

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MARIA APARECIDA DE LIMA OLIVEIRA**

**O CONSUMO MATERNO PERINATAL DE HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO  
PREJUDICA O NEURODESENVOLVIMENTO COMPORTAMENTAL DA PROLE.**

**Alfenas/MG**

**2021**

MARIA APARECIDA DE LIMA OLIVEIRA

O CONSUMO MATERNO PERINATAL DE HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO  
PREJUDICA O NEURODESENVOLVIMENTO COMPORTAMENTAL DA PROLE.

Dissertação de mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Cardoso Vilela Giusti.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hudsara Aparecida de Almeida Paula.

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Oliveira, Maria Aparecida de Lima.  
O48c O consumo materno perinatal de herbicida à base de glifosato  
prejudica o neurodesenvolvimento comportamental da prole. /  
Maria Aparecida de Lima Oliveira. -- Alfenas/MG, 2021.  
90f.: il. –

Orientadora: Fabiana Cardoso Vilela Giusti.  
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à  
Saúde) -Universidade Federal de Alfenas, 2021.  
Bibliografia.

1. Agroquímicos. 2. Comportamento. 3. Gravidez. 4.  
Lactação. 5. Transtornos do espectro autista. I. Giusti, Fabiana  
Cardoso Vilela. II. Título.

CDD-612.8

**MARIA APARECIDA DE LIMA OLIVEIRA**

**O CONSUMO MATERNO PERINATAL DE HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO  
PREJUDICA O NEURODESENVOLVIMENTO COMPORTAMENTAL DA PROLE.**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e comportamento.

Aprovada em: 19 de novembro de 2021

Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

Instituição: Universidade Paulista - UNIP

Prof. Dr. Lucas César Pinheiro

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Cezar Pinheiro, Professor (a) Visitante**, em 24/11/2021, às 16:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Cardoso Vilela Giusti, Usuário Externo**, em 24/11/2021, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Berti Kirsten, Usuário Externo**, em 25/11/2021, às 09:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0619018 e o código CRC 7605F3E9.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Enilda e José Jucemar, apenas devo gratidão pelo amor incondicional, confiança e incentivo. Sem o companheirismo e apoio por eles dado, jamais teria chegado até aqui.

Aos amigos que conquistei durante os anos de universidade, Júlia, Viviane, Gabi e Lívia, e, em especial, à Francielle que sempre foi a pessoa com quem compartilhei alegrias e dificuldades, que esteve ao meu lado mesmo com toda distância.

Aos amigos que conquistei durante o mestrado, Josiane, Luana, Jádina, Tati e também a todos do grupo que de alguma forma estiveram ao meu lado e me auxiliaram a chegar até aqui.

Aos amigos do Frifas, Luck, Barb, Camila, Samara e Aline que, embora nunca tenham estado presentes fisicamente, fizeram parte das horas de descontração e me ajudaram nos momentos pesados da jornada.

À minha orientadora, professora Fabiana Cardoso Vilela Giusti, que foi, além de orientadora, uma amiga e também mãe, compreendendo os momentos difíceis e estando ao meu lado para comemorar as vitórias. É ela a mente brilhante por detrás de cada pedacinho deste trabalho e é a ela a quem devo gratidão por todos os infinitos ensinamentos e pela confiança.

Ao professor Alexandre Giusti-Paiva, pelos ensinamentos e por toda confiança.

À minha coorientadora, Hudsara Aparecida de Almeida Paula com quem, desde a graduação, tenho aprendido e evoluído não apenas profissionalmente, mas como ser humano.

Agradeço ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Deus, por ter colocado em meu caminho pessoas incríveis que estiveram comigo em mais uma conquista e pela oportunidade, perseverança que me foram dadas mesmo em tempos tão difíceis.

## RESUMO

O aumento crescente do uso de agrotóxicos tem preocupado a população. Os herbicidas à base de glifosato (HBG) são os principais agrotóxicos comercializados no Brasil e no mundo. Estudos tentam esclarecer os impactos trazidos pelo consumo destas substâncias presentes, principalmente, nos alimentos. Entre as consequências já descritas está o câncer, estresse oxidativo, depressão e ansiedade. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do consumo perinatal de HBG por ratas *Wistar* e as alterações neurocomportamentais na prole que caracterizem sintomas típicos do autismo e, por fim, buscar pelas hipóteses mecânicas responsáveis pelas alterações sofridas. Para isso, ratas *Wistar* prenhes receberam HBG, Zapp QI 620 via gavagem durante a gestação e lactação. Nossos resultados demonstraram que as ratas progenitoras do grupo glifosato tiveram uma redução no ganho de peso durante o 16º e 19º dia de lactação. Durante a avaliação do comportamento materno, estas ratas também apresentaram um aumento da exploração sem filhotes. No teste de campo aberto, ratas do grupo glifosato demonstraram um aumento da distância percorrida total. Quanto aos filhotes, fêmeas glifosato tiveram uma redução do ganho de peso no 28º dia pós-natal quando comparadas aos machos do mesmo grupo. Machos glifosato tiveram uma redução no nº de VUS. Fêmeas glifosato tiveram aumento do nº de imersões com a cabeça nos furos do aparato no teste de placa com furos. Fêmeas e machos glifosato tiveram redução no comportamento de brincadeira. No teste de reconhecimento de objetos, machos glifosato aumentaram o tempo de exploração do objeto familiar e reduziram o índice de reconhecimento de objetos no teste de 2 e 24 horas. Proteínas ligadas à neurogênese e conexões sinápticas tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), *Doublecortin* (DCX) e Sinaptofisina foram quantificados por meio da técnica de *Western Blotting*, porém não foram encontradas diferenças entre os grupos na expressão de nenhuma das proteínas analisadas. Sendo assim, conclui-se que o consumo de HBG por ratas *Wistar* durante o período perinatal pode ocasionar alterações neurocomportamentais semelhantes ao autismo na prole.

Palavras-chave: Agroquímicos; Comportamento; Gravidez; Lactação; Transtorno do espectro autista.

## ABSTRACT

The increasing use of pesticides has worried the population. Glyphosate-based herbicides (GBH) are the main pesticides sold in Brazil and worldwide. Studies try to clarify the impacts brought about by the consumption of these substances present, mainly in food. Among the consequences already described are câncer, oxidative stress, depression and anxiety. Therefore, it was believed to be pertinent to investigate whether an GBH would be able to induce behavior similar to autism, since the prevalence of the disease has grown alarmingly worldwide, as well as the use of pesticides. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of perinatal consumption of GBH by Wistar rats and the neurobehavioral alterations in offspring that characterize typical symptoms of autism and, finally, to search for the molecular mechanisms responsible for the alterations suffered. For this, pregnant Wistar rats received GBH, Zapp QI 620, by gavage during pregnancy and lactation. Our results showed that the glyphosate had a reduction in weight gain of the dams during the 16th and 19th day of lactation. During the assessment of maternal behavior, these dams also showed an increase in exploration without offspring. Finally, when evaluated in the open field test, the dams from the glyphosate group showed an increase in the total distance walked. As for the offspring, glyphosate females had a reduction in weight gain on the 28th postnatal day when compared to males in the same group. Glyphosate males had a reduction in the number of VUS, while glyphosate females had an increase in the repetitive behavior observed by the increase in the number of head dips in the hole board test. Glyphosate females and males had reduced play behavior. In the object recognition test, male glyphosate increased the familiar object exploration time and reduced the object recognition index in the 2 and 24 hours test. Proteins linked to neurogenesis and synaptic connections such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Doublecortin (DCX) and Synaptophysin were quantified using the Western Blotting technique, but no differences were found between groups in the expression of any of the analyzed proteins. Based on the results presented, it's concluded that the consumption of HBG by Wistar rats during the perinatal period can cause neurobehavioral changes similar to autism in offspring.

Keywords: Agrochemicals; Autism spectrum disorder; Behavior; Lactation; Pregnancy.

## LISTA DE FIGURAS E QUADRO

Figura 1 - Delineamento do grupo experimental dos testes comportamentais .....	30
Figura 2 - Delineamento experimental .....	33
Figura 3 - Ganho de peso durante o período gestacional e de lactação das ratas progenitoras do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) .....	45
Figura 4 - Percentual dos parâmetros maternos apresentados pelas ratas progenitoras do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) .....	46
Figura 5 - Percentual dos parâmetros não maternos apresentados pelas ratas progenitoras do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) .....	47
Figura 6 - Avaliação da atividade locomotora em campo aberto das ratas progenitoras do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) .....	47
Figura 7 - Ganho de peso da ninhada durante a lactação dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) .....	48
Figura 8 - Ganho de peso dos filhotes fêmeas e machos do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) pós desmame .....	49
Figura 9 - Número de vocalizações ultrassônicas (VUS) apresentadas pelos filhotes machos e fêmeas do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) .....	50
Figura 10 - Avaliação dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) no teste de retorno ao ninho .....	51
Figura 11 - Avaliação dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) no teste de placa de furos.....	52
Figura 12 - Avaliação tempo de comportamento de brincar ( <i>following</i> e <i>Sniffing</i> ) dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) no teste de comportamento de brincar .....	53
Figura 13 - Avaliação dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) no teste de reconhecimento de objetos de 2hrs .....	54
Figura 14 - Avaliação dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) no teste de reconhecimento de objetos de 24hrs .....	56
Figura 15 - Avaliação dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) no teste de campo aberto .....	58
Figura 16 - Expressão do percentual de BDNF/Actina do córtex pré-frontal de fêmeas e machos grupo Controle (n=7) e Glifosato (n=7) .....	59



Figura 17 - Expressão do percentual de DCX/Actina do córtex pré-frontal de fêmeas e machos grupo Controle (n=7) e Glifosato (n=7) .....	60
Figura 18 - Expressão do percentual de Sinaptofisina/Actina do córtex pré-frontal de fêmeas e machos grupo Controle (n=7) e Glifosato (n=7) .....	61
Quadro 1 - Resumo dos resultados obtidos .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLO

AMPA	Aminometilfosfônico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
C	Controle
CM	Comportamento materno
CYP	Citocromo P450
DCX	<i>Doublecortin</i>
EPSPS	5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
G	Glifosato
GD	Dia gestacional
GOX	Glifosato oxidorreductase
HBG	Herbicida à Base de Glifosato
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LPS	Lipopolissacarídeo
NOAEL	Limites do nível sem efeitos adversos observáveis
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PND	Dia pós-natal
PTEN	Subconjunto de neurônios que possui papel crítico sobre o utismo
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SYP	Gene codificador da sinaptofisina
SHANK	Genes estudados no autismo
TEA	Transtorno do espectro autista
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
VPA	Ácido valpróico
VUS	Vocalizações Ultrassônicas

®

Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1	GLIFOSATO.....	16
2.2	TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA).....	20
2.3	MODELOS COMPORTAMENTAIS PARA ESTUDO DE SINTOMAS SEMELHANTES AO TEA.....	23
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4.2.1</b>	<b>Ratas progenitoras .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Filhotes.....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
5.1	ANIMAIS.....	29
5.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	29
5.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
5.4	ACASALAMENTO.....	34
5.5	ADMINISTRAÇÃO DE HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO.....	34
5.6	ACOMPANHAMENTO DO GANHO DE PESO DAS MÃES E SUA PROLE.....	34
5.7	PADRONIZAÇÃO DA NINHADA.....	35
5.8	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DAS RATAS PRENHES.....	35
<b>5.8.1</b>	<b>Comportamento materno.....</b>	<b>35</b>
<b>5.8.2</b>	<b>Campo aberto.....</b>	<b>36</b>
5.9	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DA PROLE.....	36
<b>5.9.1</b>	<b>Vocalizações ultrassônicas (VUS) .....</b>	<b>36</b>
<b>5.9.2</b>	<b>Retorno ao ninho.....</b>	<b>37</b>
<b>5.9.3</b>	<b>Placa de furos.....</b>	<b>37</b>
<b>5.9.4</b>	<b>Comportamento de brincar.....</b>	<b>38</b>
<b>5.9.5</b>	<b>Teste de reconhecimento de objetos.....</b>	<b>38</b>
<b>5.9.6</b>	<b>Campo aberto.....</b>	<b>39</b>
<b>5.9.7</b>	<b>Western Blotting.....</b>	<b>39</b>

6	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</b>	<b>42</b>
7	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
7.1	RESULTADOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS E GANHO DE PESO CORPORAL DAS MÃES.....	43
7.1.1	<b>Avaliação do ganho de peso das ratas prenhes durante o período gestacional e de lactação.....</b>	<b>43</b>
7.1.2	<b>Comportamento materno.....</b>	<b>44</b>
7.1.3	<b>Teste de campo aberto das mães.....</b>	<b>46</b>
7.2	RESULTADOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS E GANHO DE PESO CORPORAL DA PROLE.....	47
7.2.1	<b>Ganho de peso das ninhadas e dos filhotes.....</b>	<b>47</b>
7.2.2	<b>Vocalizações ultrassônicas .....</b>	<b>49</b>
7.2.3	<b>Retorno ao ninho (<i>Homing Behavior</i>) .....</b>	<b>50</b>
7.2.4	<b>Placa de furos (<i>Hole Board</i>) .....</b>	<b>51</b>
7.2.5	<b>Comportamento de brincar (<i>Play Behavior</i>) .....</b>	<b>52</b>
7.2.6	<b>Reconhecimento de objetos.....</b>	<b>53</b>
7.2.7	<b>Teste de campo aberto com filhotes.....</b>	<b>57</b>
7.2.8	<b><i>Western blotting</i> .....</b>	<b>59</b>
7.2.9	<b>Resumo dos resultados.....</b>	<b>61</b>
8	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
8.1	DISCUSSÃO DOS TESTES COMPORTAMENTAIS E GANHO DE PESO CORPORAL DAS MÃES .....	63
8.1.1	<b>Ganho de peso das ratas prenhes durante o período gestacional e de lactação.....</b>	<b>63</b>
8.1.2	<b>Comportamento materno .....</b>	<b>64</b>
8.1.3	<b>Campo aberto das mães .....</b>	<b>65</b>
8.2	DISCUSSÃO DOS TESTES COMPORTAMENTAIS E GANHO DE PESO CORPORAL DA PROLE.....	67
8.2.1	<b>Ganho de peso das ninhadas e dos filhotes.....</b>	<b>67</b>
8.2.2	<b>Vocalizações ultrassônicas.....</b>	<b>68</b>
8.2.3	<b>Retorno ao ninho (<i>Homing Behavior</i>).....</b>	<b>69</b>
8.2.4	<b>Placa de furos (<i>Hole Board</i>).....</b>	<b>71</b>
8.2.5	<b>Comportamento de brincar (<i>Play Behavior</i>).....</b>	<b>72</b>
8.2.6	<b>Reconhecimento de objetos.....</b>	<b>73</b>

8.2.7	Teste de campo aberto com filhotes.....	74
8.2.8	<i>Western blotting</i> .....	75
9	CONCLUSÃO .....	80
	REFERÊNCIAS.....	81
	ANEXO A .....	90

## 1 INTRODUÇÃO

Nos anos de 1960, a chamada revolução verde propunha um novo modelo de produção agrícola para atenuar o problema da fome em escala mundial. A base desta revolução consistia em modernizar as técnicas agrícolas para então alcançar uma maior produção a fim de que todas as pessoas tivessem acesso a alimentação. A modernização se baseava no uso de adubos, de sementes selecionadas, na mecanização do trabalho e, por fim, no uso de agrotóxicos, pregando máxima produção com menores investimentos (SERRA *et al.* 2016).

Com o passar dos anos, embora a revolução verde não tenha sido capaz de sanar o problema da fome, ela de fato impulsionou a produção agrícola mundial, trazendo consigo outras consequências. As indústrias viram na agricultura uma forma de reproduzir seu capital e, desta maneira intensificou-se cada vez mais a mecanização do trabalho, ocasionando o que hoje chamamos de desemprego estrutural, além disso, o uso de sementes transgênicas fizeram com que a agricultura desprezasse o uso das sementes crioulas. Por fim, o uso cada vez maior de agrotóxicos para garantir uma lavoura livre de pragas vem ocasionando, aos poucos, a infertilidade dos solos, a contaminação de mananciais, do ar, dos trabalhadores expostos a estas substâncias e de toda a população que consome os alimentos produzidos por meio deste sistema feroz de produção mundial (SCHNEIDER; ESCHER, 2011).

No Brasil a produção agrícola cresceu tanto que desde 2016 o país figura entre os três maiores exportadores agrícolas do planeta, sendo considerado assim uma grande potência mundial no setor (VASCONCELOS, 2018). Neste sentido, além da alta taxa de exportação, o país tem se destacado também pelo aumento crescente do uso de agrotóxicos visando, entre outras coisas, o alto índice de produção de alimentos e o lucro das indústrias agroquímicas (FAO, 2018; LONDRES, 2011). Além disso, o aumento do uso de agrotóxicos não tem ocorrido apenas em território brasileiro, mas também ao redor do mundo, o que torna a exposição a essas substâncias um problema de saúde global, levando a população a uma situação de insegurança alimentar (BAI; OGBOURNE, 2016; WHO, 2010).

Enquanto o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93% nos últimos anos, o mercado brasileiro cresceu 190%, sendo que no primeiro semestre de 2019 foram registrados no país 262 novos agrotóxicos a serem liberados, valor superior ao mesmo

período de 2018, quando foram registrados 234 agrotóxicos (BRITO, 2019; CARNEIRO *et al.*, 2015).

Entre os ingredientes ativos dos agrotóxicos registrados, figuram nomes já conhecidos como o glifosato, principal ingrediente ativo do Roundup<sup>®</sup>, um herbicida de amplo espectro utilizado para controlar o crescimento de plantas daninhas em áreas cultivadas (BRASIL, 2019). O glifosato é o principal herbicida consumido no Brasil e no mundo e, além do Roundup<sup>®</sup>, o glifosato é comercializado com vários outros nomes, como Direct<sup>®</sup>, Gliato<sup>®</sup>, Glifos<sup>®</sup> e Glifogan<sup>®</sup> (ANDREI, 2009; IBAMA, 2019). Em 2017 foram comercializadas 540 mil toneladas de agrotóxicos no país e 32% deste valor, o que corresponde a cerca de 173 mil toneladas é referente apenas à comercialização do ingrediente ativo glifosato (IBAMA, 2019).

Algumas autoridades e entidades negam que o consumo de agrotóxicos como o glifosato seja realmente capaz de causar prejuízos à saúde, por outro lado, estudos já tem demonstrado a algum tempo as consequências trazidas por estas substâncias (ANVISA, 2018). Entre as implicações causadas pelos herbicidas à base de glifosato, estudos epidemiológicos relatam seu potencial carcinogênico, alguns estudos *in vitro* ressaltam um poder apoptótico e, por fim, estudos *in vivo* com modelo animal revelam que a substância atua desregulando o sistema endócrino, causando teratogênese, retardando o desenvolvimento do sistema reprodutivo dos animais e desencadeando estresse oxidativo, acarretando assim um prejuízo na neurogênese e no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (CATTANI, 2017; DALLEGRAVE, *et al.*, 2007; DE ROOS *et al.*, 2003; PAGANELLI *et al.*, 2010; SOUZA, *et al.*, 2017).

Neste sentido, visto a relação entre o consumo dos pesticidas e o surgimento de danos neuronais, passou-se a avaliar os prejuízos comportamentais que podem ser causados pelo glifosato. Desta maneira, alguns estudos ressaltam que animais adultos que consumiram a substância apresentam comportamento do tipo depressivo e ansioso (CATTANI *et al.*, 2014; FUJIWARA, *et al.*, 2011).

Ainda sobre a questão comportamental, é importante ressaltar que alguns estudos epidemiológicos têm sugerido que o transtorno do espectro autista (TEA) possa ocorrer com maior frequência em filhos de mães expostas ao glifosato no período pré-natal (EHRENSTEIN *et al.*, 2019). Isso, pois, o herbicida é capaz de atravessar a barreira placentária durante o período gestacional e causar danos à criança (CATTANI, 2017). Além disso, evidências relacionam o mecanismo de ação do herbicida glifosato ao funcionamento prejudicado do intestino humano, o que



acarretaria um comprometimento na homeostase de alguns neurotransmissores e outros componentes fisiológicos que, ao fim do processo, conduziriam ao surgimento do TEA (SAMSEL; SENEFF, 2013).

Desta maneira, partindo do princípio que os agrotóxicos são capazes de induzir danos neuronais, estruturais, comportamentais, de atravessar a barreira placentária e de se acumularem no leite materno, e que, são necessárias maiores evidências que auxiliem na compreensão da etiologia do TEA, haja vista que estudos retrospectivos com humanos sugerem que a exposição ao glifosato relaciona-se ao surgimento do transtorno, o objetivo deste trabalho é estudar o efeito da administração subcrônica do herbicida à base de glifosato, sobre o comportamento de ratas prenhes bem como sobre o desenvolvimento neurocomportamental de sua prole a fim de avaliar a presença de comportamentos que caracterizem o TEA.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GLIFOSATO

O glifosato, composto de nome químico N-(fosfometil) glicina e de fórmula molecular  $C_3H_8NO_5P$  é um herbicida não-seletivo, de ação sistêmica, pertencente à classe química dos organofosforados que pode ser utilizado não apenas na agricultura para controlar uma ampla variedade de plantas daninhas nas áreas cultivadas, mas também no ambiente urbano e doméstico (GUYTON *et al.*, 2015). Nas plantações, o herbicida é registrado para uso em 26 tipos de culturas entre elas culturas de frutas, vegetais, arroz, milho, soja, cana-de-açúcar e algodão, além disso, a substância é utilizada também na silvicultura e em pastagens (OGA *et al.*, 2008).

O herbicida foi sintetizado pela primeira vez pelo químico suíço Henri Martin em 1950 enquanto o mesmo trabalhava em uma pequena indústria farmacêutica, cujo nome era Cilag, porém, naquela época, a substância não tinha nenhuma aplicação. Em 1959, a indústria foi vendida para a Johnson & Johnson que, revendeu algumas de suas pesquisas para a Aldrich Química, estando o glifosato incluído nesta venda. No ano seguinte, a Aldrich Química repassou pequenas quantidades da substância para diversas indústrias farmacêuticas, entre elas a Monsanto que, ao testar a substância, percebeu suas atividades sobre as plantas daninhas e então desenvolveu cerca de 100 substâncias análogas ao glifosato (NANDULA, 2010).

Em 1971 a Monsanto introduziu o glifosato no mercado e a partir de então a substância passou a ser comercializada sob três diferentes formas, o glifosato-isopropilamônico, o glifosato-trimesium, patenteado pela Syngenta e, por fim, o glifosato-sesquisódio patenteado pela Monsanto e vendido com o nome popular Roundup®. No Brasil, além do Roundup®, o glifosato é comercializado com diversos outros nomes, e todas suas formulações contêm ingredientes que tem como função potencializar a ação do glifosato (AMARANTE JUNIOR; SANTOS, 2002).

Desta maneira, tais ingredientes contribuem para que o herbicida seja conhecido pela eficácia de sua ação. Neste sentido, o mecanismo através do qual atua o glifosato é baseado na inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), responsável pela biossíntese de ácido corísmico, que é um mediador da síntese de aminoácidos aromáticos essenciais em vegetais como a fenilalanina, tirosina e o triptofano. Desta maneira, ao inibir-se a enzima EPSPS, o

crescimento das plantas é igualmente inibido já que outros produtos como lignina, alcalóides, flavonóides, ácidos benzóicos e vitamina K são dependentes dos aminoácidos aromáticos essenciais. Sendo assim, em semanas ou até mesmo em poucos dias a substância é capaz de matar as plantas daninhas (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Ao considerar seu mecanismo de ação, é importante ressaltar que o glifosato, quando em contato com o solo passa por uma série de transformações como, por exemplo a degradação de sua molécula e a formação de alguns metabólitos (FORLANI *et al.*, 1999). A principal via de degradação da molécula de glifosato resulta no metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) por ação da enzima glifosato oxidoredutase (GOX) que cliva ligações carbono-nitrogênio (C-N). Uma via alternativa à formação de AMPA produz sarcosina e posteriormente glicina. Contudo, a produção do metabólito AMPA tem despertado um olhar mais atento dos pesquisadores já que recentemente o metabólito foi reconhecido pelo seu efeito tóxico, porém ainda são necessários mais estudos para confirmar essa ação (CATTANI, 2017).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), apresentou em 2005 um relatório referindo-se à toxicidade do glifosato e do AMPA. No relatório, a FAO menciona principalmente o acúmulo de resíduos advindos destas substâncias na cadeia alimentar, mas ressalta que o glifosato não coloca a saúde em risco se seu consumo diário máximo for de 1 mg/kg de peso corpóreo (BAI; OGBOURNE, 2016). Ainda neste sentido, na bula dos produtos da linha Roundup® disponibilizada no site pertencente à Monsanto, a classificação toxicológica dos herbicidas à base de glifosato alterna entre nível III (medianamente tóxico), possuindo também produtos que se enquadram na classificação II (altamente tóxico) e, por fim, a linha possui produtos de classificação I (extremamente tóxico) (ROUNDUP, 2018).

Desta maneira, a segurança do glifosato tem sido questionada em diversos estudos. A toxicidade causada pela exposição aguda ao produto ocasiona em humanos sintomas como dermatite de contato, conjuntivite, edema orbital, pneumonite, lesão de mucosas, enjoo, vômito, entre outros sintomas (AMARANTE JUNIOR, SANTOS, 2002). Enquanto isso, pesquisas com modelos animais, revelam que a exposição crônica ao herbicida leva à toxicidade hepática, neurotoxicidade, toxicidade reprodutiva, teratogeneicidade, tumoregenicidade, carcinogenicidade, e por fim, disfunção endócrina. Além destes prejuízos, estudos retrospectivos e com modelos animais sugerem que o herbicida glifosato possa conduzir ao TEA por vias

neuroendócrinas e metabólicas, assunto que será melhor abordado no tópico 2.2 (SAMSEL; SENEFF, 2013).

Em relação às consequências hepatóxicas, Mesnage e colaboradores (2017), expôs ratos *Sprague-Dawley* de 5 semanas de idade a uma dose de 4 ng/kg/dia de glifosato por 2 anos. Ao final do estudo, os autores observaram que a exposição crônica mesmo que a baixas doses de glifosato foi capaz de ocasionar alterações anatomopatológicas no tecido hepático, bem como acúmulo de triglicerídeos. Já com relação à toxicidade reprodutiva, Dallegrave e colaboradores (2007) mostrou que a administração de Roundup® por gavagem em diferentes doses (0, 50, 150 e 450 mg/kg) em ratas fêmeas durante o período de gestação e lactação, embora não tenha conduzido as ratas prenhes à toxicidade, retardou a abertura do canal vaginal dos filhotes em todas as doses e atuou diminuindo a espermatogênese e os níveis de testosterona de ratos machos durante a vida adulta. Schimpf e colaboradores (2017) ressaltaram que a exposição pós-natal de ratos a uma dose de 2 mg/kg de glifosato dissolvido em salina e administrado por via subcutânea a cada 48h entre os dias pós-natal 1 (PND1) ao 7(PND7) foi capaz de alterar a morfologia uterina e a expressão de proteínas envolvidas no desenvolvimento e diferenciação uterina.

Quanto à carcinogenicidade, Wang e colaboradores (2019), mostrou que a adição de 1g/L de glifosato na água fornecida a camundongos durante um período de 72 semanas foi capaz de promover a progressão de mieloma múltiplo, um tipo de câncer que afeta a medula óssea, além de aumentar o risco do surgimento de Linfoma não-Hodgkin, que é um tipo de câncer raro que surge nas células do sistema linfático. Em 2015, o glifosato foi classificado como potencialmente carcinogênico pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), afirmação que se baseou em estudos que envolviam tanto formulações à base de glifosato quanto o ingrediente ativo isolado (GUYTON *et al.*, 2015).

Com relação à disrupção endócrina, Souza e colaboradores (2017) mostrou que ratas prenhes tratadas por gavagem com diferentes doses de glifosato (5 e 50 mg/kg/dia) do dia gestacional 18 (GD18) ao PND5 ocasionou mudança nos níveis de hormônio estimulante da tireoide (TSH) por meio de alterações causadas no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.

O efeito teratogênico causado pelo herbicida à base de glifosato é evidenciado por um estudo epidemiológico realizado no Paraguai, onde foram analisados 139 recém-nascidos que apresentavam algum tipo de malformação. Às mães destas

crianças, foi aplicado um questionário a fim de identificar formas de contato com agrotóxicos. Ao final do estudo, foi possível observar um aumento significativo da ocorrência de malformações e defeitos no tubo-neural em filhos de mães que moravam a cerca de 1 km de distância dos locais onde eram aplicados os herbicidas (BENÍTEZ-LEITE; MACCHI; ACOSTA, 2014).

Já com relação à neurotoxicidade, Cattani e colaboradores (2014), mostrou que a exposição de ratas *Wistar* prenhes a 1% de glifosato na água do GD5 ao PND15 é capaz de aumentar a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), ocasionando assim o estresse oxidativo em regiões do cérebro como, por exemplo, córtex, hipocampo e substância nigra. Cattani demonstrou ainda que animais adultos expostos ao herbicida à base de glifosato expressam um comportamento do tipo depressivo e ansioso.

Além disso, estudos prévios com modelo animal ressaltam que a exposição perinatal de ratas ao herbicida glifosato em várias doses (50, 100 e 150 mg/kg/dia) por meio de gavagem é capaz de desencadear efeitos negativos sobre o comportamento materno e também sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole (CAMARGO, 2014). Em concordância com este estudo, Gallegos e colaboradores (2015) também observou que a exposição de ratos durante toda gravidez e lactação a diferentes doses de herbicida à base de glifosato (100 e 200 mg/kg/dia) por meio da água de beber conduz a alterações neurocomportamentais na prole como, por exemplo, comportamento tipo ansioso e dificuldade de locomoção. Seguindo a mesma linha, Rocha *et al*, 2019, encontrou uma redução da atividade dopaminérgica estriatal e um atraso no desenvolvimento dos reflexos dos filhotes quando mães foram expostas via gavagem a diferentes doses de herbicida glifosato (50 e 150 mg/kg/dia) durante GD15 e o PND7.

Desta maneira, ao analisar-se os estudos, é possível perceber que o glifosato, substância básica do herbicida à base de glifosato, merece grande atenção por parte dos pesquisadores. Evidências ressaltando o potencial tóxico do herbicida tem surgido continuamente, porém ainda são necessários estudos para melhor entender a maneira como a substância atua no corpo humano e para então trazer conclusões cada vez mais concretas, principalmente com relação ao surgimento do TEA, já que a doença se tornou recorrente nos dias atuais.

## 2.2 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)

O TEA foi descrito primeiramente por Leo Kanner no início da década de 1940. O médico foi responsável por fazer relatos detalhados de 11 pacientes que apresentavam sintomas como incapacidade de se relacionar com outras pessoas, resistência à mudança, insistência na monotonia além de comportamentos motores estereotipados e a repetição mecânica de frases ouvidas. Ainda naquela época, entre as décadas de 50 e 60, surgiram muitas discussões acerca da etiologia e do diagnóstico da doença, porém poucas teorias foram aceitas e, a maioria delas foi refutada anos mais tarde. Hoje, passados muitos anos após a primeira descrição feita por Kanner na década de 40, o TEA tem definições mais delimitadas com relação aos sintomas e diagnóstico enquanto que sua etiologia permanece ainda sendo intensamente investigada (ZANOLLA *et al.*, 2015).

Neste sentido, o TEA é atualmente considerado uma doença heterogênea, que apresenta vários sinais e sintomas, tais como déficit na comunicação verbal e não verbal, podendo o indivíduo apresentar atraso ou ausência de linguagem, incapacidade de iniciar e manter uma conversa, além disso, autistas apresentam menos expressões faciais e realizam menos contato visual. Há também uma tendência a comportamentos repetitivos e restritivos, onde o indivíduo reproduz frases ouvidas e dedica sua atenção a determinados temas e a características específicas dos objetos, por exemplo. Além disso, o indivíduo enxerga as situações no sentido literal, não apresentando habilidade para compreender pensamentos abstratos. É possível notar ainda a presença de hipo ou hiperatividade frente a estímulos sensoriais como, por exemplo temperatura, dor, sons, texturas e odores. Além disso, dificuldades de aprendizagem e baixo QI são igualmente comuns. É relevante dizer que estas manifestações sofrem variações de indivíduo para indivíduo tanto com relação à intensidade quanto com relação aos tipos de comportamentos apresentados (BERNARDI *et al.*, 2012).

Quanto ao diagnóstico da doença, este pode ser feito antes dos 3 anos de idade tendo em vista que alguns sintomas podem ser percebidos aos 6 meses de vida (CHAKRABARTI; FOMBONNE, 2005). Entre os instrumentos diagnósticos estão entrevistas estruturadas associadas a métodos de observação do comportamento, comunicação e de habilidades sociais onde é possível diferenciar todos os graus de autismo. Estes recursos evoluíram com o passar dos anos e, desta forma, o transtorno

deixou de ser confundido com a esquizofrenia. Além disso, a evolução das técnicas diagnósticas permitiu o conhecimento de dados relativos à prevalência da doença (BERNARDI *et al.*, 2012).

O número de indivíduos com TEA tem aumentado significativamente nos últimos anos e estima-se que atualmente nos Estados Unidos, o transtorno afete 1 em cada 59 crianças (BAIO *et al.*, 2018). Além disso, a proporção do transtorno entre os sexos masculino e feminino é de 4:1, porém existem evidências sugerindo que em mulheres, o transtorno se manifesta de maneira severa (AMERICAN, 2014). No Brasil, os dados sobre a prevalência da doença ainda são escassos, tendo em vista que apenas ano de 2019 foi sancionada a lei que obriga o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a inserir no censo a ser realizado em 2020, perguntas relacionadas ao autismo (BRASIL, 2019).

Em termos etiológicos, permanece o desafio aos pesquisadores. O que estudos ressaltam é que o TEA não possui uma única causa, mas múltiplas, o que dificulta e ao mesmo tempo instiga os estudiosos. Entre as causas citadas até então, está a junção de fatores ambientais, genéticos, imunológicos e neurológicos. Sendo assim, tomando como base estes fatores, é possível citar algumas das principais causas do autismo (BERNARDI *et al.*, 2012).

Entre os principais fatores genéticos ligados à presença da doença está a esclerose tuberosa, a síndrome do X frágil, síndrome de Rett e síndrome de Down. Já com relação aos erros inatos do metabolismo associam-se ao transtorno a deficiência de adenilosuccinase e creatina, além disso, doenças mitocondriais também podem acarretar a presença do transtorno (ZANOLLA *et al.*, 2015).

Já, com relação aos fatores imunológicos ligados ao TEA, estudos dizem que a presença de doenças autoimunes como artrite reumatoide, doença celíaca e diabetes mellitus tipo 1 são recorrentes em mães de filhos autistas, o que sugere que problemas imunológicos presentes na mãe são capazes de afetar o cérebro fetal durante seu desenvolvimento (PATTERSON, 2011).

Ainda com relação aos eventos durante a gestação que podem acarretar o TEA, estão infecções, inflamações, idade avançada da mãe (>35 anos), complicações no pré e pós-parto e depressão materna (ZANOLLA *et al.*, 2015). Tais dados auxiliam na compreensão da importância de se avaliar eventos ocorridos durante a gestação já que estes podem acarretar mudanças de longa duração na estrutura do

desenvolvimento cerebral, comprometendo assim sua função (DANTZER; KELLEY; 2008; KOCOVSKA *et al.*, 2017).

Quando se trata dos fatores ambientais, os pesquisadores têm despendido uma grandiosa atenção. Além dos já citados anteriormente como os eventos relacionados à gestação, outros fatores ambientais associados ao surgimento do TEA são a poluição do ar, fármacos, drogas ilícitas, exposição a metais pesados, cosméticos, detergentes e, por fim, a exposição a inseticidas e herbicidas (SEALEY *et al.*, 2016).

Em seu estudo retrospectivo, Ehrenstein e colaboradores (2019), analisou 2961 indivíduos com diagnóstico de autismo através de dados do Departamento de Desenvolvimento de Serviços da Califórnia. No estudo, Ehrenstein sugere que mulheres que foram expostas a pesticidas à base de glifosato em um raio de 2000 metros do local onde moravam, tornaram-se mães de filhos autistas, diferentemente de mulheres que não passaram pela mesma exposição durante o período gestacional.

Enquanto isso, estudos relatam que a exposição ao glifosato acarreta em disbiose intestinal, conduzindo à episódios de diarreia, sintoma sentido por pacientes autistas. Ainda neste sentido, o glifosato é capaz de agir bloqueando a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais no intestino humano, como por exemplo o triptofano, precursor da serotonina. Sendo assim, a diminuição da serotonina está ligada ao surgimento de depressão, doença que, segundo alguns estudos, quando presente na mãe pode predispor o feto ao TEA, como citado anteriormente. Além destas evidências, estudos relacionam ao autismo a diminuição da absorção de zinco e manganês ocasionadas pelo glifosato. Por outro lado, algumas pesquisas evidenciam também que baixos níveis de vitamina D durante a gravidez pode ocasionar danos no feto como alterações que conduzam à presença do TEA, isso pois, o glifosato é capaz de inativar as enzimas da família Citocromo P450 (CYP), responsáveis por ativar a molécula de vitamina D (SAMSEL; SENEFF, 2013).

Por fim, alguns estudos associam a alteração da plasticidade sináptica no cérebro à presença do TEA. Esses achados levam à hipótese de que fatores como a conectividade neuronal, a formação das sinapses, e a estabilização do circuito neural podem ser um caminho importante a fim de se explicar a patogênese do transtorno (ZATKOVA *et al.*, 2016).

Hoje já temos pistas sobre alguns genes que codificam determinadas proteínas que desempenham um papel crítico no surgimento do TEA. Entre eles temos a família de genes SHANK que codificam proteínas estruturais localizadas na



densidade pós sináptica de sinapses excitatórias, a neurexina e a neuroligin que são proteínas de adesão celular pré-sináptica (WOHR, *et al*, 2011). Ainda temos o gene PTEN que é responsável por regular a via de sinalização intracelular PI3K / AKT / mTOR já conhecida e muito estudada por possuir um papel crítico sobre o surgimento de transtornos do neurodesenvolvimento tal como o TEA (LUGO *et al*, 2014).

Além dessas temos outras proteínas que estão diretamente relacionadas às conexões sinápticas e tem sido estudadas quanto ao seu potencial de intervenção no surgimento do TEA. Entre elas o fator neurotrófico derivado do cérebro, também conhecido como BDNF que é membro da família de neurotrofinas e tem por função o crescimento e diferenciação neuronal ((BARBOSA, 2020; ROSA *et al.*, 2006). Ainda nesse sentido, a proteína *Doublecortin*, também chamada de DCX (nome do gene que a codifica), está diretamente relacionada com a estabilização de microtúbulos, além disso, a DCX é expressa, quase sempre, em neurônios em desenvolvimento e, por esse motivo, ela é considerada um marcador sináptico (CORNELL; TOYO-OKA, 2017). Por fim, a sinaptofisina, uma glicoproteína decodificada pelo gene SYP, está sempre presente nas fendas pré-sinápticas neuronais, ela está envolvida na formação da vesícula sináptica e na exocitose (BATISTA, 2012).

Entre as três últimas proteínas citadas, o BDNF é o mais estudado, seguido pela sinaptofisina e, por fim o DCX. Alguns estudos já relacionam o surgimento de transtornos do neurodesenvolvimento com alterações nos níveis dessas proteínas, reforçando a necessidade de se continuar investigando os mecanismos entrelaçados ao surgimento do TEA (STEPHENSON *et al.*, 2011; SCATTONI *et al.*, 2013; JASIEN *et al.*, 2014; DAIMON *et al.*, 2015).

As evidências encontradas pelos pesquisadores até então ressaltam a importância de prosseguir os estudos a fim de esclarecer melhor as influências dos fatores dos quais a população é exposta diariamente sobre doenças que se fazem cada dia mais presentes e que ainda não estão bem esclarecidas como o TEA

### 2.3 MODELOS COMPORTAMENTAIS PARA ESTUDO DE SINTOMAS SEMELHANTES AO TEA

Atualmente, os modelos de experimentação animal são parte indispensável para o entendimento de inúmeras patologias e contribuem, em última instância, para o desenvolvimento da medicina moderna (SCHOR; BOIM, 2008). Várias doenças

psiquiátricas podem ser estudadas por meio destes modelos, entre elas, o autismo. Nesta última, os modelos animais com roedores são os mais comuns e são capazes de auxiliar na compreensão das bases neurofisiológicas da doença bem como sua etiologia (BERNARDI *et al.*, 2012).

Já com relação aos exemplos de indução de sintomas semelhantes ao autismo em animais, quatro modelos podem ser utilizados tais como aqueles baseados em alterações genéticas específicas (PATTERSON *et al.*, 2011), modelos de linhagens geneticamente selecionadas que tem como característica principal animais com presença da alteração no comportamento de sociabilidade (SCATTONI *et al.*, 2008), modelos que baseiam-se em lesões estruturais de regiões do cérebro como a região límbica, o hipocampo ventral e a amígdala (DAENEN *et al.*, 2002) e, por fim, modelos que tomam como base a exposição de animais a drogas ou até mesmo a agentes patogênicos durante o período gestacional (DUFOR-RAINFRAY *et al.*, 2010).

Dentre os testes realizados com roedores para caracterizar sintomas semelhantes ao autismo está o teste de placa de furos (*hole-board*), o teste de reconhecimento de objetos, gravações de emissões de vocalizações ultrassônicas, retorno ao ninho (*homing behavior*) e o teste de comportamento de brincar (*play behavior*) (BASSI *et al.*, 2012). Estes testes ajudam a identificar comportamentos tais como a dificuldade de comunicação e baixa interação social, além da presença de comportamentos repetitivos e restritivos, características semelhantes aos padrões comportamentais de um indivíduo autista (BATISTA; GIUSTI-PAIVA; VILELA, 2018).

Em relação ao teste de gravações de emissões de vocalizações ultrassônicas, sabe-se que as vocalizações emitidas pelos animais são parte essencial do processo de interação social entre a mãe e o filhote, sendo considerado como um sinal afetivo. A diminuição significativa no número de vocalizações por parte dos filhotes indica a presença de um déficit na comunicação social. O prejuízo da comunicação mãe-filhote caracteriza um sintoma típico da presença de autismo. Estudos que induziram autismo pela exposição pré-natal de ratas a lipopolissacarídeo (LPS) elucidou que há, de fato, uma diminuição no número de vocalizações por parte de filhotes com comportamentos similares ao autismo (KIRSTEN *et al.*, 2015).

Já com relação ao teste de retorno ao ninho, o mesmo possibilita medir a capacidade cognitiva, sensorial e motora dos animais. Basicamente, neste teste o animal precisa usar o sistema olfativo para retornar ao ninho guiando-se pelo odor característico de sua mãe já que o cheiro e os estímulos maternos são cruciais para

que o animal desenvolva seu comportamento e reconhecimento social. Neste sentido, animais que apresentam um desempenho prejudicado no teste de retorno ao ninho são associados a problemas de interação social, característicos de indivíduos autistas (SERVADIO; VANDERSCHUREN; TREZZA, 2015).

O teste de placa de furos é utilizado para avaliar padrões de comportamentos repetitivos. Sendo assim, animais que mergulham a cabeça mais vezes dentro dos furos presentes na placa, são considerados animais com padrões de comportamentos estereotipados, tais como os apresentados por indivíduos com autismo (BATISTA; GIUSTI-PAIVA; VILELA, 2018).

Além do comportamento repetitivo apresentado por estes indivíduos, outro sintoma comum é a dificuldade de desenvolver uma relação social, ou seja, de fazer amigos e se relacionar com outras pessoas. Sendo assim, o teste de comportamento de brincar avalia as habilidades sociais de roedores quando estes são colocados juntos no mesmo ambiente. Desta maneira, animais que brincam menos e se envolvem menos com o outro animal, são considerados animais que apresentam comportamentos típicos do transtorno (AMERICAN, 2014; BATISTA; GIUSTI-PAIVA; VILELA, 2018).

Indivíduos com autismo além de apresentar comportamentos repetitivos, apresentam também comportamentos restritivos. Desta maneira, o teste de reconhecimento de objetos ajuda a identificar padrões de comportamentos restritivos nos animais. Ratos normais apresentam comportamento exploratório, mas animais que apresentam comportamentos característicos do autismo tem uma tendência a explorar sempre o que já é conhecido. Sendo assim, quando colocados frente a um objeto familiar e outro desconhecido, animais que apresentam sintomas semelhantes ao autismo deverão explorar sempre o objeto familiar, não se interessando pelo objeto novo, caracterizando assim um comportamento restritivo apresentado por autistas (DENNINGER; SMITH; KIRBY, 2018).

Tendo em vista os modelos de indução de autismo e os testes realizados para identificar alterações comportamentais, este estudo se baseará na exposição de ratos *Wistar* fêmeas ao glifosato durante o período gestacional e de lactação a fim de identificar na prole a presença de comportamentos que caracterizem sintomas semelhantes ao autismo.

### 3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, o aumento crescente do uso de agrotóxicos em escala mundial tem alarmado a população sobre as consequências da aplicação destas substâncias de maneira desenfreada. Os herbicidas à base de glifosato, tal como o Zapp QI 620 são os agrotóxicos mais utilizados tanto no Brasil quanto no mundo e estes já têm sido associados a diversas doenças e alterações fisiológicas. Além disso, estudos retrospectivos com humanos evidenciam que a exposição de gestantes a agrotóxicos pode conduzir seus filhos à presença de alterações comportamentais. Pensando nisso, ao se levar em consideração que a prevalência do TEA tem aumentado de maneira surpreendente nos últimos anos e que alterações sofridas pela mulher durante a gestação são capazes de influenciar diretamente no neurodesenvolvimento do feto, é pertinente investigar se o consumo do herbicida à base de glifosato, Zapp QI 620 durante o período gestacional e de lactação é capaz de induzir mudanças comportamentais na prole que caracterizem o autismo. É necessário também avaliar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos no surgimento das alterações sofridas pela prole a fim de elucidar a patogênese da doença, tendo em vista a importante contribuição dos achados anteriores sobre genes que codificam proteínas específicas que nos permitem compreender as vias pelas quais o transtorno surge.

Além da busca pelos possíveis danos causados pelo consumo do herbicida à base de glifosato, Zapp QI 620 e pelas hipóteses mecanísticas responsáveis pelas alterações, deve-se considerar também que a literatura carece de dados relacionados ao consumo perinatal dessas substâncias e suas consequências na prole, sendo necessário ainda ressaltar que existem poucas informações sobre as consequências do consumo materno relacionadas ao autismo em estudos *in vivo* com modelo animal, além de se considerar a importância e a atualidade do tema, o que torna ainda mais relevante a execução do trabalho.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos do consumo do herbicida à base de glifosato, Zapp QI 620, durante o período de gestação e lactação em ratas *Wistar*, bem como avaliar se sua prole sofreu alterações neurocomportamentais que permitem a caracterização da presença de sintomas típicos do autismo e buscar pelas hipóteses mecânicas responsáveis pelas alterações sofridas.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 4.2.1 Ratas progenitoras

- Acompanhar o ganho de peso das ratas progenitoras durante a gestação e lactação;
- Avaliar o comportamento materno das ratas lactantes submetidas ou não à ingestão de herbicida à base de glifosato, Zapp QI 620;
- Avaliar a atividade locomotora das ratas lactantes submetidas ou não à ingestão de herbicida à base de glifosato, Zapp QI 620.

#### 4.2.2 Filhotes

- Acompanhar o ganho de peso da prole de ambos os grupos experimentais;
- Quantificar as Vocalizações Ultrassônicas (VUS) de proles de mães que consumiram ou não herbicida à base de glifosato;
- Analisar a discriminação olfatória da prole por meio do teste de retorno ao ninho;
- Analisar a presença de comportamentos repetitivos na prole por meio do teste de placa de furos;
- Avaliar o comportamento social de brincar no teste de comportamento de brincar;

- Observar a presença de comportamentos restritivos por meio do teste de reconhecimento de objetos na prole de mães submetidas ou não à ingestão de herbicida à base de glifosato;
- Avaliar a atividade locomotora da prole por meio do teste de campo aberto;
- Avaliar possíveis mecanismos envolvidos nas alterações encontradas na prole por meio de quantificação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e *doublecortin* (DCX) e sinaptofisina.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Os animais experimentais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL. Foram utilizadas ratas *Wistar* fêmeas de 6 a 8 semanas de vida pesando entre 200 e 250 gramas. Foram também utilizados ratos machos experientes da mesma raça tendo de 8 a 10 semanas de idade e peso entre 250 e 300 gramas para acasalamento. Os animais passaram por um período breve de ambientação de sete dias onde foram agrupados em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção, que abrigaram um total de 5 animais por caixa. Estes animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), bem como a iluminação, que seguiu um ciclo claro-escuro de 12h, sendo as luzes acesas às 7h e desligadas às 19h. Os procedimentos experimentais também foram realizados a uma temperatura controlada ( $23 \pm 1$ °C). Os animais receberam água e ração comercial *ad libitum* durante todo período experimental.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais, da Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL, sob o protocolo 0004/2019, tal como demonstrado no arquivo do ANEXO A. Todos os procedimentos adotados estão conforme o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

### 5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O estudo conta com 2 grupos experimentais:

- Controle (C): n=8;
- Glifosato (G): n=8.

Total: 16 ratas.

Destas ratas, foram originados 64 machos e 64 fêmeas, sendo 32 machos e 32 fêmeas de mães Controle (C) e 32 machos e 32 fêmeas de mães Glifosato (G). Sendo assim, para cada teste foram utilizados um macho e uma fêmea de cada ninhada, sendo que os animais utilizados durante a lactação foram reutilizados em testes na adolescência de acordo com a figura a seguir:

Figura 1 - Delineamento do grupo experimental dos testes comportamentais.



Fonte: Da autora.

Legenda: F: Fêmea

M: Macho

VUS: Vocalização Ultrassônica.

Conforme apresentado na figura 1 acima, os testes foram realizados da seguinte maneira:

F1 e M1 de cada ninhada (8 machos e 8 fêmeas):

- Retorno ao ninho na lactação;
- Placa de furos na adolescência;

F2 e M2 de cada ninhada (8 machos e 8 fêmeas):

- Campo aberto na adolescência (utilizado também para ambientação do teste de reconhecimento de objetos);
- Reconhecimento de objetos na adolescência;

F3 e M3 de cada ninhada (8 machos e 8 fêmeas):

- VUS na lactação;

F4 e M4 de cada ninhada (8 machos e 8 fêmeas):

- Comportamento de brincar na adolescência;



### 5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais advindos do biotério central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, passaram por um período de sete dias de ambientação ao laboratório de Neuroimunomodulação. Após a ambientação, os animais foram colocados para acasalar na proporção de 3 fêmeas para cada 1 macho. Na manhã do dia seguinte, foi realizado o procedimento de lavado vaginal para identificar a presença de espermatozoides em fase estral do ciclo do animal. Quando identificados espermatozoides nesta fase, considerou-se como sendo o dia de gestação 0 (GD0). Neste mesmo dia, as ratas prenhes foram transferidas para caixas de polipropileno individuais, onde mais tarde, ficaram também alocados seus filhotes. Ainda no GD0, as ratas foram pesadas e então deu-se início a administração de herbicida à base de glifosato, o Zapp QI 620 na concentração 50 mg/kg/dia via gavagem até o PND21. As mães do grupo controle receberam a mesma quantidade de salina pela mesma via de administração e mesmo período.

As ratas prenhes de ambos os grupos, mães Controle e Glifosato foram pesadas a cada 3 dias até o PND21, quando foram então eutanasiadas com excesso de anestésico inalatório isoflurano (mL/mL).

O nascimento dos filhotes foi chamado de PND0. No dia seguinte, PND1, as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes para cada mãe, sendo 4 fêmeas e 4 machos. Assim como as mães, os filhotes foram igualmente pesados a cada 3 dias desde o PND1 até o PND 28.

No PND 2-6, as mães de ambos os grupos C e G foram avaliadas quanto ao comportamento materno apresentado. No PND6 as mães passaram ainda pelo teste de campo aberto.

No PND5, os filhotes passaram pelo teste de VUS (n=32). No PND13 foi realizado o teste de retorno ao ninho e os animais que passaram por este teste (n=32), passaram também pelo teste de placa de furos no PND28-32. O teste de campo aberto (n=32) foi realizado no PND28-32 e foi utilizado também para ambientar os animais para o teste de reconhecimento de objetos que foi realizado igualmente entre o PND28-32. Por fim, outro grupo de animais (n=32) passou pelo teste de Comportamento de brincar que foi realizado também entre o PND28-32.

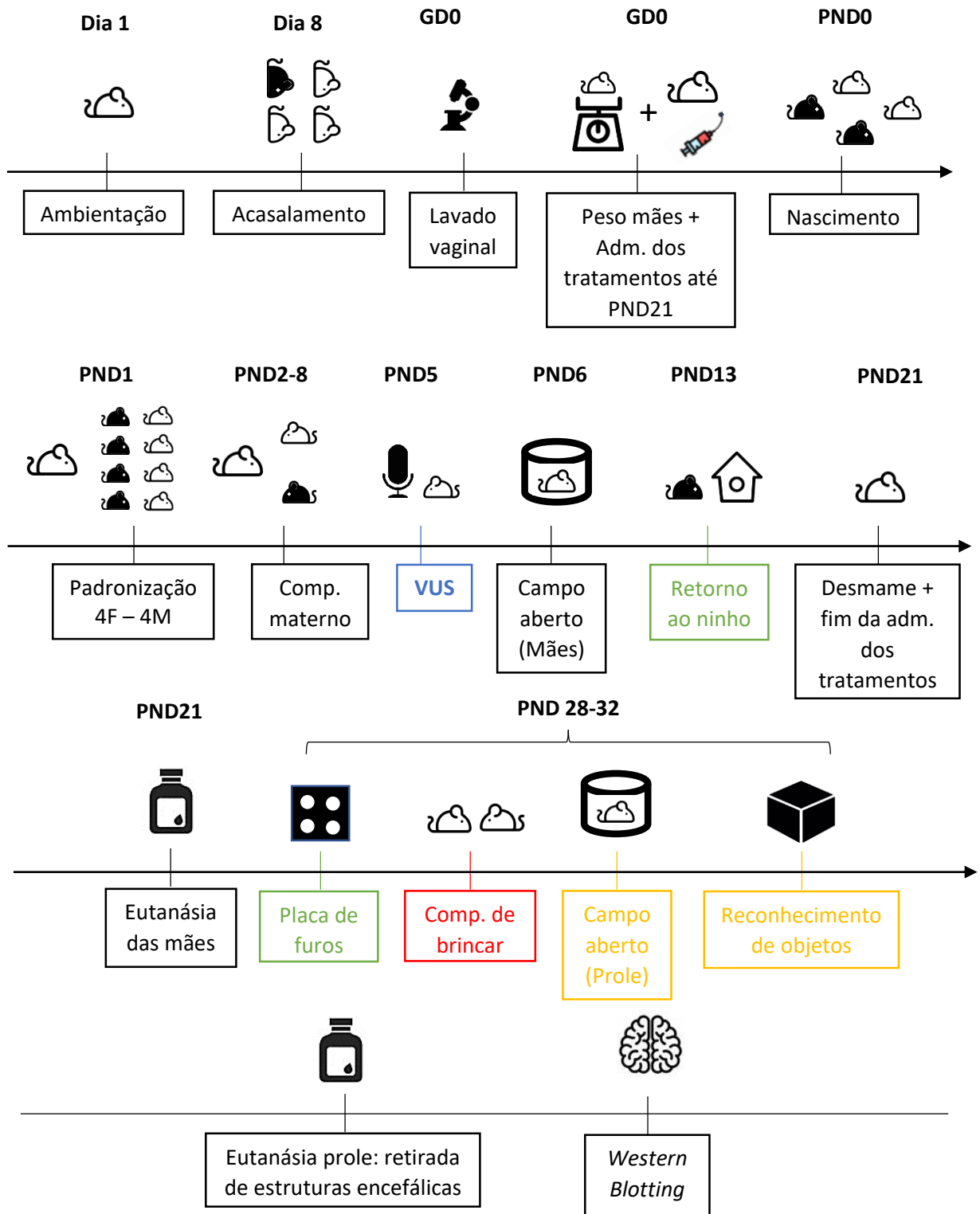
Vale ressaltar que no PND21 os animais foram desmamados e neste dia também, a administração de herbicida à base de glifosato, Zapp QI 620, via gavagem foi cessada e as mães eutanasiadas como citado anteriormente.

Após a realização de todos os testes comportamentais as proles foram eutanasiadas com excesso de anestésico inalatório isoflurano (mL/mL) e posteriormente decapitados. Estes animais tiveram seus cérebros retirados para coleta da estrutura encefálica córtex para realização de *Western Blotting* a fim de quantificar a expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), *Doublecortin* (DCX) e sinaptofisina. Vale ressaltar que parte dos animais do experimento, após eutanasiados, tiveram seus cérebros perfundidos e encontram-se armazenados para análises posteriores.

Sendo assim, os animais que passaram pelo teste de VUS e reconhecimento de objetos foram destinados à coleta da estrutura encefálica córtex para a realização do teste de *Western Blotting*.

Abaixo, na Figura 2, está demonstrada a ordem cronológica do experimento:

Figura 2 - Delineamento experimental.



Fonte: da autora

Legenda: F: Fêmea

M: Macho.

Nota: Os testes representados pela mesma cor foram realizados com os mesmos animais, tal como representado pela Figura 1 (pág. 34).

#### 5.4 ACASALAMENTO

Os animais advindos do biotério central da universidade passaram por um período de 7 dias de adaptação ao laboratório de Neuroimunomodulação. Após este período, foram colocados em uma caixa para acasalamento em uma proporção de 3 fêmeas para 1 macho. No dia seguinte, para verificar a prenhez destes animais, foi realizado o procedimento de lavado vaginal, se verificada a presença de espermatozoides na fase estral do ciclo do animal, considerou-se como dia gestacional 0 (GD0).

#### 5.5 ADMINISTRAÇÃO DE HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO.

A partir do GD0 as ratas prenhes receberam via gavagem o herbicida à base de glifosato, Zapp QI 620 (sal potássico de N-(phosphonomethyl) glycine 620 g/L sendo 500 g/L equivalente ácido) na dose de 50 mg/kg/dia até o 21º dia pós-gestacional (PND21), estas foram então identificadas como mães Glifosato. Enquanto isso, as mães Controles receberam a mesma quantidade de salina pela mesma via de administração e durante o mesmo período.

A dose de herbicida à base de glifosato escolhida foi baseada em estudos prévios que demonstram alterações comportamentais decorrentes do consumo animal da substância (GALLEGOS *et al.*, 2015). Além disso, a dose do herbicida administrada respeitou os limites do nível sem efeitos adversos observáveis (NOAEL) para toxicidade materna em roedores que é de 1000 mg/kg/dia (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

#### 5.6 ACOMPANHAMENTO DO GANHO DE PESO DAS MÃES E SUA PROLE

O peso das mães de ambos os grupos foi acompanhado durante todo o período experimental. As ratas foram pesadas individualmente a cada 3 dias desde o GD0 até o PND21. O mesmo ocorreu com os filhotes que, inicialmente, foram pesados em ninhada a cada 3 dias até o PND21, a partir de então, os filhotes foram pesados individualmente até o PND 28, também a cada 3 dias.

## 5.7 PADRONIZAÇÃO DA NINHADA

Após os 21 dias gestacionais, o dia do nascimento dos filhotes, foi considerado como PND0. No dia seguinte, PND1, a ninhada foi padronizada em 8 filhotes para cada uma das 8 mães de cada grupo sendo 4 fêmeas e 4 machos tanto para o grupo Controle como para o grupo Glifosato

## 5.8 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DAS RATAS PRENHES

### 5.8.1 Comportamento materno

O cuidado materno durante o período neonatal está diretamente relacionado com o desenvolvimento emocional e cognitivo da prole. Alterações no comportamento da mãe podem ocasionar danos aos filhotes na vida adulta, isso pois, a primeira semana de vida pós-natal caracteriza-se por ser um período crítico do desenvolvimento por sua alta sensibilidade (KAFFMAN; MEANEY, 2007; LIU *et al.*, 1997). A partir disso, percebe-se a importância de se avaliar o comportamento materno durante este período a fim de entender possíveis alterações comportamentais presentes nos filhotes durante a vida adulta (BATISTA, 2015).

No presente estudo, o comportamento materno (CM) foi avaliado do PND2 ao PND6 em ambos os grupos experimentais, C e G. O comportamento materno foi observado 3 em 3 minutos no período da manhã das 7h30min até às 9h e no período da tarde, das 15h30min às 17h, somando 30 observações por período e um total final de 60 observações por dia (adaptado de VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014).

Os parâmetros do comportamento materno avaliados foram:

- Número de vezes em que a rata fica em posição arqueada, ou seja, posiciona-se sobre os filhotes para amamentação;
- Número de vezes em que a rata apenas se posiciona sobre a ninhada sem amamentar;
- Número de vezes em que a rata se posiciona de barriga para cima, caracterizando uma posição passiva para então amamentar os filhotes (deitada de costas ou de lado);
- Número de vezes que a rata lambe os filhotes;

- Número de construções de ninho;
- Número de vezes em que a rata se limpa (*self grooming* na região abdominal).

Os parâmetros de comportamentos não maternos avaliados foram:

- Número de vezes que a rata fica fora do ninho e se alimenta sem os filhotes;
- Número de vezes que a rata fica sem os filhotes e explora o ambiente;
- Número de vezes que a rata fica sem os filhotes e não explora o ambiente;
- Número de vezes que a rata se limpa (*self grooming* na região da cabeça).

### **5.8.2 Campo aberto**

O teste do campo aberto, também conhecido como Open Field é um modelo preditivo de parâmetros de ansiedade, além disso, é um teste útil para análise da atividade locomotora do animal (VALLE, 1970). O aparato de campo aberto consiste em uma arena circular de acrílico, com diâmetro de 60 cm e paredes com 50 cm de altura, com o piso dividido em quadrantes.

O teste foi realizado com as ratas dos grupos C e G no PND6. Cada animal foi colocado no centro da arena e a sua atividade locomotora foi filmada por 10 minutos. Os parâmetros avaliados foram distância total percorrida, distância percorrida no centro, distância percorrida na periferia e tempo de imobilidade dos animais. Após o teste de cada animal, o aparato foi limpo com álcool 5%. O software Ethovision XT versão 9.0 foi utilizado para análise automática dos parâmetros anteriormente determinados.

## **5.9 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DA PROLE**

### **5.9.1 Vocalizações ultrassônicas (VUS)**

No PND5, um filhote macho e uma fêmea de cada rata foi avaliado quanto ao número de VUS. Cada filhote foi separado de sua ninhada e colocado em uma caixa com temperatura controlada (27°C) por 10 minutos. Após o isolamento, o filhote foi colocado em um recipiente de acrílico raso situado em uma câmara com isolamento acústico contendo um microfone de captação ultrassônica conectado a um sistema de

aquisição computadorizada (ML 221 *PowerLab*, *ADInstruments*, Bella Vista, NSW, Austrália) para detectar as VUS de 40 a 100 kHz. Os sons foram registrados por 4 minutos, e o número total de vocalizações foram analisadas posteriormente. A câmara com isolamento acústico e o recipiente de acrílico raso foram limpos álcool 5% após cada teste.

### **5.9.2 Retorno ao ninho**

No PND13, um filhote macho e uma fêmea de cada rata lactante foram separados das mães e mantidos por 30 min em uma sala com temperatura controlada ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ). Após esse período, cada filhote foi colocado em uma caixa onde  $\frac{1}{4}$  do chão estava coberto com maravalha da mãe e  $\frac{3}{4}$  com maravalha limpa. O filhote foi posicionado no lado da caixa que estava coberto por maravalha limpa e seu comportamento analisado por 4 minutos em tempo real. Os parâmetros registados foram: latência em segundos para atingir a área com maravalha da mãe, tempo total em segundos gasto pelo filhote na área de maravalha da mãe (MELANCIA; TREZZA, 2018).

### **5.9.3 Placa de furos**

O aparato onde é realizado o teste de placa de furos, também conhecido como *hole board*, consiste em uma caixa de vidro (40 cm largura x 40 cm comprimento x 40 cm altura), com uma tábua contendo 16 furos de 2,5 cm de diâmetro elevada à 15 cm do fundo da caixa por suportes de madeira, sendo montada sobre um fundo preto (CASARRUBEA; SORBERA; CRESCIMANNO, 2009).

Um dia antes do teste, no PND27, todos os animais, até mesmo aqueles que não passaram pelo teste, foram levados para sala de comportamento para ambientação e lá permaneceram por 24h. No mesmo dia o filhote que passaria pelo teste foi colocado no aparato sem a tábua com furos para ambientação por um período de 10 min. No dia seguinte, PND28, o filhote já ambientado foi colocado no centro do aparato e seu comportamento filmado por 5 minutos para análises posteriores. O parâmetro avaliado foi a frequência com a qual os animais colocavam a cabeça até a altura dos olhos dentro dos buracos. Após o término de cada teste, o aparato foi limpo com álcool 5%.

#### 5.9.4 Comportamento de brincar

O teste de comportamento de brincar, também chamado de *play behavior*, foi realizado em um aparato que consiste em uma caixa quadrada de acrílico (60 cm x 60 cm x 60 cm). Os ratos foram individualmente habituados à caixa de teste durante 10 minutos por 3 dias antes do experimento. No dia do teste (PND 28 - 32), os animais foram isolados por 3h30min antes do teste para aumentar sua motivação social e assim facilitar a expressão do comportamento de brincadeira (TREZZA; BAARENDSE; VANDERSCHUREN, 2009; TREZZA; VANDERSCHUREN, 2008). No dia do teste dois animais pertencentes ao mesmo grupo experimental foram colocados na arena durante 10 minutos e as interações do comportamento de brincadeira foram então registradas para posterior análise. Os parâmetros analisados foram: Tempo em segundos que um animal cheirou qualquer parte do corpo do parceiro (*sniffing*), incluindo a área anogenital e tempo em segundos que o animal avançou na direção ou seguiu o parceiro (*following*). Com o objetivo de reduzir as interferências nas respostas comportamentais, os animais em pares não diferiram mais de 10 g no peso corporal e não apresentaram experiência social anterior (MELANCIA; TREZZA, 2018).

#### 5.9.5 Teste de reconhecimento de objetos

No teste de reconhecimento de objetos, ao serem expostos a 2 objetos diferentes, um previamente conhecido e outro desconhecido, os animais são avaliados quanto ao seu comportamento exploratório, já que, no caso de um comportamento autista típico, os roedores tenderiam a explorar o objeto já conhecido. (DENNINGER; SMITH; KIRBY, 2018).

Dois dias antes do teste, os animais foram expostos ao aparato por 10 minutos para a ambientação a fim de garantir que estes passem tempo suficiente explorando os objetos e não o ambiente (ANDERSEN *et al.*, 2004). O aparato constitui-se de uma arena quadrada (60 cm x 60 cm). No dia do teste, PND 28-32, os animais foram colocados frente a 2 objetos idênticos (A e B) por 10 minutos (treinamento), 2 horas depois, um dos objetos de treinamento foi substituído por um novo objeto. Todos os objetos apresentavam texturas e tamanhos semelhantes, mas formas distintas. Os filhotes foram colocados individualmente na arena e seu comportamento foi filmado por 10 minutos. Os parâmetros avaliados foram: exploração (quando o animal cheira



ou toca o objeto com o nariz) e o tempo gasto pelo animal explorando os dois objetos (objeto familiar ou novo). Entre o teste de cada animal, os objetos e a arena foram limpos com álcool 5%. Para análise do teste, foi realizado o cálculo do índice de reconhecimento de objetos, cuja fórmula é: Objeto novo/ (objeto novo + objeto familiar) (BATISTA, 2015).

### **5.9.6 Campo aberto**

Como já citado anteriormente no tópico 5.8.2, o teste do campo aberto é um teste útil para análise da atividade locomotora do animal (VALLE, 1970). O aparato de campo aberto consiste em uma arena circular de acrílico, com diâmetro de 60 cm e paredes com 50 cm de altura, com o piso dividido em quadrantes.

O teste foi realizado com os filhotes de ambos os grupos experimentais do PND28-32. Cada animal foi colocado no centro da arena e a sua atividade locomotora foi filmada por 10 minutos. Os parâmetros avaliados foram distância total percorrida, distância percorrida no centro, distância percorrida na periferia e tempo de imobilidade dos animais. Após o teste de cada animal, o aparato foi limpo com álcool 5%. O software *Ethovision XT* versão 9.0 foi utilizado para análise automática dos parâmetros anteriormente determinados.

### **5.9.7. Western Blotting**

Após coletados os cérebros dos animais advindos do teste de reconhecimento de objetos, o córtex foi dissecado a fim de realizar o teste molecular de *Western Blotting* para quantificação da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), *doublecortin* (DCX) e sinaptofisina. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), proteína que, em humanos, é produzida pela glia e pelos núcleos neuronais, é responsável por modular funções sinápticas, estimular a maturação, nutrição, crescimento e integridade neuronal (BARBOSA, 2020). Foi quantificada também a proteína *doublecortin* que está associada a estabilização de microtúbulos. Além disso, essa proteína se expressa quase exclusivamente em neurônios em desenvolvimento, sendo assim considerada como um marcador de neurogênese (CORNELL; TOYO-OKA, 2017). Por fim, foi quantificada também a expressão de sinaptofisina que

caracteriza-se por ser uma glicoproteína presente na fenda pré-sináptica dos neurônios sendo assim considerada como marcador de plasticidade sináptica (BATISTA, 2012).

As análises foram realizadas por acreditar-se que o consumo materno de herbicida à base de glifosato seria capaz de causar alterações a nível do SNC dos filhotes que conduziram os mesmos a apresentarem um comportamento autista típico, ou seja, os animais filhos de mães que consumiram o herbicida à base de glifosato durante o período perinatal, poderiam apresentar menos conexões sinápticas.

Sendo assim para realização do teste molecular de *Western Blotting*, após o término do teste de reconhecimento de objetos, os animais foram eutanasiados, o córtex dissecado e armazenado em câmara fria com temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização do processo de *Western Blotting*. Antes de iniciar o processo de *Western Blotting* é necessário realizar o *Bradford* (que tem por objetivo garantir que a quantidade de proteínas inseridas no processo de eletroforese em gel de poliacrilamida seja igual para todas as amostras). Para realização desse processo as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise com coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Em seguida as mostras foram centrifugadas (9200 rpm, 15 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ) e a concentração das proteínas no sobrenadante foi quantificada pelo teste de Bradford.

As amostras acrescidas de tampão de lise, juntamente, com *Laemmli* foram aquecidas a  $100^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos e levado a geladeira por 15 minutos. As amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida 12%, processo denominado de eletroforese em gel para separação das proteínas por peso molecular. Em seguida, foi realizado a transferência do conteúdo do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose com um sistema electroforético semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA). Para visualização das proteínas, na membrana, foi acrescentado o corante *Ponceau* (SIGMA®) e em seguida a membrana foi lavada com tampão fosfato-salino (PBS) até a retirada total do corante. Posteriormente a membrana foi colocada em solução de bloqueio (5% de leite desnatado em PBS 0,1 M contendo *Tween 20* a 0,05%) durante 2 horas a temperatura ( $21^{\circ}\text{C}$ ). Após esse processo foi lavada com PBS até a retirada do leite e incubada *overnight*, a  $4^{\circ}\text{C}$  com determinado anticorpo primário (conforme a proteína avaliada: BDNF, DCX ou sinaptofisina).

No dia seguinte, após 3 lavagens em PBS, as membranas foram incubadas, durante 1 hora, a uma temperatura de 4 °C com anticorpo secundário específico (apenas para a sinaptofisina). Após o período de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes em PBS e, depois, foi utilizado um *kit* de detecção comercial durante, aproximadamente, 1 a 2 minutos (*kit* de detecção ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA). Posteriormente, as membranas passaram pelo processo de *stripping*, seguido do bloqueio em 5% de leite desnatado em PBS, durante 2 horas. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com PBS até a retirada do leite, seguido da incubação *overnight* a 4 °C, com anticorpo anti-actina (1:5000, Sigma Aldrich 4700).

No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes, em PBS 0,1 M, e as membranas foram incubadas, por 1 hora, com o anticorpo secundário à 4°C (1:2000, Abcam-ab 6789). Após incubação, as membranas foram, novamente, lavadas, 3 vezes, em PBS 0,1 M. Em seguida, foi utilizado o mesmo *kit* de detecção durante, aproximadamente, 1 a 2 minutos (*kit* de detecção ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem - quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA) - e as intensidades das bandas foram quantificadas utilizando um *software* específico da Bio-Rad. A intensidade de cada banda foi expressa em relação à da  $\beta$ -actina e os dados foram expressos normalizados para o controle.

## 6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram analisados pelo *software GraphPad* versão 8.0 e expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Foi aplicado o teste *t de Student* para comparação de duas médias. No teste para comparação de dois fatores foi utilizado a análise de variância *two-way ANOVA*, como descrito em cada gráfico das figuras apresentadas, sendo considerados os fatores dia (FD) e fator tratamento (FT) ou fator tratamento (FT) e fator sexo (FS), e também a interação entre os fatores (I). Por fim, prosseguiu-se com o pós-teste de *Bonferroni*. Os resultados com  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 7 RESULTADOS

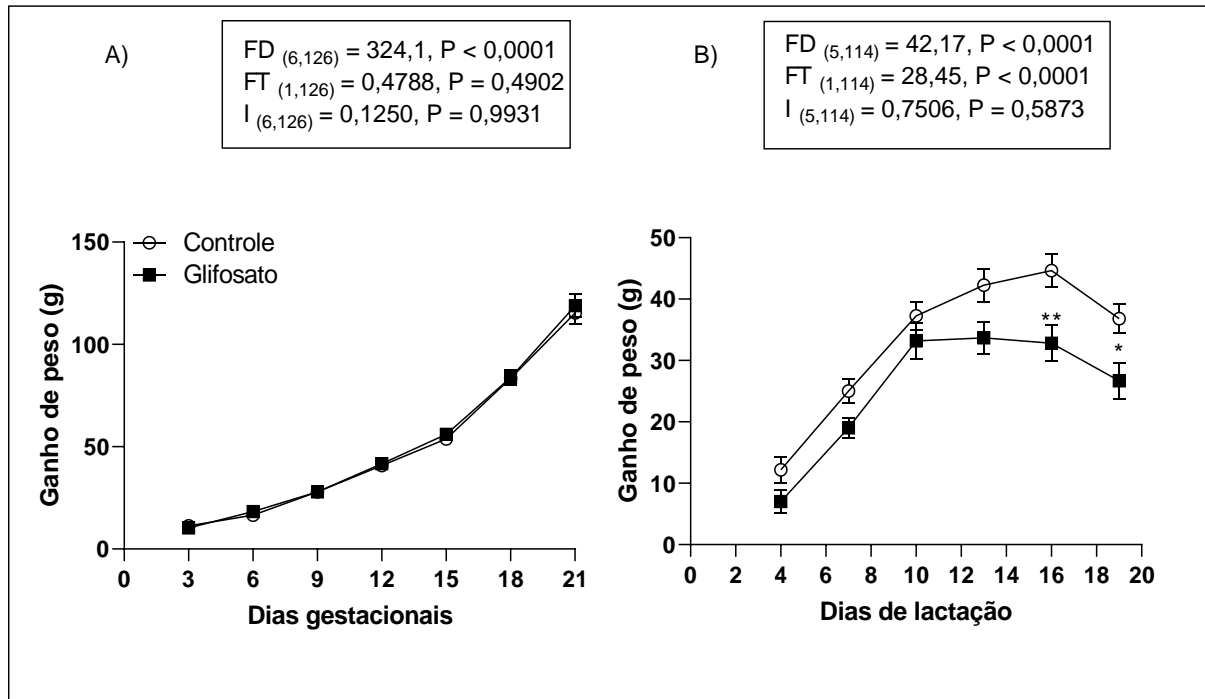
### 7.1 RESULTADOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS E GANHO DE PESO CORPORAL DAS MÃES

#### 7.1.1 Avaliação do ganho de peso das ratas prenhes durante o período gestacional e de lactação

A figura 3 (A) mostra o ganho de peso das ratas prenhes durante o período gestacional (GD 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21), enquanto a figura (B) refere-se ao ganho de peso durante os dias de lactação (PND 4, 7, 10, 13, 16 e 19).

Como podemos observar no gráfico A) da figura abaixo, o pós-teste de *Bonferroni* demonstra que não houveram diferenças estatísticas no ganho de peso entre os grupos controle e glifosato durante o período gestacional. Por outro lado, no gráfico B), observamos uma redução no ganho de peso das mães do grupo glifosato durante o período de lactação no PND16 (\*\* $p < 0,01$ ) e no PND19 (\* $p < 0,05$ ).

Figura 3 - Ganho de peso durante o período gestacional e de lactação das ratas progenitoras do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10).



Fonte: Da autora

Legenda: A) Ganho de peso durante o período gestacional e de lactação

B) Ganho de peso durante o período de lactação

FD= Fator dia

FT= Fator tratamento

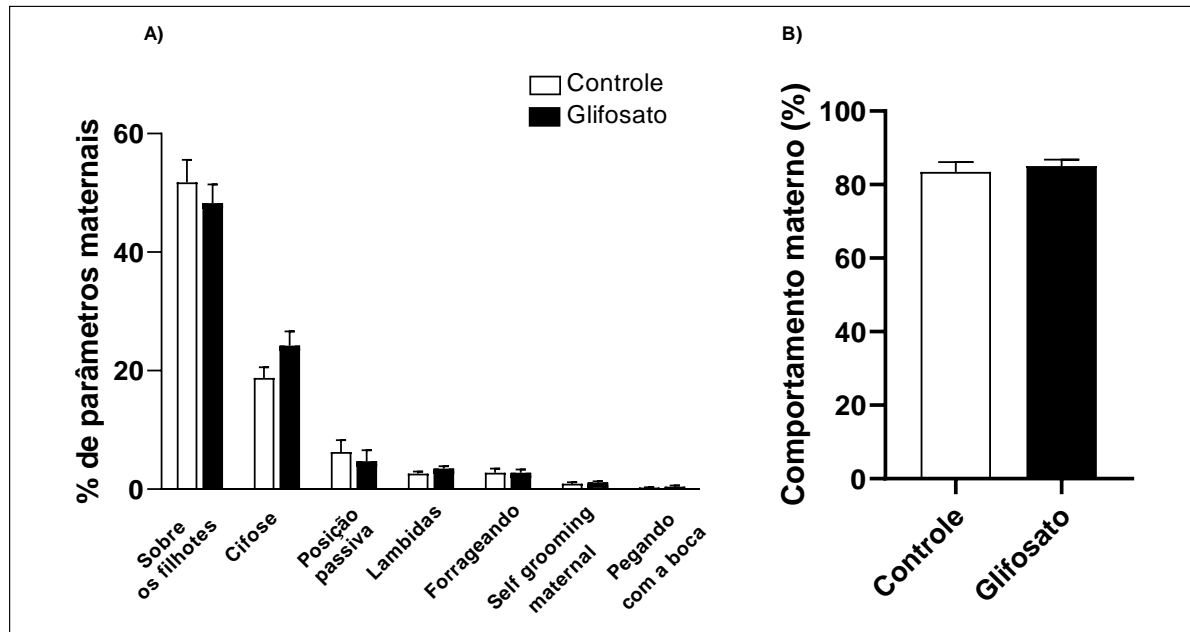
I= Interação entre os fatores

Nota: Os valores foram expressos em média  $\pm$  SEM (teste ANOVA *two-way* seguido do pós- teste *Bonferroni*). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

### 7.1.2 Comportamento materno

A figura 4 traz dados referentes ao teste de comportamento materno. O gráfico A) da figura, revela o percentual dos parâmetros maternos apresentados pelas mães do grupo controle e glifosato, respectivamente (sobre os filhotes, cifose, posição passiva, lambendo os filhotes, forrageando, *self-grooming* maternal e pegando com a boca). Enquanto isso, o gráfico B) apresenta dados referentes ao percentual de comportamento materno total dos animais de ambos os grupos experimentais. A análise dos dados foi realizada por meio do teste "t" de *Student* que revelou que os animais do grupo controle e glifosato não diferiram estatisticamente quanto ao percentual de comportamentos maternos apresentados ( $p > 0,05$ ).

Figura 4 - Percentual dos parâmetros maternos apresentados pelas ratas progenitoras do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10)



Fonte: Da autora

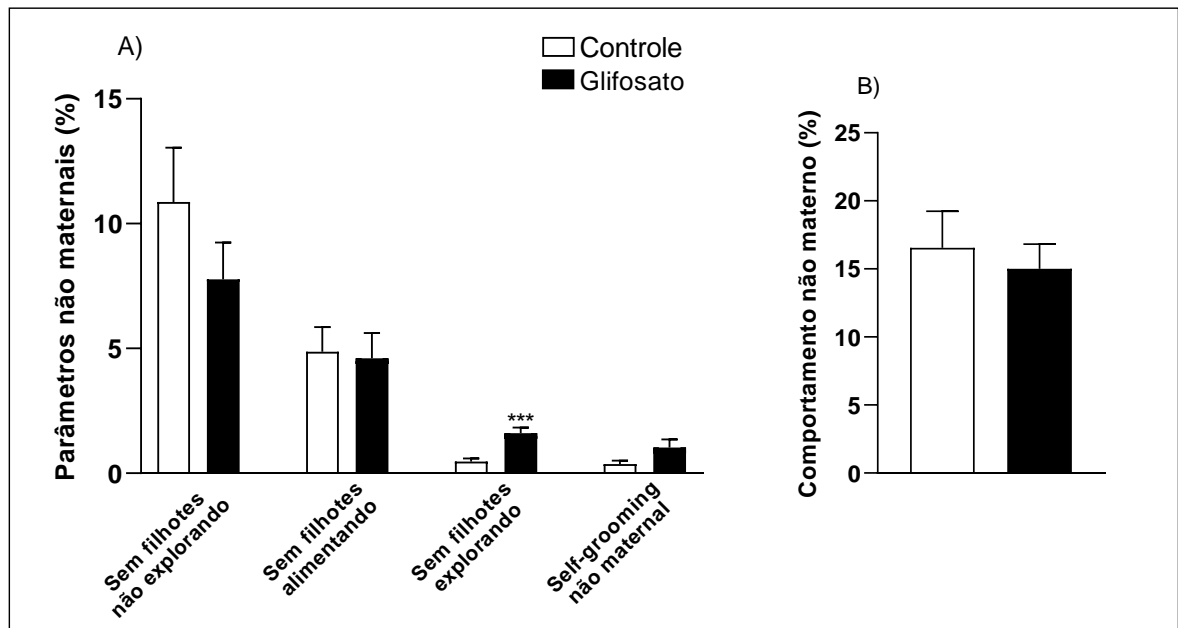
Legenda: A) Percentual dos parâmetros maternos

B) Percentual de comportamento materno total

Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM (teste *t Student*).

Semelhante ao anterior, o gráfico A) da figura 5 a seguir traz dados sobre o percentual dos parâmetros não maternos apresentados pelas mães do grupo controle e glifosato (sem filhotes não explorando, sem filhotes alimentando, sem filhotes explorando, *self-grooming* não materno). Enquanto que o gráfico B) da mesma figura apresenta o percentual de comportamento não materno total dos animais de ambos os grupos experimentais. A análise dos dados foi igualmente realizada por meio do teste “t” de *Student* que revelou que animais do grupo glifosato apresentaram um aumento da atividade exploratória quando comparado ao grupo controle ( $***p < 0,001$ ).

Figura 5 - Percentual dos parâmetros não maternos apresentados pelas ratas progenitoras do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10).



Fonte: Da autora

Legenda: A) Percentual dos parâmetros não maternos

B) Percentual de comportamento não materno

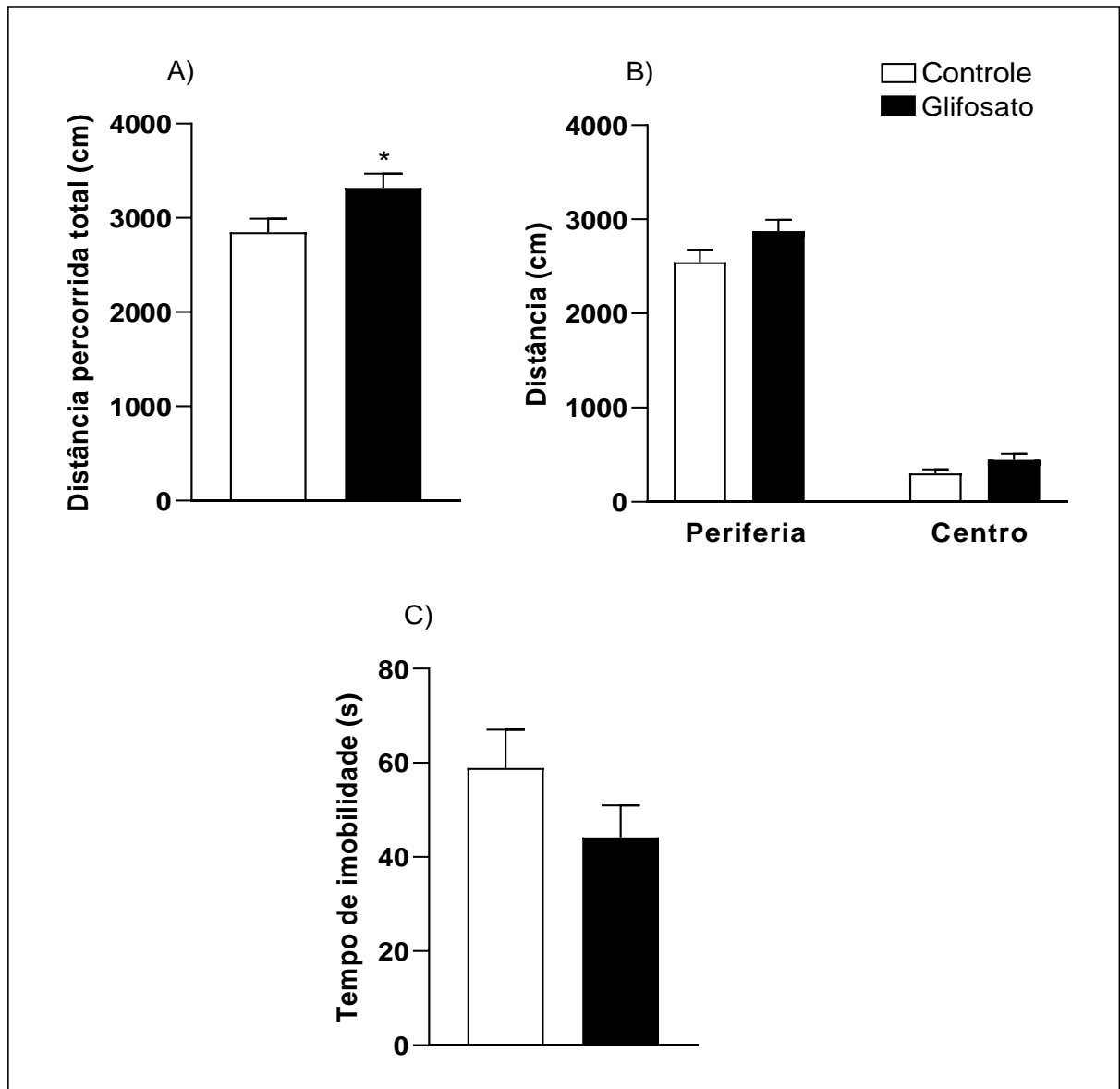
Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM \*\*\* $p < 0,001$  (teste *t Student*).

### 7.1.3 Teste de campo aberto das mães

A figura 6 refere-se ao comportamento das ratas lactantes de ambos os grupos experimentais no teste de campo aberto. No gráfico A) da figura, é possível observar a distância total (cm) percorrida pelos animais durante o teste, na figura B) observa-se a distância (cm) percorrida pelos animais na periferia do aparato e no centro, respectivamente. Por fim, na figura C) é possível observar o tempo de imobilidade destes animais. A análise por meio do teste “*t*” de *Student* revelou que houve um aumento da atividade locomotora dos animais do grupo Glifosato em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), como é demonstrado no gráfico A) da figura 6. A distância percorrida na periferia e no centro, bem como o tempo de imobilidade não diferiu entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ).



Figura 6 - Avaliação da atividade locomotora em campo aberto das ratas progenitoras do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10).



Fonte: Da autora

Legenda: A) Distância total (cm) percorrida

B) Distância (cm) percorrida na periferia e no centro do aparato

C) Tempo de imobilidade

Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM (teste *t Student*).

## 7.2 RESULTADOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS E GANHO DE PESO CORPORAL DA PROLE

### 7.2.1 Ganho de peso das ninhadas e dos filhotes

Durante a lactação, os filhotes foram pesados a cada 3 dias em ninhada e, assim que foram desmamados, foram pesados separadamente também a cada 3 dias. A figura 7 mostra o ganho de peso da ninhada durante a lactação (PND 3, 6, 9, 12, 15 e 18). Os dados foram analisados por meio do pós-teste de *Bonferroni*, que não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

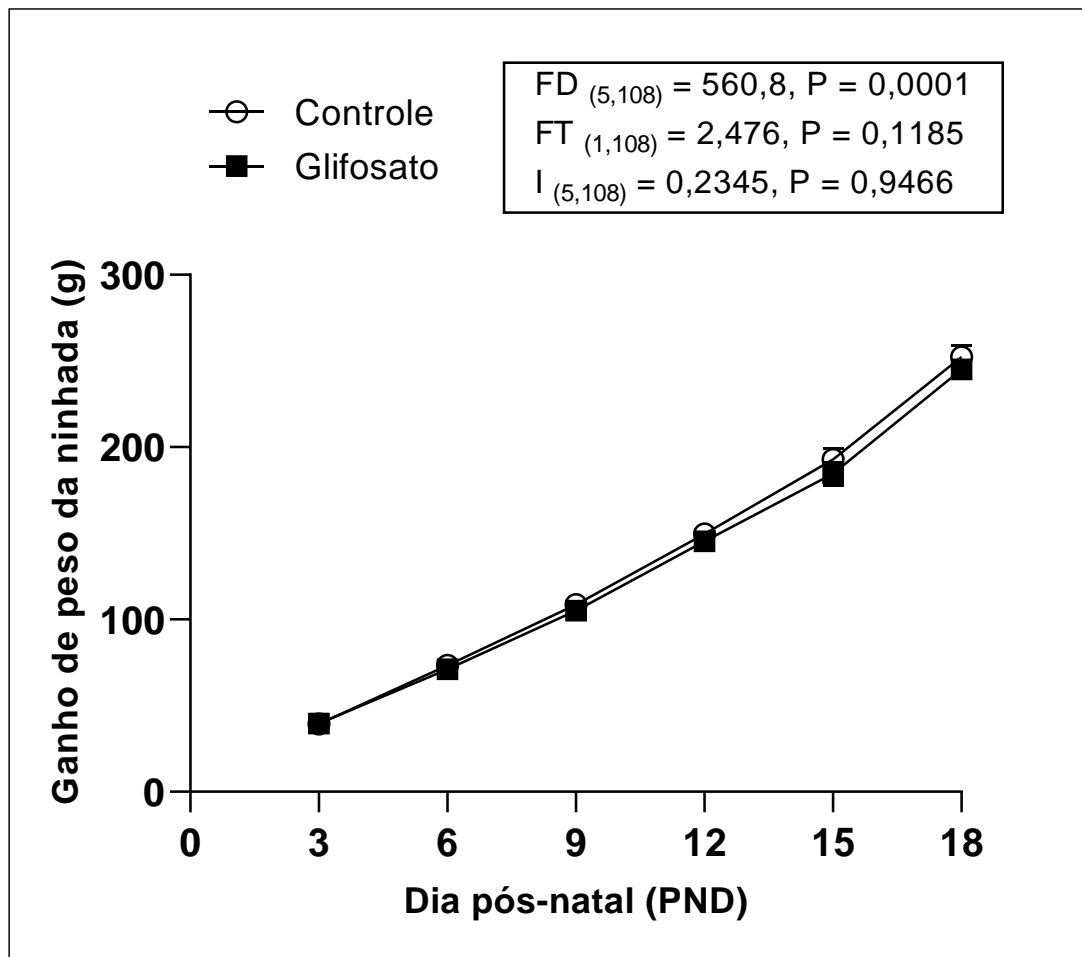


Figura 7 - Ganho de peso da ninhada durante a lactação dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10).

Fonte: Da autora

Legenda: FD= Fator dia

FT= Fator tratamento

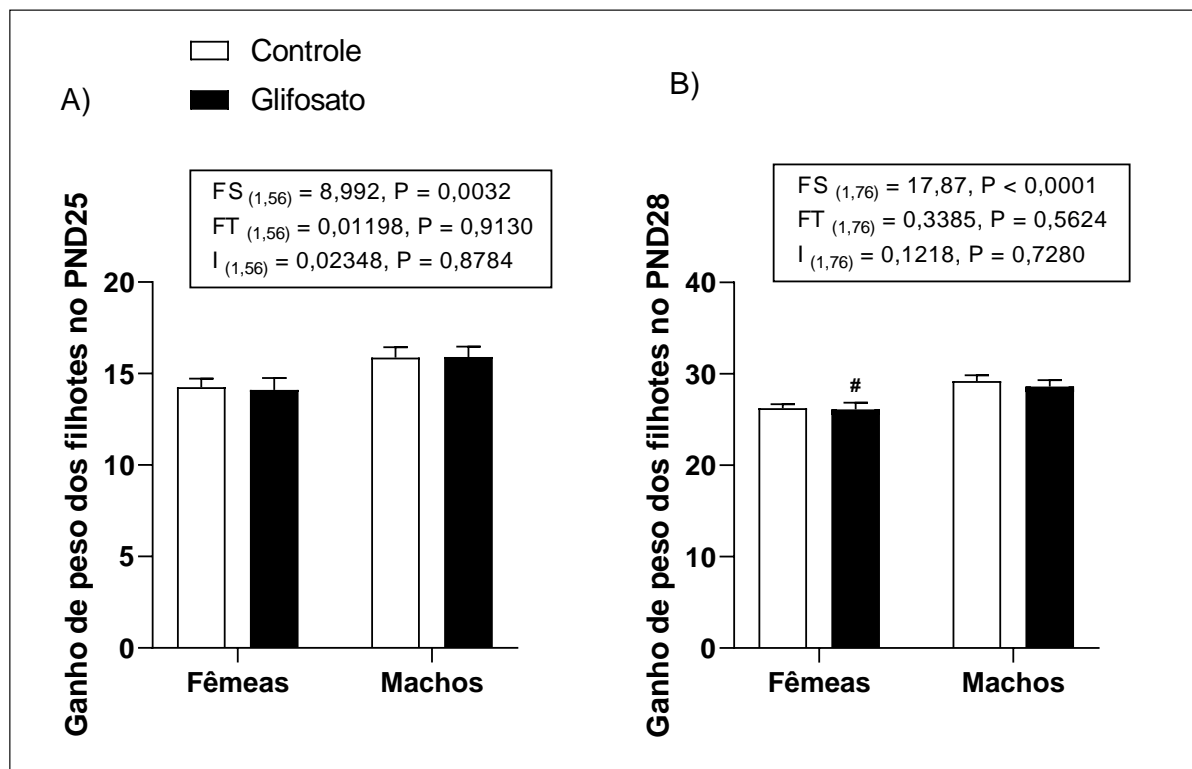
I= Interação entre os fatores

Nota: Os valores foram expressos em média  $\pm$  SEM  $p > 0,05$  (teste ANOVA *two-way* seguido do pós-teste *Bonferroni*).

A figura 8 traz dados sobre o ganho de peso dos filhotes fêmeas e machos após o desmame, quando foram pesados separadamente. A análise por meio do pós-teste de *Bonferroni* demonstrou que não houveram diferenças de ganho de peso entre os

grupos experimentais, mas demonstrou uma redução no ganho de peso de fêmeas do grupo glifosato quando comparado a machos do mesmo grupo experimental.

Figura 8 - Ganho de peso dos filhotes fêmeas e machos do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) pós desmame.



Fonte: Da autora

Legenda: A) Ganho de peso dos filhotes fêmeas e machos no PND25

B) Ganho de peso dos filhotes fêmeas e machos no PND28

FS= Fator sexo

FT= Fator tratamento

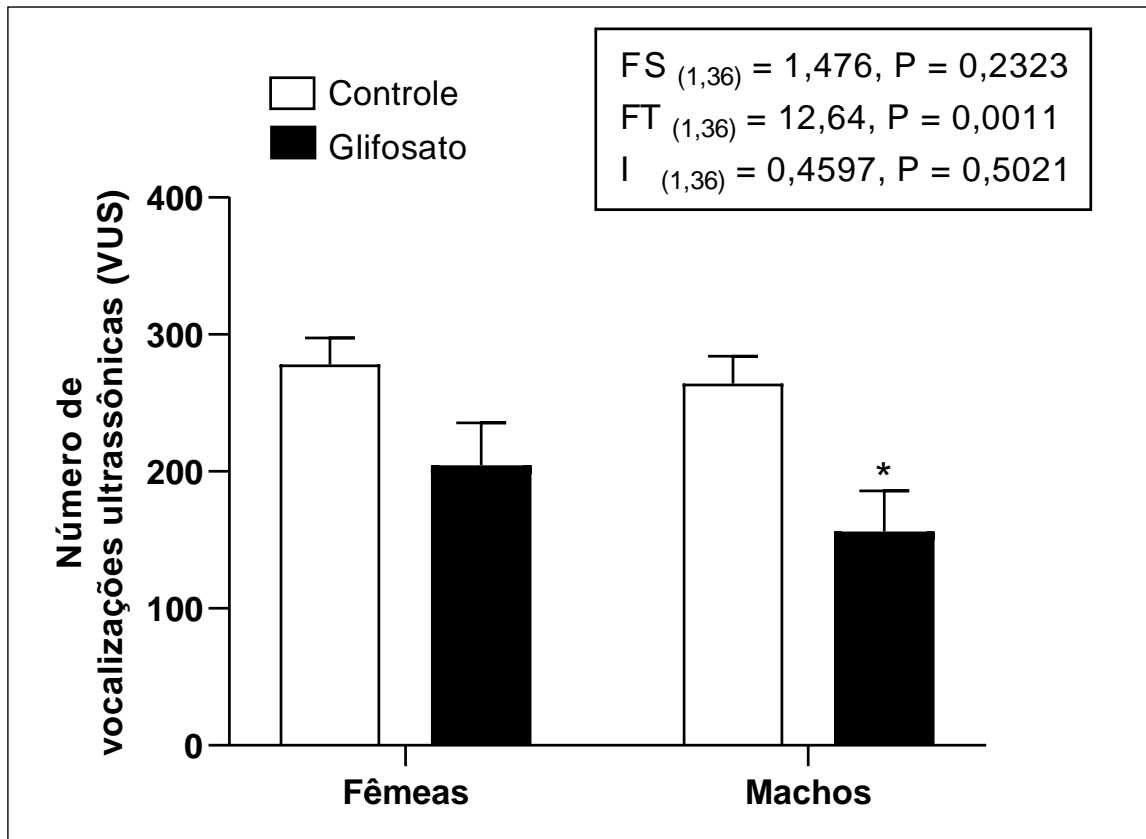
I= Interação entre os fatores.

Nota: Os valores foram expressos em média  $\pm$  SEM #p<0,05 (quando comparamos animais do mesmo grupo experimental de sexo diferentes) (teste ANOVA *two-way* seguido do pós- teste *Bonferroni*).

## 7.2.2 Vocalizações ultrassônicas

A figura 9 apresenta dados sobre o número de vocalizações ultrassônicas emitidas por filhotes fêmeas e machos do grupo Controle e Glifosato. A análise realizada por meio do pós-teste de *Bonferroni* revelou que houve uma redução no número de vocalizações dos filhotes machos do grupo Glifosato em relação ao Controle (\*p<0,05).

Figura 9 - Número de vocalizações ultrassônicas (VUS) apresentadas pelos filhotes machos e fêmeas



do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10).

Fonte: Da autora

Legenda: FS= Fator sexo

FT= Fator tratamento

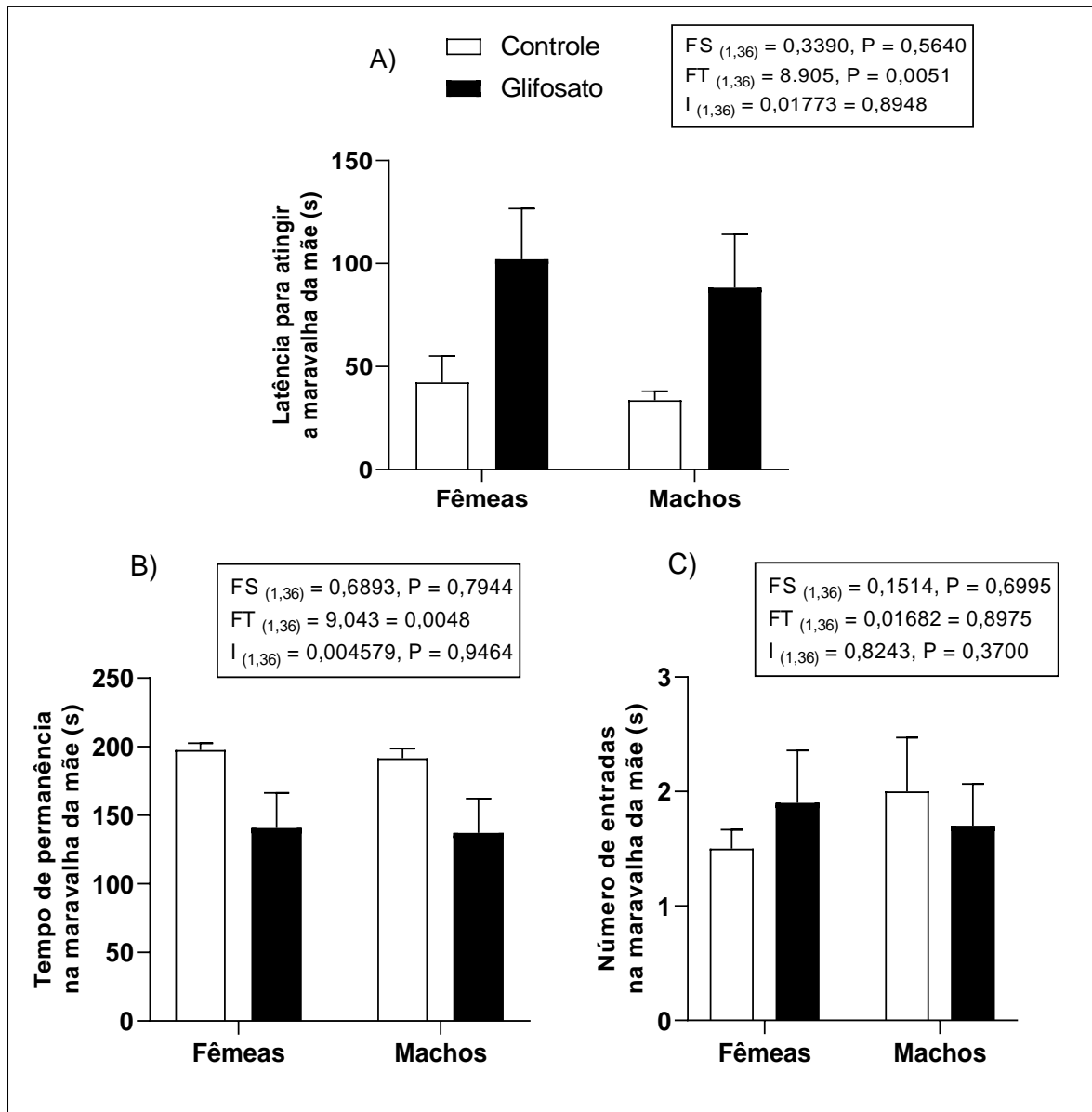
I= Interação entre os fatores.

Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM \* $p < 0,05$  (teste ANOVA *two-way* seguido do pós-teste *Bonferroni*).

### 7.2.3 Retorno ao ninho (*Homing Behavior*)

A figura 10 traz dados sobre o teste de retorno ao ninho realizado com os filhotes fêmeas e machos do grupo Controle e Glifosato. Foi analisado o tempo de latência (s) para atingir a maravalha da mãe, tempo de permanência (s) na maravalha da mãe e número de entradas na maravalha da mãe. A análise foi realizada por meio do pós-teste de *Bonferroni* e não revelou nenhuma diferença entre os grupos nos parâmetros avaliados tal como demonstrado nos gráficos a seguir ( $p > 0,05$ ).

Figura 10 - Avaliação dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) no teste de retorno ao ninho.



Fonte: Da autora

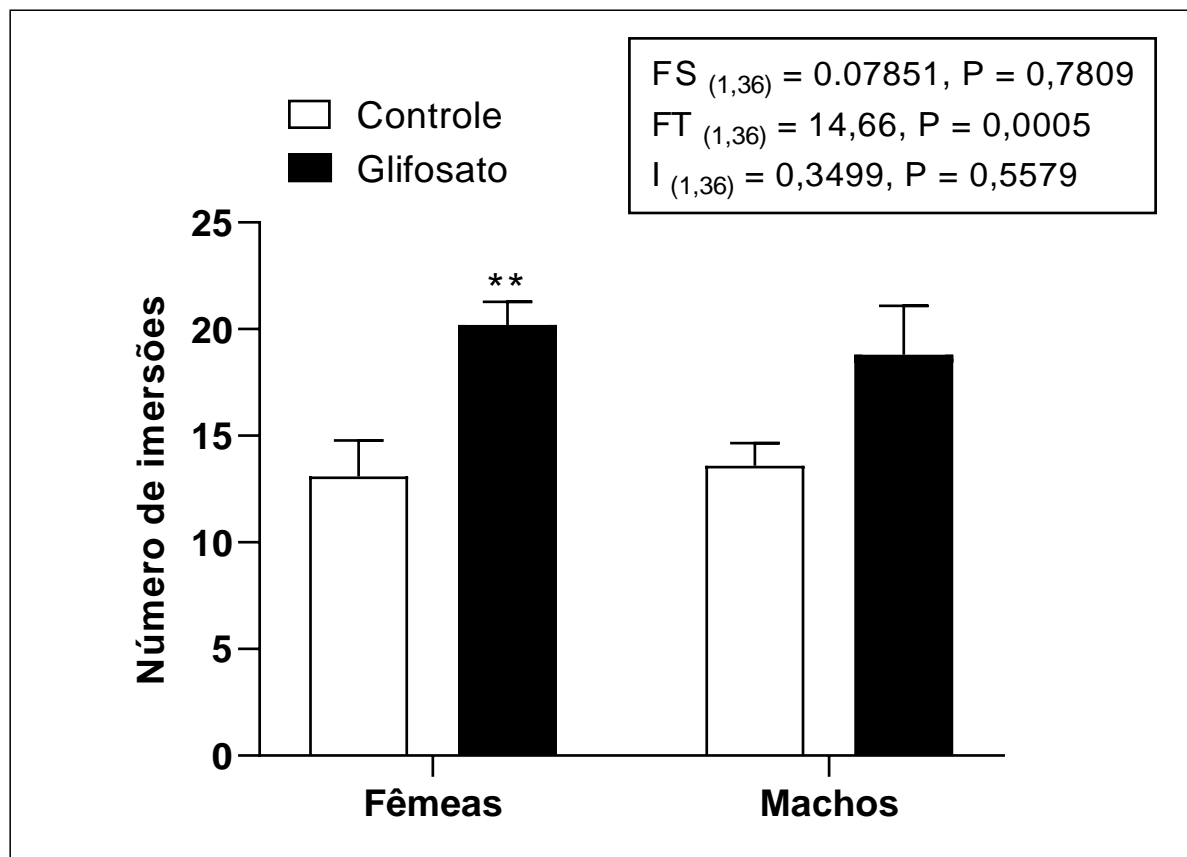
Legenda: A) Latência (s) para atingir a maravalha da mãe  
 B) Tempo de permanência (s) na maravalha da mãe  
 C) Número de entradas na maravalha da mãe.  
 FS= Fator sexo  
 FT= Fator tratamento  
 I= Interação entre os fatores.

Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM  $p > 0,05$  (teste ANOVA *two-way* seguido do pós-teste *Bonferroni*).

#### 7.2.4 Placa de furos (*Hole Board*)

A figura 11 traz dados referentes ao teste de Placa de furos onde foi avaliado o número de imersões da cabeça nos furos contidos no aparato de filhotes fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais. A análise foi realizada por meio do pós-teste de *Bonferroni* que revelou um aumento no número de imersões dos filhotes fêmeas do grupo glifosato (\*\* $p < 0,01$ ) como pode ser observado abaixo.

Figura 11 - Avaliação dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) no teste de placa de furos.



Fonte: Da autora

Legenda: FS= Fator sexo

FT= Fator tratamento

I= Interação entre os fatores

Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM \*\* $p < 0,01$  (teste ANOVA *two-way* seguido do pós- teste *Bonferroni*). FS= Fator sexo; FT= Fator tratamento; I= Interação entre os fatores.

### 7.2.5 Comportamento de brincar (*Play Behavior*)

A figura 12 abaixo refere-se ao teste de comportamento de brincar realizado com animais de ambos os sexos do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10). Os parâmetros avaliados foram *following* (seguir) e *sniffing* (cheirar) e ambos juntos foram

considerados como comportamento de brincar. A análise dos dados foi realizada por meio do pós-teste de *Bonferroni* que revelou uma diminuição do tempo de comportamento de brincar dos filhotes fêmeas (\*\* $p < 0,001$ ) e machos (\*\* $p < 0,01$ ) do grupo glifosato em relação ao grupo controle como pode ser observado abaixo.

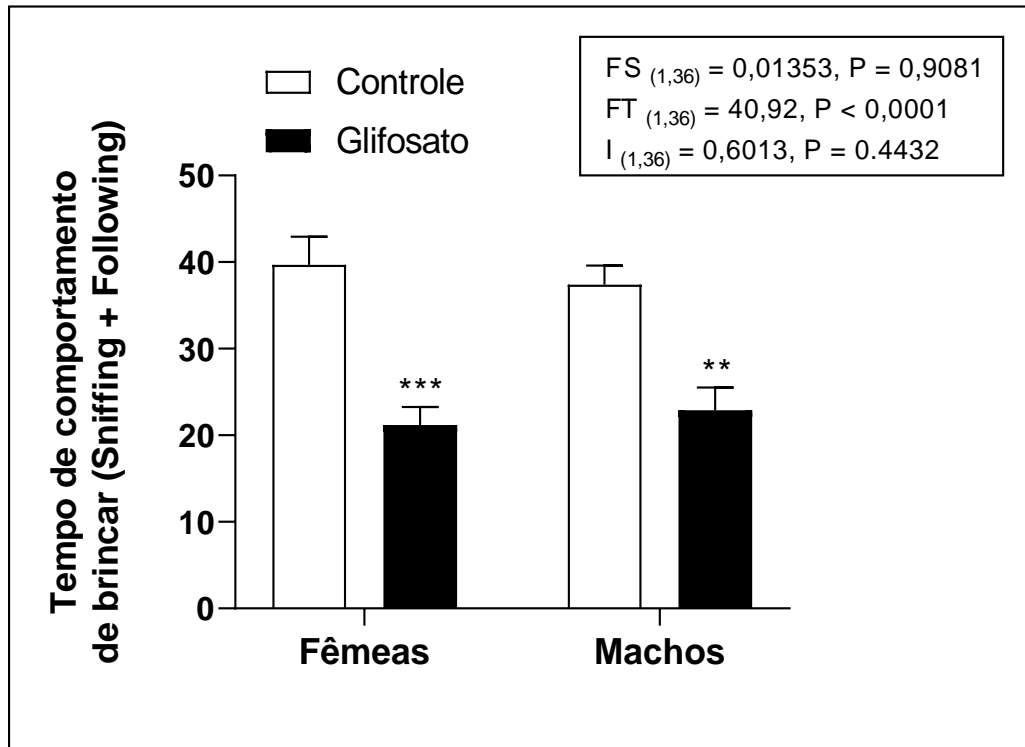


Figura 12 - Avaliação tempo de comportamento de brincar (*following* e *Sniffing*) dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) no teste de comportamento de brincar.

Fonte: Da autora

Legenda: FS= Fator sexo

FT= Fator tratamento

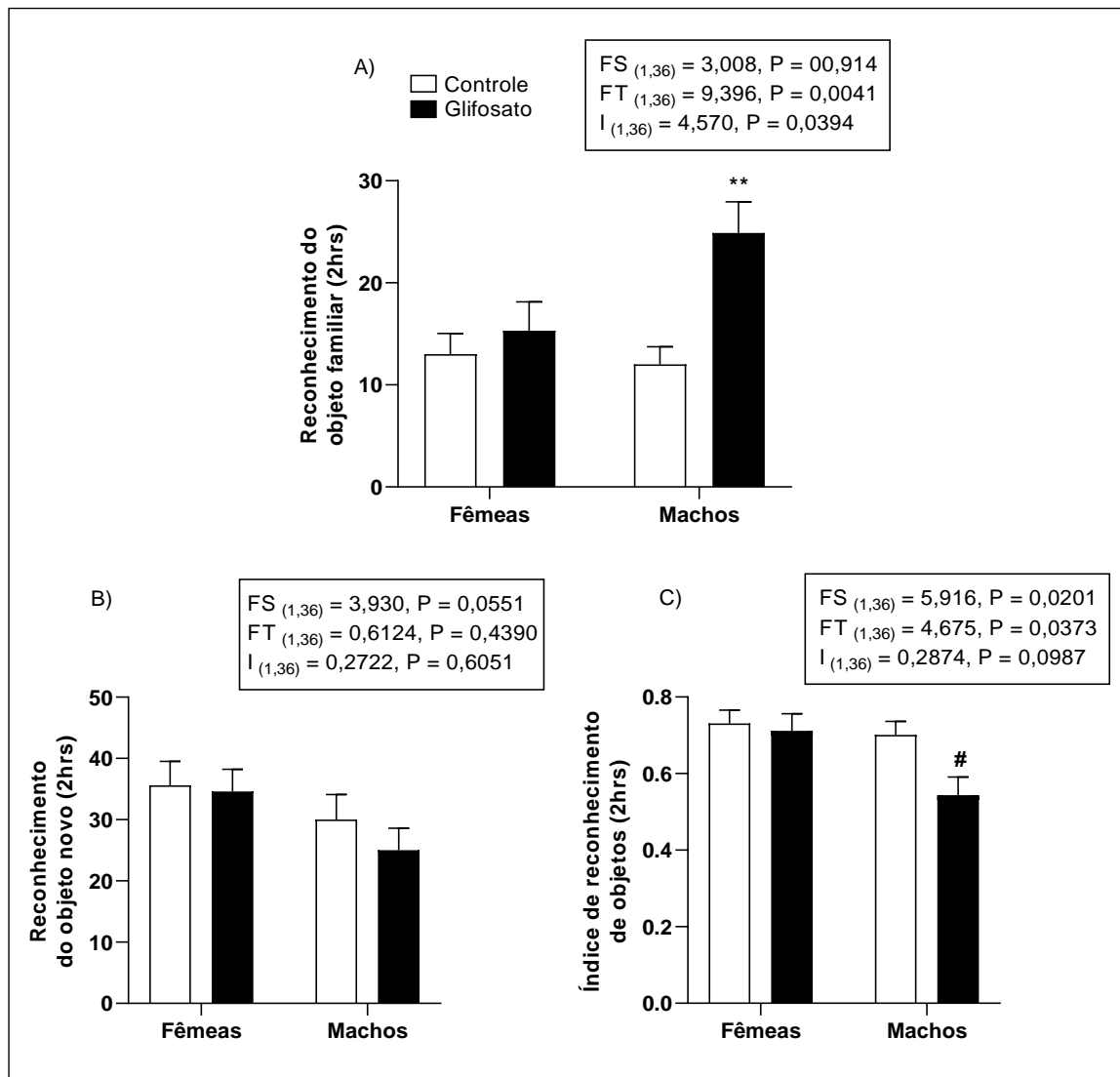
I= Interação entre os fatores.

Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM \*\*\* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,01$  (teste ANOVA *two-way* seguido do pós- teste *Bonferroni*).

### 7.2.6 Reconhecimento de objetos

A figura 13 a seguir refere-se ao teste de reconhecimento de objetos após 2 horas da primeira exposição onde os animais de ambos os grupos experimentais foram familiarizados com os objetos. A análise foi realizada por meio do pós-teste de *Bonferroni* e demonstrou aumento do reconhecimento do objeto familiar de 2hrs (A) por machos do grupo glifosato (\*\* $p < 0,01$ ) e uma diminuição no índice de reconhecimento de objetos de 2hrs (C) de machos do grupo glifosato quando comparados a fêmeas do mesmo grupo experimental ( $\#p < 0,05$ ).

Figura 13 - Avaliação dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) no teste de reconhecimento de objetos de 2hrs.



Fonte: Da autora

Legenda: A) Reconhecimento do objeto familiar

B) Reconhecimento do objeto novo

C) Índice de reconhecimento de objetos (Índice = tempo no objeto novo/tempo no objeto novo + tempo no objeto familiar)

FS= Fator sexo

FT= Fator tratamento

I= Interação entre os fatores.

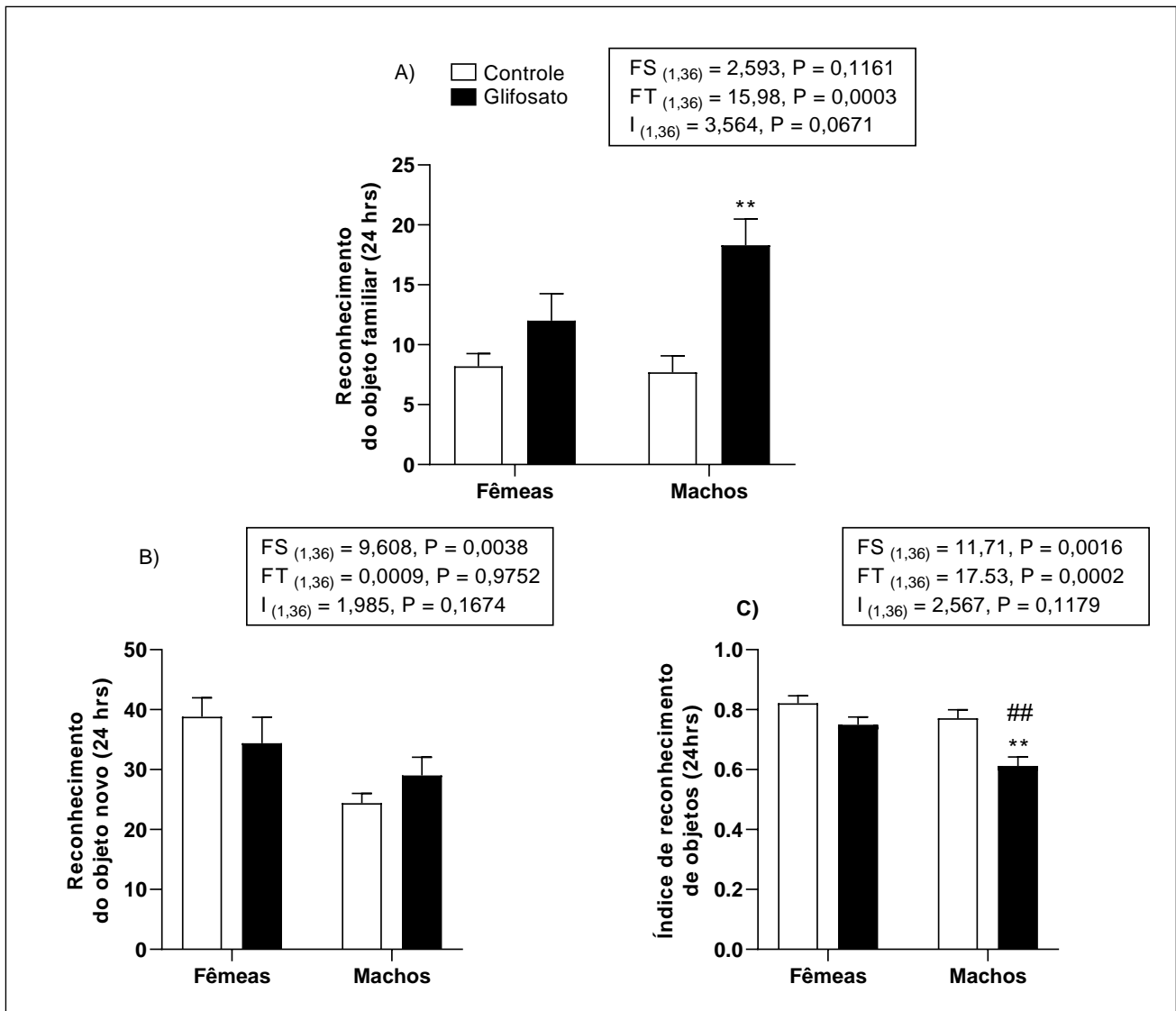
Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM \*\*p<0,01 (quando comparado aos animais do mesmo sexo do grupo controle) e #p<0,05 (quando comparamos animais do mesmo grupo experimental de sexo diferentes) (teste ANOVA two-way seguido do pós- teste *Bonferroni*).

Já na figura 14 é possível observar dados referentes ao teste de reconhecimento de objetos de 24 horas após o teste de 2 horas onde os animais de



ambos os grupos experimentais foram reexpostos a um objeto familiar e expostos a um objeto novo. A análise foi realizada por meio do pós-teste de *Bonferroni* e demonstrou um aumento da exploração do objeto familiar (\*\* $p < 0,01$ ) (A) por machos do grupo glifosato e menor índice de reconhecimento de objetos também por machos do grupo glifosato (\*\* $p < 0,01$ ) (C). Além disso, ainda em (C), as análises demonstraram que houve uma redução no índice de reconhecimento de objetos por parte de fêmeas do grupo glifosato quando comparado a machos do mesmo grupo experimental (## $p < 0,01$ ).

Figura 14 - Avaliação dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) no teste de reconhecimento de objetos de 24hrs.



Fonte: Da autora

Legenda: A) Reconhecimento do objeto familiar

B) Reconhecimento do objeto

C) Índice de reconhecimento de objetos (Índice = tempo no objeto novo/tempo no objeto novo + tempo no objeto familiar).

FS= Fator sexo

FT= Fator tratamento

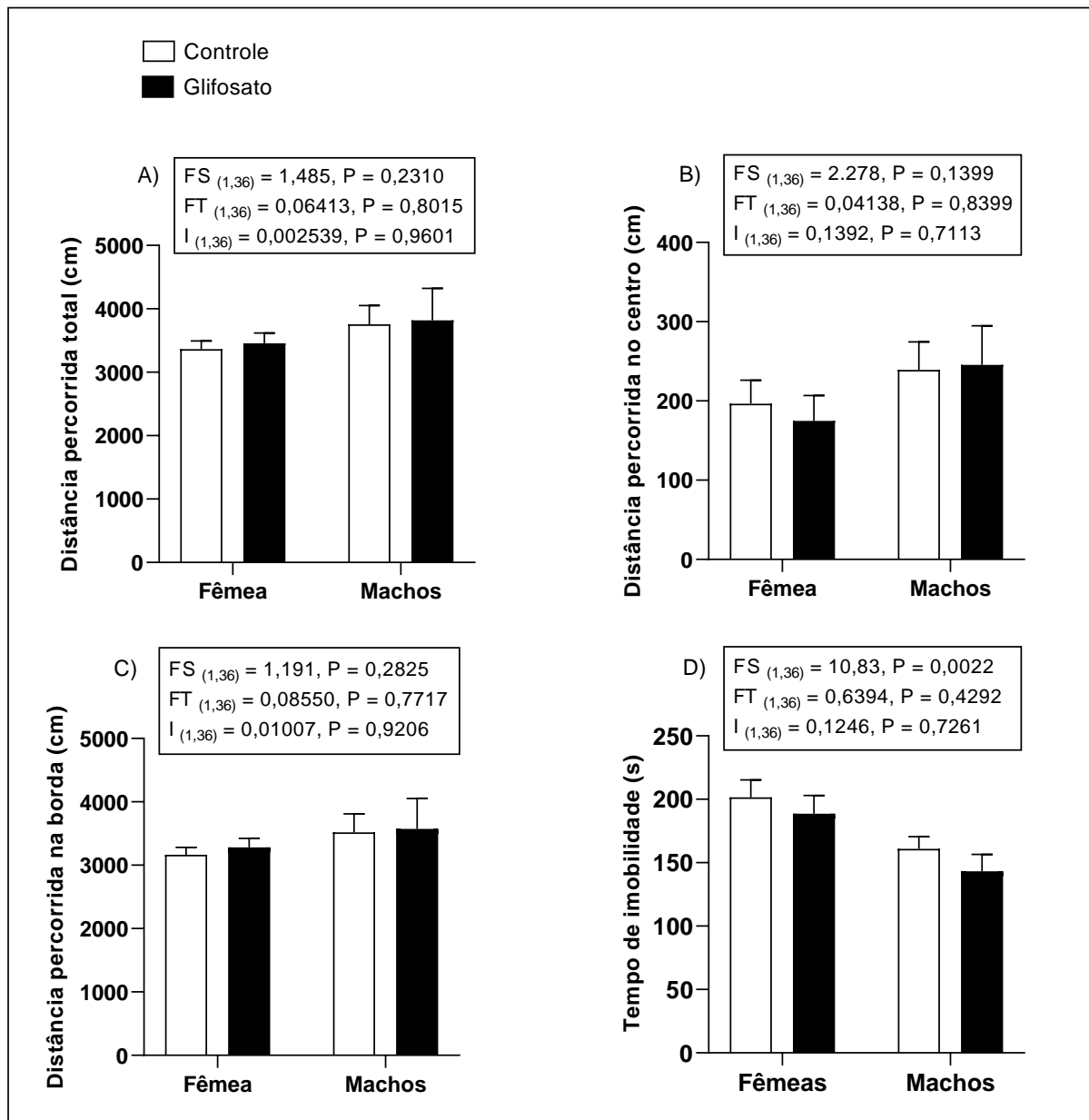
I= Interação entre os fatores.

Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM \*\*p<0,01 (quando comparado aos animais do mesmo sexo do grupo controle) e ##p<0,01 (quando comparamos animais do mesmo grupo experimental de sexo diferentes) (teste ANOVA two-way seguido do pós- teste *Bonferroni*).

### 7.2.7 Teste de campo aberto com filhotes

A figura 15 refere-se ao comportamento dos filhotes fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais no teste de campo aberto. No gráfico A) da figura, é possível observar a distância total (cm) percorrida pelos animais durante o teste, na figura B) observa-se a distância (cm) percorrida pelos animais no centro do aparato, na figura C) observa-se a distância percorrida (cm) a periferia. Por fim, na figura D) é possível observar o tempo de imobilidade destes animais. A análise por meio do pós-teste de *Bonferroni* não revelou quaisquer diferenças entre os animais do grupo Glifosato em relação ao grupo controle em nenhum dos parâmetros avaliados.

Figura 15 - Avaliação dos filhotes do grupo Controle (n=10) e Glifosato (n=10) no teste de campo aberto.



Fonte: Da autora

Legenda: A) Distância total (cm) percorrida

B) Distância (cm) percorrida no centro do aparato

C) Distância (cm) percorrida na periferia do aparato

D) Tempo de imobilidade

FS= Fator sexo

FT= Fator tratamento

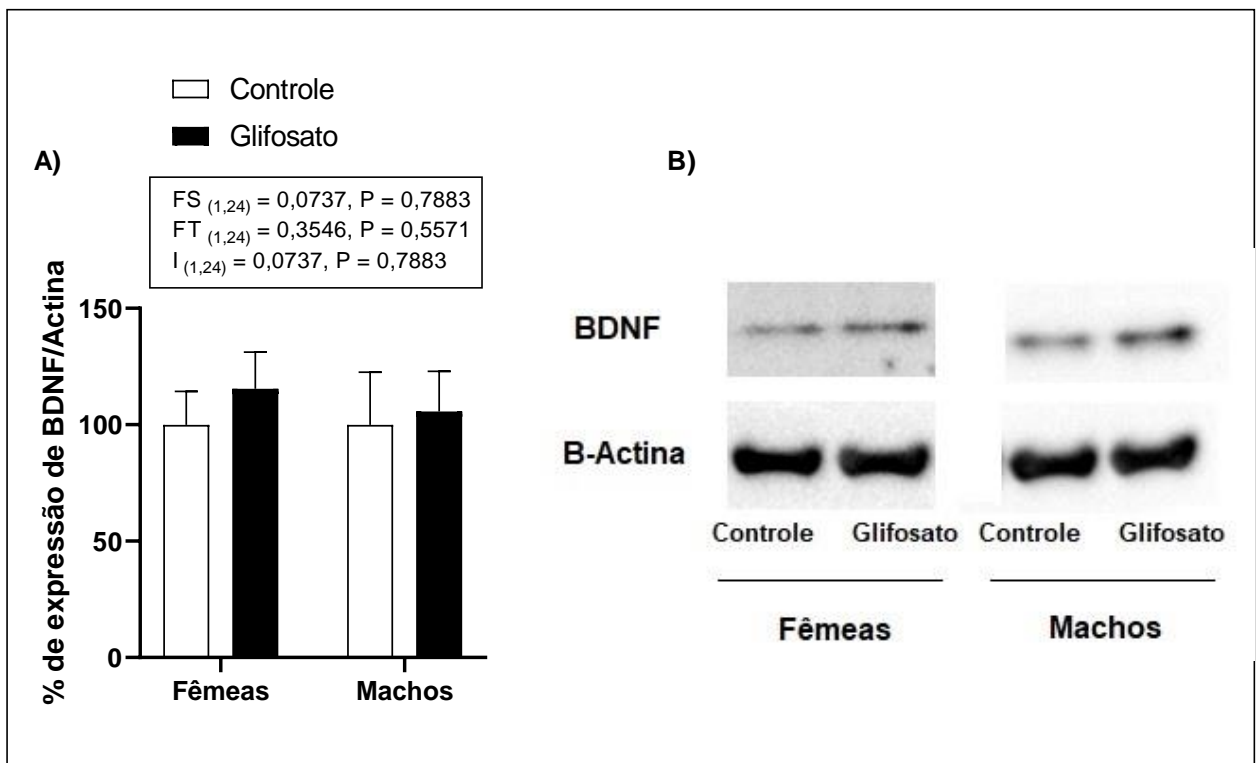
I= Interação entre os fatores.

Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM  $p > 0,05$  (teste ANOVA *two-way* seguido do pós-teste *Bonferroni*).

### 7.2.8 Western Blotting

A Figura 16 mostra a porcentagem de expressão da proteína BDNF/Actina em A) fêmeas e machos. Enquanto isso, em B), temos imagens das membranas usadas na análise da quantificação da expressão de BDNF em fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais. A análise por meio do pós-teste de *Bonferroni* não revelou qualquer diferença na expressão de BDNF entre fêmeas e machos do grupo Glifosato em relação ao grupo Controle ( $p > 0,05$ ).

Figura 16 - Expressão do percentual de BDNF/Actina do córtex pré-frontal de fêmeas e machos grupo Controle (n=7) e Glifosato (n=7).



Fonte: da autora.

Legenda: A) Expressão do percentual de BDNF/Actina do córtex de fêmeas e machos

B) Membranas usadas na análise da quantificação da expressão de BDNF em fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais.

FS= Fator sexo

FT= Fator tratamento

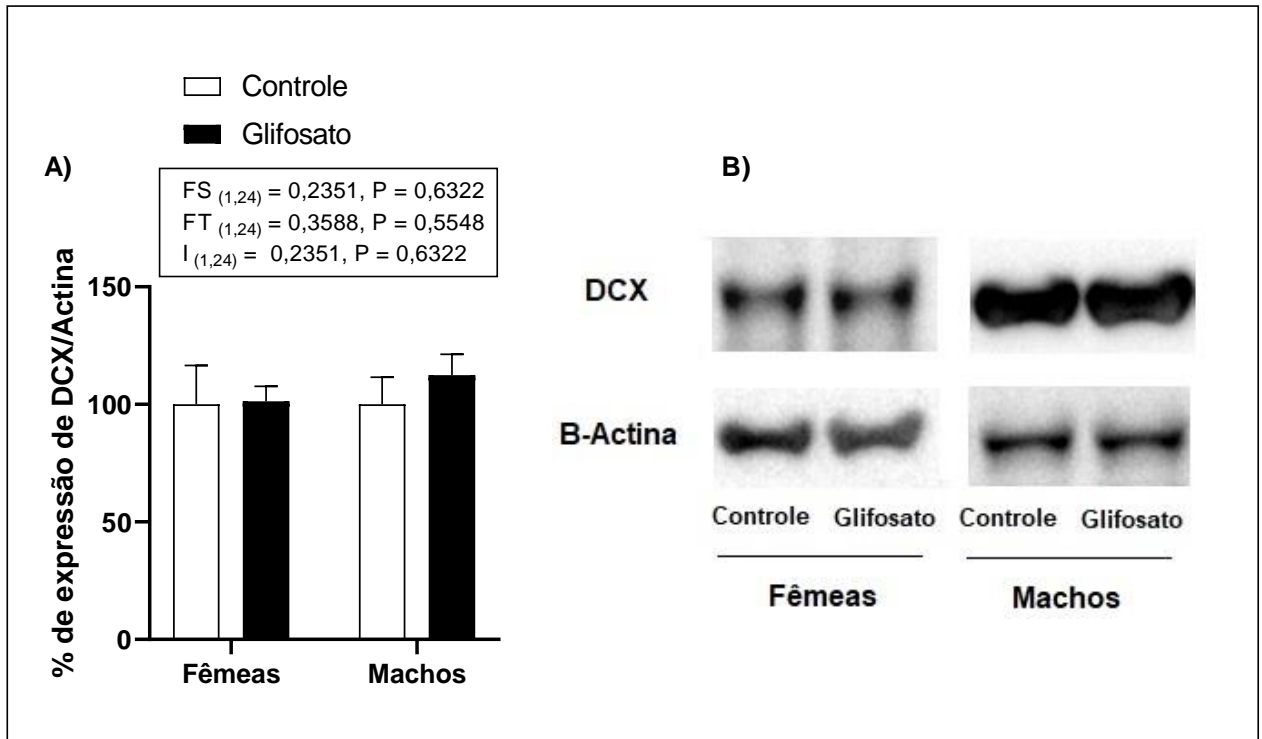
I= Interação entre os fatores

Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM  $p > 0,05$  (teste ANOVA *two-way* seguido do pós-teste *Bonferroni*).

A Figura 17 mostra a porcentagem de expressão da proteína DCX/Actina em A) fêmeas e machos. Enquanto isso, em B), temos imagens das membranas usadas na análise da quantificação da expressão de DCX em fêmeas e machos de ambos os

grupos experimentais. A análise por meio do pós-teste de *Bonferroni* não revelou qualquer diferença na expressão de DCX entre fêmeas e machos do grupo Glifosato em relação ao grupo Controle ( $p > 0,05$ ).

Figura 17 - Expressão do percentual de DCX/Actina do córtex pré-frontal de fêmeas e machos grupo Controle (n=7) e Glifosato (n=7).



Fonte: Da autora.

Legenda: A) Expressão do percentual de DCX/Actina do córtex de fêmeas e machos

B) Membranas usadas na análise da quantificação da expressão de DCX em fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais.

FS= Fator sexo

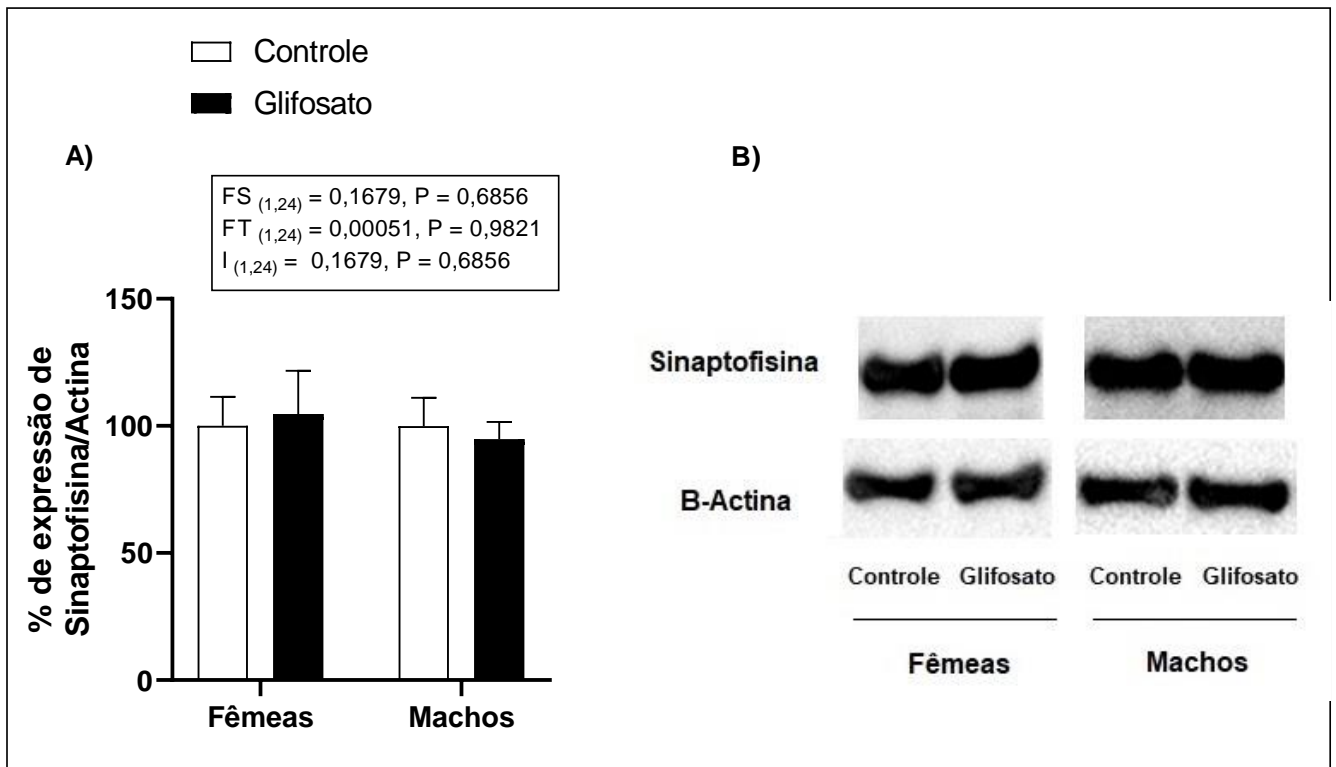
FT= Fator tratamento

I= Interação entre os fatores

Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM  $p > 0,05$  (teste ANOVA *two-way* seguido do pós-teste *Bonferroni*).

A Figura 18 mostra a porcentagem de expressão da proteína Sinaptofisina/Actina em A) fêmeas e machos. Enquanto isso, em B), temos imagens das membranas usadas na análise da quantificação da expressão de Sinaptofisina em fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais. A análise por meio do pós-teste de *Bonferroni* não revelou qualquer diferença na expressão de Sinaptofisina entre fêmeas e machos do grupo Glifosato em relação ao grupo Controle ( $p > 0,05$ ).

Figura 18 - Expressão do percentual de Sinaptofisina/Actina do córtex pré-frontal de fêmeas e machos grupo Controle (n=7) e Glifosato (n=7).



Fonte: Da autora.

Legenda: A) Expressão do percentual de Sinaptofisina/Actina do córtex de fêmeas e machos

B) Membranas usadas na análise da quantificação da expressão de Sinaptofisina em fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais.

FS= Fator sexo

FT= Fator tratamento

I= Interação entre os fatores

Nota: Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM  $p > 0,05$  (teste ANOVA *two-way* seguido do pós-teste *Bonferroni*).

## 7.2.9 Resumo dos resultados

O quadro a seguir mostra um resumo dos resultados obtidos explicitados acima:

Quadro 1 - Resumo dos resultados obtidos

PARÂMETRO AVALIADO	RESULTADO
	Ratas prenhes
Ganho de peso gestacional	Sem diferenças estatísticas entre os grupos.
Ganho de peso na lactação	Redução do peso do grupo glifosato no PND16 19.
Comportamento materno	Aumento do parâmetro exploração sem filhotes.
Campo aberto	Aumento da distância percorrida total (cm).
	Filhotes fêmeas a machos
Peso da ninhada	Sem diferenças estatísticas entre os grupos.
Peso dos filhotes	Redução no ganho de peso de fêmeas glifosato comparado a machos do mesmo grupo no PND28.
Vocalizações ultrassônicas (VUS)	Diminuição do n° de vocalizações de machos glifosato
Retorno ao ninho ( <i>homing behavior</i> )	Sem diferenças estatísticas entre os grupos.
Placa de furos ( <i>Hole board</i> )	Aumento do n° de imersões com a cabeça nos furos do aparato pelas fêmeas do grupo glifosato.
Comportamento de brincar ( <i>Play behavior</i> )	Redução no tempo de brincadeira de fêmeas e machos do grupo glifosato.
Reconhecimento de objetos (2 e 24 horas)	2hrs: Aumento na exploração do objeto familiar de machos do grupo glifosato comparado ao controle e redução do índ. de rec de objetos por machos glifosato comparado a fêmeas do mesmo grupo 24hrs: Aumento na exploração do objeto familiar de machos do glifosato comparado ao controle e redução do índ. de rec. de objetos por machos do glifosato comparado ao controle e redução do índ. de rec de objetos de a fêmeas do mesmo grupo.
Campo aberto	Sem diferenças estatísticas entre os grupos.
% de expressão BDNF, DCX e Sinaptofisina	Sem diferenças estatísticas entre os grupos.

Fonte: Da autora



## 8 DISCUSSÃO

### 8.1 DISCUSSÃO DOS TESTES COMPORTAMENTAIS E GANHO DE PESO CORPORAL DAS MÃES

#### 8.1.1 Ganho de peso das ratas prenhes durante o período gestacional e de lactação

O peso das ratas prenhes foi avaliado a cada 3 dias durante toda gestação e lactação. O ganho de peso é um parâmetro importante a ser avaliado já que a gestação é um período onde há naturalmente um aumento do consumo alimentar, tendo em vista que é preciso suprir as necessidades energéticas da mãe e dos fetos (AMUGONGO; HLUSKO, 2014).

O consumo materno de 50mg/kg/dia de herbicida à base de glifosato, Zapp QI 620, durante o período gestacional não foi capaz de alterar o ganho de peso das ratas. Corroborando com nossos estudos, Rocha (2019) observou que a administração da mesma dose (50mg/kg/dia) do herbicida durante a gestação também não foi capaz de alterar o ganho de peso. No estudo de Rocha (2019), o herbicida foi administrado durante o 15º dia de gestação até o 7º dia de lactação, além disso, é importante dizer que a diminuição do peso foi observada em ratas que receberam a dose de 150mg/kg/dia de glifosato durante o mesmo período de tempo.

Da mesma forma, resultados semelhantes foram observados no estudo de Dallegrave *et al.* (2007), onde a administração de 50mg/kg/dia do herbicida não foi suficiente para alterar o ganho de peso gestacional. Ressalta-se que, no estudo de Dallegrave *et al.* (2007), o herbicida foi administrado durante toda gestação e lactação assim como no presente estudo.

Enquanto isso, o estudo de Pu e colaboradores (2020), ofertou glifosato a ratas durante a gestação e lactação na mesma dose que nosso estudo (50mg/kg/dia, ou 0,098%) por meio da água de beber. Os resultados encontrados por Pu e colaboradores, em contraste com os nossos, demonstraram uma redução do ganho de peso das ratas gestantes.

Por outro lado, durante o período de lactação, observamos uma redução no ganho de peso das ratas no PND16 E PND19. Novamente Dallegrave *et al.* (2007) figura entre os estudos encontrados que avaliam o ganho de peso das ratas.

Diferentemente do nosso estudo, Dallegrave não observou alterações no ganho de peso das ratas durante a lactação ofertando a mesma dose pelo mesmo período de tempo que o presente estudo.

Embora tenhamos poucos dados na literatura referente ao consumo materno de herbicida à base de glifosato, Roundup<sup>®</sup>, e suas alterações sobre o peso materno gestacional e lactacional, os resultados encontrados em nosso trabalho e nos demais citados indicam que, mesmo com um consumo dentro do estabelecido pelo NOAEL, o herbicida glifosato é capaz de causar efeitos deletérios às ratas durante o período perinatal, mais precisamente como visto em nossos resultados, durante a lactação (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

### **8.1.2 Comportamento materno**

O comportamento materno das ratas foi avaliado durante 5 dias (PND2-6), somando-se um total de 300 observações ao longo destes dias. Entre os parâmetros avaliados temos parâmetros maternais como posicionar-se sobre os filhotes, cifose, posição passiva, número de lambidas, número de construções de ninho (forragear), *self-grooming* (limpando a barriga) e número de vezes que a rata pega o filhote com a boca. Além disso, avaliamos também comportamentos considerados não maternais, tais como número de vezes em que a rata fica sem os filhotes e não explora o ambiente, número de vezes em que a rata está se alimentando sem os filhotes, vezes em que ela está sem filhotes e explorando o ambiente e, por fim o *self-grooming* não maternal (limpando a cabeça).

A avaliação do comportamento materno se faz fundamental uma vez que, alterações no comportamento da mãe podem refletir diretamente sobre a saúde de seus filhotes. Sabe-se que o cuidado da mãe é importante para manter a temperatura adequada dos filhotes que são ainda imaturos e não possuem pelos, dessa maneira, o ato de construir o ninho mantendo todos os filhotes próximos uns dos outros e o fato da mãe posicionar-se sobre eles contribui para a estabilização da temperatura corporal da ninhada. Ainda neste sentido, o comportamento apresentado pela mãe de lambe o filhote auxilia na realização das necessidades fisiológicas dos mesmos (PATIN *et al.*, 2002).

Os comportamentos básicos apresentados pelas mães nos dias iniciais da lactação também são capazes de impactar na vida adulta de sua prole, positiva ou

negativamente. Um exemplo disso está demonstrado no estudo de Batista (2015) onde evidenciou-se que ratas *Wistar* que receberam dieta hipoproteica durante toda gestação apresentaram um aumento nos parâmetros maternos o que, mais tarde, veio a impactar em seus descendentes que, durante a vida adulta, apresentaram uma diminuição no comportamento tipo ansioso.

No presente estudo, foi possível observar que houve um aumento na atividade exploratória das ratas do grupo glifosato através da análise do parâmetro de comportamento não materno “sem filhotes explorando”, como já demonstrado anteriormente (figura 5, A). Porém, ainda que tenha ocorrido um aumento na exploração materna, não foi possível observar diferenças entre o percentual de comportamento materno e não materno. O aumento da atividade exploratória das ratas foi posteriormente comprovado no teste de campo aberto que será discutido no tópico a seguir (10.1.3).

Embora exista uma grande relevância em estudar a relação entre o comportamento materno e o neurodesenvolvimento saudável da prole, como já abordado acima, a literatura carece de estudos que demonstram essa relação quando o consumo de glifosato perinatal é colocado em pauta.

Quando comparamos nossos resultados ao único estudo anterior que avalia o comportamento materno de ratas expostas ao herbicida glifosato, observamos que Dechartres *et al.* (2019), ao administrar 5mg/kg/dia de glifosato do 10º dia de gestação até o fim da lactação encontrou um aumento no número de lambidas ao avaliar o comportamento das ratas do PND2 ao PND6. Já os resultados referentes aos parâmetros cifoze, sobre os filhotes, posição passiva e forrageando assemelham-se aos encontrados neste estudo, ou seja, não foram significativamente diferentes quando comparados ao grupo controle, corroborando assim com nossos resultados, demonstrando que o consumo de glifosato é capaz de alterar o comportamento de ratas expostas à substância durante o período perinatal.

### **8.1.3 Campo aberto das mães**

O teste de campo aberto foi realizado no PND6 com as mães de ambos os grupos experimentais. Os parâmetros avaliados foram distância percorrida total (cm), distância percorrida na periferia (cm), distância percorrida no centro (cm) e tempo de imobilidade. Esse teste é comumente utilizado para avaliar comportamento tipo

ansioso e a locomoção dos animais. O comportamento tipo ansioso é avaliado por meio dos parâmetros distância percorrida e tempo de permanência no centro do aparato, enquanto que a avaliação da locomoção dos animais é realizada analisando-se parâmetros como distância percorrida total e tempo de imobilidade (TOUMI *et al.*, 2016).

Em nosso estudo, o teste de campo aberto foi realizado unicamente com a intenção de avaliar a locomoção das ratas durante a lactação, isso, pois, a partir do momento em que se analisa a atividade locomotora, valida-se os demais resultados, já que se o animal apresentar qualquer déficit locomotor, pode indicar que, talvez os demais resultados tenham sido influenciados por esse déficit.

Sendo assim, como citado no tópico anterior, as mães do grupo glifosato apresentaram uma maior atividade exploratória no teste de comportamento materno ao analisar o parâmetro não materno “sem filhotes explorando”. O aumento da atividade exploratória pode ser comprovado no teste de campo aberto já que, os animais deste mesmo grupo apresentaram um aumento na distância percorrida total (como demonstrado na figura 6, A). Os demais parâmetros avaliados como distância percorrida no centro e periferia além do tempo de imobilidade, não diferiram entre as mães do grupo controle e glifosato.

Embora nossos resultados tenham demonstrado que as ratas lactantes não tiveram um déficit locomotor, outros estudos como o de Camargo (2014) e Rocha (2019) demonstraram uma redução da atividade geral observada no campo aberto de ratas que receberam a dose de 50mg/kg/dia de glifosato.

É importante ressaltar que no presente estudo, o herbicida à base de glifosato foi administrado durante toda gestação e lactação, diferentemente do estudo de Camargo (2014) e Rocha (2019), que administraram a substância entre o 15º dia gestacional e o 7º dia de lactação. É importante evidenciar que, até o presente momento, os dois estudos citados são os únicos que avaliaram a atividade locomotora em campo aberto de ratas que consumiram herbicida à base de glifosato, Roundup®.

Apesar disso, a somatória de nossos resultados confirma que ratas que receberam 50mg/kg/dia de herbicida à base de glifosato Roundup® apresentaram um comportamento exploratório aumentado durante o período de lactação, elucidando os efeitos ocasionados pelo consumo da substância.

## 8.2 DISCUSSÃO DOS TESTES COMPORTAMENTAIS E GANHO DE PESO CORPORAL DA PROLE

### 8.2.1 Ganho de peso das ninhadas e dos filhotes

Os animais foram pesados em ninhada a cada 3 dias durante toda a lactação. Após o desmame, os filhotes passaram a ser pesados individualmente até o dia de sua eutanásia. A ninhada é totalmente dependente da amamentação materna até o 21º dia de vida. Após esse período, os filhotes passam a ter autonomia para buscar o próprio alimento, mas enquanto isso, a mãe deve apresentar comportamentos que favoreçam a amamentação dos filhotes, garantindo assim a sua sobrevivência.

Nesse sentido, o presente estudo ao avaliar o ganho de peso corporal da prole, não encontrou quaisquer variações de peso entre as proles do grupo controle e glifosato durante o período de lactação, ou seja, enquanto eram pesados em ninhada. Porém durante o período pós desmame, foi possível observar uma redução no ganho de peso de fêmeas do grupo glifosato quando comparadas aos machos do mesmo grupo experimental. Por outro lado, não foram encontradas diferenças estatísticas no período pós desmame entre os grupos experimentais.

Trabalhos que vão ao encontro da mesma linha de pesquisa do nosso estudo, tal como o estudo de Dallegrave *et al.* (2007), que ao administrar a mesma dose de glifosato (50mg/kg/dia), pelo mesmo período (gestação e lactação), não encontrou diferenças entre o peso da prole no período de lactação e pós desmame quando comparado ao controle. Da mesma forma, o estudo de Camargo (2014), também não observou alterações no peso da prole ao administrar a dose de 50mg/kg/dia para as mães destes filhotes. Camargo (2014) veio a encontrar diferenças significativas no peso da prole durante a lactação e no período pós desmame, apenas naqueles animais onde suas mães foram expostas a doses mais altas de glifosato (100 e 150mg/kg/dia). Ainda nesse sentido, Gallegos e colaboradores (2015) ao ofertar a dose de 100mg/kg/dia de glifosato na água de beber de ratas durante o período perinatal, também não observou quaisquer alterações no ganho de peso da prole quando comparado ao controle.

Muito embora o glifosato seja responsável por diversas alterações, no presente estudo, ele não foi capaz de alterar o peso da prole quando comparado ao grupo controle, corroborando com os demais estudos já publicados que ofertavam a mesma

dose pelo mesmo período de tempo. Ressalta-se a presença do dimorfismo sexual encontrado já que fêmeas glifosato tiveram uma diminuição do peso quando comparado aos machos do mesmo grupo.

### **8.2.2 Vocalizações ultrassônicas (VUS)**

Os roedores são capazes de emitir vocalizações sonoras que podem ser perceptíveis ao ouvido humano, assim como também podem emitir vocalizações chamadas ultrassônicas, que estão fora da nossa capacidade de percepção, com frequências variando entre 100 e 120.000Hz (RIEDE; BORGARD; PASCH, 2017).

A função das vocalizações ultrassônicas é bastante variada, estas são emitidas por roedores como resposta ao reconhecimento social, para atração de parceiros e também como ameaça a rivais, ou seja, as VUS estão intrinsecamente ligadas à comunicação social destes animais (ZALA *et al.*, 2017). Além disso, os filhotes nascem surdos e cegos, e são incapazes de alimentar-se ou se aquecer sozinhos, assim, as VUS emitidas por eles tem a importante função de avisar às mães sobre as necessidades dos filhotes (HAHN; LAVOORY, 2005).

Hoje, o número de vocalizações ultrassônicas emitidas pelos filhotes vem sendo amplamente utilizado como parâmetro para estudo das características do comportamento tipo autista em roedores. A literatura ressalta que animais que vocalizam menos sugerem um déficit de comunicação (GREENE-COLOZZI *et al.*, 2014; YOUNG *et al.*, 2010).

Batista e colaboradores (2018) mostraram que a desnutrição proteica materna foi responsável pela diminuição do número de vocalizações ultrassônicas de filhotes fêmeas e machos, concluindo assim que animais filhos de mães que sofreram restrição proteica durante a gestação tornaram-se animais com déficit de comunicação, comportamento típico do autismo.

Ainda nesse sentido, o estudo de Novais e colaboradores (2021), ao induzir o sobrepeso materno através da redução de ninhada observou que filhotes de mãe com sobrepeso tiveram uma redução no número de vocalizações, indicando uma possível deficiência na comunicação com suas mães e um déficit de comunicação social precoce.

Como se sabe, o TEA tem etiologia genética e ambiental. No estudo de Wöhr e colaboradores (2011), eles ressaltam que mutações na família de genes SHANK

foram encontradas em vários indivíduos autistas. Os genes SHANK codificam proteínas estruturais localizadas na densidade pós sináptica de sinapses excitatórias. Partindo desse princípio, Wohr testou uma mutação no gene SHANK1 e demonstrou que esses animais também apresentavam menor nº de vocalizações ultrassônicas, indicando um déficit na comunicação social, similar ao de indivíduos autistas.

Enquanto isso, Gzielo e colaboradores (2020) demonstraram que animais que receberam ácido valpróico (VPA) durante o período gestacional tiveram filhotes que vocalizavam menos. Já é bem elucidado que o VPA é responsável por induzir comportamentos semelhantes aos do autismo em roedores. Sendo assim, Gzielo conclui que esses animais tem um déficit na comunicação e ressalta ainda que as VUS podem funcionar como um fator protetor, já que, é por meio delas que o animal comunica-se com a mãe e interage com o ambiente.

No presente estudo, o número de vocalizações ultrassônicas foi avaliado durante o PND 5 de filhotes fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais. Nossos resultados mostraram uma redução no número de vocalizações dos filhotes machos do grupo glifosato quando comparado ao grupo controle. Este resultado sugere que filhotes machos, filhos de mães que receberam glifosato na dose de 50mg/kg/dia sofreram alterações provavelmente durante o período gestacional ocasionadas pelo consumo de herbicida à base de glifosato e, por este motivo, apresentam um déficit de comunicação social, como explicitado pela figura 9).

### **8.2.3 Retorno ao ninho (*Homing Behavior*)**

Além das vocalizações ultrassônicas, outro excelente parâmetro para avaliar a comunicação social em roedores se dá por meio da análise de sua discriminação olfatória. Estes animais utilizam o sistema olfativo para comunicar-se, interagir e perceber o ambiente. Desta maneira, entendemos que o sistema olfatório destes animais é bastante complexo e essencial para que os roedores consigam discriminar situações sociais e não sociais. Sabendo disso, o comprometimento da discriminação olfatória relaciona-se diretamente com déficits na interação social. (WOHR, 2015).

Servadio *et al.* (2016), ao administrar ácido valpróico para ratas *Wistars* durante a gestação, também obteve um aumento da latência por parte dos filhotes para encontrar a maravalha da mãe e uma diminuição no tempo de permanência no local. Servadio *et al.* (2016) sugeriu que estes animais possuíam um déficit de comunicação

e discriminação social. Vale ressaltar mais uma vez que o VPA é utilizado para indução de comportamentos semelhantes aos do autismo em modelos animais.

Ainda neste sentido, Batista e colaboradores (2018) mostraram que a desnutrição proteica materna foi responsável pelo aumento da latência de fêmeas para encontrar a maravalha da mãe e pela menor permanência de machos na maravalha do ninho. Embora este estudo seja diferente do tipo de tratamento usado em nosso trabalho, observamos que Batista e colaboradores (2018) concluíram que uma diminuição do número de vocalizações ultrassônicas (como foi encontrado no estudo de Batista e também em nossos estudos) associado a um mau desempenho dos filhotes no teste de retorno ao ninho, sugere que estes animais apresentam comportamentos básicos associados ao autismo.

Mais um estudo que confirma a importância de se investigar a discriminação olfatória no teste de retorno ao ninho é o estudo de Novais e colaboradores (2021), já citado anteriormente. Ao induzir sobrepeso materno por redução de ninhada e investigar se a prole dessas mães teria prejuízos no neurodesenvolvimento, Novais encontrou um aumento na latência para atingir a maravalha da mãe e um menor tempo de permanência dos filhotes nessa maravalha, bem como os dados encontrados em nosso estudo. Novais, ao final, conclui que o déficit olfatório é mais um dos fatores que contribuem para um inadequado desenvolvimento, resultado em sintomas característicos do autismo.

Em nosso estudo, o teste de retorno ao ninho foi realizado com os filhotes fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais no PND13. Embora tenhamos encontrado alterações no teste de VUS, no presente teste, os resultados não demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, ou seja, fêmeas e machos do grupo glifosato foram capazes de discriminar as pistas olfativas do teste, ou seja, estes animais discriminaram o odor neutro da maravalha limpa e o odor da maravalha do ninho da mãe.

Desta maneira, nossos resultados demonstram que o consumo de glifosato materno gestacional e lactacional não foi capaz de induzir alterações na discriminação olfatória da prole mas, de qualquer maneira, tomando como base os estudos citados, é possível perceber que o funcionamento correto do sistema olfatório contribui para o desenvolvimento de comportamentos sociais e que prejuízos na discriminação olfatória contribuem para que os animais tenham uma comunicação prejudicada, o que ressalta a importância da realização deste teste no presente estudo.



#### 8.2.4 Placa de furos (*Hole Board*)

O teste de placa de furos, também conhecido como *hole board*, consiste basicamente em um aparato com uma placa suspensa que contém vários furos em sua superfície. Esse teste é realizado para verificar a presença de comportamentos estereotipados e repetitivos em roedores. Estes comportamentos são verificados quando os animais mergulham a cabeça nos buracos diversas vezes repetidamente. Esse comportamento assemelha-se ao padrão de comportamentos de indivíduos autistas que também apresentam comportamentos repetitivos (MAKANJOULA *et al.*, 1977).

Em nosso estudo, o teste de placa de furos foi realizado entre o PND 28-32 com filhotes fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais. Os resultados revelaram que os filhotes fêmeas do grupo glifosato imergiram com a cabeça nos buracos um maior número de vezes quando comparado ao grupo controle, indicando assim a presença de um comportamento repetitivo que provavelmente fora causado durante a gestação e/ou lactação devido ao consumo materno de herbicida à base de glifosato.

Em seu estudo, Meeking *et al.* (2020) demonstrou que infusões intracerebroventriculares de ácido propiônico foi capaz de aumentar o comportamento estereotipado de roedores no teste de placa de furos. Estudos anteriores demonstram que a infusão dessa substância em ratos adultos foi capaz de produzir diversas alterações comportamentais que se assemelhavam a alterações observadas em pacientes com TEA.

Ainda neste sentido, Lugo e colaboradores (2014) demonstraram que roedores knockout, com deleção específica do subconjunto de neurônios PTEN, apresentaram um aumento no número de imersões da cabeça nos buracos durante o teste de placa de furos, confirmando a presença do comportamento repetitivo. Salienta-se que o subconjunto de neurônios PTEN é responsável por regular a via de sinalização intracelular PI3K / AKT / mTOR que hoje é conhecida por possuir um papel crítico sobre o autismo.

Diante de nossos resultados e dos artigos citados, nos apoiamos no fato de que o teste de placa com furos já é muito bem descrito como um teste para estudar o comportamento exploratório e estereotipado de roedores. Dessa maneira, concluímos

que esse teste nos permite afirmar sobre a existência ou não de comportamentos estereotipados semelhantes aos do autismo (MAKANJOULA *et al.*, 1977).

### 8.2.5 Comportamento de brincar (*Play behavior*)

O teste de comportamento de brincar tem como objetivo principal avaliar os déficits na interação social em roedores (CEZAR *et al.*, 2018). Sabe-se que, pessoas com TEA tem grandes dificuldades para se adaptar a contextos sociais e relacionar-se com outras pessoas (APA, 2013; JORDAN, 2003; DÖLEN, 2015). Por meio do presente teste é possível analisar, em roedores, comportamentos semelhantes ao autismo avaliando o comportamento lúdico quando animais do mesmo grupo experimental (não irmãos e do mesmo sexo) são colocados frente a frente em uma arena por um tempo determinado (KIRSTEN *et al.*, 2015).

No presente estudo, o teste de comportamento de brincar foi realizado entre o PND28 e 32 com filhotes fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais. Os resultados revelaram uma redução no tempo de comportamento de brincar (*Sniffing*, designado como cheirar + *Following*, designado como seguir o parceiro) por parte de fêmeas e machos do grupo Glifosato, como demonstrado anteriormente na figura 12.

O estudo de Cezar e colaboradores (2018) observou que ratas que receberam ácido valpróico (VPA) de forma aguda durante a gestação tiveram filhotes com uma redução no comportamento de *sniffing* e *following* (comportamento de brincar). Bem como citado no item 10.7, é importante, mais uma vez, ressaltar que o VPA é utilizado para indução de comportamentos tipo autista em modelos animais. No estudo de Kirsten, temos a confirmação da indução de um comportamento autista típico por meio do ácido valpróico quando analisamos os resultados do teste de comportamento de brincar, onde foi possível observar uma redução na sociabilidade dos animais filhos de mães que receberam uma dose aguda de VPA durante a gestação.

Ainda nesse sentido, o estudo de Schneider e Przewlocki (2005), expôs igualmente ratas prenhas ao VPA também de forma aguda. Seus resultados demonstraram redução no comportamento social de brincar, o que indica que a prole de ratas expostas ao VPA tem uma menor capacidade de compreensão e expressão de sinais de comunicação.

Seguindo as análises, o estudo de Ribeiro e colaboradores (2018), mostrou que a prole de ratas que receberam uma dieta rica em gorduras, calorias e altamente

palatável durante a gestação tiveram uma redução no comportamento lúdico no teste de comportamento de brincar. O comportamento de brincadeira é considerado como uma importante forma de interação social em mamíferos e a capacidade de interagir socialmente com outros animais participando de brincadeiras indica um desenvolvimento saudável (VANDERSCHUREN, 1997; SPEAR, 2000, TREZZA, 2010).

### **8.2.6 Reconhecimento de objetos**

O teste de reconhecimento de objetos tem por objetivo avaliar a capacidade de um animal em reconhecer um objeto que fora anteriormente explorado, frente a um objeto nunca visto antes. Em alguns trabalhos, esse teste ajuda a avaliar a memória, mas, no presente estudo, o teste de reconhecimento de objetos avalia a capacidade exploratória dos animais, onde é possível observar se roedores apresentam um comportamento exploratório restritivo (observado quando o animal explora mais o objeto familiar) ou um comportamento exploratório normal (observado quando o animal explora mais o objeto novo) já que quando expostos a ambientes e objetos diferentes, roedores tendem a exibir um comportamento exploratório (CAPLETTE; WICKER; GOSELIN, 2016). Ainda nesse sentido, é importante ressaltar que crianças com o TEA apresentam padrões comportamentais ritualizados, além de comportamentos não apenas repetitivos, mas também restritivos, dando sempre preferência a lugares, pessoas e objetos já conhecidos (APA, 2013).

Em nossos estudos o teste de reconhecimento de objetos de 2 e 24 horas foi realizado com fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais durante o PND 28-32.

Nossos resultados relacionados ao teste de 2 horas demonstraram que machos apresentaram maior exploração do objeto familiar quando comparado ao novo no teste de 2 horas. Além disso, o índice de reconhecimento de objetos, que refere-se, basicamente, ao quanto os animais exploraram o objeto novo em relação ao familiar, está também reduzido em machos quando comparados a fêmeas também do grupo glifosato, evidenciando o dimorfismo sexual. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas com relação à exploração de fêmeas quando comparado ao controle.

Ainda nesse sentido, nossos resultados relacionados ao teste de 24 horas também demonstraram que machos apresentaram maior exploração do objeto familiar quando comparado ao novo no teste de 24 horas. Além disso, o índice de reconhecimento de objetos, já explicitado anteriormente, está também reduzido em machos do grupo glifosato quando comparado ao controle e, além disso, foi possível identificar uma redução no índice de reconhecimento de objetos de machos do grupo glifosato quando comparado a fêmeas do mesmo grupo experimental.

O estudo de Batista e colaboradores (2018), observou que a desnutrição proteica materna foi responsável pela maior exploração do objeto familiar e menor exploração do objeto novo por filhotes machos, indicando que estes animais possuíam um comportamento exploratório restritivo, com padrões ritualizados, tal como observado em crianças com autismo.

Ainda nesse sentido, Takuma e colaboradores (2014) encontraram resultados semelhantes aos apresentados em nosso estudo quando trataram ratas prenhas cronicamente com VPA durante a gestação, sendo assim, houve uma diminuição no índice de reconhecimento do objeto novo.

Para complementar, o estudo de Novais e colaboradores, 2021, demonstrou que o sobrepeso materno induzido por redução de ninhada foi responsável pelo aumento no tempo de exploração do objeto familiar por parte de fêmeas e machos, bem como uma redução no índice de reconhecimento de objetos. O estudo associa tais alterações a sintomas encontrados em distúrbios do neurodesenvolvimento, tal como o autismo.

### **8.2.7 Teste de Campo aberto com filhotes**

O teste de campo aberto foi realizado entre o PND28-32 com os filhotes fêmeas e machos de ambos os grupos experimentais. Os parâmetros avaliados, assim como nas mães, foram distância percorrida total (cm), distância percorrida na periferia (cm), distância percorrida no centro (cm) e tempo de imobilidade.

Como já citado anteriormente, esse teste é comumente utilizado para avaliar comportamento tipo ansioso e a locomoção dos animais, sendo o comportamento tipo ansioso avaliado por meio dos parâmetros distância percorrida e tempo de permanência no centro do aparato, enquanto que a avaliação da locomoção dos

animais é realizada analisando parâmetros como distância percorrida total e tempo de imobilidade (TOUMI; MERZOUG; TAHRAOUI, 2016).

Assim como no teste de campo aberto realizado com as mães durante a lactação, o teste de campo aberto com filhotes também foi realizado com a intenção de avaliar a locomoção da prole após o desmame, isso, pois, a partir do momento em que se analisa a atividade locomotora dos animais, valida-se os demais resultados, já que se o animal apresentar qualquer déficit locomotor, pode indicar que, talvez os demais resultados tenham sido influenciados por esse déficit.

Nossos resultados não demonstraram quaisquer diferenças entre os sexos nem entre os grupos experimentais nos parâmetros avaliados, indicando que o consumo materno gestacional e durante o período de lactação de herbicida à base de glifosato não foi capaz de conduzir prejuízos na locomoção da prole.

Corroborando com nossos achados, Cattani *et al.* (2017) também não verificou prejuízos locomotores na prole de mães que consumiram 1% de glifosato na água de beber entre o período gestacional (GD5) e o período de lactação (PND15). Camargo (2014) também não encontrou alterações relevantes na atividade geral de filhotes fêmeas e machos avaliados no teste de campo aberto em nenhuma das doses ofertadas às mães durante a gestação e lactação (50, 100 e 150mg/kg/dia).

Baier e colaboradores (2017), ao administrar glifosato por via intranasal 2mg/narina/dia, 3 dias por semana durante 4 semanas (somando um total de 50mg/kg/dia) não observou alterações na distância percorrida total (cm) por camundongos adultos.

Dessa maneira, podemos concluir que o consumo materno de 50mg/kg/dia de herbicida à base de glifosato durante a gestação e lactação não é ser capaz de conduzir a prejuízos locomotores na prole.

### **8.2.8 Western blotting**

Hoje sabemos muito bem que as sinapses são consideradas como junções célula-célula bastante especializadas que tem por unidade fundamental a comunicação cerebral. Pensando nisso, já há algum tempo, foi sugerido que alterações sinápticas em diversas áreas do cérebro podem contribuir para o surgimento da fisiopatologia do transtorno, isso, pois, o TEA é principalmente diagnosticado nos estágios iniciais da vida (antes mesmo dos 3 anos de idade), sendo

esse um período onde ocorre significativa sinaptogênese (HUTTENLOCHER; DABHOLKAR, 1997; CODAGNONE *et al.*, 2014).

O TEA é ainda considerado como um transtorno desafiador a continuar sendo estudado (principalmente em termos de tratamento), mas não podemos mais dizer que não sabemos sobre sua etiologia tendo em vista que diversos estudos abordam as mais variadas causas sendo elas genéticas e até mesmo ambientais, como seria o caso do presente estudo. Hoje temos propriedade em afirmar que, por exemplo, mutações genéticas ou alterações ambientais podem causar prejuízos sinápticos que implicam diretamente no surgimento de doenças do neurodesenvolvimento, tal como o autismo (GUO, 2017; GUANG, 2018).

Para que a sinapse de fato ocorra, temos proteínas de suporte, que estão envolvidas na transcrição sináptica, além de proteínas que possibilitam a síntese e degradação de outras proteínas e, alterações em quaisquer desses processos, pode ser determinante para afetar o produto final: a sinapse e a plasticidade sináptica. As alterações ambientais sofridas, principalmente durante a gestação, podem ocasionar falha nos processos, mutações genéticas que culminam na formação prejudicada das sinapses, ainda mais quando levamos em consideração que o período gestacional é o período de mais intensa sinaptogênese (GUANG, 2018).

Dessa maneira, levando em consideração os achados prévios de que alterações ambientais podem, de alguma forma, prejudicar o processo de sinaptogênese e mais adiante o acontecimento das sinapses, é importante estudar mais a fundo se o herbicida à base de glifosato, Roundup® seria capaz de ocasionar a desregulação da expressão de proteínas responsáveis pelas conexões sinápticas. Entre essas proteínas estudadas e previamente citadas, estão o BDNF, DCX e Sinaptofisina.

A primeira proteína sobre a qual vamos discutir, é o fator neurotrófico derivado do cérebro, BDNF. Como já citado anteriormente, essa é uma proteína que, em humanos, é produzida pela glia e pelos núcleos neuronais, sendo responsável por modular funções sinápticas, estimular a maturação, nutrição, crescimento e integridade neuronal (BARBOSA, 2020).

Evidências tem indicado que o BDNF tem um papel de extrema importância na memória e na plasticidade neuronal, sendo ele o mediador do aprendizado e das experiências vividas pelo indivíduo BDNF (ROSA *et al.*, 2006).

Em nossos resultados, observamos apenas uma tendência de aumento da proteína BDNF, mas não observamos quaisquer diferenças estatísticas significativas da expressão desta proteína entre animais do grupo controle e glifosato.

Nesse sentido, o estudo de Kirsten e colaboradores (2019) salienta que ratos expostos ao lipopolissacarídeo (LPS) durante a gestação tiveram um aumento nos níveis de expressão de BDNF plasmático. Ressalta-se mais uma vez que o LPS é responsável pela indução do comportamento tipo autista em roedores.

Da mesma forma, outro estudo de Kirsten e colaboradores (2015) demonstra que animais filhos de mães que receberam LPS durante a gestação de forma aguda, além de se tornarem animais com comportamento tipo autista, apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de BDNF maduro na vida adulta, mas não nos níveis de BDNF livre. Ressalta-se que embora o presente estudo não avalie os níveis plasmáticos, mas sim o percentual de expressão de BDNF no cérebro, o plasma funciona, neste caso, como um reflexo da quantidade de BDNF advinda do cérebro (SEMBA *et al.*, 2007).

Almeida e colaboradores (2014) observaram que a exposição materna ao VPA durante a gestação ocasionou um aumento nos níveis de mRNA de BDNF no cérebro do feto sem ocasionar alterações no cérebro materno.

Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado uma redução na expressão de BDNF em animais da linhagem TBR T + tf/J (BTBR) que são animais que mimetizam os sintomas típicos do transtorno do espectro autista (STEPHENSON *et al.*, 2011; SCATTONI *et al.*, 2013; JASIEN *et al.*, 2014; DAIMON *et al.*, 2015). Enquanto isso, em humanos, a literatura mostra que existem dados elucidando que os níveis séricos de BDNF estão reduzidos em crianças de 0 a 9 anos de idade que apresentam o transtorno (SEMBA *et al.*, 2007).

Levando em consideração os dados apresentados acima, nota-se a necessidade de seguir demonstrando qual a correlação entre os níveis de BDNF e o TEA já que não há um consenso por parte dos estudos. Mas, levando em consideração os trabalhos realizados e os modelos animais de Kirsten e colaboradores (2019), Kirsten e colaboradores (2015) e Almeida e colaboradores (2014) que são aqueles que mais se assemelham ao nosso estudo em termos de modelo experimental, demonstramos que o consumo materno perinatal de herbicida à base de glifosato Roundup® não foi capaz de alterar significativamente a expressão de BDNF no córtex da prole.

Além do BDNF, foi quantificada também a proteína *doublecortin* (DCX) que está associada a estabilização de microtúbulos. Além disso, essa proteína se expressa quase exclusivamente em neurônios em desenvolvimento, sendo assim considerada como um marcador de neurogênese e plasticidade sináptica (CORNELL; TOYO-OKA, 2017).

Em nosso estudo, o percentual de expressão da proteína DCX encontra-se inalterado entre os grupos controle e glifosato. No estudo de Luhach e colaboradores (2020), observou-se que ao administrar VPA pré-natal, a expressão de DCX no córtex foi reduzida nos filhotes. O artigo relaciona que as anormalidades produzidas se devem, possivelmente, à presença de VPA.

Da mesma maneira, estudo de Stephenson e colaboradores em 2011 buscou caracterizar histopatologicamente o modelo de roedores BTBR que, como citado anteriormente, são animais que mimetizam os sintomas típicos do transtorno do espectro autista. Stephenson observou que animais BTBR tem uma redução da expressão de DCX no giro denteado do hipocampo mas não observou diferenças no córtex piriforme (associado ao olfato), ao córtex entorrinal (associado à memória) e na amígdala (diretamente associada a comportamentos sociais e aprendizado). Stephenson diz ainda que mudanças nos níveis de expressão da proteína DCX são consistentes com um defeito congênito do neurodesenvolvimento.

Quando acessamos a literatura, podemos perceber que os dados referentes a associação da proteína DCX ao TEA, ainda são escassos. Mas, de forma geral, o DCX tem sido associado a outros transtornos do neurodesenvolvimento, o que indica que, em breve, teremos dados consistentes da associação dos níveis de DCX ao TEA, tendo em vista a importância de tal proteína no neurodesenvolvimento. Por hora, apenas podemos afirmar que o glifosato, no tempo e dose na qual foi consumido, não foi capaz de causar alterações a nível central na expressão da proteína DCX.

A última proteína que teve sua expressão quantificada foi a sinaptofisina. Esta caracteriza-se por ser uma glicoproteína presente na fenda pré-sináptica dos neurônios sendo assim considerada como marcador de plasticidade sináptica (BATISTA, 2012).

Diferentemente do DCX, a sinaptofisina é mais amplamente estudada em trabalhos que envolvem o TEA e, por isso, temos dados mais consistentes que serão discutidos a seguir.



Codagnone e colaboradores (2014), aplicaram de maneira aguda VPA intraperitoneal em ratas prenhes e a prole dessas mães foi investigada quanto a expressão de sinaptofisina no córtex e hipocampo. Os resultados demonstram que há um aumento na quantidade de sinaptofisina no córtex, enquanto observa-se uma redução no hipocampo. Os autores discutem que esses resultados elucidam a presença de uma neuroinflamação seguida de alterações sinápticas, além de indicar que o córtex e o hipocampo podem se comportar de maneira diferente frente às conexões sinápticas.

Outro estudo que pode ser citado é o de Kim e colaboradores (2013) que, expôs igualmente ratas prenhes ao VPA de forma aguda e quantificou a expressão de sinaptofisina por meio da técnica de *western blotting* tanto no córtex quanto hipocampo. Os resultados indicaram um aumento da expressão de sinaptofisina tanto no córtex quanto hipocampo.

Ainda nesse sentido, um estudo mais recente de Novais e colaboradores (2021) já citado anteriormente, demonstra que a indução de sobrepeso materno por redução de ninhada ocasionou em seus filhotes comportamentos semelhantes aos do autismo e, além disso, ao avaliar a expressão de sinaptofisina, foi possível perceber uma situação de dimorfismo sexual já que machos tiveram uma redução e fêmeas um aumento na expressão de sinaptofisina no hipocampo. Enquanto isso, no córtex, apenas fêmeas demonstraram uma redução da expressão de sinaptofisina. Novais e colaboradores relacionam as alterações comportamentais encontradas em seu estudo com a redução da glicoproteína a nível cortical e salientam ainda sobre a importância em se estudar proteínas específicas a fim de compreender os caminhos da etiologia do transtorno.

A partir dos resultados e discussões feitas em torno das proteínas e glicoproteínas analisadas no presente estudo, é possível concluir que os sintomas semelhantes ao autismo podem ter distintas causas subjacentes e mecanismos fisiopatológicos. Ressalta-se, mais uma vez, a necessidade de dar continuidade aos estudos acerca dessa temática a fim de elucidar o anormal desenvolvimento neuronal de indivíduos que possuem o transtorno.

## 9 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram que o consumo materno gestacional e durante o período de lactação de herbicida à base de glifosato, é capaz de impactar negativamente no desenvolvimento comportamental e social da prole logo nos primeiros dias de vida. Nossos achados corroboram com a ideia de que alterações ocasionadas pelo consumo do herbicida à base de glifosato acontecem durante o período gestacional, onde o feto é formado, além disso, o consumo do leite materno contendo quantidades desta substância, podem também contribuir para os prejuízos relatados em nosso estudo. Os mecanismos neurogênicos estudados aqui demonstraram que o consumo materno perinatal de herbicida à base de glifosato, Zapp QI 620 não foi capaz de alterar proteínas ligadas à neurogênese e conexões sinápticas, indicando que, possivelmente as alterações causadas pelo glifosato atuam por outros mecanismos fisiopatológicos. A somatória de nossos resultados, sugere que filhotes filhos de mães que consumiram herbicida à base de glifosato durante a gestação e a lactação, apresentam comportamentos característicos do TEA.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. E. F. *et al.* Increased BDNF expression in fetal brain in the valproic acid model of autism. **Mol. Cell Neurosci.**, v. 59, p. 57-62, 2014.
- AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- AMUGONGO, S. K.; HLUSKO, L. J. Impact of maternal prenatal stress on growth of the offspring. **Aging Dis.**, v. 5, p. 1-16, 2014.
- ANDERSEN, M. L. *et al.* **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2004. 167 p. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/unifesp/resources/prod-120012>. Acesso em: 31 out. 2019.
- ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. 8. ed. rev. atual. São Paulo: Andrei, 2009.
- ANVISA. **NOTA TÉCNICA nº 23/2018/GGMED/DIARE/ANVISA**. Brasília, 19 de setembro de 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349757/Nota+t%C3%A9cnica+23+2018+GGMED+-+Intercambialidade/a42bd2fa-0136-4bb1-b7dc-a8d5243197a7>. Acesso em: 31 ago. 2019.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DMS-5**. 5th ed. Washington, 2013.
- BAI, S. H.; OGBOURNE S. M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 19, p 1-14, 2016.
- BAIER, C. J. *et al.* Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 64, p 63-72, 2017.
- BARBOSA, A. G. **Níveis séricos de BDNF em crianças brasileiras portadoras do transtorno do espectro autista**. 2020. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2020.
- BASSI, G. S. *et al.* Lipopolysaccharide-induced sickness behaviour evaluated in different models of anxiety and innate fear in rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 110, n. 4, p. 69-359, 2012.
- BATISTA, C. H. M. M. **Análise dos mecanismos de neuroplasticidade na porção lombar da medula espinal do rato submetida à lesão isquêmica fototrombótica e tratada pela injeção local de PEDF**. 2012. 135f. Dissertação (Mestrado em Neurologia) – Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, 2012.

BATISTA, T. H. **Influência da dieta hipoproteica sobre as respostas comportamentais de ratas lactantes e a repercussão comportamental nos filhotes machos**. 2015. 97f. Dissertação (Mestrado em Biociências aplicadas à saúde) – Laboratório Fisiologia Translacional, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2015.

BATISTA, T. H.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F. C. Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring. **Nutritional Neuroscience**, v. 22, n. 9, 2018.

BENÍTEZ-LEITE, S. *et al.* Malformaciones congénitas asociadas a agrotóxicos. **Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría**, Sucre, v. 48, n. 3, p. 204-217, 2009.

BERNARDI, M. M. *et al.* Sobre o autismo, neuroinflamação e modelos animais para o estudo de autismo: uma revisão. **Rev. Neurocienc.**, v. 20, n.1, p. 117-127, 2012.

BRASIL. Ato nº 42, de 19 de junho de 2019. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2019, nº 119, segunda-feira, 24 de junho de 2019. Seção 1, p. 4.

BRITO, M. Percepção versus realidade do agro. **Estadão**, Caderno Agro, São Paulo, 28 ago. 2019. Disponível em: <https://especiais.estadao.com.br/canal-agro/colunistas/percepcao-versus-realidade-do-agro/>. Acesso em: 31 ago. 2019.

CAMARGO, E. L. R. A. **Estudo de neuroteratologia em ratos: efeitos da restrição alimentar e da monocrotalina**. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 2010.

CAMARGO, E. L. R. A. **Exposição perinatal de ratos ao glifosato (Roundup®): efeitos sobre o comportamento materno e sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta**. 2014. 117f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 2014.

CAPLETTE, L.; WICKER, B.; GOSSELIN, F. Atypical time course of object recognition in autism spectrum disorder. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

CARNEIRO, F. F. *et al.* **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, 2015. p. 49. Disponível em: [https://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco\\_2015\\_web.pdf](https://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf). Acesso em: 07 dez. 2021.

CASARRUBEA, M.; SORBERA, F.; CRESCIMANNO, G. Structure of rat behavior in hole-board: II) multivariate analysis of modifications induced by Diazepam. **Physiology & Behavior**, v.96, p. 683-692, 2009.

CATTANI, D. **Envolvimento do sistema glutamatérgico e de estresse oxidativo no mecanismo de neurotoxicidade induzida por herbicida à base de glifosato**

**em células neurais.** 2017. 219f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

CATTANI, D. *et al.* Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, Santa Catarina, v. 320, p. 34-45, 2014.

CEZAR, L. C. *et al.* Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 84, n. 8, p. 173-180, 2018.

CHAKRABARTI, S.; FOMBONNE, E. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 6, p. 1133-1141, 2005.

CODAGNONE, M. G. *et al.* Differential local connectivity and neuroinflammation profiles in the medial prefrontal cortex and hippocampus in the valproic acid rat model of autism. **Developmental Neuroscience**, v. 37, n. 3, p. 215-31, 2014.

CORNELL, B.; TOYO-OKA, K. Proteins in brain development: neurogenesis, neuronal migration and neuromorphogenesis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. 318, p. 318-335, 2017.

DAENEN, E. W. P. M. *et al.* The effects of neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus on social behaviour later in life. **Behavioural Brain Research**, v. 136, p. 571-582, 2002.

DAIMON, C. M. *et al.* Hippocampal transcriptomic and proteomic alterations in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. **Front Physio**, v. 6, p. 324, 2015.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Autistic children: a neuroimmune perspective. **Brain. Behav. Immun.**, v. 22, n. 6, p. 804-805, 2008.

DECHARTRES, J. *et al.* Glyphosate and glyphosate-based herbicide exposure during the peripartum period affects maternal brain plasticity, maternal behaviour and microbiome. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 31, n. 9, 2019.

DALLEGRAVE, E. *et al.* Pre and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Arch. Toxicol.**, Porto Alegre, v. 81, n. 9, p. 665-673, 2007.

DENNINGER, J. K.; SMITH, B. M.; KIRBY, E. D. Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. **J. Vis. Exp.**, v. 20, n. 141, p. 10-20, 2018.

DE ROOS, A. J. *et al.* Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. **Occupational & Environmental Medicine**, Seattle, v. 60, n. 9, p.1-9, 2003.

DÖLEN G. Autism: oxytocin, serotonin, and social reward. **Soc. Neurosci.**, v. 10, p. 450-65, 2015.

DOUKKALI, Z. *et al.* Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *urtica urens* in a mice model. **Behav. Brain Funct.**, v. 11, n. 19, p. 11-19, 2015.

DUFOUR-RAINFRAY, D. *et al.* Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: a model for autism. **Neuroscience Letters**, v. 470, n. 1, p. 55–59, 2010.

EHRENSTEIN, O. S. V. *et al.* Prenatal and infant exposure to ambient pesticides and autism spectrum disorder in children: population based case-control study. **Research**, v. 364, n. 962, 2019.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Faostat – Statistics Database**, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize>. Acesso em: 26 ago. 2019.

FORLANI, G. *et al.* The herbicidally active compound N-2-(6-methyl-pyridyl)-aminomethylene bisphosphonic acid inhibits in vivo aromatic biosynthesis. **J. Plant Growth Regul.**, v. 18, n. 2, p. 73-79, 1999.

FUJIWARA, S. *et al.* Anhedonia in japanese patients with parkinson's disease: analysis using the Snaith–Hamilton pleasure scale. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 11, p. 275-281, 2011.

GALLEGOS, C. E. *et al.* Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring. **Neurotoxicology**, v. 53, p. 20-28, 2015.

GREENE-COLOZZI, E. A. *et al.* Both maternal and pup genotype influence ultrasonic vocalizations and early developmental milestones in *tsc2* (+/-) mice. **Epilepsy Research and Treatment**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

GROVES, T. R. *et al.* Assessment of hippocampal dendritic complexity in aged mice using the golgi-cox method. **Journal of Visualized Experiments**, v. 124, n. 55696, p. 2-8, 2017.

GUANG, S. *et al.* Synaptopathology involved in autism spectrum disorder. **Front Cell Neurosci.**, v. 12, n. 470, p. 1-16, 2018.

GUO, H. *et al.* Genome-wide copy number variation analysis in a chinese autism spectrum disorder cohort. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 44155, p. 1-9, 2017.

GUYTON K. Z. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **Lancet Oncol.**, v. 16, n. 5, p. 490-491, 2015.

- GZIELO, K. *et al.* Valproic acid exposure impairs ultrasonic communication in infant, adolescent and adult rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 4, n. 21, p. 52-62, 2020.
- HAHN, M. E.; LAVOY, M. J. A review of the methods of studies on infant ultrasound production and maternal retrieval in small rodents. **Behaviour Genetics**, v. 35, n. 1, p. 31-52, 2005.
- HUTTENLOCHER, P. R.; DABHOLKAR, A. S. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. **J. Comp. Neurol.**, v. 20, n. 387, p. 167-178, 1997.
- IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Brasília, 2019. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 27 ago. 2019.
- JASIEN, J. M. *et al.* The effects of aging on the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. **Front Aging Neurosci.**, v. 6, n. 225, p. 225, 2014.
- JORDAN, R. Social play and autistic spectrum disorders: a perspective on theory, implications and educational approaches. **Autism**, v. 7, n. 4, p. 347-360, 2003.
- KAFFMAN, A.; MEANEY, M. J. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. **J. Child Psychol. Psychiatry**, v. 48, n. 3-4, p. 224-244, mar./abr. 2007.
- KIRSTEN, T. B. *et al.* Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure. **Life Sci.**, v. 130, p. 12-17, 2015.
- KIRSTEN, T. B. *et al.* Pioglitazone abolishes cognition impairments as well as BDNF and neurotensin disturbances in a rat model of autism. **The Company of Biologists Ltd.**, v. 8, n. 5, p. 1-6, 2019.
- KOCOVSKA, E. *et al.* Vitamin-D deficiency as a potential environmental risk factor in multiple sclerosis, schizophrenia, and autism. **Front Psychiatry**, v. 8, n. 47, p. 1-8, 2017.
- LIU, D. *et al.* Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1659-1662, 1997.
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para a ação e defesa da vida**. Rio de Janeiro: Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.
- LUGO, J. N. *et al.* Deletion of PTEN produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 7, n. 27, 2014.

LUHACH, K. *et al.* Attenuation of neurobehavioural abnormalities by papaverine in prenatal valproic acid rat model of ASD. **European Journal of Pharmacology**, v. 890, n. 173663, p. 1-12, 2020.

MAKANJUOLA, R. O. A. *et al.* An Automated Method for Studying Exploratory and Stereotyped Behaviour in Rats. **Psychopharmacology**, v. 52, p. 271-277, 1977.

MEEKING, M. M. *et al.* Propionic acid induced behavioural effects of relevance to autism spectrum disorder evaluated in the hole board test with rats. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 97, n. 109794, 2020.

MELANCIA, F.; TREZZA, V. Modelling fragile X syndrome in the laboratory setting: A behavioral perspective. **Behav. Brain Res.**, v. 17. n. 350, p. 149-163, 2018.

NANDULA, V. K. **Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management.** Estados Unidos, John Wiley & Sons, 2010.

NOVAIS, C. O. *et al.* Maternal overweight induced by reduced litter size impairs the behavioral neurodevelopment of offspring. **Life Sciences**, v. 277, n. 119611, 2021.

OGA, S. *et al.* Fundamentos de toxicologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Exposure to highly hazardous pesticides: a major public health concern.** Geneva, 2010. Disponível em: [https://www.who.int/ipcs/features/hazardous\\_pesticides.pdf?ua=1](https://www.who.int/ipcs/features/hazardous_pesticides.pdf?ua=1). Acesso em: 26 ago. 2019.

PAGANELLI, A. *et al.* Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effectson vertebrates by impairing retinoic acid signaling. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 23, n. 10, p. 1586-1595, 2010.

PATTERSON, P. H. Maternal infection and immune involvement in autism. **Trends Mol. Med.**, v. 17, n. 7, p. 389-394, 2011.

PATIN, V. *et al.* Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v 139, n. 1, p. 1-8, 2002.

PU, Y. *et al.* Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 117, n. 21, p. 11753-11759, 2020.

RIBEIRO, A. C. A. F. *et al.* Cafeteria diet during the gestation period programs developmental and behavioral courses in the offspring. **Int. J. Devl. Neuroscience**, v. 68, n. 1, p. 45-52, 2018.

RIEDE, T.; BORGARD, H. L.; PASCH, B. Laryngeal airway reconstruction indicates that rodent ultrasonic vocalizations are produced by an edge-tone mechanism. **The Royal Society**, v. 4, n. 11, p. 1-18, 2017.



ROCHA, P. R. D. *et al.* Perinatal glyphosate-based herbicide impaired maternal behavior by reducing the striatal dopaminergic activity and delayed the offspring reflex development. **Atas de Saúde Ambiental**, v. 7, p. 130-156, 2019.

ROSA, A. R. *et al.* Increased serum glial cell line-derived neurotrophic factor immunocontent during manic and depressive episodes in individuals with bipolar disorder. **Neuroscience Letters**, v. 407, n. 2, p. 146-150, 2006.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases. **Entropy**, v. 15, n. 4, p. 1416-1463, 2013.

SCATTONI, M. L. *et al.* Reduced social interaction, behavioural flexibility and BDNF signalling in the BTBR T+ tf/J strain, a mouse model of autism. **Behav. Brain Res.**, v. 251, p. 35-40, 2013.

SCHNEIDER, S.; ESCHER, F. A contribuição de Karl Polanyi para a sociologia do desenvolvimento rural. **Sociologias**, v. 13, n. 27, p. 180-219, maio/ago. 2011.

SCHNEIDER, T.; PRZEWLOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 80-89, 2005.

SCHOR, N.; BOIM, M. A. Importância do uso de animais experimentais para a medicina humana. **Philosophy**, v. 33, n. 1, p. 1, 2008.

SEALEY, L. A. Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. **Environment International**, v. 88, p. 288-298, 2016.

SEMBA, R. K. *et al.* Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls. **Dev. Neurosci.**, v. 25, n. 6, p. 367-372, 2007.

SERRA, L. S. *et al.* Revolução Verde: reflexões acerca da questão dos agrotóxicos. **Rev. do Ceds**, v. 1, n. 4, jan./jul. 2016.

SERVADIO, M. *et al.* Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 9, p. e902, 2016.

SERVADIO, M.; VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; TREZZA, V. Modeling autism-relevant behavioral phenotypes in rats and mice: do 'autistic' rodents exist? **Behav. Pharmacol.**, v. 26, n. 6, p. 522-540, 2015.

SOUZA, J. S. *et al.* Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. **Toxicology**, v. 377, p. 25-37, 2017.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 24, n. 4, p. 417-463, 2000.

STEPHENSON, D. T. *et al.* Histopathologic characterization of the BTBR mouse model of autistic-like behavior reveals selective changes in neurodevelopmental proteins and adult hippocampal neurogenesis. **Mol. Autism**, v. 2, n. 7, p. 2-21, 2011.

TAKUMA, K. *et al.* Chronic treatment with valproic acid or sodium butyrate attenuates novel object recognition deficits and hippocampal dendritic spine loss in a mouse model of autism. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 126, p. 43–49, 2014.

TOUMI, M. L.; MERZOUG, S.; TAHRAOUI, A. Effects of quercetin on predator stress-related hematological and behavioral alterations in pregnant rats and their offspring. **J. Biosci.**, v. 41, n. 2, p 237-249, 2016.

TREZZA, V.; BAARENDSE, P. J.; VANDERSCHUREN, L. J. Prosocial effects of nicotine and ethanol in adolescent rats through partially dissociable neurobehavioral mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 12, p. 2560-2573, 2009.

TREZZA, V.; BAARENDSE, P.J.; VANDERSCHUREN, L.J. The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 21, n.10, p. 463-469, 2010.

TREZZA, V.; VANDERSCHUREN L. J. Bidirectional cannabinoid modulation of social behavior in adolescent rats. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 2, p. 217-227, 2008.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **The American Journal of Psychology**, v. 83, n. 1, p. 103-111, 1970.

VANDERSCHUREN, L. J.; NIESINK, R. J.; VAN REE, J. M. The neurobiology of social play behavior in rats. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 21, n. 3, p. 309-326, 1997.

VASCONCELOS, Y. **Agrotóxicos na berlinda**. São Paulo, 2018. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/agrotoxicos-na-berlinda/>. Acesso em: 26 ago. 2019.

VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Behav. Brain Res.**, v. 263, p. 190-197, 2014.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup1 and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Ideal Library**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WOHR, M. Effect of social odor context on the emission of isolation-induced ultrasonic vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model for autism. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. 73, p. 1-12, 2015.

WOHR, M. *et al.* Communication impairments in mice lacking shank1: reduced levels of ultrasonic vocalizations and scentmarking behavior. **PlosOne**, v. 6, n. 6, p. e20631, 2011.

YOUNG, D. M. *et al.* Altered ultrasonic vocalizations in a tuberous sclerosis mouse model of autism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 24, p. 11074-11079, 2010.

ZALA, S. M. *et al.* Sex-dependent modulation of ultrasonic vocalizations in house mice (*mus musculus musculus*). **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0188647, 2017.

ZANOLLA, T. A. *et al.* Causas genéticas, epigenéticas e ambientais do transtorno do espectro autista. **Programa de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, v. 15, n. 2, p. 29-42, 2015.

ZATKOVA, M. *et al.* Synapse alterations in autism: review of animal model findings. **Biomed Pap.**, v. 160, n. 2, p. 201-210, 2016.

## ANEXO A – Certificado de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL-MG

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Efeito da exposição materna perinatal ao agrotóxico Roundup® sobre as alterações neurocomportamentais semelhantes ao autismo na prole**, registrada com o nº **0004/2019**, sob a responsabilidade de **Fabiana Cardoso Vilela**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/12/2019 a 01/12/2020**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Wistar	26	6	20	Biotério central da universidade federal de alfenas

Alfenas, 05 de Julho de 2021

**Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira**  
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG