

O aparato para observação consiste em uma caixa de madeira (56 x 32 x 32 cm) com uma cobertura móvel e vidro frontal (Figura 11); o chão da caixa foi forrado com maravalha.

Figura 11: Foto do aparato utilizado para avaliação do comportamento sexual em rato (vista frontal).



Fonte: Autoral.

Para avaliação do comportamento sexual do rato, empregou-se o protocolo proposto por Moreira e colaboradores (2020). Sucintamente, o rato macho teste foi colocado no aparato 5 min antes do início do teste para habituação e impregnação do odor. Para observação do comportamento,

utilizou-se uma fêmea isca em estro induzido farmacologicamente por meio da administração subcutânea de 0,5 mg/kg de valerato de estradiol 24 h antes do início do teste. Após o período de habituação do macho, a fêmea foi colocada no aparato e o comportamento foi observado por 50 min, sendo analisados os seguintes parâmetros:

- 1) latência para primeira monta;
- 2) latência para primeira intromissão;
- 3) latência para primeira ejaculação;
- 4) latência para primeira intromissão pós-ejaculatória;
- 5) número de montas incompletas;
- 6) número de intromissões;
- 7) número de ejaculações;
- 8) total de montas.

Após a observação do comportamento sexual, tanto o rato como a fêmea isca foram retirados do aparato para troca da maravalha. As observações foram feitas intercalando os animais do grupo controle e experimentais.

Ao término da observação de cada animal, o aparato foi limpo com álcool 70% e foram intercalados animais dos grupos controle e experimentais.

4.3.9 Comportamento sexual feminino

A avaliação do comportamento sexual feminino, da mesma forma que o comportamento sexual dos machos, foi realizada no período escuro do ciclo de luz invertido dos animais, iniciando-se a partir das 11 h (pelo menos três horas após a luz se apagar) e empregou-se o mesmo aparato ilustrado pela Figura 11.

A avaliação do comportamento sexual das ratas foi feita de duas maneiras: acompanhando o ciclo natural das fêmeas e pela indução do estro farmacologicamente. Para a avaliação em ciclo estral fisiológico, foi realizado esfregaço vaginal diariamente pela manhã e, quando as fêmeas que apresentassem estro, tiveram seu comportamento avaliado no período da tarde.

Antes do início do teste, um rato macho sexualmente experiente foi introduzido na caixa de observação por 5 min para habituação, de forma que impregnasse seu odor na caixa e maravalha. Em seguida, a fêmea a ser avaliada foi colocada no aparato e foi feita a observação do comportamento até a realização de 10 montas. O comportamento foi avaliado de duas formas, pelo

coeficiente e a intensidade de lordose, sendo a lordose caracterizada pela flexão côncava da coluna vertebral da fêmea, elevação da cauda e exposição da genitália (FELICIO et al., 1989; TEODOROV et al., 2005; MOREIRA et al., 2014).

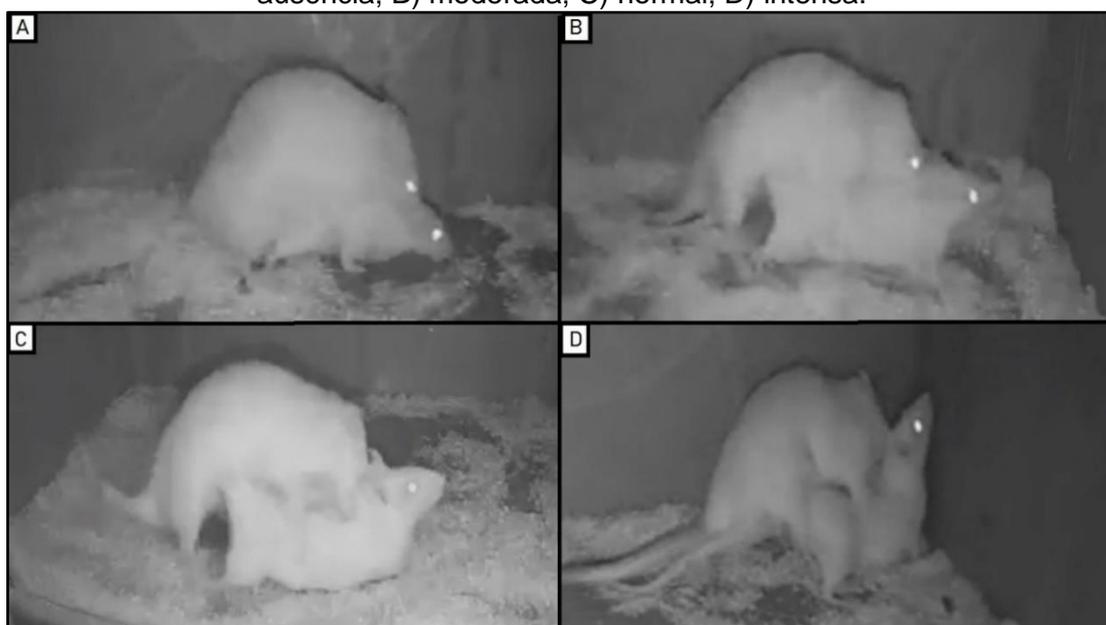
O coeficiente de lordose (em %) foi calculado pelo número de lordoses em 10 montas multiplicado por 10. Já a intensidade de lordose foi avaliada por atribuição de escores (HARDY; DEBOLD, 1971) de acordo com o comportamento realizado em cada uma das 10 montas, conforme o apresentado no Quadro 7 e ilustrado pela Figura 12.

Quadro 7: Escores atribuídos à intensidade de lordose no comportamento sexual de ratas.

Escore	Intensidade	Descrição
0	Ausente	Ausência da postura de lordose (Figura 12-A)
1	Moderada	Leve flexão côncava da coluna vertebral e ligeira elevação da cabeça e base da cauda erguida (Figura 12-B)
2	Normal	Flexão côncava da coluna vertebral, elevação da cabeça em ângulo de 30°, membros torácicos estendidos ligeiramente para frente enquanto os membros pélvicos sustentam o quadril e a cauda para cima (Figura 12-C)
3	Intensa	Proeminente flexão côncava da coluna, elevação da cabeça em ângulo igual ou superior a 45° e cauda bastante elevada (Figura 12-D)

Fonte: (adaptado de HARDY; DEBOLD, 1971).

Figura 12: Intensidade de lordose observada no comportamento sexual de ratas: A) ausência; B) moderada; C) normal; D) intensa.



Fonte: Autoral.

Após a observação do comportamento sexual, tanto a rata como o macho isca foram retirados do aparato para troca da maravalha. As observações foram feitas intercalando os animais do grupo controle e experimentais.

4.3.10 Avaliação do ciclo estral

O ciclo estral foi acompanhado durante 15 dias consecutivos por observações microscópicas diárias do material proveniente do esfregaço vaginal das ratas. As coletas foram feitas sempre entre às 12 h e 14 h.

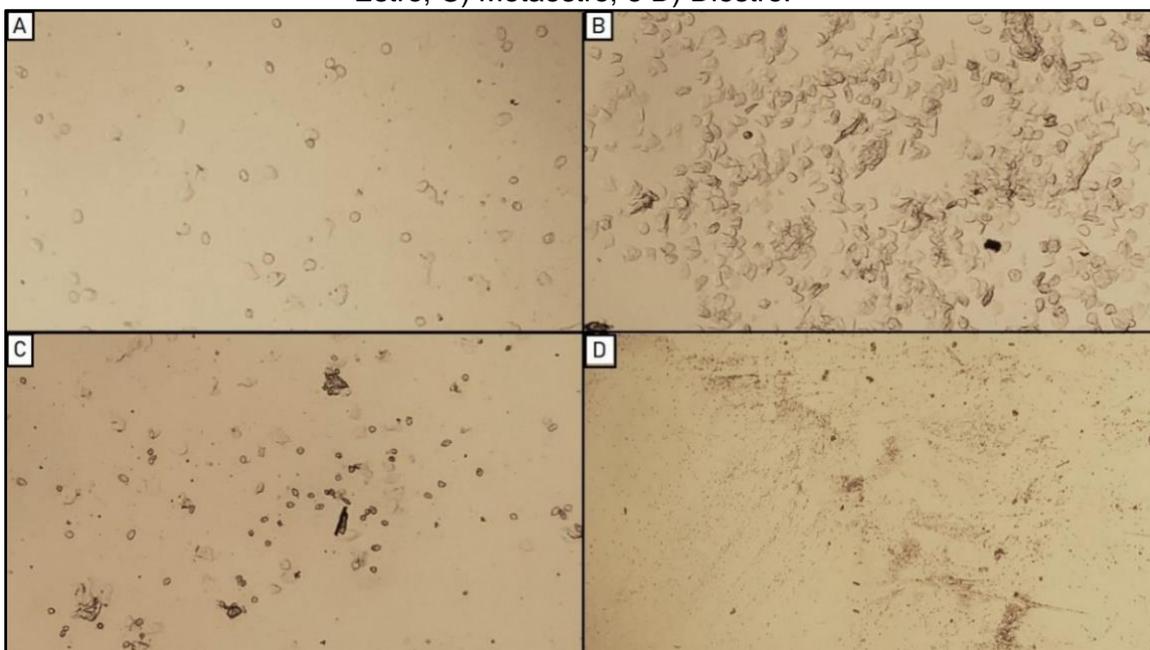
Para a coleta do material, foi introduzido delicadamente na vagina da rata um *swab* umedecido em solução salina (NaCl 0,9%) Em seguida, esse material foi depositado em uma lâmina de vidro e observado sob microscopia de luz (lente de aumento 40x) para determinação da fase do ciclo estral.

Sob a microscopia de luz foi possível observar três tipos celulares, conforme descrito por Marcondes e colaboradores (2002): 1) células epiteliais nucleadas e arredondadas; 2) células queratinizadas, irregulares e anucleadas; e 3) leucócitos pequenos, circulares e bem definidos. Esses tipos celulares caracterizam as diferentes fases do ciclo estral, descritas no Quadro 8.

Quadro 8: Descrição das fases do ciclo estral de ratas.

Fase do ciclo estral	Descrição	Duração
Proestro	Predominância de células epiteliais nucleadas (Figura 13-A)	12h
Estro	Presença de células queratinizadas e anucleadas, muitas vezes justapostas (Figura 13-B)	24h a 36h
Metaestro	Presença de todos os tipos celulares, em concentrações variadas (Figura 13-C)	24 a 48h
Diestro	Alta presença de leucócitos (Figura 13-D)	12h.

Figura 13: Fases do ciclo estral de ratas em microscopia de luz (40x): A) Proestro; B) Estro; C) Metaestro; e D) Diestro.



Fonte: Autoral.

4.3.11 Avaliação do peso relativo dos órgãos e do índice gonadossomático

Os ratos foram pesados individualmente e submetidos a eutanásia por decapitação. Os órgãos sexuais (testículos, epidídimos, vesícula seminal, próstata, ovários e útero), rins, adrenais e fígado foram removidos e pesados.

Com esses órgãos, foi realizado o cálculo do peso relativo (PR) da seguinte forma: $PR = PO/PC \times 100$, onde PO = peso do órgão e PC = peso corporal. Já com as gônadas masculinas foi calculado o índice gonadossomático (IGS), conforme proposto por Moreira e colaboradores (2020), da seguinte forma: $IGS = PG/PC \times 100$, onde PG = peso dos dois testículos e PC = peso corporal.

4.3.12 Dosagem de neurotransmissores cerebrais e seus metabólitos

Os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação para a obtenção das seguintes estruturas cerebrais coletadas: córtex pré-frontal, hipotálamo, hipocampo e corpo estriado. O hipotálamo é uma estrutura que possui funções endócrinas, autonômicas e comportamentais; participa do controle hormonal, através do eixo hipotálamo-hipófise, da regulação da temperatura corporal, do controle da ingestão de alimentos, do comportamento sexual, da manutenção da homeostase e da mediação de respostas emocionais (GUYTON; HALL, 2002). O hipocampo tem papel importante para a cognição e

faz parte do sistema límbico; possui duas grandes regiões: a dorsal, responsável pelo aprendizado-memória, e a ventral relacionada com as emoções (FANSELOW; DONG, 2010). O corpo estriado faz parte dos núcleos da base e participa do controle de movimentos voluntários (HIKOSAKA et al., 2000). O córtex pré-frontal é uma importante região do lóbulo frontal dos mamíferos com papel fundamental na organização dos aspectos cognitivos complexos, as funções executivas, incluindo-se atenção, memória de trabalho etc. (SEMRUD-CLIKEMAN; ELLISON, 2009).

Para isso, após a decapitação, o encéfalo do animal foi retirado e colocado sob uma placa de Petri com gelo, a fim de deixar o órgão preservado para a obtenção das estruturas cerebrais. Esse procedimento não ultrapassou o período de 3 min. Após a coleta, as estruturas foram colocadas em *ependorffs*® e acondicionadas em nitrogênio líquido para rápido e imediato congelamento. Em seguida elas foram pesadas e armazenadas, por até 20 dias, a uma temperatura de -80°C.

Posteriormente, as estruturas coletadas foram homogeneizadas em ácido perclórico (ClHO₄) a 0,1 M contendo ácido 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA – padrão interno) com o auxílio de uma caneta sonicadora de alta frequência, sendo o volume de ácido 10 vezes o peso da estrutura.

Após a homogeneização, as estruturas foram deixadas *overnight* em refrigerador a 10°C para precipitação das proteínas e ácidos nucleicos. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm (centrífuga *Eppendorff*® - 540 R), a 4°C por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado com o auxílio de micropipeta e colocado em *ependorffs*® para ser armazenado em *freezer* -80°C, até o momento da quantificação analítica. Foram quantificados:

- Dopamina (DA) e seus metabólitos, ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA);

- Noradrenalina (NOR) e seu metabólito, ácido vanilmadélico (VMA);

- Serotonina (5HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA);

Foi calculado também o *turnover* (taxa de renovação), por meio da relação metabólito/neurotransmissor, de NOR, DA e 5HT da seguinte forma: DOPAC/DA, HVA/DA, VMA/NOR e 5HIAA/5-HT.

As análises das monoaminas (noradrenalina, dopamina e serotonina) e seus metabólitos foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência com

detecção eletroquímica (HPLC-ED), como descrito por Zaccarelli-Magalhães et al. (2019) e Sandini et al. (2018). Para tanto foi empregado o cromatógrafo Shimadzu Modelo 20A, composto por um injetor automático com válvula injetora de volume variável (entre 1 e 100 μ l), bombas de fluxo quaternárias, uma coluna cromatográfica (150 X 4,6 mm, Shimpak – ODS C 18) com filtro de linha e um detector eletroquímico Antec Decade. Utilizou-se a técnica de cromatografia em fase reserva com pareamento iônico (ácido heptanosulfônico), que é baseada na cromatografia de partição ou absorção. Para as análises foi utilizada a temperatura de 60°C e o tempo de obtenção dos picos de até 19 min.

A fase móvel utilizada foi um sistema isocrático formado por tampão citrato 0,02 M, metanol 92:8 (v/v), 0,12 nM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) sódico e 0,0556% de ácido 1-heptanosulfônico (HSA). O pH será ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico (H_3PO_4). A fase móvel foi filtrada em um sistema à vácuo antes de ser utilizada no HPLC-ED. Após esse procedimento ela circulou no sistema *overnight* para equilíbrio da coluna, que foi acondicionada em um fluxo de 1 ml/min. O detector foi mantido com um potencial de 0,8 V no eletrodo de trabalho.

Para o preparo das soluções padrões de monoaminas foram utilizados padrões de concentrações 1 nM de cada neurotransmissor e seu metabólito diluídos em ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio e estocados em *freezer* -80°C. No momento da análise os padrões foram descongelados e diluídos de 2.500 a 10.000 vezes em ácido perclórico 0,1 M.

Foram injetados pelo menos dois padrões no HPLC-ED diariamente, um antes e outro ao final das dosagens para a utilização dos valores como referência.

O equipamento foi padronizado diariamente, ao início e ao término do trabalho, com uma solução de trabalho, com concentração conhecida, de neurotransmissores, seus metabólitos e DHBA, empregando-se como diluente uma solução de ácido perclórico, 0,1M, contendo EDTA e metabissulfito de sódio.

O limite de detecção foi de 0,25 e 1 ng para todos os analitos, o limite de quantificação foi de 10 ng/g de tecido cerebral ou 1,0 ng por 60 ng de sobrenadantes e a taxa de recuperação foi superior a 80%.

4.4 Delineamento experimental

40 ratos e 40 ratas foram divididos em 4 grupos: 1 grupo controle (Cont) e 3 experimentais (ATZ10, ATZ30 e ATZ100; n= 10 animais/grupo). Os animais do grupo controle receberam período da puberdade, isto é, do DPN 22 ao 41, por gavagem, 1mL/kg de água filtrada. Os animais dos grupos experimentais receberam por idêntico período e via, 10, 30 ou 100 mg/kg de formulação comercial de atrazina diluída em água filtrada. Os procedimentos experimentais foram realizados do DPN 90 ao 120, conforme esquematizados no Quadro 9.

Quadro 9: Delineamento experimental de ratos machos e fêmeas.

Animais	Procedimentos
Machos	Teste da marcha
	Avaliação do comportamento sexual
	Avaliação da motivação sexual
	Avaliação da ereção peniana
Fêmeas	Índice gonadossomático
	Avaliação do ciclo estral
	Avaliação do comportamento sexual em ciclo estral fisiológico e farmacológico
Machos e Fêmeas	Ganho de peso durante o tratamento
	Consumo de água e ração durante o tratamento
	Avaliação do peso relativo dos órgãos sexuais, rins, adrenais e fígado
	Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos

4.5 Análise estatística

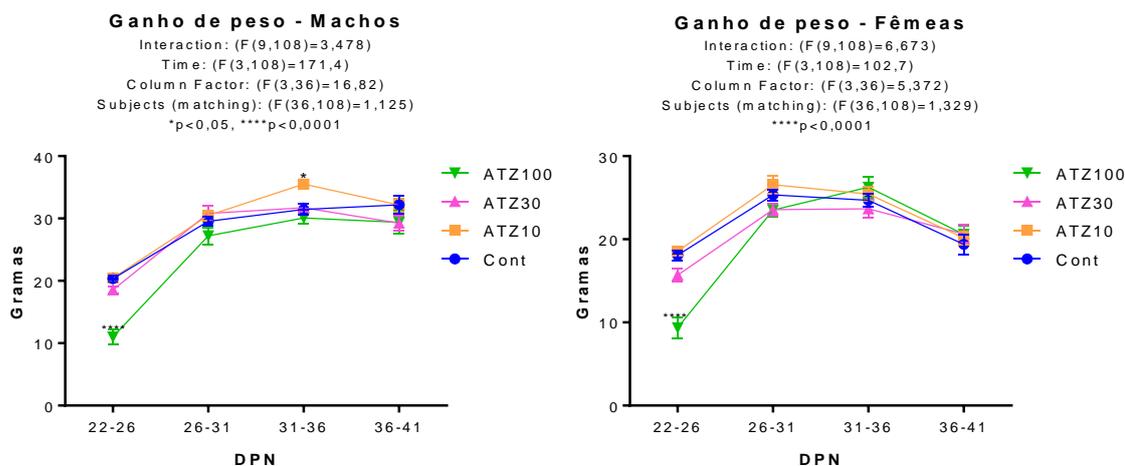
A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 6® (GraphPad software, Inc., San Diego, California, USA). O teste de Bartlett foi utilizado para a verificação da homocedasticidade dos dados. Para os dados paramétricos foram utilizados ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett, quando havia apenas um fator (tratamento) a ser avaliado e ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni, quando tiverem dois fatores (tratamento e tempo) a serem avaliados. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunns. O nível de significância para todas as análises foi considerado $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do ganho de peso, de machos e fêmeas, durante o tratamento com diferentes doses de atrazina

A figura 14 apresenta o ganho de peso, de machos e fêmeas, durante os 20 dias de tratamento (DPN22 ao 41). A ANOVA de uma via mostrou diminuição significativa do ganho de peso entre o grupo controle (Cont) e o grupo tratado com a dose mais alta de atrazina (ATZ100) nos 5 primeiros dias de exposição, tanto em machos quanto em fêmeas e aumento significativo do ganho de peso do grupo tratado com a dose mais baixa de atrazina (ATZ10) em comparação ao grupo Cont do 10^o ao 15^o dia de tratamento em machos.

Figura 14: Ganho de peso de machos e fêmeas que foram expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentados as médias e os respectivos erros padrões. N=10 machos ou 10 fêmeas por grupo. DPN: Dia pós-natal.

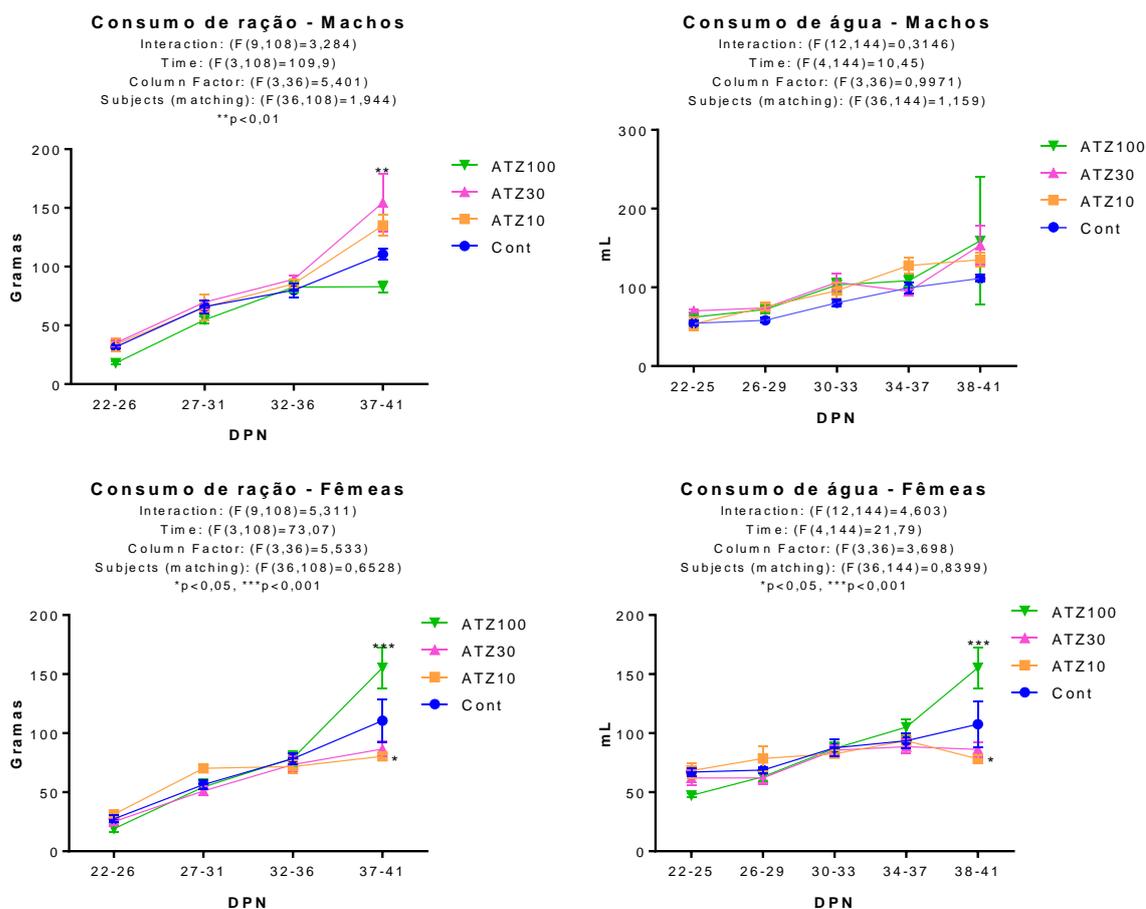


ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni.

5.2 Avaliação do consumo médio individual de água e ração, por machos e fêmeas, durante o tratamento com diferentes doses de atrazina

A figura 15 apresenta o consumo médio individual de água e ração, por machos e fêmeas, durante os 20 dias de tratamento (DPN22 ao 41). A ANOVA de duas vias mostrou aumento significativo no consumo de ração entre o grupo ATZ30 e Cont de machos dos DPNs 37 ao 41; não houve diferença significativa no consumo de água pelos machos entre os grupos controle e experimentais. A ANOVA de duas vias também mostrou um aumento significativo no consumo de água (DPN38 ao 41) e de ração (DPN37 ao 41) por fêmeas do grupo ATZ100 em comparação ao grupo Cont, entretanto o consumo de água e ração foi menor no grupo ATZ10 em relação ao grupo controle ao final da exposição.

Figura 15: Consumo médio de água e ração por machos e fêmeas que foram expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=10 machos ou 10 fêmeas por grupo. DPN: dia pós-natal.

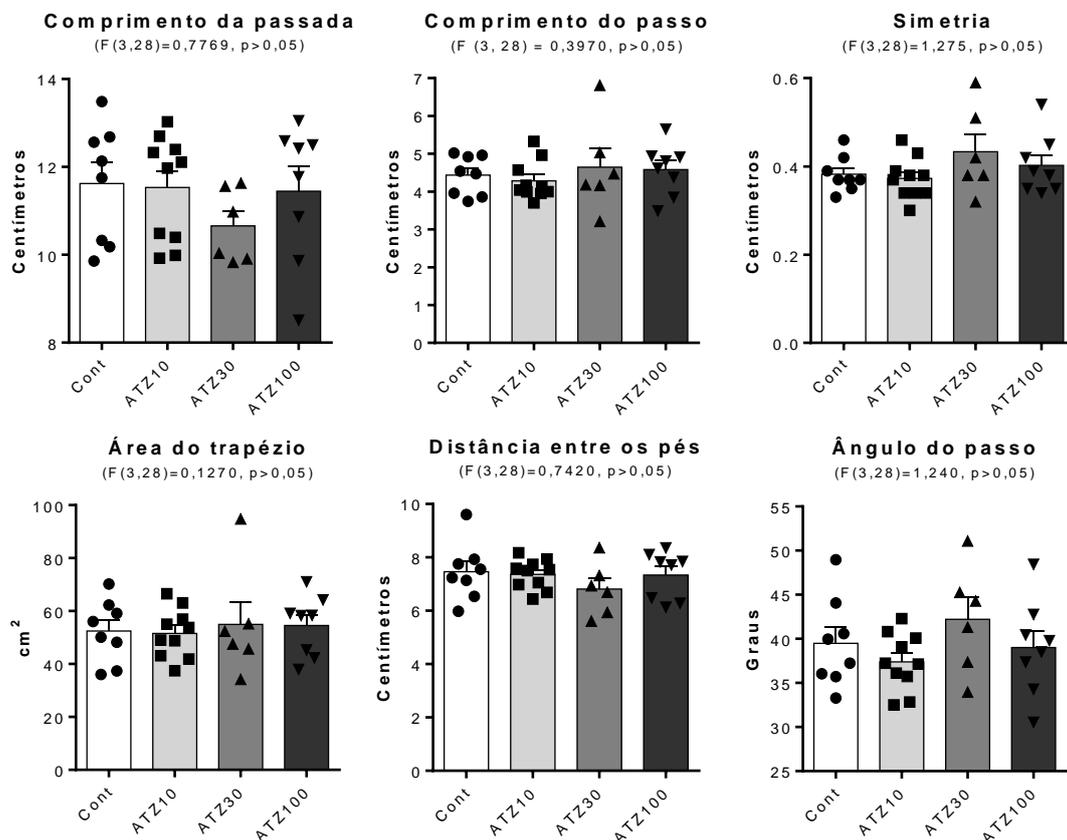


ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni.

5.3 Avaliação da marcha de ratos machos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 16 apresenta os resultados dos parâmetros analisados no teste da marcha. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais e controle nos parâmetros analisados: comprimentos da passada e do passo, simetria, área do trapézio formado por dois passos, distância entre os pés em um mesmo passo e ângulo médio dos passos.

Figura 16: Parâmetros do teste da marcha em ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-10 animais por grupo.

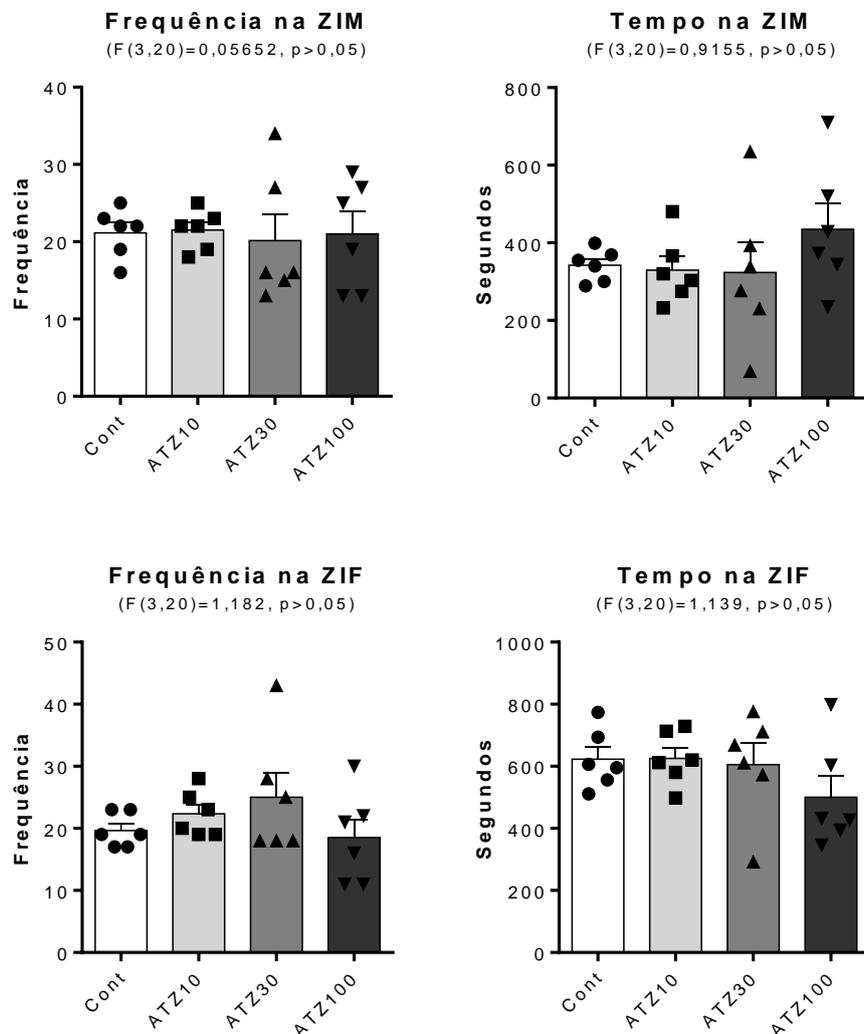


ANOVA de uma via.

5.4 Avaliação da motivação sexual de ratos machos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 17 apresenta os resultados dos parâmetros analisados no teste de motivação sexual em ratos machos. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais na frequência na ZIM, tempo na ZIM, frequência na ZIF e tempo na ZIF.

Figura 17: Parâmetros do comportamento de motivação sexual em ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6 animais por grupo. ZIM=zona de incentivo do macho; ZIF=zona de incentivo da fêmea.

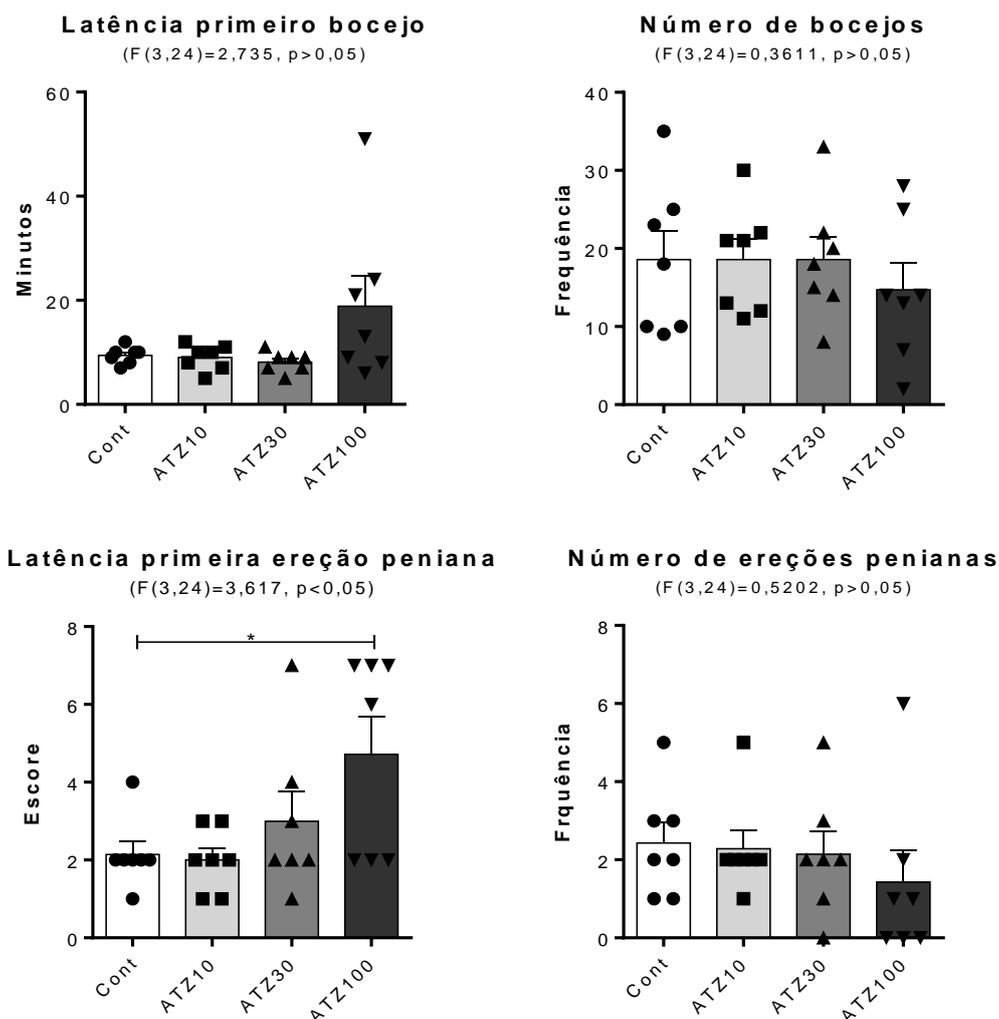


ANOVA de uma via.

5.5 Avaliação da ereção peniana de ratos machos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 18 mostra os resultados dos parâmetros analisados no teste de ereção peniana em ratos machos. A ANOVA de uma via mostrou um atraso significativo na latência para primeira ereção peniana dos animais do grupo ATZ100 e relação ao grupo Cont. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais na latência para o primeiro bocejo, número de bocejos e número de ereções penianas.

Figura 18: Parâmetros do comportamento de ereção peniana em ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7 animais por grupo.

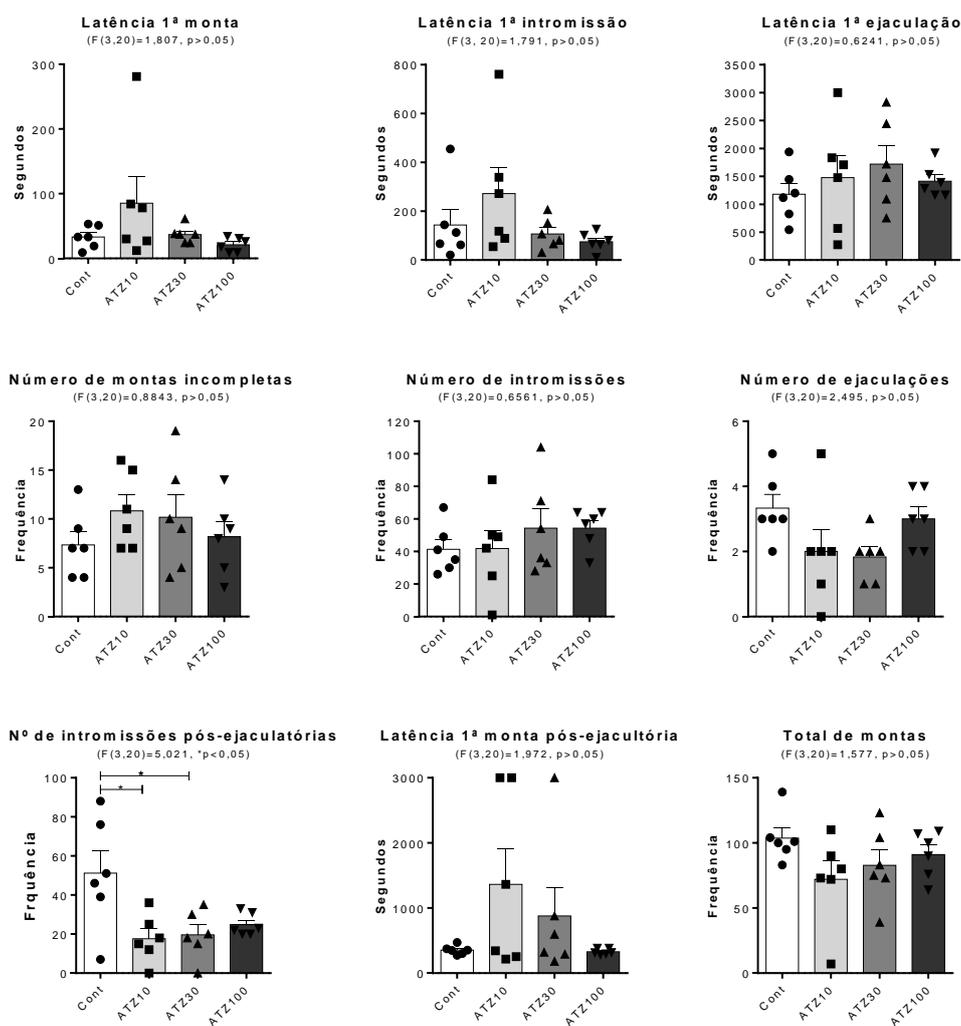


ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

5.6 Avaliação do comportamento sexual de ratos machos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 19 apresenta os resultados dos parâmetros analisados no teste de comportamento sexual em ratos machos. A ANOVA de uma via mostrou um menor número de intromissões pós-ejaculatórias dos animais dos grupos ATZ10 e ATZ30 e relação ao grupo Cont. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais nas latências para 1^o monta, intromissão, ejaculação e para 1^a monta pós-ejaculatória, nos números de montas incompletas, de intromissões, de ejaculações e no total de montas.

Figura 19: Parâmetros do comportamento sexual de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6 animais por grupo.

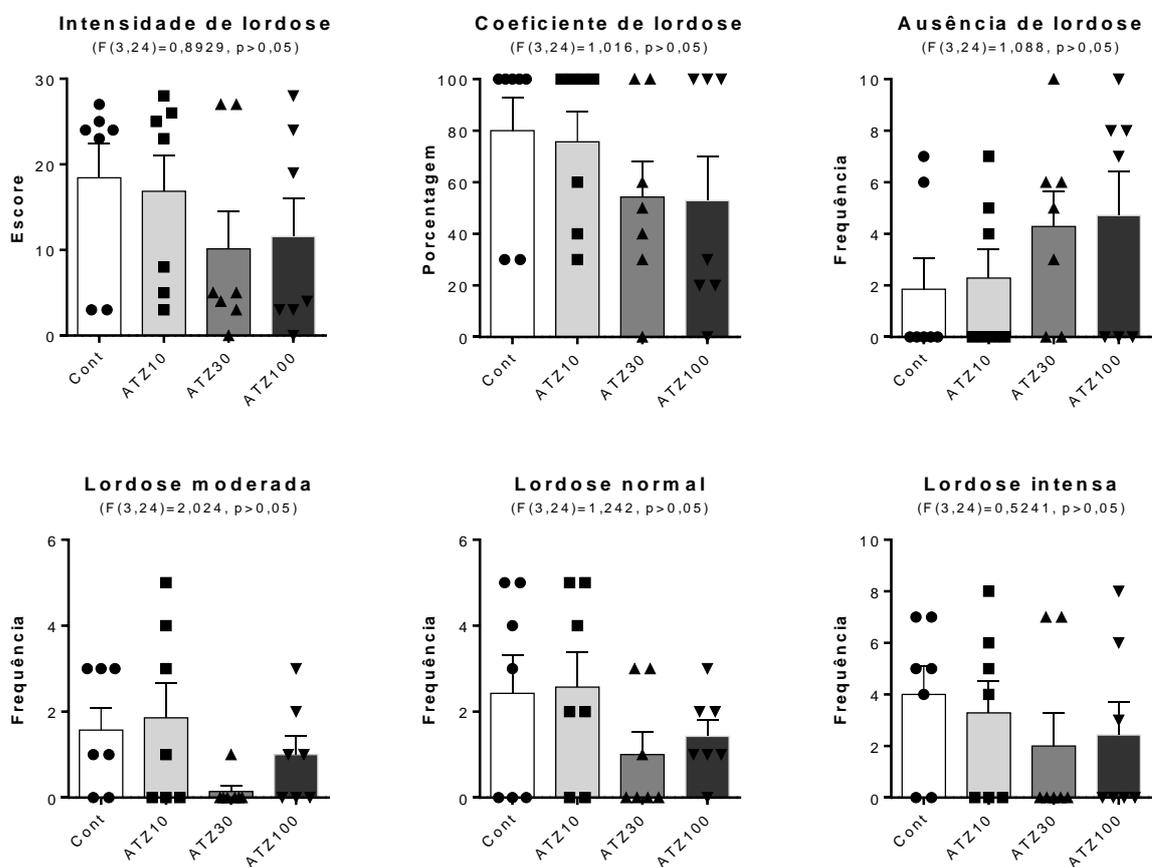


ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

5.7 Avaliação do comportamento sexual feminino, em ciclo estral fisiológico, de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 20 apresenta os resultados dos parâmetros analisados no teste de comportamento sexual de ratas em ciclo estral fisiológico. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais no coeficiente e intensidade de lordose, frequência de ausência de lordose e frequência de lordoses moderadas, normais e intensas

Figura 20: Parâmetros do comportamento sexual de ratas adultas em ciclo estral fisiológico expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7 animais por grupo.

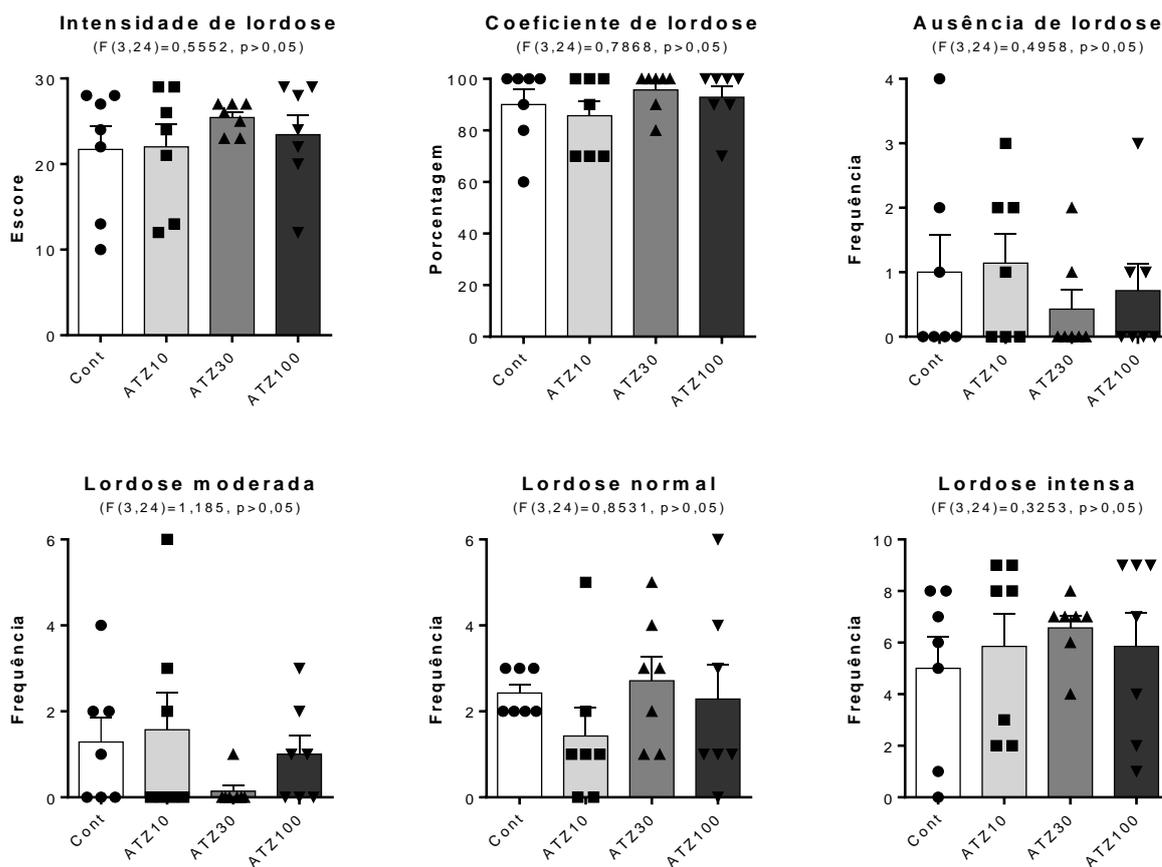


ANOVA de uma via.

5.8 Avaliação do comportamento sexual feminino, em ciclo estral farmacológico, de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 21 apresenta os resultados dos parâmetros analisados no teste de comportamento sexual de ratas em ciclo estral farmacológico, induzido por valerato de estradiol. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais no coeficiente e intensidade de lordose, frequência de ausência de lordose e frequência de lordoses moderadas, normais e intensas

Figura 21: Parâmetros do comportamento sexual de ratas adultas em ciclo estral farmacológicos expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7 animais por grupo.

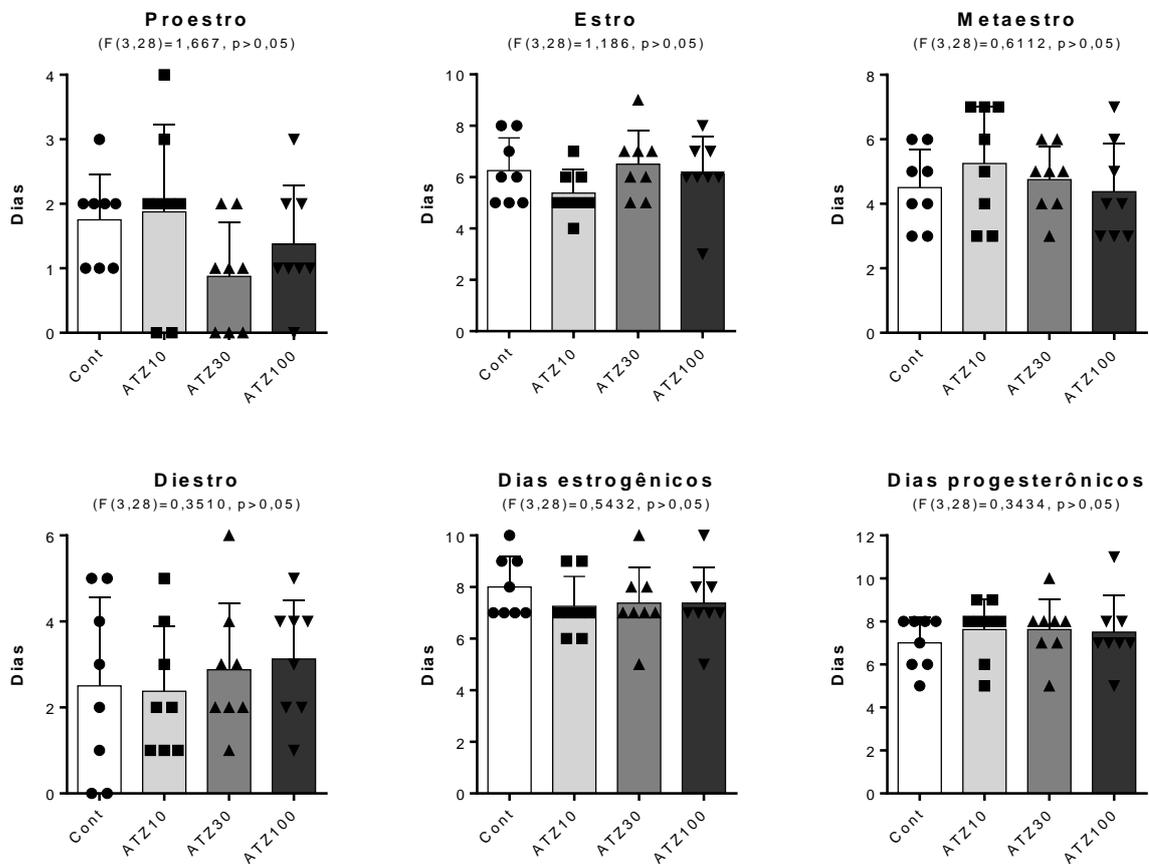


ANOVA de uma via.

5.9 Acompanhamento do ciclo estral de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 22 mostra os resultados do acompanhamento do ciclo estral de ratas adultas. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais nos dias em que os animais passaram em estro, metaestro, diestro e proestro, nem na quantidade de dias estrogênicos e progesterônicos.

Figura 22: Acompanhamento do ciclo estral de ratas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8 animais por grupo.

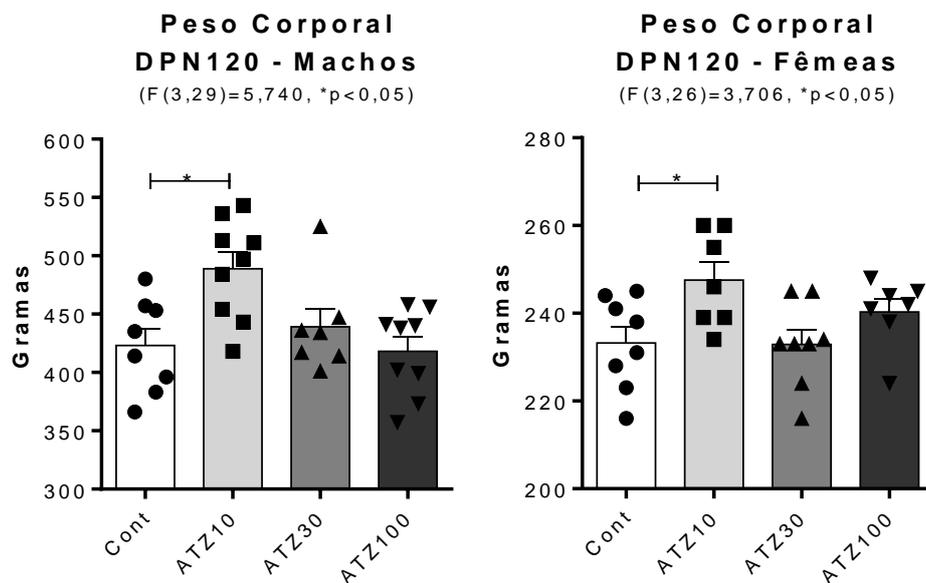


ANOVA de uma via.

5.10 Avaliação do peso corporal no DPN120 de ratos machos e fêmeas adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 23 apresenta os resultados do peso corporal no DPN120 de ratos machos e fêmeas. A ANOVA de uma via mostrou um aumento significativo do peso corporal de machos e fêmeas do grupo ATZ10 e relação aos animais do grupo Cont. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos ATZ30 e ATZ100 no peso corporal no DPN120.

Figura 23: Peso corporal de ratos machos e fêmeas adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo. DPN: dia pós-natal.

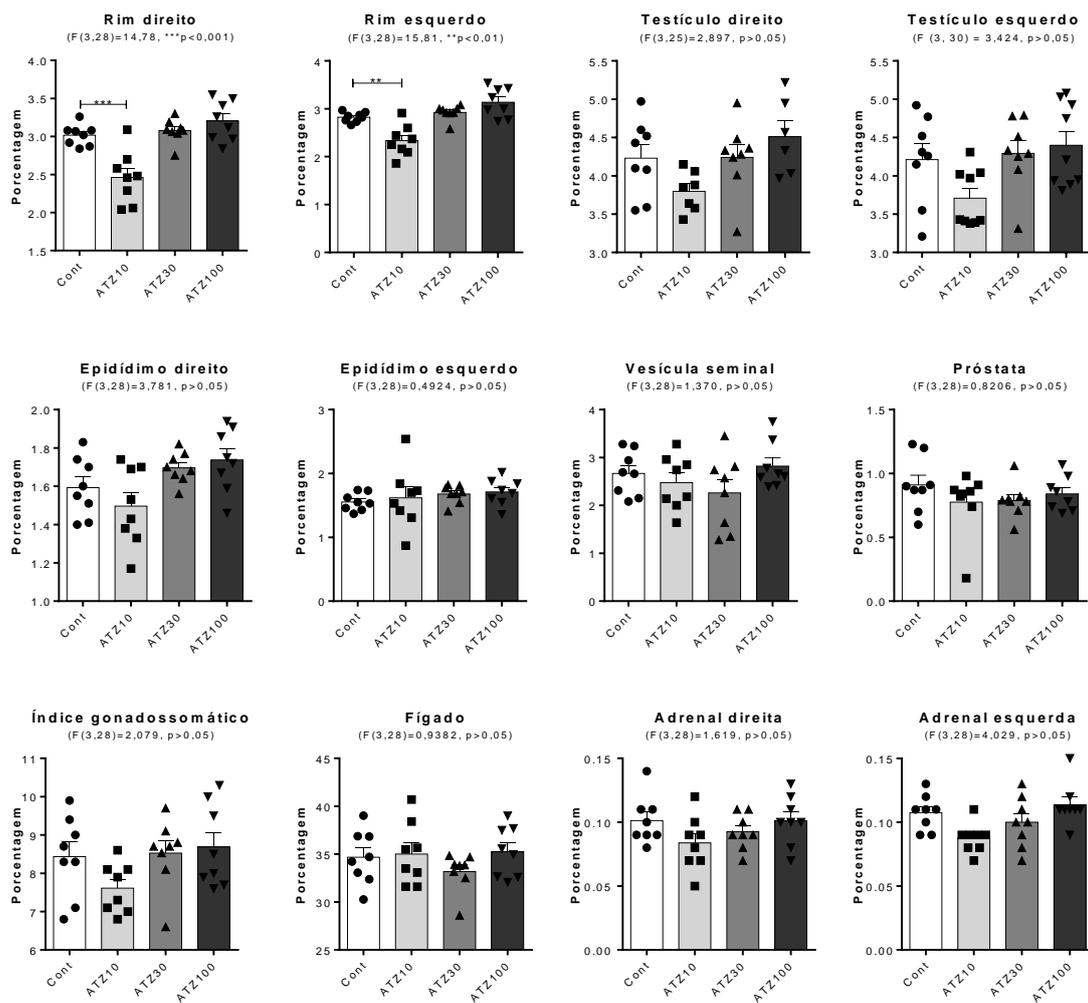


ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

5.11 Avaliação do peso relativo de órgãos de ratos machos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 24 apresenta os resultados do cálculo do peso relativo de órgãos e do índice gonadossomático de ratos machos. A ANOVA de uma via mostrou diminuição significativa do peso dos rins direito e esquerdo dos animais do grupo ATZ10 e relação aos animais do grupo Cont. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais no peso do fígado, dos testículos direito e esquerdo, dos epidídimos direito e esquerdo, da vesícula seminal, da próstata, das adrenais direita e esquerda e no índice gonadossomático.

Figura 24: Peso relativo de órgão de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8 animais por grupo.

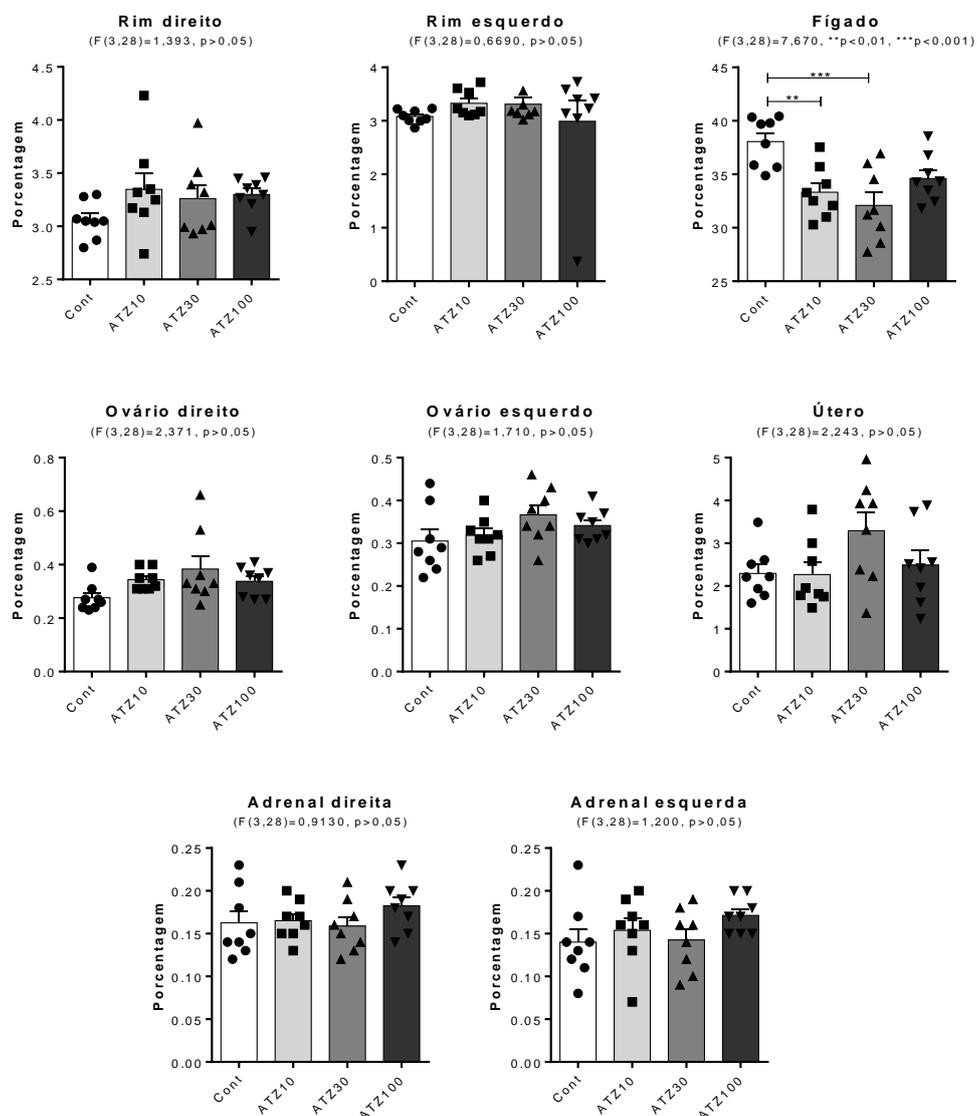


ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

5.12 Avaliação do peso relativo de órgãos de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 25 mostra os resultados do cálculo do peso relativo de órgãos de ratas. A ANOVA de uma via mostrou diminuição do peso do fígado dos animais dos grupos ATZ10 e ATZ30 em relação aos animais do grupo Cont. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais no peso dos rins direito e esquerdo, dos ovários direito e esquerdo, do útero e das adrenais direita e esquerda.

Figura 25: Peso relativo de órgão de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos dos grupos. N=8 animais por grupo.

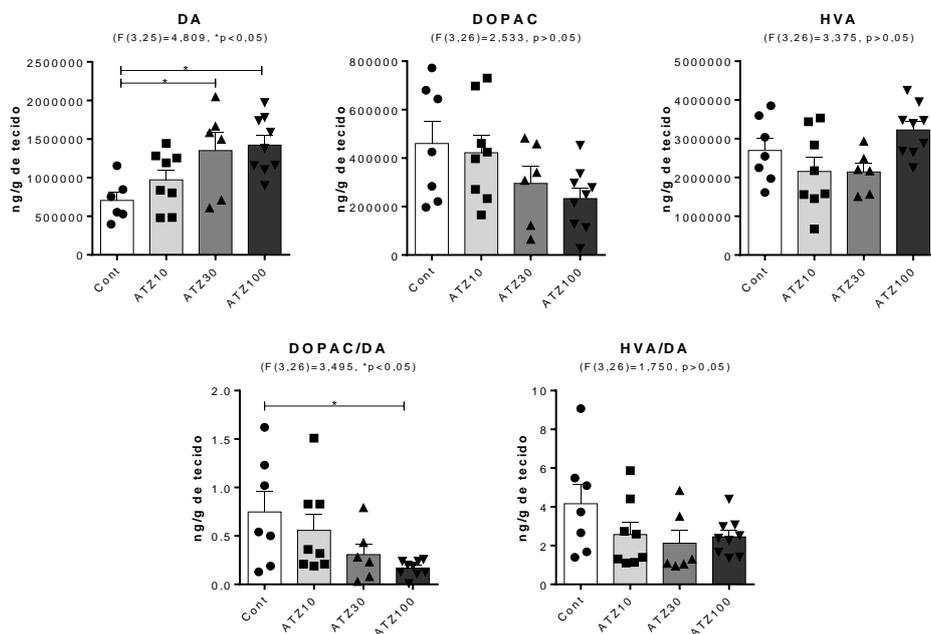


ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

5.13 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no córtex pré-frontal de ratos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 26 apresenta a concentração de dopamina (DA) e seus metabólitos cerebrais (DOPAC e HVA), bem como a taxa de renovação (*turnover* – DOPAC/DA e HVA/DA) no córtex pré-frontal de ratos adultos. A ANOVA uma via mostrou um aumento significativo de DA nos animais dos grupos ATZ30 e ATZ100 em comparação ao grupo controle; os animais do grupo ATZ100 também apresentaram um aumento significativo do *turnover* DOPAC/DA. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos experimentais e controle na concentração de DOPAC e HVA e no *turnover* HVA/DA.

Figura 26: Avaliação do sistema dopaminérgico do córtex pré-frontal de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-8 animais por grupo.

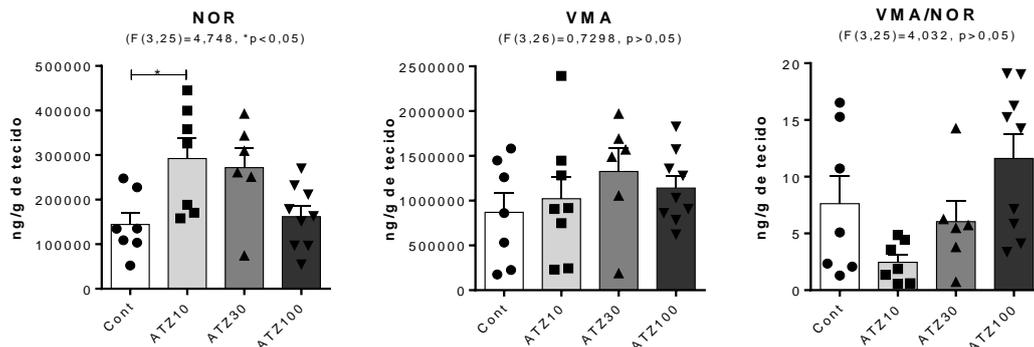


ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

A figura 27 apresenta a concentração de noradrenalina (NOR) e seu metabólito cerebral (VMA), bem como a taxa de renovação (*turnover* – VMA/NOR) no córtex pré-frontal de ratos adultos. A ANOVA dia uma via mostrou um aumento significativo na concentração de NOR no grupo ATZ10 em relação

ao grupo controle. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de VMA e no *turnover*.

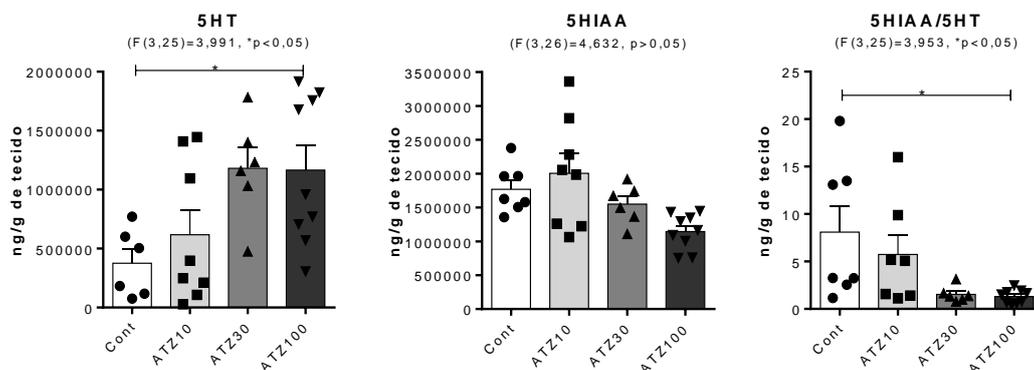
Figura 27: Avaliação do sistema noradrenérgico do córtex pré-frontal de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N= 6-9 animais por grupo.



ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

A figura 28 apresenta a concentração de serotonina (5HT) e seus metabólitos cerebrais (5HIAA), bem como a taxa de renovação (*turnover* – 5HIAA/5HT) no córtex pré-frontal de ratos adultos. A ANOVA dia uma via mostrou um aumento significativo de 5HT e do *turnover* nos animais do grupo ATZ100 em comparação ao grupo controle. A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa na concentração do metabólito serotoninérgico 5HIAA.

Figura 28: Avaliação do sistema serotoninérgico do córtex pré-frontal de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo.

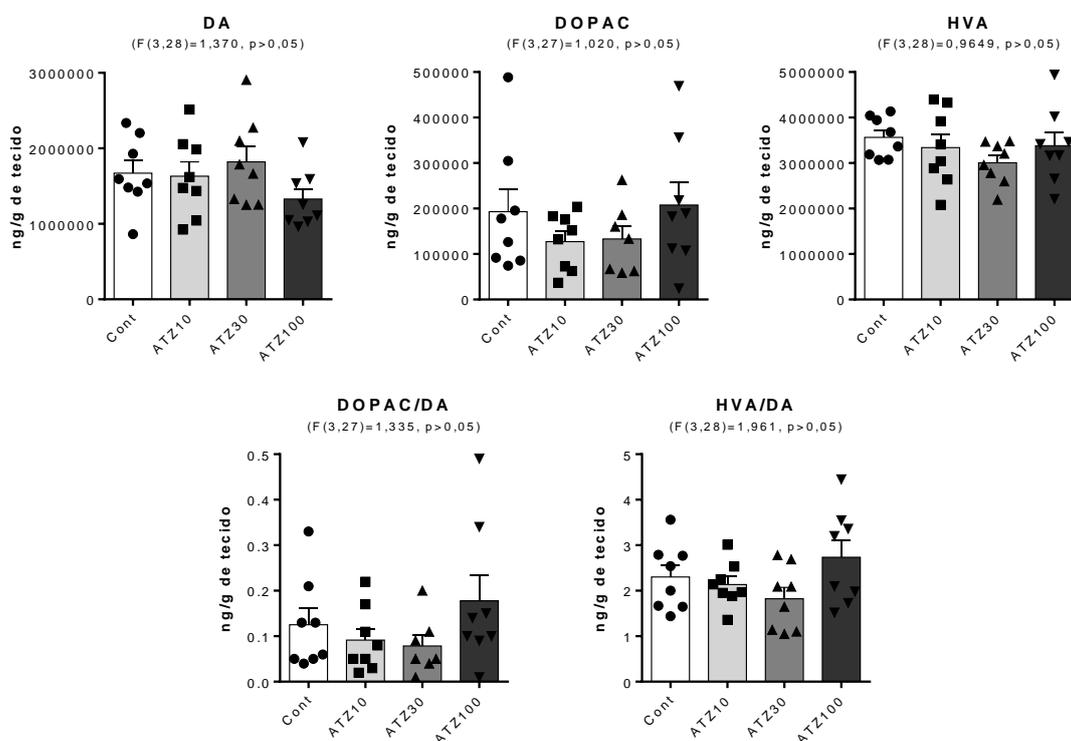


ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

5.14 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no córtex pré-frontal de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 29 apresenta a concentração de DA e seus metabólitos cerebrais, DOPAC e HVA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no córtex pré-frontal de ratas adultas. A ANOVA de uma via não nenhuma mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de DA, de DOPAC e HVA e nos *turnovers* DOPAC/DA e HVA/DA.

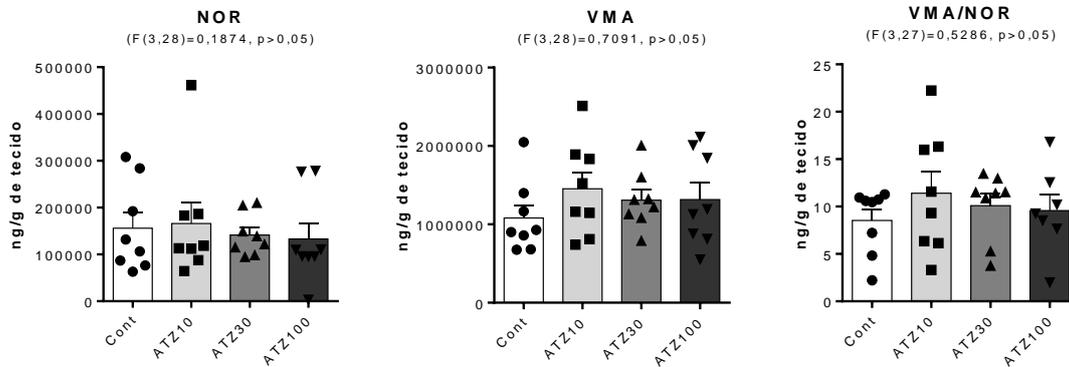
Figura 29: Avaliação do sistema dopaminérgico do córtex pré-frontal de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8 animais por grupo.



ANOVA de uma via.

A figura 30 apresenta a concentração de NOR e seu metabólito cerebral, VMA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no córtex pré-frontal de ratas adultas. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de NOR, de VMA e no *turnover* VMA/NOR.

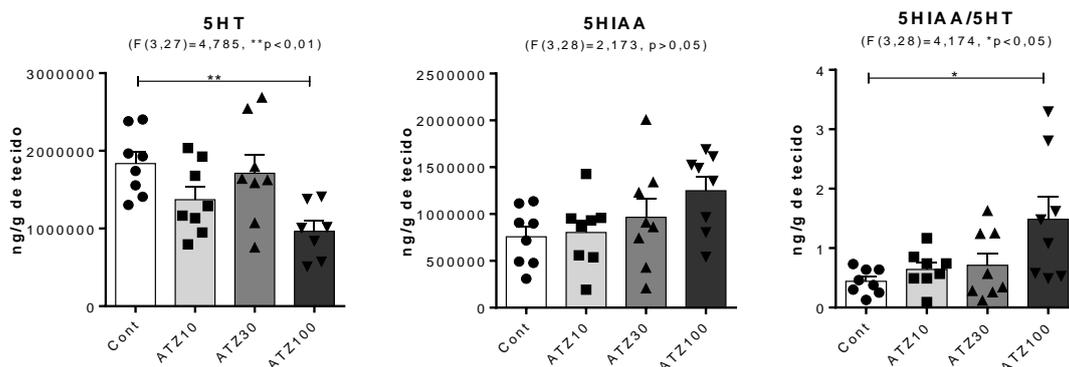
Figura 30: Avaliação do sistema noradrenérgico do córtex pré-frontal de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo.



ANOVA de uma via.

A figura 31 apresenta a concentração de 5HT e seu metabólito cerebral, 5HIAA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no córtex pré-frontal de ratas adultas. A ANOVA dia uma via mostrou diminuição de 5HT e aumento significativo do *turnover* 5HIAA/5HT nos animais do grupo ATZ100 em comparação ao grupo controle. A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa na concentração de 5HIAA.

Figura 31: Avaliação do sistema serotoninérgico do córtex pré-frontal de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo.

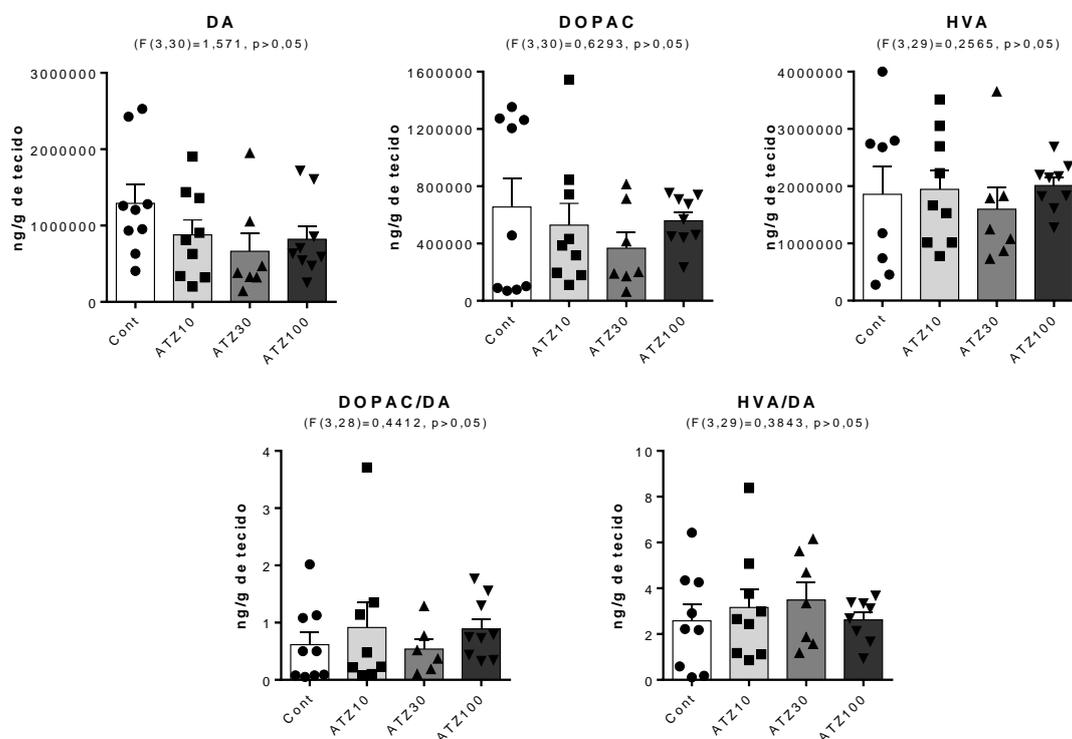


ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

5.15 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no hipocampo de ratos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 32 apresenta a concentração de DA e seus metabólitos cerebrais, DOPAC e HVA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no hipocampo de ratos adultos. A ANOVA de uma via não nenhuma mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de DA, de DOPAC e HVA e nos *turnovers* DOPAC/DA e HVA/DA.

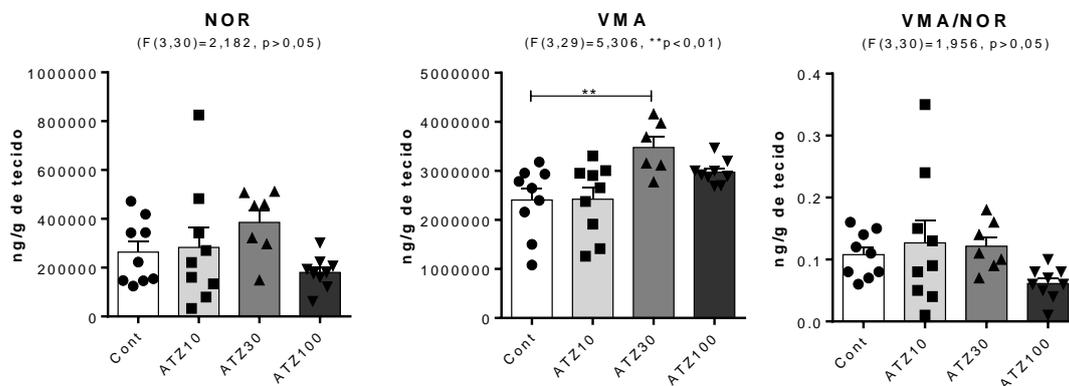
Figura 32: Avaliação do sistema dopaminérgico do hipocampo de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8-9 animais por grupo.



ANOVA de uma via.

A figura 33 apresenta a concentração de NOR e seu metabólito cerebral, VMA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no hipocampo de ratos adultos. A ANOVA de uma mostrou um aumento significativo de VMA no grupo ATZ30 em relação ao grupo controle. A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de NOR e no *turnover* VMA/NOR.

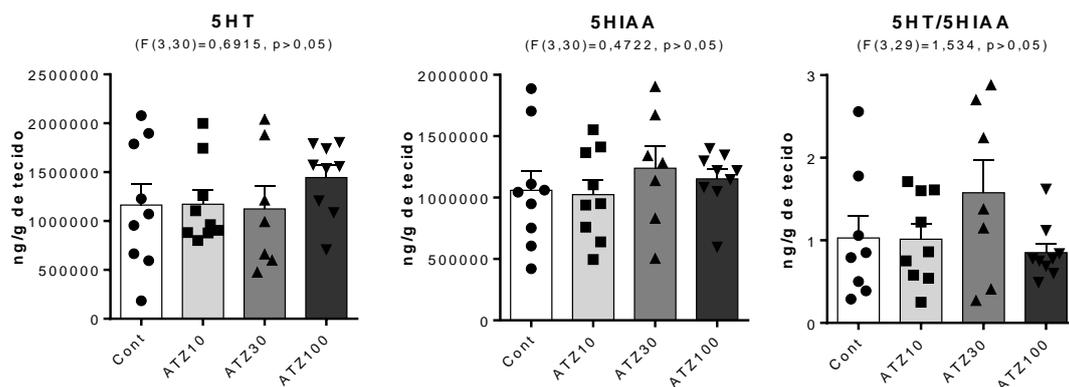
Figura 33: Avaliação do sistema noradrenérgico do hipocampo de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8-9 animais por grupo.



ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

A figura 34 apresenta a concentração de 5HT e seu metabólito cerebral, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no hipocampo de ratos adultos. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa na concentração de 5HT, do metabólito 5HIAA e no *turnover* 5HIAA/5HT.

Figura 34: Avaliação do sistema serotoninérgico do hipocampo de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-9 animais por grupo.

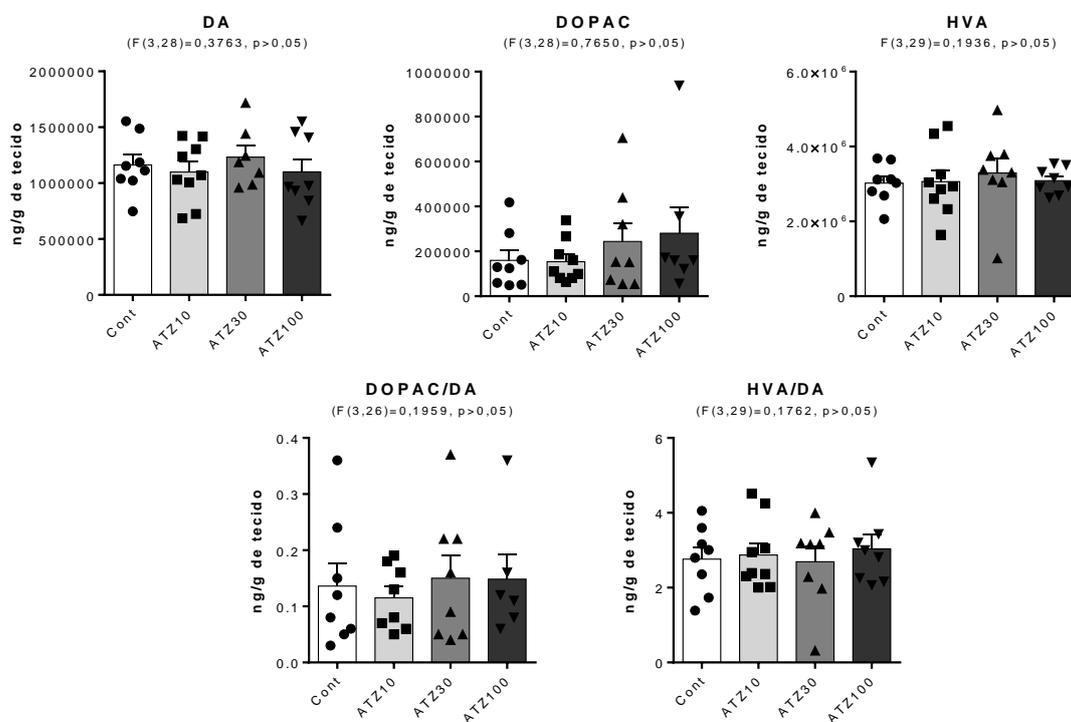


ANOVA de uma via.

5.16 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no hipocampo de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 35 apresenta a concentração de DA e seus metabólitos cerebrais, DOPAC e HVA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no hipocampo de ratas adultas. A ANOVA de uma via não nenhuma mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de DA, de DOPAC e HVA e nos *turnovers* DOPAC/DA e HVA/DA.

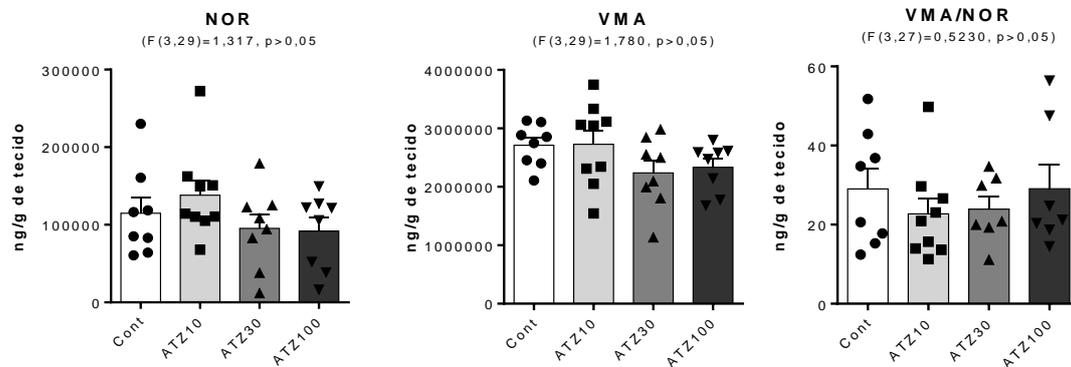
Figura 35: Avaliação do sistema dopaminérgico do hipocampo de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8-9 animais por grupo.



ANOVA de uma via.

A figura 36 apresenta a concentração de NOR e seu metabólito cerebral, VMA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no hipocampo de ratas adultas. A ANOVA de uma via não nenhuma mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de NOR, do metabólito VMA e no *turnover* VMA/NOR.

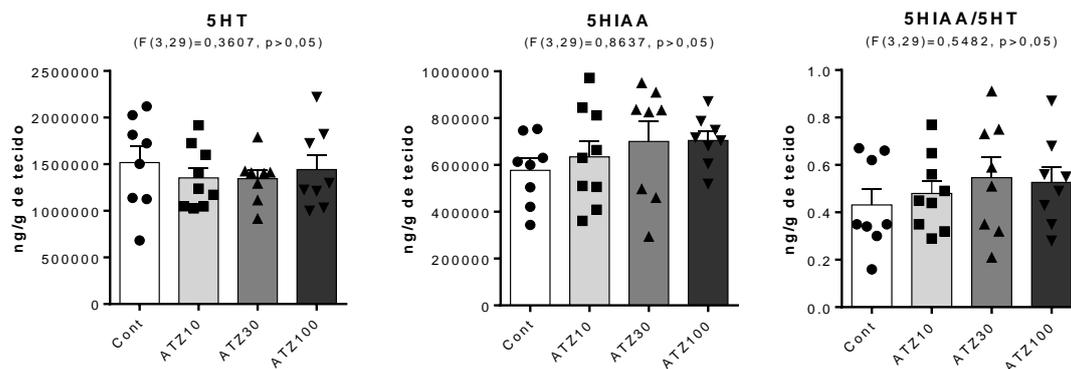
Figura 36: Avaliação do sistema noradrenérgico do hipocampo de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8-9 animais por grupo.



ANOVA de uma via.

A figura 37 apresenta a concentração de 5HT e seu metabólito cerebral, 5HIAA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no hipocampo de ratas adultas. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa na concentração de 5HT, do metabólito 5HIAA e no *turnover* 5HIAA/5HT.

Figura 37: Avaliação do sistema serotoninérgico do hipocampo de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=8-9 animais por grupo.

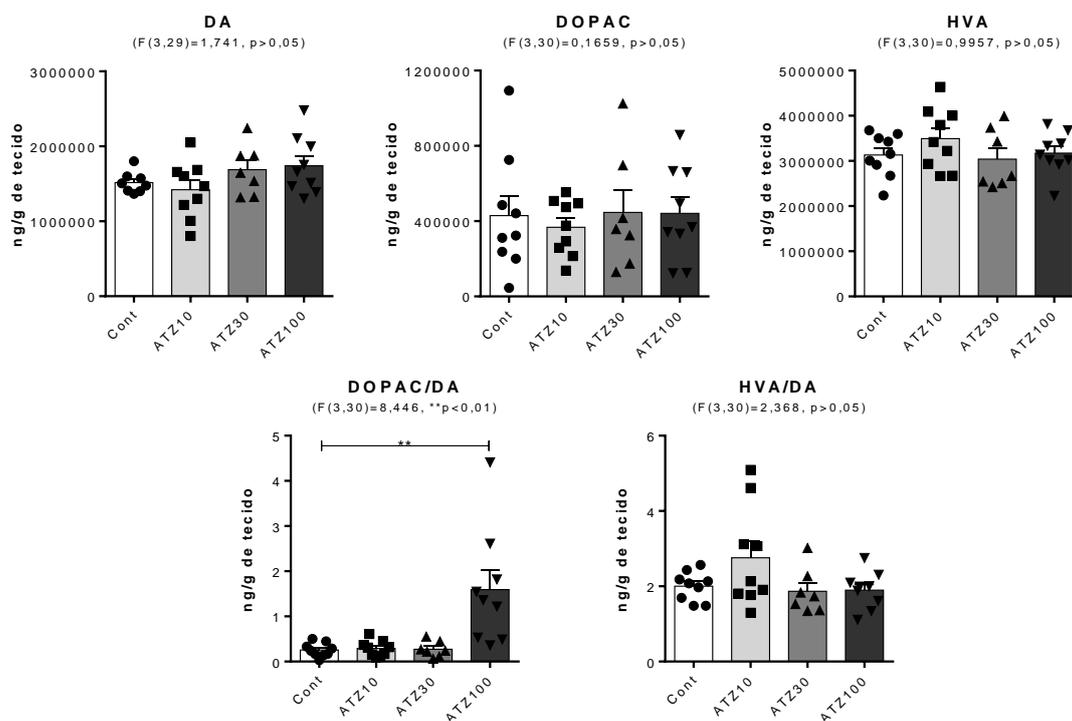


ANOVA de uma via.

5.17 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no hipotálamo de ratos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 38 apresenta a concentração de DA e seus metabólitos cerebrais, DOPAC e HVA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no hipotálamo de ratos adultos. A ANOVA de uma via mostrou um aumento significativo no *turnover* DOPC/DA dos animais do grupo ATZ100 em relação ao grupo controle. A ANOVA de uma via não nenhuma mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de DA, de DOPAC e HVA e no *turnover* HVA/DA.

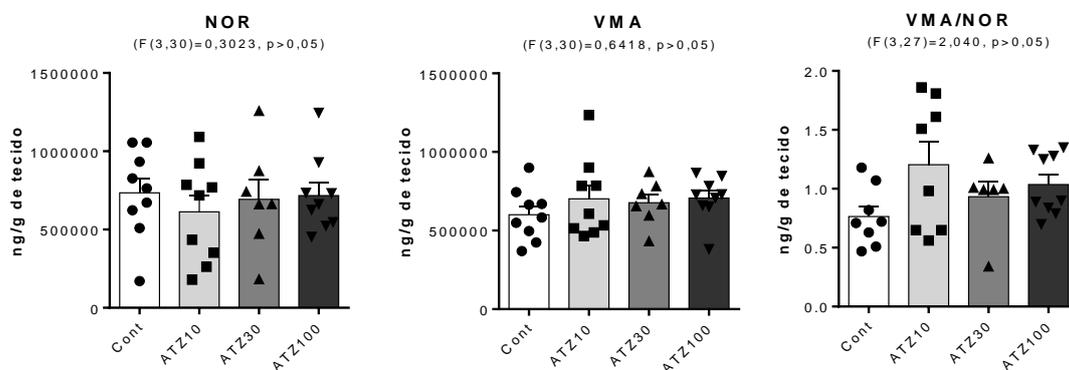
Figura 38: Avaliação do sistema dopaminérgico do hipotálamo de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-9 animais por grupo.



ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

A figura 39 apresenta a concentração de NOR e seu metabólito cerebral, VMA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no hipotálamo de ratos adultos. A ANOVA de uma via não nenhuma mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de NOR, do metabólito VMA e no *turnover* VMA/NOR.

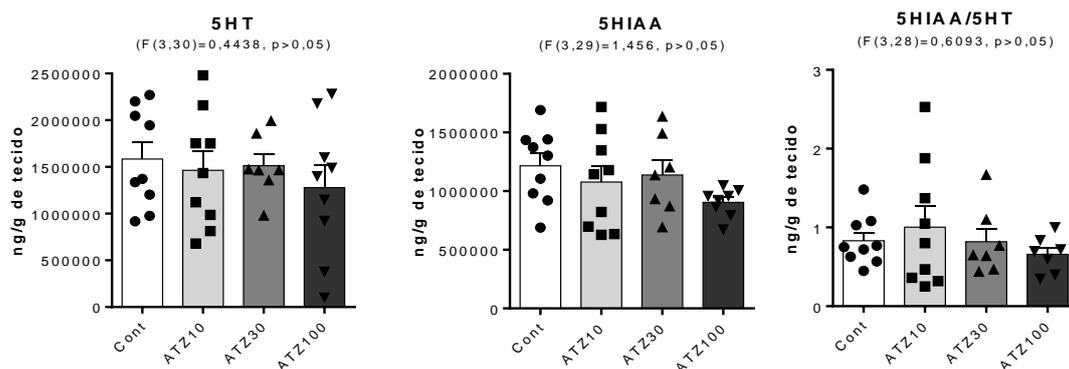
Figura 39: Avaliação do sistema noradrenérgico do hipotálamo de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo.



ANOVA de uma via.

A figura 40 apresenta a concentração de 5HT e seu metabólito cerebral, VMA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no hipotálamo de ratos adultos. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa na concentração de 5HT, do metabólito 5HIAA e no *turnover* 5HIAA/5HT.

Figura 40: Avaliação do sistema serotoninérgico do hipotálamo de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-9 animais por grupo.

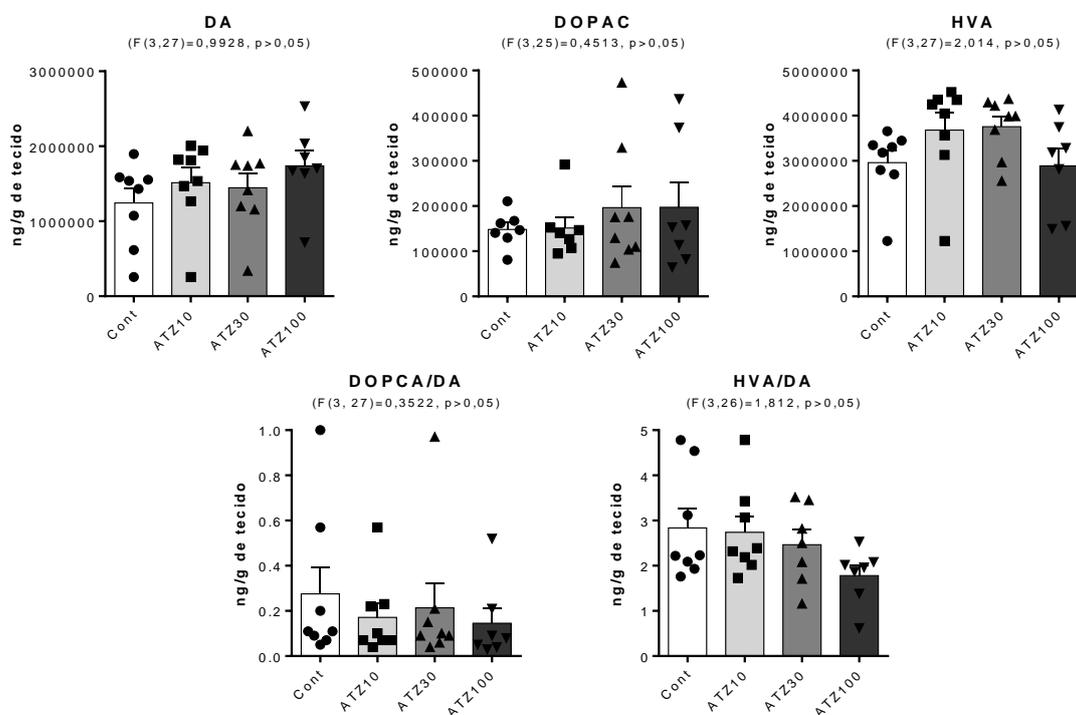


ANOVA de uma via.

5.18 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no hipotálamo de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 41 apresenta a concentração de DA e seus metabólitos cerebrais, DOPAC e HVA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no hipotálamo de ratas adultas. A ANOVA de uma via não nenhuma mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de DA, de DOPAC e HVA e nos *turnovers* DOPAC/DA e HVA/DA.

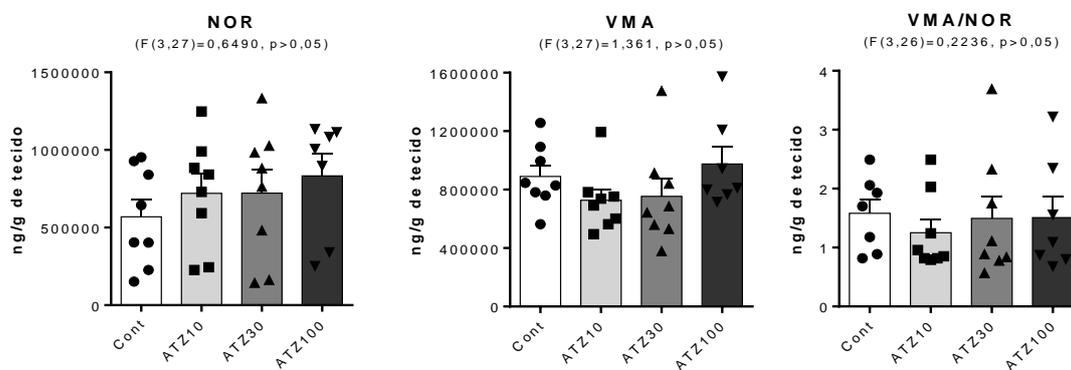
Figura 41: Avaliação do sistema dopaminérgico do hipotálamo de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo.



ANOVA de uma via.

A figura 42 apresenta a concentração de NOR e seu metabólito cerebral, VMA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no hipotálamo de ratas adultas. A ANOVA de uma via não nenhuma mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de NOR, do metabólito VMA e na *turnover* VMA/NOR.

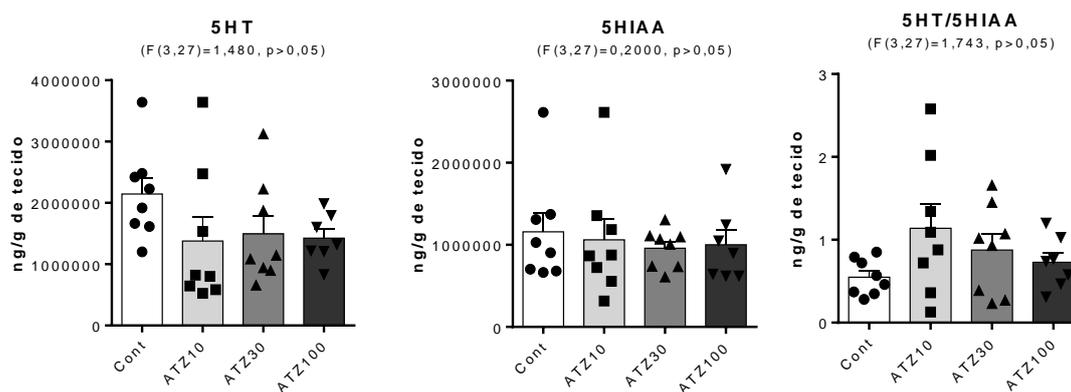
Figura 42: Avaliação do sistema noradrenérgico do hipotálamo de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo.



ANOVA de uma via.

A figura 43 apresenta a concentração de 5HT e seu metabólito cerebral, VMA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no hipotálamo de ratas adultas. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa na concentração de 5HT, do metabólito 5HIAA e no *turnover* 5HIAA/5HT.

Figura 43: Avaliação do sistema serotoninérgico do hipotálamo de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo.

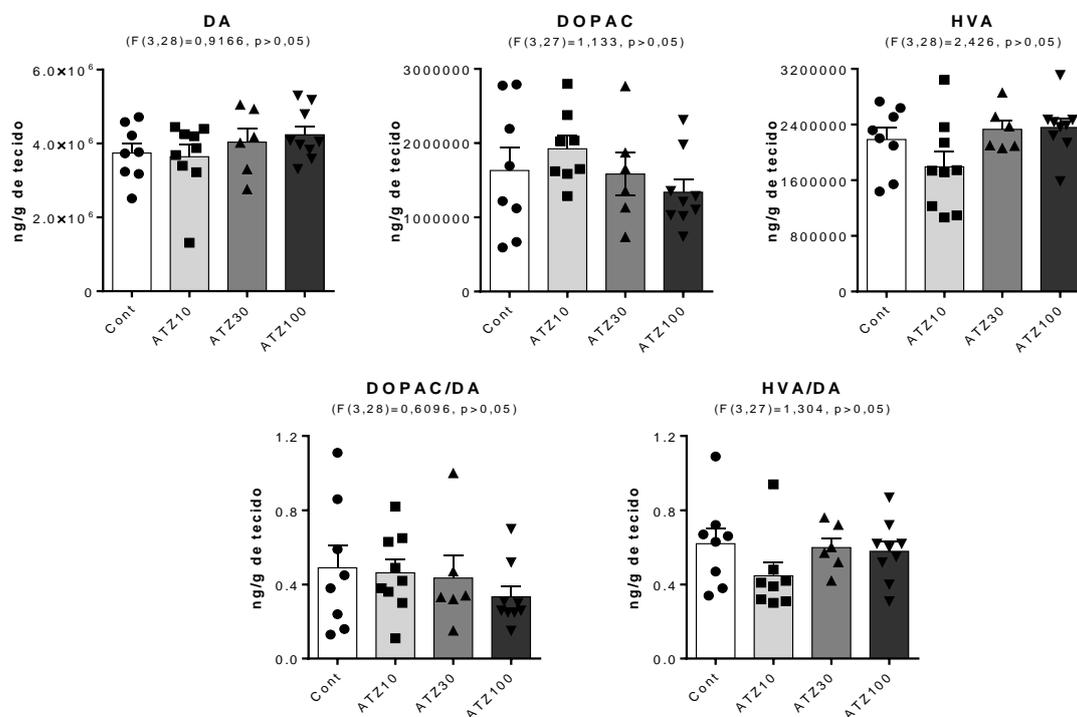


ANOVA de uma via.

5.19 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no corpo estriado de ratos adultos expostos à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 44 apresenta a concentração de DA e seus metabólitos cerebrais, DOPAC e HVA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no corpo estriado de ratos adultos. A ANOVA de uma via não nenhuma mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de DA, de DOPAC e HVA e nos *turnovers* DOPAC/DA e HVA/DA.

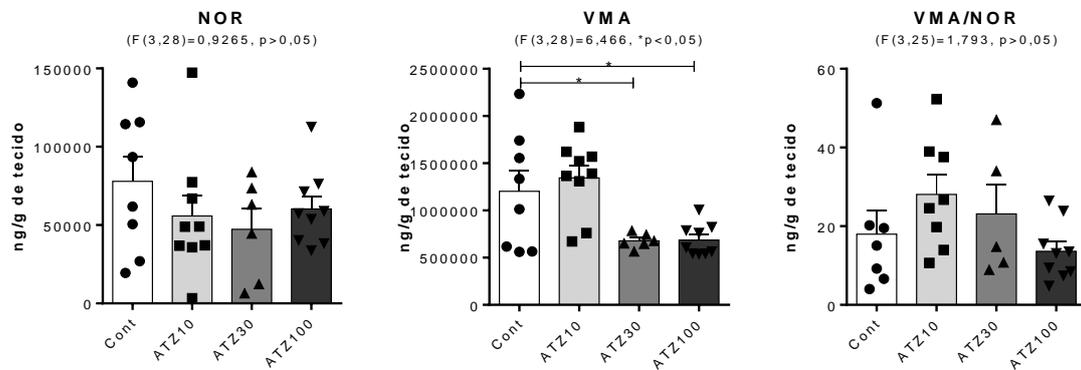
Figura 44: Avaliação do sistema dopaminérgico do corpo estriado de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-8 animais por grupo.



ANOVA de uma via.

A figura 45 apresenta a concentração de NOR e seu metabólito cerebral, VMA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no corpo estriado de ratos adultos. A ANOVA de uma via mostrou aumento significativo do metabólito VMA nos animais dos grupos ATZ30 e ATZ100 em relação ao grupo controle. A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de NOR e no *turnover* VMA/NOR.

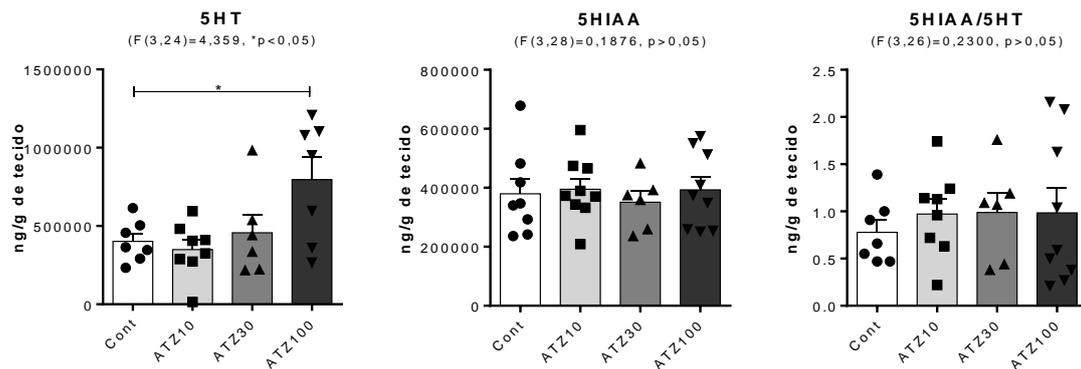
Figura 45: Avaliação do sistema noradrenérgico do corpo estriado de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo.



ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

A figura 46 apresenta a concentração de 5HT e seu metabólito cerebral, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no corpo estriado de ratos adultos. A ANOVA de uma via mostrou um aumento 5HT nos animais do grupo ATZ100 em relação ao grupo controle. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significantes na concentração do metabólito 5HIAA e no *turnover* 5HIAA/5HT.

Figura 46: Avaliação do sistema serotoninérgico do corpo estriado de ratos machos adultos expostos a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo.

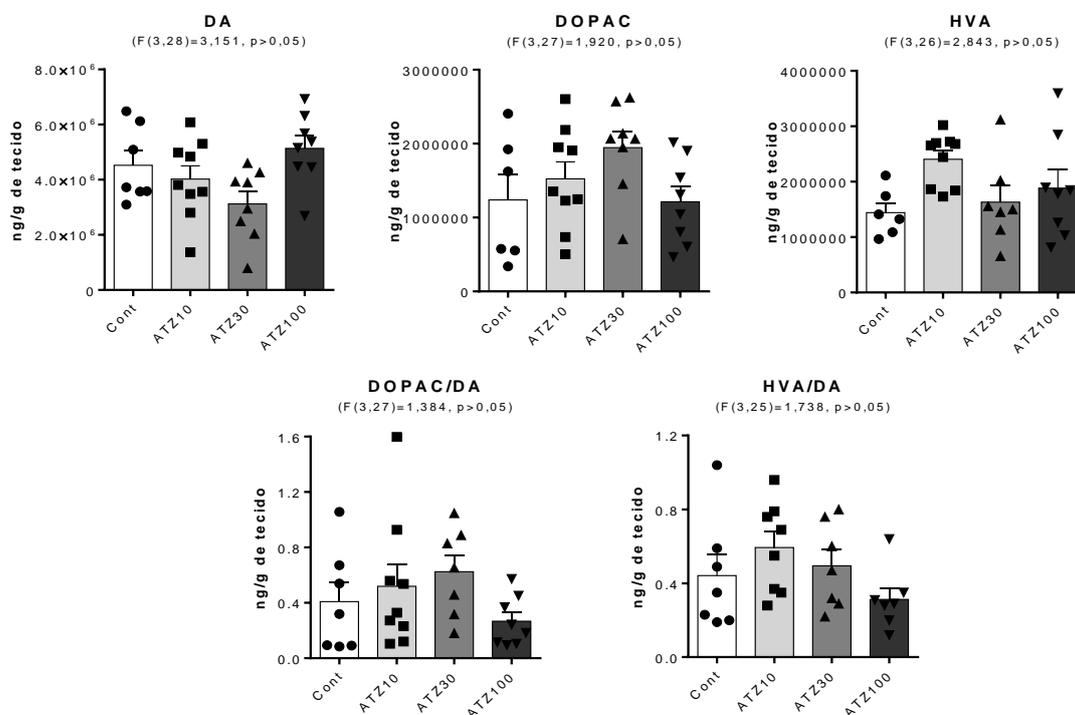


ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

5.20 Dosagem de monoaminas cerebrais e seus metabólitos no corpo estriado de ratas adultas expostas à diferentes doses de atrazina durante a puberdade

A figura 47 apresenta a concentração de DA e seus metabólitos cerebrais, DOPAC e HVA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no corpo estriado de ratas adultas. A ANOVA de uma via não nenhuma mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle na concentração de DA, de DOPAC e HVA e nos *turnovers* DOPAC/DA e HVA/DA.

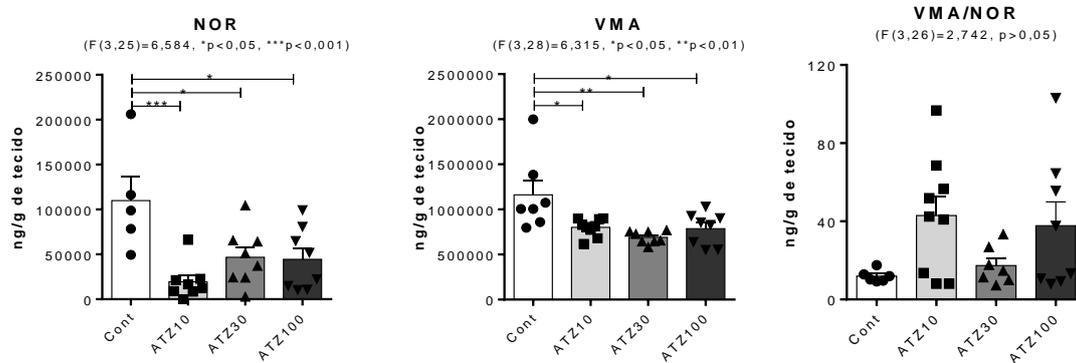
Figura 47: Avaliação do sistema dopaminérgico do corpo estriado de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=6-9 animais por grupo.



ANOVA de uma via.

A figura 48 apresenta a concentração de NOR e seu metabólito cerebral, VMA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no corpo estriado de ratas adultas. A ANOVA de uma via mostrou uma diminuição significativa na concentração de NOR e VMA nos animais dos três grupos experimentais (ATZ10, ATZ30 e ATZ100) em relação ao grupo controle. A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controle no *turnover* VMA/NOR.

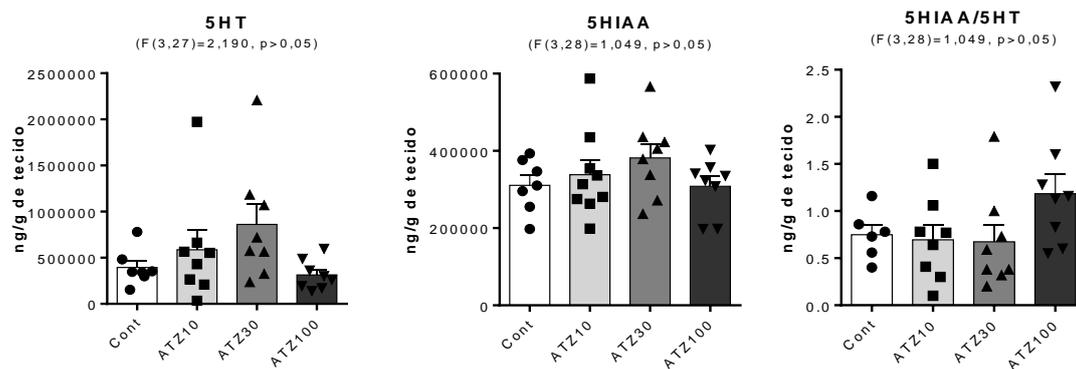
Figura 48: Avaliação do sistema noradrenérgico do corpo estriado de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo.



ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett.

A figura 49 apresenta a concentração de 5HT e seu metabólito cerebral, 5HIAA, bem como a taxa de renovação (*turnover*) no corpo estriado de ratas adultas. A ANOVA de uma via não mostrou nenhuma diferença significativa na concentração de 5HT, do metabólito 5HIAA e no *turnover* 5HIAA/5HT.

Figura 49: Avaliação do sistema serotoninérgico do corpo estriado de ratas fêmeas adultas expostas a atrazina (ATZ - 10, 30 ou 100 mg/kg) ou água filtrada (Controle - Cont), por via oral do DPN21 ao 42. São apresentadas as médias, os respectivos erros padrões e a dispersão dos indivíduos nos grupos. N=7-8 animais por grupo.



ANOVA de uma via.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou os efeitos da exposição à atrazina durante a puberdade e estudou na idade adulta o comportamento sexual de ratos machos e fêmeas, bem como analisou os efeitos nos níveis de monoaminas cerebrais e seus metabólitos. Para isso, foram empregadas três doses de atrazina, 10, 30 ou 100 mg/kg administradas diariamente por via oral, em machos e fêmeas Wistar, do DPN22 ao 41, fase correspondente à puberdade dos roedores e em que ocorrem importantes alterações hormonais e de desenvolvimento.

As doses utilizadas foram baseadas em estudos de Ashby et al. (2002) e de Goldman et al. (2013) que analisaram os efeitos da atrazina na maturação sexual e alterações hormonais causadas por ela.

Durante os 20 dias de tratamento foram acompanhados o ganho de peso e a ingestão de água e de ração pelos animais dos grupos controle e experimentais de machos e fêmeas.

Os animais expostos a dose mais alta de atrazina (100 mg/kg), tanto machos como fêmeas, tiveram diminuição significativa no ganho de peso em comparação ao grupo controle nos 5 primeiros dias tratamento, porém essa diferença foi reversível e, ao término da exposição, já não havia mais diferenças entre os grupos.

Nossos resultados corroboram os estudos de Davis e colaboradores (2011) que avaliaram os efeitos das doses de 1, 5, 20 e 100 mg/kg de atrazina na prole de ratas Sprague-Dawley expostas dos DGs 14 a 21, uma ou duas vezes ao dia. Os autores relataram pesos corporais reduzidos da prole ao nascimento de filhotes tratados com a dose de 100 mg/kg em ambos os protocolos exposição. Contudo, no DPN21, os pesos dos animais haviam sido recuperados e eram comparáveis ao grupo controle.

Em seres humanos, a diminuição do peso ao nascer devido a uma exposição gestacional à atrazina tem relação com as alterações nas importantes respostas endócrinas na mãe, placenta e feto na regulação do desenvolvimento e crescimento fetal (FOWDEN et al., 2015). Os níveis maternos de andrógenos e estrógenos aumentam durante a gravidez e desempenham papéis importantes na manutenção da gravidez e na indução do parto (HAKIM et al., 2017).

Estudo com seres humanos, Svensson e colaboradores (2019) evidenciaram que a maior proporção de testosterona/estradiol salivar materna

medida no meio da gravidez foi associada a menores pesos ao nascer. A associação entre testosterona elevada e peso ao nascer inferior é consistente com o fato de que mulheres com hiperandrogenismo clínico, como, por exemplo, síndrome do ovário policístico ou pré-eclâmpsia, têm risco aumentado de dar à luz bebês pequenos para a idade gestacional (MCCOWAN, 2009), possivelmente devido à aromatase placentária prejudicada, que converte androgênios em estrogênios e, portanto, resulta em aumento dos níveis circulantes de testosterona materna (HAKIM et al., 2017).

A diminuição do peso corporal devido a exposição de ratos à atrazina também foi relatada por Breckenridge e colaboradores (2017). O peso corporal médio de animais dos grupos administrados com doses de 50 e 100 mg/kg de atrazina diariamente, durante 4, 8 ou 14 dias foi menor em comparação com animais do grupo controle.

Ashby et al. (2002) e Eldridge et al. (1994) mostraram que exposições mais longas, de 40 a 50 dias, nas doses de 30 a 200 mg/kg de atrazina durante a vida adulta de ratos também causaram diminuição do peso corporal. Efeitos semelhantes foram relatados por Stoker et al. (2000); Trentacoste et al. (2001), Enoch et al. (2007), Moon et al. (2007), Rosenberg et al. (2008), Abarikwu et al. (2010), Hovey et al. (2011).

Sobre a ingestão de água e ração, nossa avaliação mostrou que a exposição à dose intermediária de atrazina (30 mg/kg), em machos, aumentou o consumo de ração nos últimos 5 dias de tratamento; não houve diferença no consumo de água. As fêmeas do grupo exposto à dose mais alta de atrazina (100 mg/kg) consumiram mais água (DPN38 ao 41) e mais ração (DPN37 ao 41), entretanto, o consumo de água e ração foi menor no grupo exposto a dose mais baixa (10 mg/kg) ao final da exposição.

Esses dados estão de acordo com os resultados de Hovey et al. (2011), em que doses médias e altas de atrazina, 50 e 100 mg/kg, administradas em ratas prenhes levaram a redução da ingestão de alimentos dos DGs 13 a 20.

Em contrapartida, Lin et al. (2014) expôs fêmeas de camundongos C57BL/6 a uma concentração baixa de atrazina na água potável (3 mg/l - consumo diário estimado em 1,4 mg/kg) do DG6 ao DPN23 e não houve diferença na quantidade de alimento e água consumidos.

Breckenridge et al. (2017) administraram, por gavagem, doses de 6,5, 50 e 100 mg/kg de atrazina por 1, 2, 3, 4, 8 ou 14 dias em ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas; em seus resultados foi observada uma tendência de menor consumo de alimentos nos grupos tratados com atrazina, mas nenhuma das diferenças foi estatisticamente significativa.

Essas heterogeneidades nos resultados apresentados por nossos resultados e por outros autores podem-se justificar pelo fato de o consumo de água e ração ser altamente variável entre os grupos, além de haver diferenças no período de vida, espécie animal utilizada, duração e dose em que as exposições ocorreram nos diferentes estudos.

As avaliações comportamentais, tanto de machos quanto em fêmeas, ocorreram entre os DPNs 90 e 120, período corresponde a idade adulta em ratos Wistar e de maturação sexual efetiva.

De acordo com Lamb et al. (2020), cada vez mais os estudos estão revelando que os desreguladores endócrinos, incluindo a atrazina, podem alterar o comportamento animal. A exposição precoce a esses agentes pode alterar permanentemente os fenótipos até a idade adulta.

A exposição a produtos químicos desreguladores endócrinos e neuroendócrinos são relatados como indutores de uma variedade de comportamentos anormais em peixes-zebra (CLOTFELTER et al., 2004; SÖFFKER; TYLER, 2012), particularmente, quando os indivíduos são expostos no início da vida (WIRBISKY et al., 2016a e 2016b). Foi visto que esses produtos interferem nos mecanismos moleculares que definem os comportamentos, como, por exemplo, na expressão gênica, nos níveis hormonais e nos níveis de neurotransmissores (THÖRNQVIST et al., 2015; VANDENDERG et al., 2012). Os efeitos das exposições a esses compostos estão, principalmente, implicados na interrupção de comportamentos reprodutivos típicos, como coorte e comportamento sexual dos pais (SHENOY, 2014), mas também com comportamentos não reprodutivos, como ansiedade, agressão e comportamento de risco (LAGESSON et al., 2019; PORSERYD et al., 2017).

Em estudo de Lin et al. (2014), a exposição a atrazina causou tendência à hiperatividade e aumento da atividade locomotora nos filhotes jovens machos e fêmeas de roedores, mas esse efeito foi transitório e não persistiu na idade adulta. Esse achado corrobora os estudos anteriores de Bardullas et al. (2011)

e Belloni et al. (2011) que mostraram que a exposição crônica de 1 ano à dieta enriquecida com a dose de 10 mg/kg aumentou a atividade locomotora em ratos machos e a exposição oral a atrazina em doses $\geq 0,001$ mg/kg do DG14 ao DPN16 aumentou a atividade motora em campo aberto em filhotes de camundongos jovens machos e fêmeas. Por outro lado, exposições de curto prazo a doses mais altas de atrazina, de 100 a 250 mg/kg, resultam em hipoatividade com duração de até 5 dias em roedores machos adultos (LIN et al., 2013b; RODRIGUEZ et al., 2013). Esses dados, juntos, sugerem que a exposição a atrazina interrompe consistentemente a função motora em ambos os sexos e em vários paradigmas de exposição e a direção desse efeito pode depender da dose e do tempo.

Lin et al. (2014) ainda afirma que a exposição a uma dose relativamente baixa de atrazina em água potável, durante a gestação e lactação, causa efeitos prejudiciais ao sistema nervoso e múltiplas anormalidades comportamentais na fêmea exposta e sua prole. Essas alterações comportamentais, que incluem déficits de memória, comprometimento motor e cognitivo, estão associadas à perturbação da homeostase monoaminérgica cerebral.

Estudo de Genovese et al. (2021) também mostra alterações comportamentais após o tratamento com atrazina. A exposição por 28 dias a um aerossol contendo 25 mg/kg de atrazina por camundongos jovens e idosos aumentou a ansiedade e a depressão, bem como déficit no aprendizado espacial e na função de memória, alteração na atividade motora, força de preensão e sociabilidade.

No presente trabalho, foi avaliado o comportamento sexual de ratos machos e fêmeas expostos às diferentes doses de atrazina, sendo que em machos foram realizados os testes da marcha, de motivação sexual, de ereção peniana e avaliação de comportamento sexual; já com as fêmeas, foram realizados o comportamento sexual, tanto em estro fisiológico como farmacológico, além do acompanhamento do ciclo estral.

A avaliação da locomoção e equilíbrio animal foi uma ferramenta comportamental usada para descrever o fenótipo de uma determinada doença, lesão ou exposição a uma determinada droga (WERTMAN et al., 2019).

A locomoção normal, em mamíferos, envolve uma sequência organizada de movimentos coordenados nos quatro membros, postura e equilíbrio, precisão

do movimento balístico, posicionamento e suporte, acompanhada por uma coordenação neurológica e musculoesquelética complexa; dessa forma, déficits em um único aspecto das vias motoras podem produzir anormalidades em uma variedade de comportamentos, inclusive no desempenho sexual, pelo comprometimento da execução da monta (DUNNETT; BROOKS, 2018).

Dentre os aspectos locomotores e de equilíbrio, tem-se a marcha fisiológica, que depende da integridade neurológica (sistemas proprioceptivos centrais e periféricos, nervos e raízes periféricos, sistema extrapiramidal, aferências e eferências cerebelares, sistema piramidal com neurônios motores superior e inferior) e ortopédica (ligamentos, tendões, articulações e músculo estriado esquelético) para que a sua execução seja adequada (PINTO et al., 2015).

A análise da marcha fornece dados comportamentais quantificáveis sobre como uma determinada doença, lesão ou exposição a drogas podem afetar o movimento de um animal (WERTMAN et al., 2019). Essa análise é indicada para casos, entre outros, de doenças neurodegenerativas com componente motor significativo (PINTO et al., 2015).

Em estudo recente publicado pelo nosso grupo de pesquisa (PANTALEON et al., 2021), foi realizada uma revisão integrativa da literatura com o objetivo de verificar o panorama científico sobre questões relacionadas à exposição à atrazina e seus impactos, principalmente no que se refere à sua toxicidade no sistema nervoso central. Essa revisão reuniu estudos publicados na literatura *in vivo*, *in vitro* e estudos epidemiológicos, que mostraram que a atrazina tem efeitos deletérios sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos, bem como sua relação com doenças degenerativas, em particular, a doença de Parkinson, isso porque a atrazina tem como alvo a região nigroestriatal.

Mudanças no padrão de marcha estão relacionadas a alterações morfológicas e funcionais no cerebelo, incluindo aquelas induzidas por danos ao o sistema dopaminérgico nigroestriatal (YAMAMOTO et al., 2019); os déficits motores têm sido reconhecidos como a principal consequência da disfunção estriatal (DUNNETT; BROOKS, 2018). Os núcleos da base (corpo estriado - núcleo caudado e putâmen -, globo pálido, núcleo subtalâmico e substância negra), de forma mais ampla, também estão envolvidos no controle da marcha,

principalmente por meio de sua interação com áreas motoras corticais, ou seja, área motora suplementar (FERNAGUT et al., 2012).

No presente trabalho, entretanto, após a realização do teste da marcha, não foram evidenciadas nenhuma alteração na execução da marcha pelos animais dos grupos experimentais, evidenciando que, possivelmente, a exposição à atrazina na puberdade não promoveu déficits motores persistentes até a idade adulta.

Contudo, estudo focado no comprometimento motor devido exposição a atrazina realizado pelo nosso grupo de pesquisa (DE-PAULA, 2021) mostrou que o mesmo tratamento, do DPN 22 ao 41 nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg por via oral, alterou o desempenho dos animais no teste da marcha logo após o tratamento, no DPN42, evidenciado pela diminuição significativa do ângulo do passo, possivelmente por um comprometimento no equilíbrio, reforçando os resultados de Pantaleon et al. (2021), Yamamoto et al. (2019) e Pinto et al. (2015).

Esses resultados apoiam estudo de Lin e colaboradores (2014), em que as alterações observadas na atividade locomotora foram transitórias e não persistiram até a idade adulta. Exposições de curto prazo a doses mais altas de atrazina, de 100 a 250 mg/kg, resultaram em hipoatividade (LIN et al., 2013b), porém com duração de até 5 dias em roedores machos adultos (RODRIGUEZ et al., 2013).

Essas avaliações sugerem que a exposição a atrazina interrompe consistentemente a função motora, contudo a direção desse efeito pode depender da dose e do tempo de exposição.

Em relação as questões motoras e traçando um paralelo com a Doença de Parkinson, Souza e colaboradores (2007) relatam que quanto maior o estágio da doença, pior a qualidade de vida nos aspectos físicos, emocionais e cognitivos. No entanto, os sinais e sintomas que aparecem nessa doença são tardias, uma vez que ela é neurodegenerativa e incapacitante (SILVA et al., 2010). Nesse sentido, a interrupção reversível da função motora da atrazina pode estar ligada a esse aspecto progressivo da doença.

No que se refere ao comportamento sexual masculino e feminino, ele é altamente dependente de hormônios sexuais – testosterona em machos e estrógeno e progesterona em fêmeas –, que são produzidos e liberados por

glândulas sexuais, ou seja, testículos e ovários, que estão sob o controle do eixo HHG (JENNINGS; DE-LECEA, 2020).

Bernardi e colaboradores (2011) relataram que o comportamento sexual masculino de roedores possui dois aspectos, a fase apetitiva (de motivação ou libido) e a fase consumatória (de desempenho ou potência). A fase apetitiva caracteriza-se pela facilidade de ativação do comportamento sexual ou de geração da libido; já a fase consumatória é definida pela execução do ato copulatório.

Vários neurotransmissores e neuropeptídeos, em níveis central e periférico, estão envolvidos nas fases apetitiva e consumatória do comportamento sexual. Entre os neuropeptídeos, os mais estudados são a oxitocina, adrenocorticotropina (ACTH), hormônio estimulador dos melanócitos α (α -MSH) e peptídeos opióides, entre outros (PFAUS; GORZALKA, 1987; BERTOLINI; GESSA, 1981). Esses neuropeptídeos efetuam seu papel no comportamento sexual, agindo no hipotálamo e seus núcleos e/ou a área pré-óptica medial (ARGIOLAS; MELIS, 2013).

O teste de motivação sexual foi utilizado para avaliação da libido, ou seja, para análise somente dos aspectos da fase apetitiva. Esse teste consiste em avaliar a preferência do macho-teste a dois incentivos distintos, uma fêmea receptiva (incentivo sexual) e um macho sexualmente experiente (incentivo social).

Estudo de Agmo (2014) mostrou que ratos sexualmente inexperientes, como os aqui utilizados, permanecem mais tempo junto ao incentivo sexual, entretanto, essa diferença não foi observada e nenhuma das doses de atrazina influenciou a libido dos animais.

Os dados aqui obtidos vão ao encontro dos achados de Moreira (2014) que, apesar de ter usado outro xenobiótico (ivermectina), em seu estudo também não observou alterações na motivação sexual; dessa forma, para a autora, o prejuízo no comportamento sexual não pode ser atribuído a aspectos motivacionais.

Para avaliação da fase consumatória do comportamento sexual masculino, ou seja, de desempenho, foi analisada a ereção peniana induzida por apomorfina.

A ereção peniana resulta de uma interação neural complexa entre os sistemas nervosos central e periférico, que causa alterações musculares e vasculares nos tecidos eréteis do aparelho genital masculino (corpos cavernosos, corpo esponjoso e outros músculos perineais). Esse comportamento é favorecido por influências humorais e endócrinas, especialmente pela testosterona e seus metabólitos (ARGIOLAS, 2005). Outros compostos como neurotransmissores, neuropeptídeos e seus agonistas e, às vezes também antagonistas, atuam na indução da ereção peniana por mecanismo central, incluindo dopamina, ácido glutâmico, peptídeos relacionados a hexarelina secretagogo de hormônio do crescimento (GH) e peptídeos derivados de VGF C-terminal, bem como óxido nítrico e GMPc (MELIS; ARGIOLAS, 2021; LEONI et al., 2014).

A apomorfina, por sua vez, é um agonista não seletivo de receptores dopaminérgicos, com mais afinidade aos receptores da família D2-*like* e, quando administrada em pequenas doses, induz comportamentos repetidos caracterizados por bocejos, ereção peniana e *grooming* genital (RODRIGUES-ALVES et al., 2008).

Os resultados obtidos no presente estudo não mostraram diferenças entre os grupos experimentais e controle na latência e número de bocejos, resultado que demonstra a atividade da apomorfina nos receptores dopaminérgicos D2-*like*; também não houve diferença no número total de ejaculações. Entretanto, os machos tratados com a dose mais alta de atrazina (100 mg/kg) demoraram mais tempo para ter a primeira ereção peniana.

A avaliação do comportamento sexual masculino também foi realizada para análise da fase consumatória e, para isso, foi utilizada uma rata receptiva por indução farmacológica do estro. Os parâmetros copulatórios de ratos machos avaliados no comportamento sexual foram: latências para primeira monta, intromissão, ejaculação e intromissão pós-ejaculatória; número de montas incompletas, de intromissões e de ejaculações; e total de montas. Neste sentido, de acordo com Melis e Argiolas (2021), apenas a latência produz detalhes sobre modificações na motivação e/ou excitação sexual; diminuição ou aumento neste parâmetro indica aumento ou diminuição na motivação sexual, respectivamente. Os outros parâmetros fornecem informações sobre a fase

consumatória do comportamento sexual ou sobre a velocidade em que ocorre a cópula (MELIS; ARGIOLAS, 2021).

Os animais dos grupos expostos as doses baixa e intermediária de atrazina (10 e 30 mg/kg) apresentaram menos intromissões após a ejaculação.

As diferenças obtidas no teste da ereção peniana e no comportamento sexual masculinos demonstram, juntas, um déficit copulatório nesses animais, sucedido por um maior tempo de recuperação, o que pode ser justificado, em nível hormonal pelo aumento da atividade da aromatase proporcionado pela exposição à atrazina, que é classificada como um desregulador endócrino com potencial estrogênico, que eleva a concentração sérica de estrógeno e culmina em feminilização e diminuição da eficácia sexual masculina (FAN et al., 2007).

Já com as fêmeas, foi avaliado o comportamento sexual, tanto em estro fisiológico como farmacológico, além do acompanhamento do ciclo estral.

Em fêmeas de roedores que exibem comportamento sexual adequado, é muito evidente a postura ou reflexo de lordose durante a cópula. A lordose é definida como a flexão côncava da coluna vertebral em resposta a monta do macho; esse reflexo é imprescindível para monta e intromissão peniana eficazes (NELSON, 1995).

A postura de lordose é regulada por hormônios sexuais – estrógeno e progesterona – e tem início como forma responsiva a informação tátil fornecida pela monta do macho. Entretanto, esse é um comportamento complexo, em que circuitos neurais também são ativados para sua perfeita execução; as informações somatossensoriais da cópula são recebidas pela medula espinhal, que, por sua vez, é responsável por modular a saída de informações por meio dos neurônios motores que sinalizam a flexão da coluna vertebral. Nesse mecanismo também se faz importante o papel do hipotálamo, responsável pela síntese e liberação hormonal necessário para o comportamento sexual (NELSON, 1995).

Os parâmetros analisados na exibição do comportamento sexual feminino foram o coeficiente e a intensidade de lordose. Além disso, esse comportamento foi avaliado em ciclo estral farmacológico e fisiológico, isso porque, sobre a indução do estro, os efeitos da atrazina sobre esse comportamento seriam minimizados, considerando que o animal estava exposto à elevados níveis séricos de estradiol, o que não acontece em estro fisiológico.

Os resultados mostraram que o perfil do comportamento sexual feminino em ciclo estral fisiológico foi semelhante ao mesmo comportamento em ciclo estral farmacológico. Assim, o modelo de exposição a atrazina utilizado não alterou o desempenho sexual das fêmeas em nenhuma das doses utilizadas, demonstrando que este herbicida não exerceu influência sobre as concentrações e ação dos hormônios esteroides gonadais e/ou na modulação neural.

O ciclo estral das ratas acontece a cada 4 ou 5 dias, sempre seguindo uma ordem fases, sendo elas: proestro, estro, metaestro e diestro. A identificação de cada uma dessas fases é possível sobre microscopia de luz, uma vez que elas se diferenciam por tipos e concentrações celulares.

No presente trabalho, a ciclicidade estral das fêmeas controles e experimentais foi acompanhado por 15 dias consecutivos entre o DPN90 e 120; as coletas aconteceram sempre ao mesmo o horário do dia. Entretanto, não foram observadas diferenças nos dias passados em cada uma das fases do ciclo, nem na quantidade de dias estrogênicos (proestro e estro) e progesterônicos (metaestro e diestro).

As alterações na ciclicidade estral devido à exposição a atrazina é controversa pela comunidade científica. Os dados aqui obtidos são contrários a alguns estudos da literatura. Exposições mais longas a atrazina, de 40 a 50 dias, com doses acima de 40 mg/kg em ratas Sprague-Dawley resultaram em padrões alterados de ciclicidade do estro, além do aumento de ciclos irregulares e aumento dos dias em estro; ratas dessa linhagem iniciam estro permanente em uma idade, particularmente, precoce em comparação com outras linhagens de ratos e essa alteração ocorre ainda mais cedo com o tratamento com atrazina (ELDRIDGE et al., 1994 e 1999; WETZEL et al., 1994). Ciclos irregulares também foram vistos em ratas Long-Evans expostas a 75 mg/kg de atrazina por 21 dias (COOPER et al., 1996).

Contudo, os resultados obtidos confirmam estudos de Laws et al. (2000) que utilizou o mesmo período de tratamento que o presente trabalho. Em seu estudo, apesar dos autores terem observado ciclicidade estral alterada durante o primeiro intervalo de 15 dias após a abertura vaginal, o período de observação durou até o DPN149 e do DPN57 ao 149 e nenhuma alteração na ciclicidade do estro foi descrita (LAWS et al., 2000). Este período de observação prolongado é benéfico, visto que apenas a avaliação dentro do período de tratamento, que foi

do DPN22 ao 41, englobaria apenas a irregularidade que ocorre naturalmente nos ciclos estrais femininos que ocorrem no início da puberdade (LAWS et al., 2000).

Juliani et al. (2008) expôs ratas Wistar às doses de 0,75 ou 400 mg/kg de atrazina por 14 dias, sendo relatada ovotoxicidade causada pela maior dose. Esses dados demonstram alterações na ciclicidade do estro, consequentes da exposição a alta dose de atrazina, que pode ainda ser acompanhada por infertilidade e efeitos deletérios na foliculogênese.

Davis et al. (2011) administraram 1, 5, 20 ou 100 mg/kg de atrazina em ratas Sprague-Dawley dos DGs 14 ao 21 uma ou duas vezes ao dia e não foram observadas diferenças na ciclicidade do estro no DPN272. Vale ressaltar que neste estudo, no DPN216, 100% dos animais no grupo tratado com a dose de 100 mg/kg de ambos os estudos continuaram a ciclar normalmente, enquanto os animais de todos os outros grupos de doses entraram no estro persistente. Nos estudos de Davis et al. (2011), as irregularidades na ciclicidade eram frequentemente transitórias e sucedidas por períodos de ciclos normais de 4 e 5 dias. Isso indica que os episódios irregulares não são biologicamente significativos.

Esses estudos, juntos, fornecem evidências de que a atrazina age alterando a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-ovário. Cooper et al. (2000) mostrou que a atrazina inibe especificamente os aumentos induzidos por estrogênio do hormônio luteinizante (LH) e prolactina (PRL) em ratos Sprague-Dawley e Long-Evans ovariectomizadas, demonstrando suporte adicional a esse modo de ação na ciclicidade do estro.

Após os testes comportamentais e antes da eutanásia no DPN120, os animais foram pesados para posterior cálculo do peso relativo dos órgãos.

O peso corporal no DPN120 de machos e fêmeas foi maior nos animais tratados com a menor dose de atrazina (10 mg/kg) em relação ao grupo controle. Esses resultados vão ao encontro de estudo de Lim et al. (2009) que identificou efeitos sobre o ganho de peso da atrazina em roedores, ou seja, para esses autores a atrazina foi capaz de alterar a atividade metabólica, interferindo na função mitocondrial.

A evidência do aumento do peso corporal pela exposição a atrazina corrobora propostas de Foulds et al. (2017). Para esses autores, a exposição

precoce a desreguladores endócrinos é considerada um fator causal que pode explicar o aumento da incidência de esteatose hepática em seres humanos. Essa associação foi confirmada por Lim e colaboradores (2009), utilizando modelos de roedores, nos quais a exposição crônica a uma dose de 30 µg/kg induziu ganho de peso corporal, resistência à insulina e esteatose hepática com dieta rica em gordura.

Nesse sentido, Roa e Tena-Sempere (2014) e Katib (2015) propuseram que esses efeitos negativos sobre o metabolismo podem ter impacto sobre a função reprodutiva, já que ambos os sistemas são controlados por vias regulatórias sobrepostas.

Em estudo de Harper e colaboradores (2020), a exposição à dose de 5 mg/kg de atrazina do DG9,5 até 12 semanas de idade causou um aumento na expressão de vários genes envolvidos na captação de lipídios no fígado.

Além disso, esses resultados reafirmam os efeitos estrogênicos da atrazina no sistema endócrino (LEET et al., 2020). O herbicida em questão atua diminuindo a expressão da 5α-redutase – enzima responsável pela conversão da testosterona em dihidrotestosterona (DHT) – e seus efeitos estrogênicos acontecem pelo aumento da expressão de Cyp19a1, que codifica a enzima aromatase, a qual converte a testosterona em estradiol (HAYES et al., 2011). Esses efeitos são evidentes *in vivo* em anfíbios e ratos, bem como *in vitro* em tecidos humanos sensíveis ao estrogênio (JIN et al., 2013; HOLLOWAY et al., 2008).

Os efeitos da atrazina no Cyp19a1 são avaliados utilizando células da granulosa e células do carcinoma adrenocortical (H295R) e foi evidenciado que a exposição à atrazina aumenta a expressão e a atividade da aromatase (HOLLOWAY et al., 2008; SANDERSON et al., 2000). Este aumento na atividade é o responsável pelo aumento do estradiol (WIRBISKY; FREEMAN, 2015).

As alterações metabólicas, evidentes pela exposição a atrazina, também podem ter efeito indireto na reprodução, já que ambos os sistemas são controlados por vias regulatórias sobrepostas (ROA; TENA-SEMPERE, 2014). As interrupções na expressão de genes metabólicos podem alterar os hormônios metabólicos e influenciar o eixo HHG, que alteram a produção de hormônios esteroides (ROA; TENA-SEMPERE, 2014). Além disso, as mudanças na

regulação dos lipídios podem afetar a disponibilidade do colesterol, que é o precursor dos hormônios esteroides sexuais (GELY-PERNOT et al., 2015).

A exposição à atrazina também afetou a expressão de genes esteroideogênicos no desenvolvimento do aparelho reprodutor por meio da interrupção da ativação de andrógenos genômicos durante desenvolvimento de órgãos reprodutivos masculinos (TAN et al., 2021)

Vale ressaltar que a atrazina não ativa diretamente o receptor de estrogênio, mas induz a expressão do citocromo P450, família 19, subfamília A, polipeptídeo 1a (Cyp19a1a, anteriormente aromatase) por meio da inibição da fosfodiesterase; ativação do receptor nuclear da subfamília cinco, grupo A, membro 1a (Nr5a1a); ou alterações na expressão de miRNA (SANDERSON et al., 2001; ROBERGE et al., 2004; SUZAWA; INGRAHAM, 2008; WANG et al., 2019).

Em machos, foi realizado o cálculo do peso relativo de órgãos sexuais – testículos, epidídimos, próstata e vesícula seminal –, dos rins, do fígado e das adrenais. Os resultados mostraram redução significativa no peso dos rins, direito e esquerdo, do grupo exposto a menor dose de atrazina (10 mg/kg) em comparação ao grupo controle. Não houve diferença significativa no peso relativo em nenhuma das outras estruturas coletadas.

Esse achado corrobora os estudos de Stanko et al. (2010), Rosenberg et al. (2008) e Harper et al. (2020) que observaram que atrazina não exerce influência sobre o peso de órgãos sexuais. Stanko et al. (2010) avaliaram a prole masculina exposta à atrazina durante a gestação; para tal, ratas Long-Evans prenhes foram tratadas por gavagem com 100 mg/kg de atrazina dos DGs 15 ao 19 e as observações da prole foram realizadas nos DPNs 120 e 180. Os resultados demonstraram que a exposição gestacional à atrazina não causou diferenças significantes nos pesos dos testículos, pesos das vesículas seminais ou alterações na morfologia da próstata.

Um estudo realizado por Rosenberg et al. (2008), expôs ratas Sprague-Dawley prenhes a 100 mg/kg de atrazina do DG14 até o parto. Uma análise posterior em suas proles, no DPN60, não encontrou alterações nos testículos, vesícula seminal ou peso da próstata.

Harper e colaboradores (2020) relataram que a exposição crônica à atrazina na dose de 5 mg/kg fornecida na água do DG 9.5 até 12 ou 26 semanas

de vida da prole não causou diferenças observadas nos pesos absoluto ou relativo das vesículas seminais, testículos nos animais tratados com atrazina em qualquer idade investigada. No entanto, foi observado que essa exposição à atrazina reduziu os pesos absoluto e relativo do fígado em animais na 12ª semana de vida, todavia, esta diferença foi reversível e não foi mais observada na 26ª semana.

Contudo, esses resultados estão contrapostos aos observados por Trentacoste et al. (2001), Jin et al. (2013) e Victor-Costa et al. (2010).

No estudo de Trentacoste et al. (2001), ratos Sprague-Dawley machos foram expostos a 100 ou 200 mg/kg de atrazina e, no DPN22, foram encontradas diminuições vesícula seminal. Estudo de Jin et al. (2013) foi conduzido seguindo um regime de dosagem semelhante, no qual os resultados revelaram diminuição significativa no peso corporal na dose de 200 mg/kg de atrazina, juntamente com aumento no peso relativo dos testículos nas doses 100 e 200 mg/kg; os autores observaram que o peso dos testículos diminuiu em doses de 50 e 200 mg/kg.

Os resultados de trabalho de Victor-Costa et al. (2010) demonstraram que a exposição à atrazina de 200 mg/kg por 15 dias e 300 mg/kg por 7 dias diminuiu o peso corporal e aumentou o peso relativo e absoluto iniciais dos testículos e da adrenal; enquanto a dose de 200 mg/kg por 40 dias reduziu o peso relativo e absoluto dos testículos.

Alguns autores ainda relatam efeitos da atrazina sobre o peso relativo somente em alguns órgãos em roedores machos. Um estudo expondo roedores Wistar às doses de 12,5 a 200 mg/kg por gavagem do DPN23 ao 53 encontrou redução do peso corporal, da próstata ventral e da vesícula seminal nos animais expostos à maior dosagem, mas nenhuma alteração no peso testicular (STOKER et al., 2000).

Um estudo adicional abordando as alterações hormonais e histológicas causadas pela atrazina, expôs ratos Sprague-Dawley machos adultos a 38,5, 77 ou 154 mg/kg de atrazina por 30 dias. Uma diminuição no peso dos testículos foi observada no tratamento de 154 mg/kg sem alterações no peso da vesícula seminal, próstata ou epidídimo (SONG et al., 2014).

De acordo com o relatado por Wirbisky e Freeman (2015), as alterações no peso dos testículos têm sido controversas. Os resultados mostraram um aumento inicial no peso testicular com exposições mais curtas à atrazina, mas

observaram uma diminuição com períodos de exposição mais longos. Ainda nesse sentido, Harper e colaboradores (2020) concluem que nenhuma alteração foi identificada no peso relativo dos órgãos reprodutivos ou na histologia do testículo e isso, provavelmente, se deve à menor dose de atrazina utilizada, uma vez que estudos anteriores relatam alterações com doses muito maiores, acima de 100 mg/kg (JIN et al., 2013; DESESSO et al., 2014; VICTOR-COSTA et al., 2010).

Contudo, nós identificamos aumento do peso de ambos os rins dos machos tratados com a menor dose de atrazina (10 mg/kg). A produção de aldosterona é regulada principalmente pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona, que envolve vários órgãos e sistemas, incluindo os rins, o trato gastrointestinal e o comportamento ingestivo (ZIMMERMAN et al., 2021).

Em estudo de Zimmerman et al. (2021), o tratamento com atrazina levou a redução da espessura da zona glomerulosa adrenocortical e da expressão da aldosterona sintase (Cyp11b2), indicativa de estimulação adrenal repetida pelo hormônio adrenocorticotrópico, além de elevar as concentrações circulantes de aldosterona. Vale ressaltar que a liberação de aldosterona induzida por Angiotensina II também foi potencializada em células de carcinoma adrenocortical humano pré-tratadas com atrazina (H295R).

O aumento do peso relativo de ambos os rins que observamos em ratos machos expostos à dose mais baixa de atrazina não foi vista nas fêmeas. Esse fato pode ser justificado considerando que animais do sexo masculino apresentam níveis mais elevados de aldosterona e testosterona do que as fêmeas (TOERING et al., 2018), ou seja, a testosterona é convertida em estrógeno pela ação da aromatase; o estrógeno, por sua vez, tem uma similaridade estrutural com a aldosterona, sendo capaz de se ligar também em receptores deste hormônio, o que culmina em diminuição da função renal e nefrotoxicidade que, nesse estudo, foi evidenciado pela diminuição do peso relativo dos órgãos.

Além disso, trabalhos recentes sugerem que a aldosterona tem efeitos cardiovasculares e metabólicos generalizados (MONTICONE et al., 2018), reforçando a possível ligação do estrógeno nos receptores de aldosterona, que leva a diminuição do ritmo de filtração glomerular e com efeitos no equilíbrio hídrico e eletrolítico, uma vez que esse hormônio aumenta a geração de

superóxido (IWASHIMA et al., 2008), que pode envolver diminuições na atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase e aumentos na NADPH oxidase.

Nossos resultados nas fêmeas, realizando-se cálculo do peso relativo de órgãos sexuais – útero e ovários –, dos rins, do fígado e das adrenais mostraram redução no peso do fígado dos grupos expostos às doses baixa e intermediária de atrazina (10 e 30 mg/kg). Não houve diferença significativa no peso relativo em nenhuma das outras estruturas coletadas.

Esses dados apoiam os resultados apresentados por Harper e colaboradores (2020). Esses autores expuseram camundongos à atrazina na dose de 5 mg/kg fornecida na água do DG9,5 até 12 ou 26 semanas de vida, sendo observado que essa exposição causou diminuição no peso do fígado na 12ª semana de vida. Assim, concluíram que a exposição à atrazina, começando no período pré-natal, afeta negativamente as características metabólicas e reprodutivas, bem como o desenvolvimento do órgão e a expressão gênica do fígado, e isso resultaria em perturbações na homeostase metabólica. Contrariamente a isso, não foi observada nenhuma diferença no peso do fígado na 26ª semana de vida, sugerindo que, embora possa haver diferenças no desenvolvimento do fígado, eventualmente a dose crônica não foi alta o suficiente para atrasar permanentemente o desenvolvimento, e o fígado cresce para um tamanho semelhante ao do grupo controle. Essa conclusão pode justificar o porquê de as alterações no peso relativo do fígado não terem sido observadas em todos os grupos expostos a atrazina e somente nas fêmeas.

Outros estudos também investigaram mecanismo para explicar esse achado, sugerindo que poderia ser através da capacidade da atrazina alterar a função mitocondrial ao interferir com os complexos I e III na cadeia de transporte de elétrons (LIM et al., 2009), o que poderia interromper o metabolismo energético e induzir o estresse oxidativo, criando, assim, um ambiente desfavorável para o desenvolvimento dos órgãos (THOMPSON; AL-HASAN, 2012). Isso é corroborado por estudos em células hepáticas humanas que revelaram que a exposição à atrazina na dose de 0,625 µg/ml diminuiu as taxas de proliferação celular e induziu a disfunção mitocondrial (POWELL et al., 2011; SAGARKAR et al., 2016).

As avaliações aqui relatadas se somam à crescente quantidade de trabalhos da literatura que propõe que os estressores no início da vida durante

e/ou períodos críticos de desenvolvimento podem alterar a estrutura e a fisiologia hepática (HARPER et al., 2020; GOFREY; BARKER, 2001).

A respeito do peso relativo de órgãos sexuais em fêmeas, os resultados aqui obtidos não são corroborados por outros autores. Ashby et al. (2002) e Eldridge et al. (1994) observaram diminuição nos pesos uterinos. Exposições mais longas, de 40 a 50 dias, nas doses de 30 a 200 mg/kg durante a vida adulta causaram diminuição do peso de órgãos reprodutivos e da glândula adrenal em ratos Wistar na dose de 100 mg/kg e em ratos Fisher 344 nas doses de 40 e 200 mg/kg por via oral durante 2 semanas.

Ratas fêmeas Long-Evans foram alimentadas com 100 mg/kg de atrazina do DGs 15 ao 19 e houve queda de 10% no peso uterino da prole (RAYNER et al.; 2004). Alterações no desenvolvimento normal dos órgãos reprodutivos devido à exposição a atrazina também são relatadas por Tentracoste et al. (2001).

Além disso, Zimmerman e colaboradores (2021) observaram que 4 dias de tratamento com 100 mg/kg de atrazina causou alterações na morfologia adrenal. O tratamento prolongado com atrazina também pode levar a alterações nos pesos da adrenal (ELDRIDGE et al., 1994; VICTOR-COSTA et al., 2010; FORADORI et al., 2017), entretanto, nossas análises não evidenciaram nenhuma diferença no peso da adrenal nas três diferentes doses de exposição e em ambos os sexos.

De acordo com Wirbisky e Freeman (2015), essas diferenças podem ser contribuídas pelas divergências nas doses utilizadas e nos períodos de observação. Além disso, estudos de McMullin et al. (2003) e de Campbell et al. (2016) evidenciaram que as concentrações plasmáticas de atrazina atingem o pico 2 horas após a gavagem no rato, com a maior parte da atrazina e seus metabólitos eliminados do animal em 24 horas.

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia para dosagem dos níveis de monoaminas cerebrais (DA, NOR e 5HT) e seus metabólitos, em ambos os sexos.

A DA é uma catecolamina envolvida no controle da atividade motora, nos mecanismos de recompensa, nas emoções e ainda em funções cognitivas e endócrinas (BEAR et al., 2008).

Os neurônios dopaminérgicos são encontrados, principalmente, na substância *nigra* do mesencéfalo que se projetam até o estriado – a chamada via nigroestriatal –, importante no controle das zonas motoras involuntárias. O mesencéfalo, mais especificamente a área tegmental ventral, também possui neurônios dopaminérgicos que se projetam até o córtex pré- frontal e ao sistema límbico através da amígdalas, do hipocampo, do núcleo accumbens – a chamada via mesolímbica –, importante na regulação do comportamento emocional e no sistema de recompensas. Há ainda a via mesocortical, que liga a área tegmental ventral aos lobos frontais do córtex cerebral – essa via está relacionada ao desenvolvimento das funções cognitivas, memória, atenção, recompensa e aprendizagem –; e a via tuberoinfundibular, que tem funções na liberação de hormônios hipofisários (BEAR et al., 2008; MACHADO, 2007; SPINOSA et al., 2017).

A degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância *nigra* é a principal causa de desenvolvimento de doenças motoras neurodegenerativas, como a doença Parkinson, cujos mecanismos subjacentes foram descritos em detalhes em Pantaleon et al. (2021).

A noradrenalina também é uma catecolamina. Os neurônios noradrenérgicos são encontrados no sistema nervoso vegetativo periférico e no *locus ceruleus* localizados na ponte e na área tegmental lateral da formação reticular, cujas projeções atingem todo sistema nervoso central, inclusive o córtex cerebral.

Esses neurônios estão envolvidos na regulação da atenção, do alerta e do ciclo de sono-vigília, na memória e aprendizagem, ansiedade, dor, humor e metabolismo cerebral e são mais bem ativados por estímulos sensoriais novos, inesperados e não-dolorosos oriundos do ambiente do animal. No córtex cerebral, a noradrenalina aumenta sua resposta a estímulos sensoriais salientes; já no *locus ceruleus*, a noradrenalina funciona de forma mais geral, aumentando a capacidade cerebral de responder a estímulos, acelerando o processamento de informações pelos sistemas sensorial e motor, tornando-os mais eficientes (BEAR et al., 2008; MACHADO, 2007; SPINOSA et al., 2017).

A hiperatividade deste sistema induz a um estado de *arousal* acompanhado por insônia, ansiedade, irritabilidade, instabilidade emocional,

paranoia e excitação. A hipoatividade deste sistema leva a hipersonia, respostas embotadas ou apatia (SPINOSA et al., 2017).

Todos os neurônios catecolaminérgicos contêm a enzima tirosina hidroxilase (TH) que converte tirosina em DOPA (L-diidroxifenilalanina). A atividade da TH é determinante de velocidade para a de síntese de catecolaminas. A DOPA é convertida em DA pela enzima dopa-descarboxilase. Neurônios noradrenérgicos contêm TH, dopa-descarboxilase e dopamina- β -hidroxilase (DBH); essa última converte dopamina em noradrenalina. Uma vez dentro dos terminais axonais, a DA e a NOR podem ser transportadas novamente para as vesículas sinápticas para serem reutilizadas ou podem ser degradadas por uma enzima denominada monoamina oxidase (MAO) e assim, são obtidos os seus metabólitos, DOPAC, HVA e VMA (BEAR et al., 2008).

A 5HT é uma indolamina derivada do triptofano. A maioria dos neurônios serotoninérgicos origina-se dos nove núcleos da rafe localizados nas regiões superiores do tronco encefálico e, cada um desses núcleos, se projetam para diferentes regiões encefálicas, como para o córtex, o hipotálamo e o sistema límbico. No núcleo supraquiasmático do hipotálamo, ela é fundamental para o controle do ciclo sono-vigília e em outras regiões do hipocampo regula o comportamento alimentar e outras funções vegetativas. No comportamento adaptativo, desempenha papel na modulação do prazer. Seus neurônios fazem sinapses com neurônios motores, controlando os movimentos e o estabelecimento de da força dos reflexos. Além disso, a 5HT controla a liberação de alguns hormônios, regula o ritmo circadiano, o sono e o apetite, a imunidade entre outras funções (BEAR et al., 2008; SPINOSA et al., 2017).

A síntese de 5HT ocorre em duas etapas; a enzima triptofano hidroxilase converte triptofano em 5-HTP (5-hidroxitriptofano) e, em seguida, converte 5-HTP em 5HT pela enzima triptofano hidroxilase. Após ser liberada na fenda sináptica, a 5HT é removida pela ação de um transportador específico e, uma vez de volta ao terminal do axônio, é transportada para a vesícula sináptica ou degradada pela MAO e, assim, é obtido o seu metabólito 5HIAA (BEAR et al., 2008).

As estruturas coletadas para a dosagem de monoaminas cerebrais foram: córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo e corpo estriado.

O córtex pré-frontal compreende a parte anterior não-motora do lobo frontal e recebe fibras de todas as demais áreas de associação do córtex e tem ligação, ainda, com o sistema límbico. Assim sendo, essa região se relaciona com a escolha de opções e estratégias comportamentais, manutenção da atenção e controle do comportamento emocional (MACHADO, 2007).

No córtex pré-frontal dos ratos machos tratados com atrazina, houve um aumento de DA naqueles expostos as doses intermediária e alta de atrazina (30 e 100 mg/kg); os animais expostos a dose mais alta também tiveram aumento no *turnover* DOPAC/DA, e de 5HT e do *turnover* 5HT/5HIAA; os animais tratados com a dose mais baixa de atrazina (10 mg/kg) apresentaram um aumento na concentração de NOR. Esses resultados sugerem que a atrazina tenha ação sobre o aumento da velocidade de metabolização da DA, bem como a de 5HT nas respectivas doses. As alterações neuroquímicas em machos observadas em nosso estudo podem estar relacionadas com aquelas vistas no comportamento sexual. Hull e colaboradores (2004) relataram em seus estudos que os hormônios esteroides regulam o comportamento sexual principalmente por efeitos lentos, mediados genomicamente. Esses efeitos são notados, em parte, por aumento do processamento de estímulos sensoriais relevantes, alterando a síntese de receptores e/ou liberação de neurotransmissores nas fendas sinápticas. A DA tem efeitos facilitadores na motivação sexual, melhoria no desempenho sexual e reflexos genitais, entretanto, a 5HT é principalmente inibitória, uma vez que a estimulação dos receptores 5-HT_{2C} aumenta a latência das ereções e inibe a ejaculação; já a estimulação dos receptores 5-HT_{1A} tem efeitos de facilitação da ejaculação e, em algumas áreas cerebrais, como no hipotálamo lateral anterior, leva a inibição da ereção no momento da ejaculação. Microinjeções de inibidores seletivos da recaptção de 5HT atrasam o início da cópula e retarda a ejaculação após o início da cópula; isso ocorre, pois, o aumento de 5HT em regiões cerebrais, como córtex pré-frontal e estriado, em geral, leva a diminuição na liberação de DA na via mesolímbica.

No córtex pré-frontal de fêmeas, foi visto um aumento de 5HT e do *turnover* 5HIAA/5HT nos animais expostos a dose mais alta. Esses achados sugerem aumento da velocidade de metabolização da 5HT no córtex pré-frontal, bem como diminuição das catecolaminas NOR e DA na região nigroestriatal nas

três doses testadas, porém essas alterações neuroquímicas não foram capazes de alterar o comportamento sexual desses animais.

O hipocampo é um dos componentes do sistema límbico, é responsável pela regulação dos processos emocionais e, também, tem participação em mecanismos de memória (MACHADO, 2007).

No hipocampo de ratos machos tratados com atrazina, houve aumento significativo de VMA, sem alteração nos níveis de NOR, nos animais expostos a dose de 30 mg/kg. Esses resultados sugerem que, no hipocampo, essa dose promove aumento de NOR sem saturação do sistema enzimático de metabolização.

Gelinas e Nguyen (2007) descrevem que o sistema neuromodulador noradrenérgico inerva amplamente o encéfalo dos mamíferos, incluindo o hipocampo e que a plasticidade sináptica hipocampal contribui, de maneira importante, para a formação e consolidação de alguns tipos de memória. Esses autores ressaltam, ainda, que a estimulação de receptores noradrenérgicos nessa região cerebral altera a excitabilidade neuronal e a plasticidade sináptica, sugerindo um papel fundamental para a NOR no aprendizado e na memória, bem como inúmeras outras funções dependentes do hipocampo e na plasticidade celular e cerebral. Além disso, a disfunção do sistema neuromodulador noradrenérgico contribui para vários distúrbios cognitivos e psiquiátricos.

O hipotálamo é uma pequena área do diencefalo com importantes funções relacionadas principalmente com o controle da homeostase; para isso, essa estrutura tem papel regulador sobre o sistema nervoso autônomo e o sistema endócrino, além de exercer papel importante em processos motivacionais para a sobrevivência do indivíduo (MACHADO, 2007). No hipotálamo de ratos machos tratados com atrazina, houve um aumento no *turnover* DOPAC/DA nos animais expostos a dose de 100 mg/kg, sugerindo um aumento na velocidade de metabolização de DA pelas enzimas envolvidas no processo.

O corpo estriado recebe projeções (aferências) provenientes de várias regiões do córtex cerebral; essas informações são transmitidas ao tálamo que as reenvia de volta ao córtex cerebral, influenciando a atividade motora somática (MACHADO, 2007).

No presente trabalho, alterações na homeostase dopaminérgica não foram vistas no corpo estriado, mas sim no córtex pré-frontal e no hipotálamo de machos. No córtex pré-frontal houve um aumento na concentração de DA e do *turnover* DOPAC/DA e no hipotálamo, houve um aumento no *turnover* DOPAC/DA.

No corpo estriado de ratos machos tratados com atrazina, houve aumento do metabólito VMA naqueles expostos às doses intermediária e alta de atrazina (30 e 100 mg/kg), e, ainda, aumento 5HT nos animais expostos a dose mais alta de atrazina. No corpo estriado de fêmeas, houve diminuição na concentração de NOR e VMA em todos os grupos experimentais (10, 30 e 100 mg/kg), o que sugere aumento da velocidade de metabolização da NOR secretada pelos neurônios pré-sinápticos, tanto em machos quanto em fêmeas expostos à atrazina.

Ranjbar-Slamloo e Fazlali (2020) relataram em seu estudo que DA e NOR são neuromoduladores cruciais que controlam os estados de vigília, ação, recompensa, aprendizado e os processos de memória, sendo as áreas tegmental ventral e o *locus ceruleus* descritas como as principais fontes de DA e NOR com funções dissociadas. Assim sendo, esses neuromoduladores têm função sobreposta a vários sistemas, como rotas biossintéticas compartilhadas e co-liberação dos terminais *locus ceruleus*, inervações convergentes, inespecificidade de receptores e transportadores e vias de sinalização intracelular. As interações entre DA e NOR são estudadas principalmente no córtex pré-frontal e hipocampo, mas podem ser estendidas a todo o encéfalo, dada a diversidade de inervações de catecolaminas; exemplo disso é o *locus ceruleus* que pode liberar simultaneamente DA e NOR no encéfalo. Sendo assim a DA e a NOR podem funcionar em paralelo no circuito de aprendizado cognitivos, motores, entre outros.

Em relação ao neurotransmissor 5HT, alterado na região estriatal, Blomeley e Bracci (2009) descreveram que os interneurônios de pico rápido modulam o potencial de ação que sai do corpo estriado, mediando a inibição GABAérgica, podendo, portanto, afetar criticamente o funcionamento dos núcleos da base. Os autores estudaram os efeitos da 5HT liberada no estriado de ratos por fibras originadas nos núcleos da rafe e verificaram que a 5HT induziu despolarizações lentas e reversíveis em 37 dos 46 interneurônios de pico rápido;

os efeitos excitatórios da 5HT sobre os interneurônios de pico rápido foram atribuídos à atuação sobre receptores 5-HT_{2C} e envolveram a supressão de um potencial de ação K⁺ dependente de repolarização.

Gerber e Lynd (1998) ressaltaram que, do ponto de vista clínico, os inibidores seletivos da recaptção da 5HT, amplamente utilizados no tratamento da depressão, produzem efeitos motores extrapiramidais ou parkinsonianos, incluindo acatisia e distonia. Nesse sentido, considerando os achados neuroquímicos estatisticamente significantes ligados a NOR, DA e 5HT encontrados no presente estudo, estes podem estar relacionados com a diferenças no ângulo do passo no teste de marcha observados por De-Paula (2021).

Os resultados aqui apresentados, tomados em conjunto, mostraram que a exposição à atrazina durante a puberdade causou, na idade adulta: aumento do peso corporal em machos e fêmeas, acompanhados por comprometimento do metabolismo renal em machos e hepático em fêmeas; déficits na fase de iniciação do comportamento sexual de machos e na recuperação após a ejaculação; não alterou o comportamento sexual de fêmeas nem a ciclicidade do estro; e causou desbalanço nos sistemas monoaminérgicos encefálicos, que podem estar relacionados às alterações comportamentais observadas.

7. CONCLUSÕES

A exposição a atrazina durante a puberdade de ratos machos e fêmeas, causou, na idade adulta:

- Aumento da latência para primeira ereção peniana na dose de 100 mg/kg e diminuição no número de intromissões pós-ejaculatórias nas doses de 10 e 30 mg/kg em machos;
- Aumento do peso corporal de machos e fêmeas na dose de 10 mg/kg;
- Aumento do peso relativo dos rins direito e esquerdo em machos na dose de 10 mg/kg;
- Aumento do peso relativo do fígado em fêmeas nas doses de 10 e 30 mg/kg;
- Aumento da concentração de DA (30 e 100 mg/kg) e do *turnover* DOPAC/DA no córtex pré-frontal e no hipotálamo de machos (100 mg/kg);
- Aumento da concentração de NOR no córtex pré-frontal de machos (10 mg/kg) e no corpo estriado de fêmeas (10, 30 e 100 mg/kg), aumento da de VMA no hipocampo de machos (30 mg/kg) e no corpo estriado de machos (30 e 100 mg/kg) e fêmeas (10, 30 e 100 mg/kg);
- Aumento da concentração de 5HT e do *turnover* 5HIAA/5HT no córtex pré-frontal de machos e fêmeas e no corpo estriado de machos e fêmeas na dose de 100 mg/kg.

Assim, a exposição de ratos à diferentes doses de atrazina durante a fase peripuberal mostrou causar comprometimentos metabólicos em ambos os sexos, evidenciados por influência direta sobre o peso corporal e peso relativo dos rins e fígado, bem como prejudicou alguns parâmetros do comportamento sexual dos machos, os quais podem estar associados ao desbalanço nos sistemas monoaminérgicos encefálicos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARIKWU, S.O.; ADESIYAN, A.C.; OYELOJA, T.O.; OYEYEMI, M.O.; FAROMBI, E.O. Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by an herbicide, atrazine. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 874–882, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Monografias Autorizadas – Atrazina**. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/a/4141json-file-1>>. Acesso em: 18 set. 2021.
- AGMO, A. Animal models of female sexual dysfunction: basic considerations on drugs, arousal, motivation and behavior. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 121, p. 03-15, 2014.
- ALMBERG, K.S.; TURYK, M.E.; JONES, M.R.; RANKIN, K.; FREELS, S.; STAYNER, L.T. Atrazine contamination of drinking water and arse birth outcomes in Community water systems with elevated atrazine in Ohio, 2006-2008. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 9, 2018.
- ARGIOLAS, A. Male erectile dysfunction: Chemical pharmacology of penile erection. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 2, p. 31-36, 2005.
- ARGIOLAS, A.; MELIS, M.R. Neuropeptides and central control of sexual behaviour from the past to the present: A review. **Progress in Neurobiology**, v. 108, p. 80-107, 2013.
- ASHBY, J.; TINWELL, H.; STEVENS, J.; PASTOOR, T.; BRECKENRIDGE, C.B. The effects of atrazine on the sexual maturation of female rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 35, p. 468-473, 2002.
- BARDULLAS, U.; GIORDANO, M.; RODRIGUEZ, V. M. Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, p. 263-272, 2011.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BELLONI, V.; DESSI-FULGHERI, F.; ZACCARONI, M.; DI CONSIGLIO, E.; DE ANGELIS, G.; TESTAI, E.; SANTOCHIRICO, M.; ALLEVA, E.; SANTUCCI, D. Early exposure to low doses of atrazine affects behavior in juvenile and adult CD1 mice. **Toxicology**, v. 279, p. 19-26, 2011.
- BERNARDI, M.M.; KIRSTEN, T.B.; SPINOSA, H.S.; MANZANO, H. Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naive, but not sexually experienced male rats. **Research in Veterinary Sciences**, v. 91, p. 77-81, 2011.
- BERTOLINI, A.; GESSA, G.L. Behavioral effects of ACTH and MSH peptides. **Journal of Endocrinology Investigation**, v. 4, p. 241-251, 1981.
- BLOMELEY, C.P.; BRACCI, E. Serotonin excites fast-spiking interneurons in the striatum. **European Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 8, p. 1604-1614, 2009.
- BRASIL, IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Boletim 2019. 2020. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/>>

- relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 19 set. 2021.
- BRECKENRIDGE, C.B.; FORADORI, C.D.; CODER, P.S.; SIMPKINS, J.W.; JR, R.L.S.; HANDA, R.J. Changes in Sensitivity to the Effects of Atrazine on the Luteinizing Hormone Surge in Female Sprague-Dawley Rats after Repeated Daily Doses: Correlation with Liver Enzyme Expression. **Birth Defects Research**, v. 110, n. 3, p. 246-258, 2017.
- CAMPBELL, J.L.; ANDERSEN, M.E.; HINDERLITER, P.M., YI, K.D.; PASTOOR, T.P.; BRECKENRIDGE, C.B.; CLEWELL, H.J. Pbpk Model for Atrazine and Its Chlorotriazine Metabolites in Rat and Human. **Toxicological Sciences**, v. 150, n. 2, p. 441-453, 2016.
- CARNEIRO, F.F.; RIGOTTO, R.M.; AUGUSTO, L.G.S.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A.C. Segurança alimentar, nutricional e saúde. In: CARNEIRO, F.F.; RIGOTTO, R.M.; AUGUSTO, L.G.S.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A.C. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio; São Paulo: Expressão Popular, 2015. p. 49-87. Disponível em: <https://www.abrasco.org.br/dossieagrotoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf>. Acesso em: 18 set. 2021.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals**. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/exposurereport/index.html>>. Acesso em: 21 set. 2021.
- CHEVRIER, C.; LIMON, G.; MONFORT, C.; ROUGET, F.; GARLANTEZEC, R.; PETIT, C.; DURAND, G.; CORDIER, C. Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE birth cohort. **Environment Health Perspectives**, v. 119, n. 7, p. 1034-1041, 2011.
- CLOTFELTER, E.D.; BELL, A.M.; LEVERING, K.R. The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. **Animal Behavior**, v. 68, p. 665-676, 2004.
- COBAN, A.; FILIPOV, N.M. Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, p. 1177-1187, 2007.
- COOPER, R.L.; LAWS, S.C.; DAS, P.C.; NAROTSKY, M.G.; GOLDMAN, J.M.; TYREY, E.L. Atrazine and reproductive function: mode and mechanism of action studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, p. 98-112, 2007.
- COOPER, R.L.; STOKER, T.E.; GOLDMAN, J.M.; PARRISH, M.B.; TYREY, L. Effect of atrazine on ovarian function in the rat. **Reproductive Toxicology**, v. 10, p. 257-264, 1996.
- COUTINHO, C.; TANIMOTO, S.T.; GALLI, A.A.; GARBELLINI, G.S.; TAKAYAMA, M., DO AMARAL, R.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 5, p. 65-72, 2005.
- DAVIS, L.K.; MURR, A.S.; BEST, D.S.; FRAITES, M.J.P.; ZORRILLA, L.M.; NAROYSKYA, M.G.; STOKER, T.E.; GOLDMAN, J.M.; COOPER, R.L. The effects of prenatal exposure to atrazine on pubertal and postnatal

- reproductive indices in the female rat. **Reproductive Toxicology**, v. 32, p. 43-51, 2011.
- DE-PAULA, L.R. **Estudo dos efeitos da exposição de ratos à atrazina durante a puberdade na função motora e sua possível relação com a incidência de Doença de Parkinson**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2021.
- DESESSO, J.M.; SCIALLI, A.R.; WHITE, T.E.K.; BRECKENRIDGE, C.B. Multigeneration reproduction and male developmental toxicity studies on atrazine in rats. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 101, p. 237-253, 2014.
- DIAS, A.C.L.; SANTOS, J.M.B.; SANTOS, A.S.P.; BOTTREL, S.E.C.; PEREIRA, R.O. Ocorrência de Atrazina em águas no Brasil e remoção no tratamento da água: revisão sistemática. **Revista Internacional de Ciências**, v. 8, n. 2, p. 234-253, 2018.
- DOOLEY, G.P.; ASHLEY, A.K.; LEGARE, M.E.; HANDA, R.J.; HANNEMAN, W.H. Proteomic analysis of diaminochlorotriazine (DACT) adducts in three brain regions of Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 199, p. 17-21, 2010.
- DUNNETT, S.B.; BROOKS, S.P. Motor assessment in Huntington's Disease mice. **Methods in Molecular Biology**, v. 1780, 2018.
- ELDRIDGE, J.C.; EXTROM, P.C.; WETZEL, L.T.; BRECKENRIDGE, C.B.; GILLIS, J.H.; LUEMPFT, L.G.; STEVENS, J.T. Short-term effects of chlorotriazines on estrus in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 43, p. 155-167, 1994.
- ELDRIDGE, J.C.; MCCONNELL, R.F.; WETZEL, L.T.; TISDEL, M.O. Appearance of mammary tumors in atrazine-treated female rats: probable mode of action involving strain-related control of ovulation and estrous cycling. In: BALLANTINE, L.G.; MCFARLAND, J.E.; HACKETT, D.S. Triazine herbicides risk assessment. **American Chemical Society Symposium Series**, p. 414-423, 1998.
- ELDRIDGE, J.C.; WETZEL, L.T.; TYREY, L. Estrous cycle patterns of Sprague-Dawley rats during acute and chronic atrazine administration. **Reproductive Toxicology**, v. 13, p. 491-499, 1999.
- ENOCH, R.R.; STANKO, J.P.; GREINER, S.N.; YOUNGBLOOD, G.L.; RAYNER, J.L.; S.E. FENTON. Mammary gland development as a sensitive end point after acute prenatal exposure to an atrazine metabolite mixture in female Long-Evans rats. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, p. 541-547, 2007.
- FAKHOURI, W.D.; NUNEZ, J.L.; TRAIL, F. Atrazine binds to the growth hormone-releasing hormone receptor and affects growth hormone gene expression. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 1400-1405, 2010.
- FAN, W.Q.; YANASE, T.; MORINAGA, H.; GONDO, S.; OKABE, T.; NOMURA, M.; KOMATSU, T.; MOROHASHI, K.I.; HAYES, T.B.; TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. Atrazine-Induced Aromatase Expression Is SF-1 Dependent: Implications for Endocrine Disruption in Wildlife and Reproductive Cancers in Humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 5, p. 720-727, 2007.
- FANSELOW, M.S.; DONG, H.W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 1-25, 2010.

- FERNAGUT, P.O.; DIGUET, E.; LABATTU, B.; TISON, F. A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 113, p. 123-130, 2012.
- FELICIO, L.F.; PALERMO-NETO, J.; NASELLO, A.G. Perinatal bromopride treatment: effects on sexual behavior of male and female rats. **Behavioral and Neural Biology**, v. 52, p. 145-151, 1989.
- FERRI, R.; TODON, E.S.S.F.; CABRAL, D.; MOREIRA, N.; SPINOSA, H.S.; BERNARDI, M.M. Doramectin reduces sexual behavioral and penile erection in male rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 39, p. 63-68, 2013.
- FORADORI, C.D.; ZIMMERMAN, A.D.; CODER, P.S.; PEACHEE, V.L.; HANDA, R.J.; KIMBER, I.; PRUETT, S.B.; BRECKENRIDGE, C.B. Lack of Immunotoxic Effects of Repeated Exposure to Atrazine Associated with the Adaptation of Adrenal Gland Activation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 89, p. 200-214, 2017.
- FOULDS, C.E.; TREVINO, L.S.; YORK, B.; WALKER, C.L. Endocrine-disrupting chemicals and fatty liver disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, p. 447-457, 2017.
- FOWDEN, A.L.; FORHEAD, A.J.; SFERRUZZI-PERRI, A.N.; BURTON, G.J.; VAUGHAN, O.R. Review: Endocrine regulation of placental phenotype. **Placenta**, v. 36, n. 1, p. 50-59, 2015.
- FRAITES, M.J.; NAROTSKY, M.G.; BEST, D.D.; STOKER, T.E.; DAVIS, L.K.; GOLDMAN, J.M.; HOTCHKISS, M.G.; KLINEFELTER, G.R.; KAMEL, A.; QIAN, Y. Gestacional atrazine exposure: Effects on male reproductive development and metabolic distribution in the dam, fetus, and neonate. **Reproductive Toxicology**, v. 32, p. 52-63, 2011.
- FRIEDMANN, A.S. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following perinatal exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 16, p. 275-279, 2002.
- FUKUSHIMA, A.R.; SPINOSA, H. S.; FONTES, L.R.; NICOLETTI, M.A.; OLIVEIRA, T.F.; DE-SIQUEIRA, A.; GONCALVES-JUNIOR, V.; LEONI, L.A.B.; ANAZAWA, T.A.; CARVALHO, V.M.; MAIORKA, P.C. **Manual de análises toxicológicas forenses focado em crimes contra animais**. Ed. São Paulo: INTERTOX, 2017. v.1. 43p.
- GELINAS, J.N.; NGUYEN, P.V. Neuromodulation of Hippocampal Synaptic Plasticity, Learning, and Memory by Noradrenaline. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 17-33, 2007.
- GELY-PERNOT, A.; HAO, C.; BECKER, E.; STUPAREVIC, I.; KERVARREC, C.; CHALMEL, F.; PRIMIG, M.; JÉGOU, B.; SMAGULOVA, F. The epigenetic processes of meiosis in male mice are broadly affected by the widely used herbicide atrazine. **BMC Genomics**, v. 16, 2015.
- GENOVESE, T.; SIRACUSA, R.; FUSCO, R.; D'AMICO, R.; IMPELLIZZERI, D.; PERITORE, A.F.; CRUPI, R.; GUGLIANDOLO, E.; MORABITO, R.; CUZZOCREA, S.; SALINARO, A.T.; CORDARO, M.; PAOLA, R.D. Atrazine Inhalation Causes Neuroinflammation, Apoptosis and Accelerating Brain Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, 2021.
- GERBER, P.E.; LYND, L.D. Selective serotonin-reuptake inhibitor-induced movement disorders. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 32, p. 692-698, 1998.

- GIUSI, G.; FACCILOLO, R.M.; CANONACO, M.; ALLEVA, E.; BELLONI, V.; DESSI'-FULGHERI, F.; SANTUCCI, D. The endocrine disruptor atrazine accounts for a dimorphic somatostatinergic neuronal expression pattern in mice. **Toxicological Sciences**, v. 89, p. 257-264, 2006.
- GODFREY, K.M.; BARKER, D.J. Fetal programming and adult health. **Public Health Nutrition**, v. 4, p. 611-624, 2001.
- GOLDMAN, J.M.; DAVIS, L.K.; MURR, A.S.; COOPER, R.L. Atrazine-induced elevation or attenuation of the LH surge in the ovariectomized, estrogen-primed female rat: Role of adrenal progesterone. **Reproduction**, v. 146, p. 305-314, 2013.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Endocrinologia e reprodução. In: **Tratado de fisiologia médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 905-916.
- HAKIM, C.; PADMANABHAN, V.; VYAS, A.K. Gestational Hyperandrogenism in Developmental Programming. **Endocrinology**, v. 158, n. 2, p. 199-212, 2017.
- HARDY, D.F.; DEBOLD, J.F. The relationship between levels of exogenous hormones and the display of lordosis by female rat. **Hormones and Behavior**, v. 2, p. 287-297, 1971.
- HARPER, A.P.; FINGER, B.J.; GREEN, M.P. Chronic atrazine exposure beginning prenatally impacts liver function and sperm concentration with multi-generational consequences in mice. **Frontier in Endocrinology**, v. 11, 2020.
- HAYES, T.B.; ANDERSON, L.L.; BEASLEY, V.R.; DE-SOLLA, S.R.; IGUCHI, T.; INGRAHAM, H. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, p. 64-73, 2011.
- HE, H.; LIU, Y.; YOU, S.; LIU, J.; XIAO, H.; TU, Z. A review on recent treatment technology for herbicide atrazine in contaminated environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 24, 2019.
- HIKOSAKA, O.; TAKIKAWA, Y.; KAWAGOE, R. Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 953-978, 2000.
- HOLLOWAY, A.C.; ANGER, D.A.; CRANKSHAW, D.J.; WU, M.; FOSTER, W.G. Atrazine-induced changes in aromatase activity in estrogen sensitive target tissues. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 260-270, 2008.
- HOVEY, R.C.; CODER, P.S.; WOLF, J.C.; SIELKEN, R.L.; TISDEL, M.O.; BRECKENRIDGE, C.B. Quantitative Assessment of Mammary Gland Development in Female Long Evans Rats Following in Utero Exposure to Atrazine. **Toxicological Sciences**, v. 199, n. 2, p. 380-390, 2011.
- HULL, E.M.; MUSCHAMP, J.W.; SATO, S. Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. **Physiology & Behavior**, v. 83, n. 2, p. 291-307, 2004.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Agrotóxico: causas e prevenção**. Brasil: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>>. Acesso em: 18 set. 2021.
- IWASHIMA, F.; YOSHIMOTO, T.; MINAMI, I.; SAKURADA, M.; HIRONO, Y.; HIRATA, Y. Aldosterone Induces Superoxide Generation Via Rac1

- Activation in Endothelial Cells. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 109-114, 2008.
- JACOBS, B.Y.; KLOEFKORN, H.E.; ALLEN, K.D. Gait analysis methods for rodent models of osteoarthritis. **Current Pain and Headache Reports**, v. 10, n.18, 2014.
- JENNINGS, K.J.; DE-LECEA L. Neural and Hormonal Control of Sexual Behavior. **Endocrinology**, v. 161, 2020.
- JIN, Y.; WANG, L.; FU, Z. Oral exposure to atrazine modulates hormone synthesis and the transcription of steroidogenic genes in male peripuberal mice. **General and Comparative Endocrinology**, v. 184, p. 120-127, 2013.
- JULIANI, C.C.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; SANTOS, D.C.; BOER, P.A. Effects of atrazine on female Wistar rats: Morphological alterations in ovarian follicles and immunocytochemical labeling of 90 kDa heat shock protein. **Micron**, v. 39, p. 607-616, 2008.
- KATIB, A. Mechanisms linking obesity to male infertility. **Central European Journal of Urology**, v. 68, p. 79-85, 2015.
- KUCKAA, M.; POGRMIC-MAJKICB, K.; FAB, S.; STOJILKOVIĆ, S.S.; KOVACEVICB, R. Atrazine acts as an endocrine disrupter by inhibiting cAMP-specific Phosphodiesterase-4. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 265, n. 1, p. 19-26, 2012.
- LAGESSON, A.; SAARISTO, M.; BRODIN, T.; FICK, J.; KLAMINDER, J.; MARTIN, J.; WONG, B.B. Fish on steroids: Temperature-dependent effects of 17 β -trenbolone on predator escape, boldness, and exploratory behaviors. **Environmental Pollution**, v. 245, p. 243-252, 2019.
- LAMB, S.D.; CHIA, J.H.Z.; JOHNSON, S.L. Paternal exposure to a common herbicide alters the behavior and serotonergic system of zebrafish offspring. **Public Library of Science One**, v. 15, n. 4, 2020.
- LAWS, S.C.; FERRELL, J.M.; STOKER, T.E.; SCHMID, J.; COOPER, R.L. The effects of atrazine on female Wistar rats: an evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. **Toxicological Sciences**, v. 58, p. 366-376, 2000.
- LEET, J.K.; RICHTER, C.A.; CORNMAN, R.S.; BERNINGER, J.P.; BHANDARI, R.K.; NICKS, D.K.; ZAJICEK, J.L.; BLAZER, V.S.; TILLITT, D.E. Effects of early life stage exposure of largemouth bass to atrazine or a modern estrogen (17 α -ethinylestradiol). **PeerJ Chemistry Journals**, v. 8, 2020.
- LEONI, L.A.B.; FUKUSHIMA, A.R.; ROCHA, L.Y.; MAIFRINO, L.B.M.M.; RODRIGUES, B. Physical activity on endothelial and erectile dysfunction: a literature review. **Aging Male**, v. 17, n. 3, p. 125-130, 2014.
- LIM, S.; AHN, S.Y.; SONG, I.C.; CHUNG, M.H.; JANG, H.C.; PARK, K.S.; LEE, K.U.; PAK, Y.K.; LEE, H.K. Chronic exposure to the herbicide, atrazine, causes mitochondrial dysfunction and insulin resistance. **Public Library of Science One**, v. 4, 2009.
- LIN, Z.; DODD, C.A.; FILIPOV, N.M. Differentiation state-dependent effects of in vitro exposure to atrazine or its metabolite diaminochlorotriazine in a dopaminergic cell line. **Life Sciences**, v. 92, p. 81-90, 2013a.
- LIN, Z.; DODD, C.A.; FILIPOV, N.M. Short-term atrazine exposure causes behavioral deficits and disrupts monoaminergic systems in male C57BL/6 mice. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 39, p. 26-35, 2013b.
- LIN, Z.; DODD, C.A.; XIAO, S.; KRISHNA, S.; YE, X.; FILIPOV, N.M. Gestational and lactational exposure to atrazine via the drinking water causes specific

- behavioral deficits and selectively alters monoaminergic systems in C57BL/6 mouse dams, juvenile and adult offspring. **Society of Toxicology**, v. 141, n. 1, p. 90-102, 2014.
- LIN, Z.; FISHER, J.W.; WANG, R.; ROSS, M.K.; FILIPOV, N.M. Estimation of placental and lactational transfer and tissue distribution of atrazine and its main metabolites in rodent dams, fetuses, and neonates with physiologically based pharmacokinetic modeling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 273, p. 140-158, 2013c.
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rede Brasileira de Justiça Ambiental; Articulação Nacional de Agroecologia, 2012. Disponível em: <<https://br.boell.org/pt-br/2011/10/31/agrotoxicos-no-brasil-um-guia-para-acao-em-defesa-da-vida-0>>. Acesso em: 18 set. 2021.
- MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.
- MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrus cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.
- MCCOWAN, L.; HORGAN, R.P. Risk factors for small for gestational age infants. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 23, n. 6, p. 779-793, 2009.
- MCMULLIN, T.S.; BRZEZICKI, J.M.; CRANMER, B.K.; TESSARI, J.D.; ANDERSEN, M.E. Pharmacokinetic Modeling of Disposition and Time-Course Studies With [14C] Atrazine. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 66, n. 10, p. 941-964, 2004.
- MELIS, M.R.; ARGIOLAS, A. Oxytocin, Erectile Function and Sexual Behavior: Last Discoveries and Possible Advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, 2021.
- MONTICONE, S.; D'ASCENZO, F.; MORETTI, C.; WILLIAMS, T.A.; VEGLIO, F.; GAITA, F.; MULATERO, P. Cardiovascular Events and Target Organ Damage in Primary Aldosteronism Compared with Essential Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Lancet Diabetes Endocrinology**, v. 6, n. 1, p. 41-50, 2018.
- MOON, H.J.; HAN, S.Y.; SHIN, J.H.; KANG, I.H.; KIM, T.S.; HONG, J.H. KIM, S.H. FENTON, S.E. Gestational exposure to nonylphenol causes precocious mammary gland development in female rat offspring. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 333-344, 2007.
- MORAES, R.F. Texto para discussão. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. IPEA, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf>. Acesso em: 01 out. 2020.
- MOREIRA, N. **Influência da exposição à ivermectina na esfera sexual de ratos adultos**. 2014. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.
- MOREIRA, N.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Ivermectin reduces sexual behavior in female rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 43, p. 33-38, 2014.
- MOREIRA, N.; SANDINI, T.M.; REIS-SILVA, T.M.; NAVAS-SUÁREZ, P.; AUADA, A.V.V.; LEBRUN, I.; FLÓRIO, J.C.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Ivermectin reduces motor coordination, serum testosterone, and

- central neurotransmitter levels but does not affect sexual motivation in male rats. **Reproductive Toxicology**, v. 74, p. 195-203, 2017.
- MOREIRA, N.; VICENTE, F.L.; SANDINI, T.M.; MARTINELLI, E.C.L.; NAVAS-SUÁREZ, P.E.; REIS-SILVA, T.M.; SPINOSA, H.S. Effects of ivermectin treatment during prepubertal and pubertal period on sexual parameters and sexual behavior in adulthood in rats. **Research in Veterinary Science**, v. 129, p. 21-27, 2020.
- NELSON, R.J. **An introduction to behavioral endocrinology**. 2^a ed. Sinaver Associates Inc Publishers Sunderland, Massachusetts, 1995.
- OCHOA-ACUÑA, H.; FRANKENBERGER, J.; HAHN, L.; CARBAJO, C. Drinking-water herbicide exposure in Indiana and prevalence of small-for-gestational-age and preterm delivery. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, p. 1619-1624, 2009.
- OJEDA, S.R.; MA, Y.J.; LEE, B.T.; PREVOT, V. Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of male puberty. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 55, p. 197-223, 2000.
- PANTALEON, L.; FUKUSHIMA, A.R.; DE-PAULA, L.R.; RIBEIRO, G.M.; PACCA, B.P.; MUNOS, J.W.P.; SPINOSA, H.S.; RICCI, E.L. Integrative Review: Verification of the Influence of Atrazine Exposure on Behavioral, Neurochemical, and Parkinson's Disease Disorders. **Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences**, v. 2, n. 10, 1044-1058, 2021.
- PFAUS, J.; GORZALKA, B.B. Opioids and sexual behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 11, p. 11-34, 1987.
- PINTO, W.B.C.; SOUZA, P.V.S.; KO, G.M. Avaliação da marcha normal e patológica no camundongo. **Revista Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 3, n. 1, p. 45-51, 2015.
- PORSERYD, T.; KELLNER, M.; CASPILLO, N.R.; VOLKOVA, K.; ELABBAS, L.; ULLAH, S.; ÓLSEN, H.; DINNÉTZ, P.; HALLSTROM, I.P. Combinatory effects of low concentrations of 17 α -etinylestradiol and citalopram on non-reproductive behavior in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 193, p. 9-17, 2017.
- POWELL, E.R.; FALDLADDIN, N.; RAND, A.D.; PELZER, D.; SCHRUNK, E.M.; DHANWADA, K.R. Atrazine exposure leads to altered growth of HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 644-651, 2011.
- PRAKASH, N.; WURST, W. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 187-206, 2006.
- QUIGNOT, N.; ARNAUD, M.; ROBIDEL, F.; LECOMTE, A.; TOURNIER, M.; CREN-OLIVÉ, C.; BAROUKI, R.; LEMAZURIER, E. Characterization of endocrine-disrupting chemicals based on hormonal balance disruption in male and female adult rats. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 339-352, 2012.
- RANJBAR-SLAMLOO, Y.; FAZLALI, Z. Dopamine and Noradrenaline in the Brain; Overlapping or Dissociate Functions?. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, 2020.
- RAYNER, J.L.; ENOCH, R.R.; FENTON, S.E. Adverse effects of prenatal exposure to atrazine during a critical period of mammary gland growth. **Toxicological Sciences**, v. 87, p. 255-266, 2005.

- RAYNER, J.L.; ENOCH, R.R.; WOLF, D.C.; FENTON, S.E. Atrazine induced reproductive tract alterations after transplacental and/or lactational exposure in male Long-Evans rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 218, p. 238-248, 2007.
- RAYNER, J.L.; WOOD, C.; FENTON, S.E. Exposure parameters necessary for delayed puberty and mammary gland development in Long-Evans rats exposed in utero to atrazine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, n. 1, p. 23-34, 2004.
- ROA, J.; TENA-SEMPERE, M. Connecting metabolism and reproduction: Roles of central energy sensors and key molecular mediators. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 397, p. 4-14, 2014.
- ROBERGE, M.; HAKK, H.; LARSEN, G. Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. **Toxicology Letters**, v. 154, n. 1-2, p. 61-68, 2004.
- RODRIGUES-ALVES, P.S.B. **Interferência da moxidectin ana motivação sexual e na ereção peniana de ratos: envolvimento de neurotransmissores hipotalâmicos e estriais**. 2007. 72f. Tese (Doutorado em Neurociências e Comportamento). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.
- RODRIGUES-ALVES, P.S.B.; LEBRUN, I.; FLÓRIO, J.C.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Moxidectin interference on sexual behavior, penile erection and hypothalamic GABA level of female rats. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 100-106, 2008.
- RODRIGUEZ, V.M.; LIMON-PACHECO, J.H.; MENDOZA-TREJO, M.S.; GONZALEZ-GALLARDO, A.; HERNANDEZ-PLATA, I.; GIORDANO, M. Repeated exposure to the herbicide atrazine alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat. **Neurotoxicology**, v. 34, p. 82-94, 2013.
- ROSENBERG, B.G.; CHEN, H.; FOLMER, J.; LIU, J.; PAPADOPOULOS, V.; ZIRKIN, B.R. Gestational exposure to atrazine: effects on the postnatal development of male offspring. **Journal of Andrology**, v. 29, p. 304-311, 2008.
- ROSS, M.K.; JONES, T.L.; FILIPOV, N.M. Disposition of the herbicide 2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-S-triazine (atrazine) and its major metabolites in mice: A liquid chromatography/mass spectrometry analysis of urine, plasma, and tissue levels. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, p. 776-786, 2009.
- SAGARKAR, S.; GANDHI, D.; DEVI, S.S.; SAKHARKAR, A.; KAPLEY, A. Atrazine exposure causes mitochondrial toxicity in liver and muscle cell lines. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, p. 200-207, 2016.
- SANDERSON, J.T.; SEINEN, W.; GIESY, J.P.; VAN-DEN-BERG, M. 2-chloro-S-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: A novel mechanism for estrogenicity?. **Toxicological Sciences**, v. 54, p. 121-127, 2000.
- SANDERSON, J.T.; LETCHER, R.J.; HENEWEER, M.; GIESY, J.P.; VAN-DEN-BERG, M. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 10, p. 1027-1031, 2001.

- SANDINI, T.M.; REIS-SILVA, T.M.; MOREIRA, N.; BERNARDI, M.M.; LEBRUN, I.; SPINOSA, H.S. Effects of isoflavones on behavior, estradiol, glutamate, and GABA levels in intact middle-aged female rats. **Nutritional Neuroscience**, 2018.
- SEMRUD-CLIKEMAN, M.; ELLISON, P.A.T. Functional neuroanatomy. In: SEMRUD-CLIKEMAN, M.; ELLISON, P.A.T. **Child Neuropsychology: Assessment and Interventions for Neurodevelopmental Disorders**. 2 ed. New York: Springer, 2009. 488 p.
- SHENOY, K. Prenatal exposure to low doses of atrazine affects mating behaviors in male guppies. **Hormones and Behavior**, v. 66, p. 439-448, 2014.
- SHIBAYAMA, H.; KOTERA, T.; SHINODA, Y.; HANADA, T.; KAJIHARA, T.; UEDA, M.; TAMURA, H.; ISHIBASHI, S.; YAMASHITA, Y.; OCHI, S. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. Two or for weeks repeated-dose studies and fertility study of atrazine in female rats. **Toxicological Sciences**, v. 34, p. 147-155, 2009.
- SILVA, F.S.; PABIS, J.V.P.C.; DE-ALENCAR, A.G.; DA-SILVA, K.B.; PETERNELLA, F.M.N. Evolução da doença de Parkinson e comprometimento da qualidade de vida. **Revista Neurociências**, v. 18, n, 4, p. 463-468, 2010.
- SÖFFKER, M.; TYLER, C.R. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish—a critical review on effects and possible consequences. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, p. 653-668, 2012.
- SONG, Y.; JIA, Z.C.; CHEN, J.Y.; HU, J.X; ZHANG L.S. Toxic effects of atrazine on reproductive system of male rats. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 27, p. 281-288, 2014.
- SOUZA, R.G.; BORGES, V.; SILVA, S.M.C.A.; FERRAZ, H.B. Quality of life scale in parkinson's disease: PDQ-39 (Brazilian Portuguese version) to assess patients with and without levodopa motor fluctuation. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 65, p. 787-791, 2007.
- SPINOSA, H.S. Considerações gerais sobre os praguicidas. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária**. 2. ed. Barueri: Manole, p. 163-169, 2020.
- SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 6. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2017, 950p.
- STANKO, J.P.; ENOCH, R.R.; RAYNER, J.L.; DAVIS, C.C.; WOLF, D.C.; MALARKEY, D.E.; FENTON, S.E. Effects of prenatal exposure to a low dose atrazine metabolite mixture on pubertal timing and prostate development of male Long-Evans rats. **Reproductive Toxicology**, v. 30, p. 540-549, 2010.
- STOKER, T.E.; LAWS, S.C.; GUIDICI, D.L.; COOPER, R.L. The effect of atrazine on puberty in male Wistar rats: Na evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. **Toxicological Sciences**, v. 58, p. 50-59, 2000.
- SUZAWA, M.; INGRAHAM, H.A. The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non-steroidal NR5A nuclear receptors in fish and mammalian cells. **Public Library of Science One**, v. 3, n. 5, 2008.
- SVENSSON, K.; JUST, A.C.; FLEISCH, A.F.; SANDERS, A.P.; TAMAYO-ORTIZ, M.; BACCARELLI, A.A.; WRIGHT, R.; TÉLLEZ-ROJO, M.M.; WRIGHT, R.; BURRIS, H.H. Prenatal salivary sex hormone levels and

- birth weight-for-gestational age. **Journal of Perinatology**, v. 39, n. 7, p. 941-948, 2019.
- TAN, H.; WU, G.; WANG, S.; LAWLESS, J.; SINN, A.; CHEN, D.; ZHEONG, Z. Prenatal exposure to atrazine induces cryptorchidism and hypospadias in F1 male mouse offspring. **Birth Defects Research**, v. 113, n. 6, p. 469-484, 2021.
- TEODOROV, E.; MORAES, A.P.; FELICIO, L.F.; VAROLLI, F.M.; BERNARDI, M.M. Perinatal maternal exposure to picrotoxin: effects on sexual behavior in female rat offspring. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 81, p. 935-942, 2005.
- THOMPSON, L.P.; AL-HASAN, Y. Impact of oxidative stress in fetal programming. **Journal of Pregnancy**, v. 582748, p. 1-8, 2012.
- THÖRNQVIST, P.O.; HÖGLUND, E.; WINBERG, S. Natural selection constrain personality and brain gene expression differences in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Experimental Biology**, p. 1077-1083, 2015.
- TOERING, T.J.; GANT, C.M.; VISSER, F.W.; VAN-DER-GRAAF, A.M.; LAVERMAN, G.D.; DANSER, A.H.J.; FAAS, M.M.; NAVIS, G.; LELY, A.T. Sex Differences in Renin-Angiotensin-Aldosterone System Affect Extracellular Volume in Healthy Subjects. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 314, n. 5, p. 873-878, 2018.
- TRENTACOSE, S.V.; FRIEDMANN, A.S.; YOUKER, R.T.; BRECKENRIDGE, C.B.; ZIERKEIN, B.R. Atrazine effects on testosterone levels and adrogen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 142-148, 2001.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Atrazine Background**. US EP: Washington DC, USA, 2008.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Triazine cumulative human health risk assessment**. 2018. Disponível em: <[http://rs-files.itrcweb.org/6880/EPA%202006g\(triazine_cumulative_risk.pdf\).pdf](http://rs-files.itrcweb.org/6880/EPA%202006g(triazine_cumulative_risk.pdf).pdf)>. Acesso em: 26 set. 2020.
- VANDENBERG, L.N.; COLBORN, T.; HAYES, T.B.; HEINDEL, J.J.; JACOBS, D.R.; SHIODA D.L.T.; SOTO, A.M.; VOM SAAL, F.S.; WELSHONS, W.V.; ZOELLER, R.T.; MYERS, J.P. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. **Endocrine Reviews**, v. 33, n. 3, p. 378-455, 2012.
- VICTOR-COSTA, A.B.; BANDEIRA, S.M.; OLIVEIRA, A.G.; MAHECHA, G.A.; OLIVEIRA, C.A. Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to Atrazine. **Reproductive Toxicology**, v. 29, p. 323-331, 2010.
- WAGNER, U.; SCHELBUSH, H.; VEN, K.V.D.; VEN, H.V.D.; KREBS, D. Detection of phosphate ester pesticides and the triazine herbicide atrazine in human milk, cervical mucus, follicular and sperm fluid. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 33, p. 77-78, 1990.
- WANG, F.; YANG, Q.W.; ZHAO, W.J.; DU, Q.Y.; CHANG, Z.J. Effects of short-time exposure to atrazine on miRNA expression profiles in the gonad of common carp (*Cyprinus carpio*). **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, 2019.
- WERTMAN, V.; GROMOVA, A.; SPADA, A.R.L. CORTES, C.J. Low-Cost Gait Analysis for Behavioral Phenotyping of Mouse Models of Neuromuscular Disease. **Journal of Visualized Experiments**, v. 149, p. 1-6, 2019.

- WETZEL, L.T.; LUEMPERT, L.G.; BRECKENRIDGE, C.B.; TISDEL, M.O.; STEVENS, J.T.; THAKUR, A.K.; EXTROM, P.J.; ELDRIDGE, J.C. Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. **Journal of Toxicological Environmental Health**, v.43, p. 169-182, 1994.
- WIRBISKY, S.E.; FREEMAN, J.L. Atrazine exposure and reproductive dysfunction through the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis. **Toxics**, v. 3, p. 414-450, 2015.
- WIRBISKY, S.E.; SEPÚLVEDA, M.S.; WEBER, G.J.; JANNASCH, A.S.; HORZMANN, K.A.; FREEMAN, J.L. Embryonic atrazine exposure elicits alterations in genes associated with neuroendocrine function in adult male zebrafish. **Toxicological Sciences**, v. 153, p. 149-164, 2016b.
- WIRBISKY, S.E.; WEBER, G.J.; SCHLOTMAN, K.E.; SEPÚLVEDA, M.S.; FREEMAN, J.L. Embryonic atrazine exposure alters zebrafish and human miRNAs associated with angiogenesis, cancer, and neurodevelopment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 98, p. 25-33, 2016a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Atrazine and its metabolites in drinking-water**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, p. 1–23, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for drinking-water quality**. 4 ed. 2017. p. 318-320. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254637/9789241549950-eng.pdf;jsessionid=3FCA37069207D6A3E9B5117CCD3A1AE9?sequence=1>>. Acesso em: 01 out. 2020.
- YAMAMOTO, P.K.; SOUZA, T.A.; ANTIORIO, A.T.F.B.; ZANATTO, D.A.; GARCIA-GOMES, M.S.A.; ALEXANDRE-RIBEIRO, S.R.; OLIVEIRA, N.S.; MENCK, C.F.M.; BERNARDI, M.M.; MASSIRONI, S.M.G.; MORI, C.M.C. Genetic and behavioral characterization of Kmt2d mouse mutant, a new model for Kabuki Syndrome. **Genes, Brain and Behavior**, p. 1-12, 2019.
- ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; SANDINI, T.M.; ABREU, G.R.; PETROCELLI, B.M.; MOREIRA, N.; REIS-SILVA, T.M.; LEBRUM, I.; FLÓRIO, J.C.; RICCI, E.L.; FUKUSHIMA, A.R.; WAZIRY, P.A.F.; SPINOSA, H.S. Prolonged exposure of rats to varenicline increases anxiety and alters serotonergic system, but has no effect on memory. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.181, p.1–8, 2019.
- ZIMMERMAN, A.D.; MACKAY, L.; KEMPPAINEN, R.J.; JONES, M.A.; READ, C.C.; SCHWARTZ, D.; FORADORI, C.D. The Herbicide Atrazine Potentiates Angiotensin II-Included Aldosterone Synthesis and Release from Adrenal Cells. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 2021.

9 ANEXOS

9.1 Artigo publicado



REVIEW ARTICLE

Integrative Review: Verification of the Influence of Atrazine Exposure on Behavioral, Neurochemical and Parkinson's Disease Disorders

Lorena Pantaleon¹, Andre Rinaldi Fukushima¹⁻³, Leonardo Ribeiro de Paula¹, Guilherme Mendes Ribeiro¹, Beatriz do Prado Pacca⁴, Juliana Weckx Pena Munoz³, Helenice de Souza Spinosa^{1*} and Esther Lopes Ricci^{1,5}

¹Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnia, University of Sao Paulo, Sao Paulo / SP, Brazil

²School of Health Sciences IGESP, Rua da Consolacao, Sao Paulo, Brazil

³University Center of the Americas FAM - Sao Paulo, Brazil

⁴University of Sao Caetano do Sul, Sao Paulo, Brazil

⁵Institute of Health Sciences, Universidade Presbiteriana Mackenzie, Rua da Consolação, São Paulo / SP, Brazil