

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIA ANIMAL

LÉCIO LEONE DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MELATONINA EM RATAS PRENHES
APÓS EXPOSIÇÃO A DOSES SUBLETAIS DE HERBICIDAS**

Recife
2015

LÉCIO LEONE DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MELATONINA EM RATAS PRENHES
APÓS EXPOSIÇÃO A DOSES SUBLETAIS DE HERBICIDAS**

Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

Coorientadores:
Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira
Prof. Dr. Anísio Francisco Soares

Recife

2015

Ficha catalográfica

A447a Almeida, Lécio Leone de
Avaliação do efeito da melatonina em ratas prenhes após
exposição a doses subletais de herbicidas / Lécio Leone de
Almeida. – Recife, 2015.
132 f. : il.

Orientador(a): Valéria Wanderley Teixeira.
Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e
Fisiologia Animal, Recife, 2015.
Inclui anexo(s) e referências.

1. Herbicidas 2. Antioxidante 3. Ratas Wistar 4. Fígado
5. Melatonina 6. Estresse oxidativo 7. Endométrio
8. Embriogênese I. Teixeira, Valéria Wanderley, orientadora
II. Título

CDD 636.4

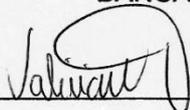
LÉCIO LEONE DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MELATONINA EM RATAS PRENHES
APÓS EXPOSIÇÃO A DOSES SUBLETAIS DE HERBICIDAS**

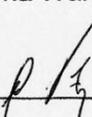
Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.

Aprovada em 01/ outubro 2015.

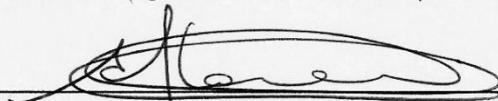
BANCA EXAMINADORA



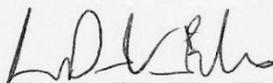
Prof^ª. Dr^ª. Valéria Wanderley Teixeira (Orientadora) - UFRPE



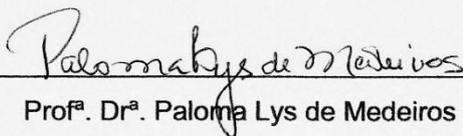
Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Coorientador) - UFRPE



Prof. Dr. Anísio Francisco Soares (Coorientador) - UFRPE



Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho - UFPE



Prof^ª. Dr^ª. Paloma Lys de Medeiros - UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais José Gonçalves de Almeida e Isabel Gonçalves da Silva, por serem minhas referências de vida, carácter e eternos incentivadores de meus estudos, a minha esposa Natallyanea Silva Bezerra por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre muito compreensiva aos questionamentos pertinentes ao bem-estar familiar e acadêmico e a minha adorável e amada filha Leona de Almeida Bezerra a quem alegra e abrilhanta os nossos dias e faz com que a minha vida seja mais leve e feliz.

Aos meus orientadores Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira e Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, por terem depositado total confiança na execução das atividades desenvolvidas ao longo do curso, consideração e amizade;

Ao Prof. Anísio Francisco Soares pelas considerações durante a qualificação do trabalho de Tese;

Ao Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho pela competência, dedicação, boa vontade e, sobre tudo humildade durante e depois da execução e análises experimentais sobre estresse oxidativo hepático, bem como pelas considerações durante a qualificação do trabalho de Tese.

Ao Prof. Dr. Franklin Magliano da Cunha pelos momentos de sabedoria sobre o encaminhamento de inúmeros procedimentos experimentais, consideração e amizade;

Ao Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior pela ajuda na interpretação dos exames histopatológicos.

Ao bioterista Marcos André pelo apoio, dedicação e compromisso na manutenção dos animais do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE.

Aos colegas do Laboratório de Histologia Ismaela Melo, Cristiane Silva, Clovis Lapa Neto, Guilherme Rolim, Hilton Nobre, Edna Barros, Carolline Guimarães, Solange Bezerra, Aline Mariano, Cíntia Giselle, Lilian Pereira, Dayane Duarte, Yuri Albuquerque, Hilda Santos, Mariana Carvalho, Welma Emídio, Fernanda Ângelo, Andresa Cristina, Marta Sarinho, Raionir Ricardo, Barbara Brooklyn, Ellen Nogueira, Belisa Duarte, Marcio Frazão, Marina Baptista, Maciel Ges, Jeanine Lemos, Fernanda Andrade, Thiago Alves, Laíse Souza e Nane Santos pela agradável convivência e permuta de experiências acadêmicas.

Ao Cenapesq pelo uso dos equipamentos e instalações do seu complexo laboratorial.

Agradeço à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal pela atenção, apoio e profissionalismo.

A todos que direta ou diretamente contribuíram para a realização do referido trabalho de Tese.

RESUMO

O uso inadequado de herbicidas pode resultar em intoxicações agudas e, às vezes crônicas por exposição em longo prazo a baixos níveis, podendo atuar ainda como agentes teratogênicos, mutagênicos, cancerígenos e disruptores endócrinos, levando ao aparecimento de doenças neurodegenerativas e distúrbios reprodutivos. Estudos têm revelado que a melatonina tem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras e atua na reprodução. Essa indolamina está entre os agentes que têm se mostrado benéfico em intoxicações por herbicidas, porém não há relatos de seu uso contra intoxicações por Glifosato-Roundup® e/ou Paraquat associado com Glifosato-Roundup®. Assim, investigou-se o efeito da melatonina sobre indicadores reprodutivos e parâmetros hepáticos em ratas prenhes expostas a doses subletais dos herbicidas Paraquat (50 mg/kg do peso corporal) e/ou Glifosato-Roundup® (500 mg/kg do peso corporal). Foram utilizadas 35 ratas prenhes, divididas aleatoriamente em 7 grupos com 5 animais cada, sendo o grupo I (controle/salina), os grupos (II e III) expostos aos herbicidas Paraquat e Glifosato-Roundup® respectivamente, o grupo IV exposto aos herbicidas associados, enquanto as ratas dos grupos (V e VI) foram exposta aos herbicidas individualmente e o grupo (VII) exposto aos herbicidas associados, porém os grupos (V, VI e VII) foram tratados simultaneamente com melatonina (10 mg/kg do peso corporal). Tanto a exposição como o tratamento com melatonina foram durante o terço inicial da gestação. Assim, após esses procedimentos foram analisados o perfil hematológico, função e estresse oxidativo hepático, parâmetros reprodutivos como peso das fêmeas, peso dos ovários, número de sítios de implantação, de corpos lúteos, perdas pré-implantação, taxa de implantação, histopatologia do fígado, histopatologia e histoquímica dos sítios de implantação e morfometria dos epitélios superficial e glandular do endométrio. A aplicação experimental dos herbicidas Glifosato-Roundup e/ou Paraquat proporcionaram toxicidade materno-embrionário e hepática, onde podem-se detalhar os seguintes efeitos: redução nos seguintes parâmetros: ganho de peso corporal, peso dos ovários, no número de sítios de implantação, na taxa de implantação, no número total de corpos lúteos e aumento do percentual de perdas pré-implantação. Quanto ao perfil hematológico observou-se redução no número de eritrócitos, na concentração de hemoglobina, nos valores do hematócrito, aumento na contagem total de leucócitos, no número de neutrófilos segmentados, de eosinófilos e redução

no número de linfócitos. Além disso, nas análises bioquímicas e do estresse oxidativo hepático foram observadas redução nos níveis séricos de albumina, aumento dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA), níveis altos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e redução dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). A análise histopatológica dos sítios de implantação revelou desorganização do blastocisto e degeneração do citotrofoblasto localizado dentro da cavidade blastocística, enquanto na análise histoquímica observou-se redução no número de células *natural killer* uterinas (nNK). A análise morfológica de parâmetros do endométrio revelou redução dos epitélios superficial e glandular, bem como no diâmetro das glândulas endometriais. Na análise histopatológica de amostras de fígado foi observada a presença de hepatócitos necróticos, infiltrado inflamatório portal e centrolobular, congestão dos capilares sinusoides. Após tratamento com melatonina verificou-se que os parâmetros supracitados foram similares aos do controle, exceto os níveis de albumina sérica em ratas do grupo associado (Paraquat 50 mg/kg e Glifosato-Roundup® 500 mg/kg de peso corporal) que permaneceram baixos. Dessa forma pôde-se concluir que a melatonina na dose de 10 mg/kg de peso corporal atuou como um agente protetor contra a toxicidade materno/embrionária induzidas experimentalmente por herbicidas, favorecendo a manutenção do peso corporal, de parâmetros reprodutivos, hematológicos, bioquímicos e redução do estresse oxidativo hepático.

Palavras-chave: Herbicidas. Antioxidante. Ratas Wistar. Fígado. Melatonina. Estresse oxidativo. Endométrio. Embriogênese.

ABSTRACT

The inadequate use of herbicides may cause serious and sometimes chronic poisoning due to long exposure to low levels. Herbicides may also be teratogenic, mutagenic, cancerigenous agents and endocrine disruptors, with the occurrence of neurodegenerative diseases and reproduction disorders. Several studies have shown that melatonin has antioxidant, anti-inflammatory and immune-modulating qualities, besides affecting the reproduction system. It is a beneficent agent in the intoxication by herbicides even though no reports are extant on the use of melatonin against intoxications by Glyphosate-Roundup® alone or associated to Paraquat. Current analysis investigates the effect of melatonin on the reproduction and hepatic aspects in female rats exposed to sub-lethal doses of the herbicide Paraquat (50 mg/kg) and/or Glyphosate-Roundup® (500 mg/kg) of body weight, alone or associated. Thirty-five pregnant rats were used, randomly divided into 7 groups with 5 animals each. Group I (control/saline), groups (II and III) exposed to Paraquat and Glyphosate-Roundup® respectively, the IV group exposed to the associated herbicide, while the rats of the groups (V and VI) were exposed to the herbicides alone and group (VII) above the associated herbicides, however the groups (V, VI and VII) were simultaneously treated with melatonin (10 mg/kg body weight). Both exposure as treatment with melatonin was during the first third of pregnancy. Thus, the hematological profile, function and hepatic oxidative stress, reproduction parameters such as body weight gain, ovaries weight, number of implantation sites, corpora lutea, pre-implantation losses, implantation rates and histopathology of implantation sites and liver were analyzed. Results post-exposure to associated or single herbicides revealed decrease in body and ovary weights, number of implantation sites, implantation rate (the implantation rate (number of implanted embryos compared with the number of corpora lutea), total number of corpora lutea, percentage increase of pre-implantation losses. The hematological profile revealed a reduction of erythrocytes in hemoglobin concentrations, in hematocrit rates, increase in total counts of leucocytes, in the number of segmented neutrophils, eosinophils and decrease in lymphocytes. Moreover, decrease in serum levels of albumin, increase in serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (AP), high levels of reactive compounds to thiobarbituric acid (TBARS) and reduction in the levels of reduced glutathione (GSH) were reported in biochemical and hepatic

oxidative stress analyses. The histopathological analysis of the implantation sites revealed the disorganization of blastocyte and degeneration of cytotrophoblasts within the blastocyte cavity, whilst in histochemical analysis was observed reduction number of uterine natural killer cells (uNKs). Morphometry revealed decrease endometrial parameters of superficial and glandular epithelium, as well as the diameter of the endometrial glands. In the histopathological analysis of liver samples was observed the presence of necrotic hepatocytes, portal and central lobular inflammatory infiltrate and congestion of sinusoid capillaries. Treatments with melatonin provided results significantly similar to those in control animals, with the exception of serum albumin levels in rats associated group (Paraquat 50 mg/kg) and/or Glyphosate-Roundup® 500 mg/kg of body weight), which remained low. Treatment with melatonin at a dose of 10 mg/kg of body weight is a protecting agent against experimentally induced maternal and embryo poisoning by herbicides. Body weight, reproduction, hematological, biochemical parameters maintenance and hepatic oxidative stress was reduced.

Keywords: Herbicides. Antioxidant. Wistar rats. Liver. Melatonin. Reproduction. Oxidative stress. Endometrial. Embryogenic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura química do glifosato, constituído de uma molécula de glicina e uma de fosfometila (N-(fosfometil) glicina encontrado em diferentes formulações. 21

Figura 2. Estrutura química do sal do ácido desprotonado do Glifosato e seu cátion (isopropil-amina) juntos formam o sal isopropilamínico da (N-fosfometil glicina) utilizado no produto comercial Roundup®. 21

Figura 3. Estrutura química do herbicida Paraquat. 23

Figura 4. Esquema da transferência de pesticidas na interfase materno-fetal. As linhas azuis indicam a transferência no sistema linfático, as linhas pretas representam transferência de sangue de um sistema para outro e as linhas verdes representam as vias de excreção primárias. 27

Figura 5. Estrutura química da Melatonina. 28

Figura 6. Esquema da biossíntese da Melatonina com seus precursores e enzimas participantes do processo. 29

Figura 7. Representação esquemática de vias metabólicas de Melatonina. 30

CAPÍTULO II

Figura 1. Ganho de peso das ratas prenhes durante a exposição aos herbicidas e tratamento com Melatonina. Todos os valores representam média \pm erro padrão de sete grupos experimentais. Notar que a exposição ao Paraquat (PQ) e sua associação com o Glifosato-Roundup® apresentou diminuição do ganho de peso e prevenção quando tratado com Melatonina. 75

Figura 2. Análise histopatológica de amostras de sítios de implantação. No grupo controle demonstrou estruturas preservadas como trofoblasto (Ct), embrioblasto (*), cavidade blastocística (CB) e decidualização bem definida (ZDM) (Fig. A). Nos grupos expostos aos herbicidas nas concentrações subletais 50 mg/kg (Paraquat) 500 mg/kg (Glifosato-Roundup®) apresentaram desorganização do trofoblasto (T), processo de decidualização reduzido (Dc) e degeneração celular (seta) dentro da cavidade blastocística (Fig. B). Os grupos após o tratamento com Melatonina apresentaram níveis de organização estrutural similares aos observados nas ratas do grupo controle (Fig C).

76

Figura 3. Histoquímica dos sítios de implantação das ratas dos grupos experimentais. (3A) G1 - controle, observar marcação forte; (B) G2 – PQ, (3C) G3 – Glifosato-Roundup® e (D) G4 - PQ+Glifosato-Roundup®, notar marcação leve; (E) G5 - PQ+Melatonina, (F) G6 – Glifosato-Roundup®+Melatonina notar marcação semelhante ao controle, exceto em (G) G7 - PQ+Glifosato-Roundup®+Melatonina. Quantificação de grânulos de polissacarídeos (glicose) em Pixels. Barras sobre asteriscos diferem significativamente do controle pelo teste de Tukey (** $p > 0.001$. ** $p > 0.01$ and * $p > 0.05$).

77

CAPÍTULO III

Figura 1. Ganho de peso das ratas prenhes durante a exposição aos herbicidas e tratamento com Melatonina. Todos os valores representam média \pm erro padrão de sete grupos experimentais. Notar que a exposição ao Paraquat (PQ) e sua associação com o Glifosato-Roundup® apresentou diminuição do ganho de peso e prevenção quando tratado com Melatonina.

108

Figura 2. Avaliação da peroxidação lipídica nos grupos G1-G7. Média \pm erro padrão de TBARS hepático nos grupos experimentais ($n = 5$). (*) indica diferença significativa entre o grupo controle e os grupos expostos aos herbicidas Paraquat (PQ) e Glifosato-Roundup® * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ e prevenção quando tratado com Melatonina * $p < 0,001$ (ANOVA/Tukey).

111

Figura 3. Avaliação do nível de GSH nos grupos G1-G7. Média \pm erro padrão de GSH hepático nos grupos experimentais ($n = 5$). (*) indica diferença significativa entre o grupo controle e os grupos expostos aos herbicidas Paraquat (PQ) e Glifosato-Roundup® *** $p < 0,001$ e prevenção quando tratado com melatonina (MLT) *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ (ANOVA/Tukey).

111

Figura 4. Fig. 4. Histopatologia do fígado de ratas prenhes. (A e A1) Controle. Notar em A veia centro lobular circundada por cordões de hepatócitos (círculo tracejado). Em A1 evidenciar capilares sinusoides (setas tracejadas) entre os hepatócitos e células de Kupffer (dupla seta). Alterações histológicas no grupo exposto aos herbicidas associados (B e B1). Notar em (B) congestão dos capilares sinusoides (círculos contínuos) e na veia porta (asterisco), infiltrado inflamatório portal (setas). Em (B1) hepatócitos necróticos (pontas de setas), além do infiltrado e congestão da veia porta. Grupo tratado com Melatonina (C e C1). Notar em (C) parênquima preservado com veia centro lobular circundada por cordões de hepatócitos (círculo tracejado), porém com áreas de reação inflamatória focal (seta tracejada) e congestão discretas (asterisco) (Fig. C1).

112

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Indicadores de fertilidade dos grupos experimentais expostos aos herbicidas e tratada com Melatonina (ratas prenhes tratadas com solução salina a 0,9%; ratas expostas a dose de 50mg/kg de Paraquat; ratas expostas a dose de 500mg/kg de Glifosato-Roundup®; ratas expostas a associação de Paraquat e Glifosato-Roundup® de acordo com suas respectivas concentrações; ratas expostas a dose de 50mg/kg de Paraquat e tratadas com Melatonina 10mg/kg; ratas expostas a dose de 500mg/kg Glifosato-Roundup® e tratadas com Melatonina 10mg/kg; ratas expostas a associação de Paraquat e Glifosato-Roundup® de acordo com suas respectivas concentrações e tratadas com Melatonina 10mg/kg).

78

Tabela 2. Análise morfométrica de parâmetros endometriais dos grupos experimentais expostos aos herbicidas e tratada com Melatonina (ratas prenhes

tratadas com solução salina a 0,9%; ratas expostas a dose de 50mg/kg de Paraquat; ratas expostas a dose de 500mg/kg de Glifosato-Roundup®; ratas expostas a associação de Paraquat e Glifosato-Roundup® de acordo com suas respectivas concentrações; ratas expostas a dose de 50mg/kg de Paraquat e tratadas com Melatonina 10mg/kg; ratas expostas a dose de 500mg/kg Glifosato-Roundup® e tratadas com Melatonina 10mg/kg; ratas expostas a associação de Paraquat e Glifosato-Roundup® de acordo com suas respectivas concentrações e tratadas com Melatonina 10mg/kg).

79

CAPÍTULO III

Tabela 1. Avaliação de parâmetros hematológicos dos grupos experimentais expostos aos herbicidas e tratados com Melatonina (ratas prenhes tratadas com solução salina a 0,9%; ratas expostas a dose de 50mg/kg de Paraquat; ratas expostas a dose de 500mg/kg de Glifosato-Roundup®; ratas expostas a associação de Paraquat e Glifosato-Roundup® de acordo com suas respectivas concentrações; ratas expostas a dose de 50mg/kg de Paraquat e tratadas com Melatonina 10mg/kg; ratas expostas a dose de 500mg/kg Glifosato-Roundup® e tratadas com Melatonina 10mg/kg; ratas expostas a associação de Paraquat e Glifosato-Roundup® de acordo com suas respectivas concentrações e tratadas com Melatonina 10mg/kg).

109

Tabela 2. Análise da função hepática dos grupos experimentais expostos aos herbicidas e tratados com Melatonina (ratas prenhes tratadas com solução salina a 0,9%; ratas expostas a dose de 50mg/kg de Paraquat; ratas expostas a dose de 500mg/kg de Glifosato-Roundup®; ratas expostas a associação de Paraquat e Glifosato-Roundup® de acordo com suas respectivas concentrações; ratas expostas a dose de 50mg/kg de Paraquat e tratadas com Melatonina 10mg/kg; ratas expostas a dose de 500mg/kg Glifosato-Roundup® e tratadas com Melatonina 10mg/kg; ratas expostas a associação de Paraquat e Glifosato-Roundup® de acordo com suas respectivas concentrações e tratadas com Melatonina 10mg/kg).

110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMK	N-acetil-5-metoxikynunamina
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
c3OHM	3-hidroximelatonina cíclica
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
COX-2	Cicloxigenase 2
DEA	Desetilatrazina
DL₅₀	Dose Letal 50%
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
GSH	Glutationa reduzida
HE	Hematoxilina e Eosina
IBAMA	Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis
LPO	Peroxidação lipídica
MDA	Malondialdeído
MLT	Melatonina
MT	Receptor de melatonina
NOAEL	Nível de efeito adverso não observado
NOEL	Efeitos não são observados
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
POEA	Polioxietileno amina
PQ	Paraquat
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

Capítulos

1	1. INTRODUÇÃO.....	17
	2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
	2.1 Herbicidas: considerações gerais.....	19
	2.1.1 Propriedades físico-químicas do Glifosato	21
	2.1.2 Propriedades biológicas e riscos toxicológicos do Glifosato.....	22
	2.1.3 Propriedades físico-químicas do Paraquat.....	23
	2.1.4 Propriedades biológicas e riscos toxicológicos do herbicida Paraquat.....	24
	2.2 Associação de herbicidas e suas consequências.....	25
	2.3 Melatonina: características gerais.....	27
	2.3.1 Melatonina e reprodução.....	33
	2.3.2 Melatonina e intoxicações por herbicidas.....	34
	REFERÊNCIAS.....	37
2	Efeito da administração da melatonina em ratas no terço inicial da gestação expostas a doses subletais de herbicidas	53
	RESUMO.....	54
	INTRODUÇÃO.....	55
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
	RESULTADOS.....	61
	DISCUSSÃO.....	64

	REFERÊNCIAS.....	68
3	Efeito protetor da melatonina sobre o fígado de ratas prenhes expostas a doses subletais de herbicidas	80
	RESUMO.....	81
	INTRODUÇÃO.....	81
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	83
	RESULTADOS.....	86
	DISCUSSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	94
	GUIA PARA AUTORES DAS REVISTAS EM SUBMISSÃO	
ANEXOS	PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA.....	113
	PLOS ONE.....	115
	EXPERIMENTAL AND TOXICOLOGY PATHOLOGY.....	120

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos no processo de produção agrícola com consequências para a saúde humana e ao meio ambiente é alvo de constante preocupação no âmbito da saúde pública e por parte da comunidade científica (ANVISA, 2003; SINITOX, 2009; GONÇALVES, 2012).

Os países em desenvolvimento são os que mais consomem esses produtos e de forma indiscriminada no cultivo agrícola (PERES; MOREIRA; LUZ, 2007) e o que se constata é a elevação da incidência de intoxicações agudas que chega a ser 13 vezes maior, quando comparada aos países industrializados (DELGADO; PAUMGARTTEN, 2004).

O Brasil, embora seja um país em pleno desenvolvimento industrial, tem sua economia ainda baseada na agricultura, o que leva ao contínuo aumento das importações, bem como o desenvolvimento da indústria de adubos e defensivos químicos para as lavouras. Além disso, os agricultores têm sido estimulados a utilizar uma grande variedade de insumos químicos a fim de aumentar a produtividade e reduzir as perdas das safras. Esta ação tem levado ao uso indiscriminado de agrotóxicos, colocando em risco a saúde dos produtores, do meio ambiente, dos consumidores e dos animais (ARAÚJO, 2007), bem como de seus familiares ligados direta e/ou indiretamente à agricultura (BURIOLA; OLIVEIRA, 2013). Assim, no início dos anos 1990, o País já era o quinto mercado mundial, sendo que em 1994 e em 1998 atingiu a quarta e a terceira posições, respectivamente, apenas superado pelos EUA e Japão. Desde 2009, o Brasil assumiu a posição de primeiro consumidor mundial de agrotóxicos (DAMS, 2006; PORTO; SOARES, 2012).

De acordo com o recente dossiê elaborado pela Associação Brasileira de Saúde Coletiva/Abrasco (CARNEIRO et al., 2015), o consumo de agrotóxicos na safra de 2011 resultou, em média, 12 litros/hectare e exposição média ambiental/ocupacional/alimentar de 4,5 litros de agrotóxicos por habitante (IBGE/SIDRA, 2012; SINDAG, 2011). Além disso, um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado pelos agrotóxicos (CARNEIRO et al., 2015).

Na literatura mundial, os agrotóxicos têm sido relacionados a diversos efeitos à saúde. Além dos danos agudos, muitos danos crônicos vêm sendo relatados, dentre os quais se destacam patologias de pele, teratogênese, carcinogênese, desregulação endócrina, neurotoxicidade, efeitos na reprodução humana e animal, no sistema imunológico, entre outros (OPAS/OMS, 1996; ELLENHORN, 1997; ECOBICHON, 2001; MEYER et al., 2003; LEE et al., 2004; CLAPP; HOWE; LEFEVRE, 2008; BILA; DEZOTTI, 2007).

Em relação a classificação toxicológica dos agrotóxicos foi feita em função de estudos laboratoriais com exposição oral, dérmica e inalatória para determinar a CL50 e DL50 (Concentração Letal e Dose Letal, dadas em miligramas do produto tóxico por quilo de peso corporal necessários para matar 50% dos ratos ou outros animais expostos ao produto). Para os estudos de DL50 oral, por exemplo, produtos sólidos se enquadram na Classe I, Extremamente Tóxicos, quando a DL50 é $\leq 0,005$ grama/kg de peso do rato. Na Classe II, Muito Tóxicos, quando a DL50 é $> 0,005$ até $0,05$ grama/kg. Classe III - Moderadamente Tóxicos, DL50 $> 0,05$ a $0,5$ gramas/kg. Classe IV - Pouco tóxicos, DL50 $> 0,5$ gramas/kg. Ao final da análise de uma bateria de estudos de exposição por via oral, dérmica e inalatória, a classe tóxica do produto será determinada pela mais tóxica que aparecer em um dos estudos agudos (WHO, 2005; ANVISA, 2007)

Neste contexto, o Paraquat (PQ), fabricado pela Syngenta® e o Glifosato pela Monsanto®, sendo este último o princípio ativo das formulações comerciais Roundup® (Glifosato-Roundup®), destacam-se como os principais herbicidas utilizados em diversos tipos de plantações em todo mundo. Quanto à classificação toxicológica, o PQ é classificado como classe I (extremamente tóxico) e o Glifosato como classe IV (pouco tóxico) (ANVISA, 2007; MUANGPHRA; KWANKUA; GOONERATNE, 2012). O PQ tem sido estudado em espécies de animais de laboratório (McCORMACK et al., 2002), sendo sua exposição durante o período gestacional um risco substancial para a gestante e feto (CHOMCHAI; TIAWILAI, 2007). Enquanto o Glifosato, apesar da classificação (pouco tóxico), as formulações Glifosato-Roundup® apresentam toxicidade relevante sobre a reprodução em humanos (SANIN et al., 2009), efeito desregulador endócrino em humanos (BENACHOUR; SÉRALINI, 2009) e em ratos Wistar (ROMANO et al., 2010), toxicidade oral aguda em ratos (DALLEGRAVE et al., 2002) e hepatotoxicidade em ratos (ÇAGLAR; KOLANKAYA, 2008).

Estudos têm revelado que a Melatonina (MLT), um hormônio produzido pela glândula pineal, tem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, atuando em diversos sistemas biológicos, inclusive como agente controlador e protetor da saúde reprodutiva (REITER et al., 2009; HAMAYATKHAH et al., 2012), bem como durante os períodos do desenvolvimento pré e pós-natal (CISTERNAS et al., 2010). A MLT está entre os agentes que têm se mostrado benéfico em intoxicações por herbicidas do grupo dos biperidílicos, tais como o PQ (MELCHIORRI et al., 1995, 1996) e Diquat (XU et al., 2007).

Tendo em vista, os estudos supracitados sobre os impactos desses herbicidas no sistema reprodutor, em especial, durante o desenvolvimento animal, bem como no fígado (um dos órgãos responsáveis pela destoxificação), bem como das propriedades biológicas da MLT e a ausência de estudos sobre o uso de MLT contra intoxicações por Glifosato-Roundup® e contra a associação entre o PQ e Glifosato-Roundup® desidiu-se investigar, em modelo murino, os efeitos da MLT sobre a primeira semana do desenvolvimento embrionário, além dos efeitos sobre a estrutura e funcionamento do fígado materno expostos a doses subletais de PQ e Glifosato-Roundup® individualmente e associados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Herbicidas: considerações gerais

A utilização de herbicidas ocorre no Brasil desde a década de 50. Naquela década, a agricultura voltou-se para o mercado interno tentando viabilizar o aumento de safras e levando, conseqüentemente, os agricultores a utilizarem produtos químicos para controlar pragas, fitopatologias e plantas daninhas (CARRARO, 1997). Além disso, a cada ano, houve um aumento considerável na utilização desses produtos (ANVISA, 2014; IBGE, 2010).

A preocupação crescente de especialistas e ambientalistas em relação ao uso de herbicidas foi pela grande quantidade dessas substâncias utilizadas nas práticas agrícolas que resultaram em impactos ambientais pouco conhecidos, além dos inúmeros problemas relacionados à saúde pública, decorrentes de seu uso, principalmente, de forma inadequada (MASCARENHA; PESSOA, 2013). Neste

contexto, o uso inadequado de herbicidas pode resultar em intoxicações agudas e, às vezes crônicas por exposição em longo prazo a baixos níveis desses agentes tóxicos (MARONI; FAIT; COLOSIO, 1999; MARONI; FANETTI; METRUCCIO, 2006). Assim, são reconhecidos ainda como possíveis agentes teratogênicos, mutagênicos, cancerígenos e disruptores endócrinos, levando ao aparecimento de doenças neurodegenerativas e distúrbios reprodutivos (FEBER; CABRAL, 1991; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013).

Dentre os herbicidas mais utilizados no mundo destacam-se o Glifosato, princípio ativo das formulações comerciais Roundup® ou Glifosato-Roundup® e PQ, sendo considerados como herbicidas-padrão de controle de plantas daninhas (MOREIRA et al., 2010). O Glifosato é considerado inibidor da biossíntese de aminoácidos essenciais de cadeia aromática (fenilalanina, tirosina e triptofano), enquanto o PQ é um inibidor do fotossistema I, na fase luminosa da fotossíntese, por meio da formação de radicais livres que atuam na membrana dos cloroplastos (MAGALHÃES et al., 2001). Além disso, o controle de plantas daninhas por meio do uso de herbicidas não seletivos tornou-se uma prática tão difundida nas lavouras, que é quase uma rotina obrigatória para os agricultores (SILVA; RODRIGUES; BEGLIOMINI, 1998). Portanto, o Glifosato apresenta elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas como e, apesar da classificação pouco tóxico, há evidências de efeitos danosos ao meio ambiente, principalmente pela resistência adquirida por algumas espécies de ervas daninhas, após o uso prolongado do herbicida em formulações comerciais. A aplicação do mesmo pode resultar na presença de resíduos tanto na colheita quanto em animais usados na alimentação humana (AMARANTE JR; SANTOS, 2002).

Em relação ao PQ, apresenta baixo custo, grande eficácia e, aparentemente não possui efeitos poluentes cumulativos para o solo. Porém, é muito tóxico em humanos e animais, podendo causar intoxicações fatais, principalmente pela falta de um tratamento eficaz na reversão do quadro clínico. Este atua mediante mecanismos de indução do estresse oxidativo, produção aumentada de radicais livres associada à depleção dos sistemas antioxidantes do organismo. Sua toxicidade promove danos aos rins, fígado, músculos, cérebro, dentre outros órgãos (ALMEIDA et al., 2007).

2.1.1 Propriedades físico-químicas do Glifosato

O Glifosato (N-fosfometil glicina), cuja estrutura química é mostrada na figura 1, foi sintetizado pela primeira vez em 1950 como potencial agente quelante industrial e, somente 20 anos mais tarde descobriu-se a ampla atividade herbicida desta molécula, que foi lançado no mercado com o nome comercial Roundup® (SMITH; OEHME, 1992).

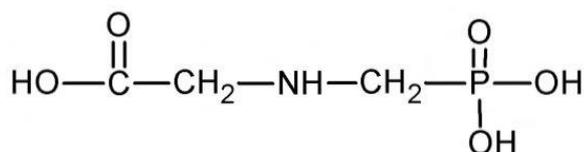


Figura 1. Estrutura química do Glifosato. Fonte: Williams; Kroes; Munro (2000).

O glifosato é um ácido orgânico fraco constituído de uma molécula de glicina e uma de fosfometila (N-(fosfometil) glicina (Fig. 1). Em sua forma pura, constituído por um sólido branco e inodoro, com densidade específica de 1,704 g/cm³, sua solubilidade em água é de 11,6 g/L a 25°C e apresenta pH 2,5 em solução a 1%. É praticamente insolúvel em solventes orgânicos, como etanol, acetona e benzeno, por sua alta polaridade e solúvel em água (WHO, 1994). Como produto comercial, este é encontrado em diferentes formulações e concentrações, sendo a formulação usualmente utilizada com o sal do ácido glifosato desprotonado e um cátion, a isopropilamina (Fig. 2), em solução aquosa na concentração de 356 g/L do ácido livre ou 480 g/L do sal e tendo como amina surfactante a polioxietileno amina (POEA) (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

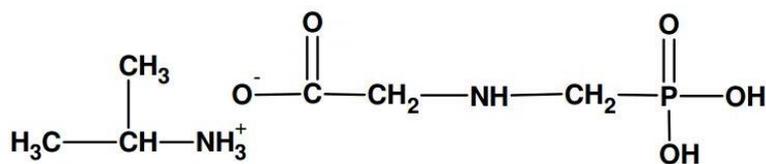


Figura 2. Estrutura química do sal do ácido desprotonado do Glifosato e seu cátion (isopropil-amina), juntos formam o sal isopropilamínico da (N-fosfometil glicina), utilizado no produto comercial. Fonte: Williams; Kroes; Munro (2000).

A amina surfactante POEA, utilizada nos produtos Glifosato-Roundup®, constitui uma mistura de alquilaminas de cadeias longas polietoxilado e sintetizado com ácidos graxos derivados de animais. Este agente tensoativo não iônico favorece

a penetração do Glifosato na cutícula da planta, melhorando a sua efetividade. A POEA é duas a três vezes mais tóxico do que o Glifosato, e o produto formulado com esta amina pode ser muito mais tóxico que o Glifosato (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; MESNAGE; BERNAY; SÈRALINI, 2013; SRIBANDITMONGKOL et al., 2012).

2.1.2 Propriedades biológicas e riscos toxicológicos do Glifosato

O Glifosato, classificado como pouco tóxico (ANVISA, 2007), após absorvido tem ampla distribuição no organismo, sendo encontrado principalmente nos intestinos, ossos e rins. Aparentemente, sua biotransformação em animais é mínima, em torno de 1% para o seu metabólito o ácido aminometilfosfônico (AMPA). Portanto, quase 100% da quantidade encontrada nos tecidos correspondem ao produto original. A absorção máxima ocorre em 6 h após a ingestão do produto havendo, após este intervalo de tempo, rápido declínio em todos os tecidos, exceto nos ossos onde a eliminação é mais lenta (BREWSTER; WARREN; HOPKINS, 1991). Após cinco dias da administração de dose única de Glifosato, observam-se traços residuais no fígado, rins e musculatura esquelética e a excreção ocorre principalmente pelas vias digestiva e renal (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Em ensaios toxicológicos foi observada maior toxicidade na formulação associada do glifosato com os seus ingredientes inertes do que o princípio ativo (glifosato) aplicado isoladamente, indicando que a toxicidade dos ingredientes inertes é maior que o princípio ativo, e que a sua presença produz maior efeito tóxico (BRADBERRY; PROUDFOOT; VALE, 2004; SURGAN, 2005; COX; SURGAN, 2006).

Neste contexto, Dallegrave et al. (2003) observaram retardo no desenvolvimento do esqueleto fetal em ratos Wistar causado pelo Glifosato-Roundup®, e comprovaram esse efeito tóxico sobre o desenvolvimento fetal em exposições agudas, utilizando-se as dosagens orais diárias de 500, 750 ou 1000 mg/kg entre o sexto e 15º dia de gestação. Em adição, Richard et al. (2005) demonstraram em ensaios *in vitro* que o Glifosato e/ou a formulação comercial Glifosato-Roundup® em baixas concentrações não tóxicas promoveram efeitos adversos sobre a enzima aromatase (responsável pela síntese de estrógenos) em células de placenta humana. Além disso, a formulação permitiu uma maior penetração

do Glifosato nas células placentárias, acentuando, assim a redução da atividade enzimática.

O efeito tóxico das formulações também foi confirmado em cultivos de células testiculares de camundongos (WALSH et al., 2000) em mitocôndrias de hepatócitos de ratos (PEIXOTO, 2005) em cultivo de células embrionárias humanas (BENACHOUR et al., 2007) e em embriões de invertebrados (MARC et al., 2002). Além disso, estudos *in vitro* com linhagens de células intestinais revelaram danos às junções celulares (VASILUK et al., 2005), bem como alterações pulmonares, epistaxe, dispneia, perda de peso, diarreia e morte dos animais (ratos) (ADAM et al., 1997) acidose metabólica, hipotensão e leucocitose (TOMINACK et al., 1991) e efeito cancerígeno em humanos (GUYTON et al., 2015).

2.1.3 Propriedades físico-químicas do Paraquat

O PQ ou 1,1-dimetil-4,4-bipiridil é um herbicida da classe dos bipyridilos cuja estrutura química é mostrada na figura 3. Sua síntese data do século XIX, porém não sabiam de suas propriedades herbicidas (SCHMITT et al., 2006), que só foram descobertas em 1955 no Jealott's Hill International Research Center, Bracknell, no Reino Unido. Sua introdução no mercado deu-se no início de agosto de 1962, pela *Plant Protection Division Ltd of Imperial Chemical Industries* (antiga ICI, atual Syngenta). Sua primeira aplicação como herbicida ocorreu na Malásia em plantações de seringueiras e a partir desse fato, seu uso foi generalizado (NEUMEISTER; ISENRING, 2011; SCHMITT et al., 2006; DINIS-OLIVEIRA et al., 2008).

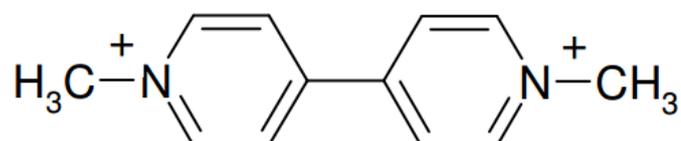


Figura 3. Estrutura química do herbicida Paraquat. Fonte: WHO, (1994).

O PQ é um sólido incolor, cristalino e higroscópico, cuja fórmula molecular é $C_{12}H_{14}N_2$ com peso molecular de 186,3 g/mol. Não é volátil, nem explosivo ou

inflamável em solução aquosa, sendo corrosivo para metais e estável em solução ácida ou neutra, mas se hidrolisa facilmente em meio alcalino ($\text{pH} > 12$). Os seus sais são eletrólitos fortes que, em solução, dissociam-se em uma grande quantidade de íons positivos e negativos (SCHMITT et al., 2006; ALMEIDA, 2007).

2.1.4 Propriedades biológicas e riscos toxicológicos do Paraquat

O PQ é altamente tóxico para humanos (HOUZE et al., 1990) e animais de laboratório (OGATA; MANABE, 1990; SATOH et al., 1992). O mesmo é absorvido por contato dérmico, inalação e, especialmente por ingestão (HOUZE et al., 1990). Por ingestão, o PQ apresenta absorção oral rápida pela sua alta hidrossolubilidade, sendo predominantemente no intestino delgado, assim o transporte ativo facilita a entrada do herbicida em todas as células da mucosa intestinal. Caso a mucosa do trato gastrintestinal fique comprometida, pelo poder de corrosão do herbicida, o percentual absorvido é suscetível de ser mais elevado, pela absorção por difusão passiva (DINIS-OLIVEIRA et al., 2008). Por inalação, o PQ acumula-se, principalmente nos pulmões, onde pode alcançar concentrações letais em menos de 10 horas, além de rins, músculos, coração, fígado (XARAU; LAITA, 2000) cérebro e adrenais (SCHMITT et al., 2006; ALMEIDA et al., 2007).

No organismo, o PQ sofre um processo redox cíclico, sendo metabolizado pela ação da enzima NADPH-citocromo P450 redutase que resulta na geração de um radical Paraquat ($\text{PQ}^{\bullet+}$). Assim, produz espécies reativas de oxigênio (EROs) durante sua oxidação com o oxigênio molecular formando o radical ânion superóxido, que é uma espécie altamente reativa. Desta forma, inicia-se o ciclo redox (BUS et al., 1976; ALONZO; CORRÊA, 2008). Por fim, o PQ é excretado pelas vias digestiva e renal (HONORÉ et al., 1994).

A formação de EROs como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH), além de instáveis, reagem rapidamente com ácidos graxos, provocando lesões nas membranas, proteínas e DNA das células (SCHMITT et al., 2006; DINIS-OLIVEIRA et al., 2008; MARTINS, 2013).

Em relação a toxicidade sistêmica do PQ tem sido determinada em várias espécies de animais por meio da administração oral. Os sintomas incluem, inflamação da garganta e lábios, vômitos e diarreias. Doses concentradas levam a progressivas

dificuldades respiratórias, distensão abdominal em virtude da dilatação do intestino e redução de sua mobilidade (SHIMIZU et al., 2003). A sua ação altamente tóxica advém da sua capacidade de produção contínua de EROs, compostos extremamente danosos às células e da perioxidação lipídica das membranas celulares podendo causar alterações morfofisiológicas em diversos órgãos, em especial nos pulmões, fígado e rim (SERRA; DOMINGOS; PRATA, 2003).

2.2 Associação de herbicidas e suas consequências

Durante muito tempo pensou-se que herbicidas em associação e com diferentes mecanismos de ação não exercia algum efeito adverso, mesmo quando presentes em doses correspondentes ao nível de efeito adverso não observado (NOAEL). Recentemente, estudos sobre o impacto dessas associações têm causado grande preocupação (KORTENKAMP, 2008; RIDER et al., 2010) e, ao examinar a literatura verificou-se que a exposição a estas associações, de fato promoviam efeitos adversos que variaram de acordo com os compostos testados, o tecido-alvo ou os parâmetros biológicos avaliados (GRAY et al., 2001; HOTCHKISS et al., 2004; HOWDESHELL et al., 2007; PADHI et al., 2008; BLYSTONE et al., 2009)

As associações de diferentes herbicidas, bem como de herbicidas com inseticidas e/ou outras classes de defensivos agrícolas, têm como objetivo aumentar o espectro de ação e reduzir o número de aplicações. Em algumas situações podem levar à ocorrência de interações, que se manifestam de forma aditiva (efeito final igual a soma dos efeitos de cada um dos agentes envolvidos), sinérgica (efeito maior que a soma dos efeitos de cada agente em separado) ou antagônica (o efeito de um agente é diminuído, inativado ou eliminado quando se combina com outro agente), o que pode ou não prejudicar o controle, bem como produzir efeitos desconhecidos quanto à toxicologia (NASH, 1967; TREZZI et al., 2005).

O uso dessas associações constitui prática relativamente comum na agricultura (MATTOS et al., 2002; CASTRO, 2009). Assim, vários resíduos, em especial de herbicidas coexistem em um mesmo ambiente podendo causar diferentes efeitos adversos, segundo as interações entre os diferentes compostos dos produtos em associação (LAETZ et al., 2009; WANG et al., 2014).

As interações químicas entre herbicidas têm propiciado a utilização de grandes variedades de associações entre dois ou mais herbicidas, até mesmo com outras classes de defensivos agrícolas. Tais associações fundamentam-se em princípios básicos de toxicologia como os efeitos de potencialização, os quais têm apresentado eficácia nas lavouras, porém efeitos adversos ao homem e ao meio ambiente (GRISOLIA, 1996).

De forma geral, a literatura científica tem apontado poucas pesquisas sobre os efeitos danosos decorrentes da exposição associada de herbicidas em diferentes organismos com relatos de estudos reprodutivos e do desenvolvimento animal (McCARTY; BORGERT, 2006). Além disso, estudos sobre efeito sinérgico de doses subletais de herbicidas em associações quase não existem (BOOBIS et al., 2011).

Neste contexto, Rouimi et al. (2012) estudaram, *in vitro*, células hepáticas expostas à associação contendo o herbicida Atrazina e relataram desregulação gênica responsável pela codificação de enzimas metabólicas e vias de desintoxicação. Esses resultados, em um contexto de exposição crônica, poderiam eventualmente promover patologias em seres humanos e animais.

Além disso, associações contendo os herbicidas Alachlor, Captan, Diazinon, normalmente ingeridas através do consumo de frutas e legumes, induziram variações específicas relacionadas ao gênero em nível de metabólitos hepáticos envolvidos no estresse oxidativo e na regulação do metabolismo da glicose em camundongos (MERHI et al., 2010). Em outro estudo, Castro et al. (2009) verificaram que a exposição associada e individual de herbicidas como a Sulfentrazone e Atrazina promoveram toxicidade reprodutiva e/ou no desenvolvimento de espécies não-alvo (humanos e animais de laboratório). Demur et al. (2013) mostraram que a exposição à dose subletal de herbicidas associados desde o desenvolvimento fetal até a idade adulta leva a grandes mudanças nos níveis de glicose plasmática e desordens hematopoiéticas, sugerindo que, mesmo quando os contaminantes não excedam a dose de referência como o nível de risco mínimo (MLR), ingestão diária aceitável (ADI) e a NOAEL, a segurança alimentar ainda pode ser um problema sério.

Ainda neste contexto, Roustan et al. (2014) demonstraram em ensaios *in vitro* com células de ovário de hamster (CHO-K1) que a associação dos herbicidas Glifosato e Atrazina e seus produtos de degradação AMPA e desetilatraxina (DEA), respectivamente, revelaram propriedades genotóxicas induzindo a formação de

micronúcleos. Além disso, as condições ambientais, tais como irradiação solar pode modular o perfil clastogênico/aneugênico dos herbicidas intensificando ou não seus efeitos deletérios.

Estudos experimentais em ratos e camundongos têm revelado uma série de alterações no desenvolvimento intrauterino, cujos danos são observados somente *a posteriori*. Enquanto, os estudos em seres humanos ainda são contraditórios, mas indicam maior risco destes desfechos em recém-nascidos cujas mães se expuseram a herbicidas (CLEMENTI et al., 2007). Assim, a transferência de herbicidas na interface materno-fetal pode promover danos ao feto, bem como à placenta, tecidos e órgãos maternos. (Fig. 4) (NEEDHAM, 2005; BARR; BISHOP; NEEDHAM, 2007).

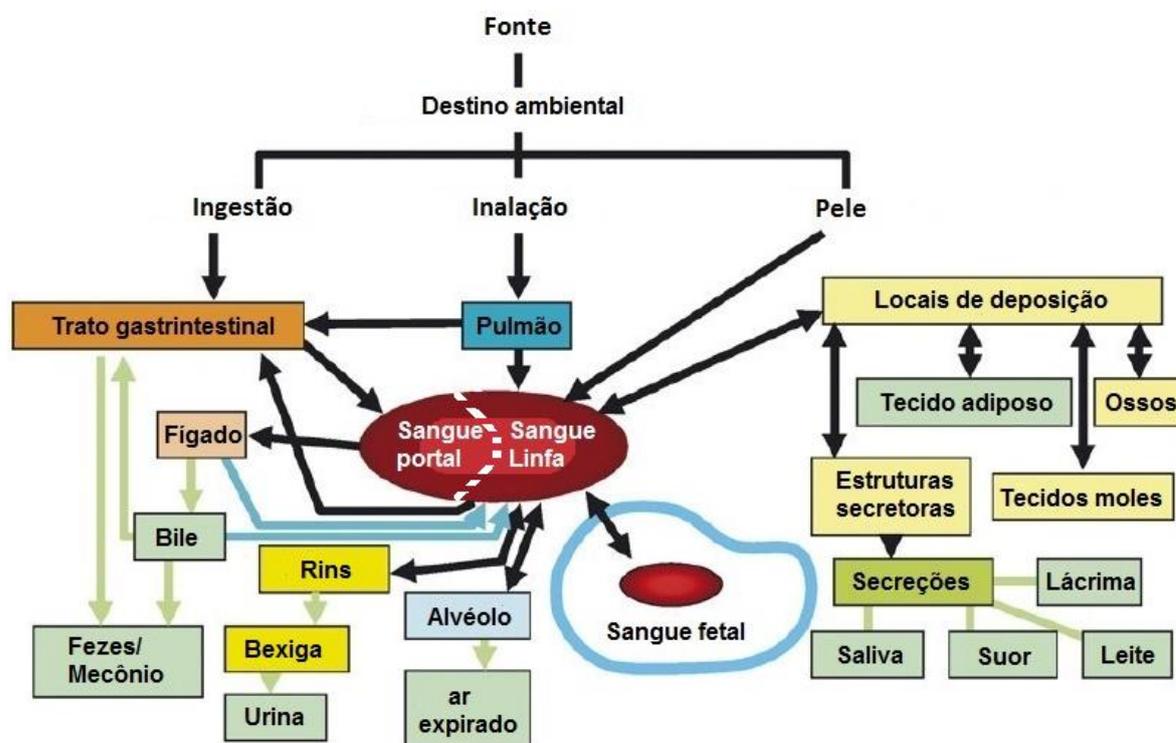


Figura 4. Esquema da transferência de herbicidas na interface materno-fetal. As linhas azuis indicam a transferência no sistema linfático, as linhas pretas representam transferência de sangue de um sistema para outro e as linhas verdes representam as vias de excreção primária. Adaptado de Barr, Bishop e Needham (2007).

2.3 Melatonina: considerações gerais

LERNER et al. (1958) isolaram uma substância da glândula pineal de bovinos que, em baixas concentrações, foi capaz de alterar a cor da pele de anfíbios. Essa substância recebeu o nome de Melatonina (MLT), pela sua ação tônica (tonina – tônus) sobre melanóforos dermais (mela – melanóforos).

A MLT (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um neuro-hormônio pertencente ao grupo das indolaminas, cuja estrutura química é mostrada na Figura 5. Encontra-se presente em todos os vertebrados e em tecidos vegetais (PUERTA et al., 2007). Sua produção é essencialmente na glândula pineal, mas podendo ser secretada em menor quantidade pela retina, osso, pele, intestino, plaquetas, vesícula biliar (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005), timo, baço, coração, músculo esquelético, fígado, estômago, intestino, placenta, testículos, ovários, córtex cerebral e corpo estriado (STEFULJ et al., 2001; SANCHEZ-HIDALGO et al., 2009).

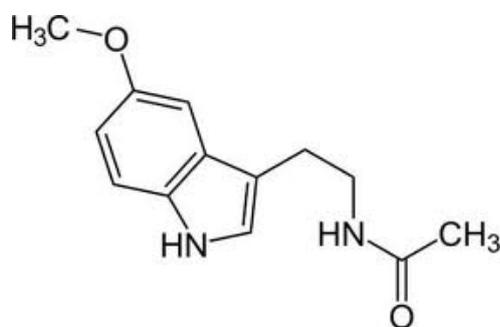


Figura 5. Estrutura química da Melatonina. Fonte: Slominski et al. (2012).

A MLT é sintetizada a partir do aminoácido triptofano que é captado da circulação sanguínea e convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela ação da enzima triptofano-5-hidroxilase (T-5-H). O 5-HTP é descarboxilado pela enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTPD), formando a serotonina. Assim, a serotonina, por sua vez é convertida a N-acetilserotonina (NAS) através de uma reação de acetilação da enzima N-acetiltransferase (NAT) e por fim, a enzima citosólica-hidroxitriptofano-O-metiltransferase, atualmente denominada acetilserotonina O-metiltransferase (ASOMT), catalisa a reação de metilação para a formação da MLT (Fig. 6) (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003; REITER et al., 2009; SLOMINSKI et al., 2012).

Os níveis circulantes de MLT em indivíduos adultos são baixos (< 20 pmol/L). Estes níveis aumentam aproximadamente às 21 h (período escuro), com pico máximo às 03 h e retornam a níveis menores às 09 h (período claro) (VOULTSIOS; KENNAWAY; DAWSON, 1997). Como não ocorre armazenamento de MLT na glândula pineal, o perfil deste hormônio no plasma reflete confiavelmente a atividade da glândula pineal (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005).

A MLT circulante é metabolizada principalmente no fígado através de uma via clássica de hidroxilação, envolvendo enzimas do sistema citocromo P450, que catalisa a formação de 6-hidroximelatonina que então sofre conjugação com ácido glicurônico ou sulfato, gerando o composto 6-sulfatoximelatonina, que posteriormente será excretado na urina (FRANCIS et al., 1987; BOUTIN et al., 2005). Patologias hepáticas e renais, como cirrose e insuficiência renal crônica, são conhecidos por alterarem as taxas de eliminação desse composto (LANE; MOSS, 1985; VILJOEN et al., 1992; KUNZ et al., 1999).

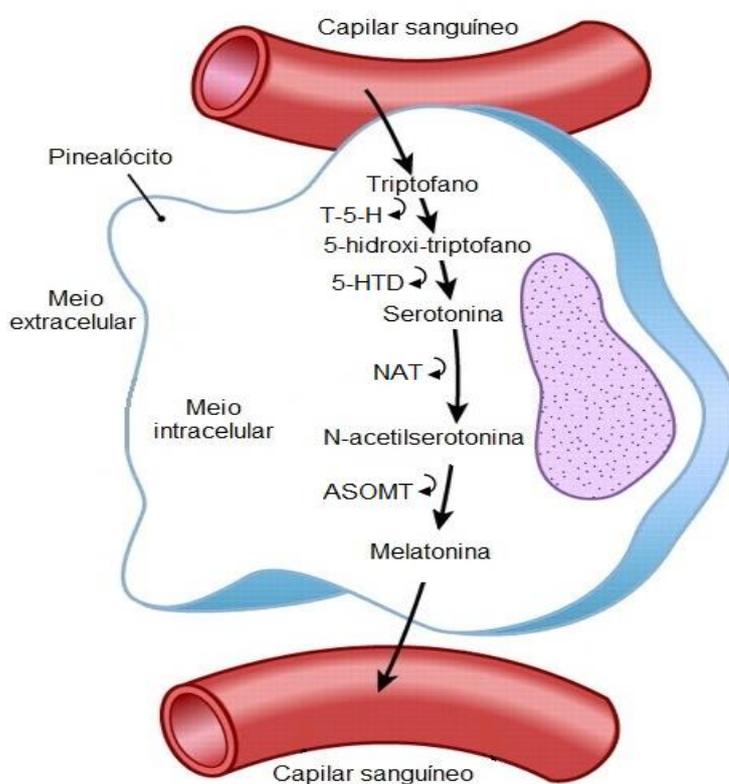


Figura 6. Esquema da biossíntese da MLT com seus precursores e enzimas participantes do processo. Adaptado de Reiter et al. (2009).

No tecido cerebral de ratos, uma parte da MLT é convertida a N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) (HIRATA et al., 1974), possivelmente através de clivagem oxidativa do anel indólico, catalisada por enzimas como a indolamina-2,3-dioxigenase, seguida de deformilação, formando N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), por ação da enzima formamidase. A MLT pode ser convertida em AFMK por

reações enzimáticas, pseudo-enzimáticas, por irradiação ultravioleta e reação com EROs (KVETNOY; SANDVIK; WALDUM, 1997).

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem a ação direta da MLT sobre as espécies reativas, muitos outros atribuem sua ação antioxidante aos metabólitos que são gerados durante o estresse oxidativo. A degradação da MLT em AFMK e AMK eleva a ação de enzimas antioxidantes e inibe a ação de mediadores pró-inflamatórios (SILVA et al., 2004; MAYO et al., 2005; TAN et al., 2007). Outras vias metabólicas menos importantes, que ocorrem em diversos tipos celulares, levam à formação de N-acetilserotonina e de 3-hidroxi melatonina cíclica (c3OHM), sendo esse último uma possível fonte de AFMK (Fig. 7) (ZLOTOS et al., 2014).

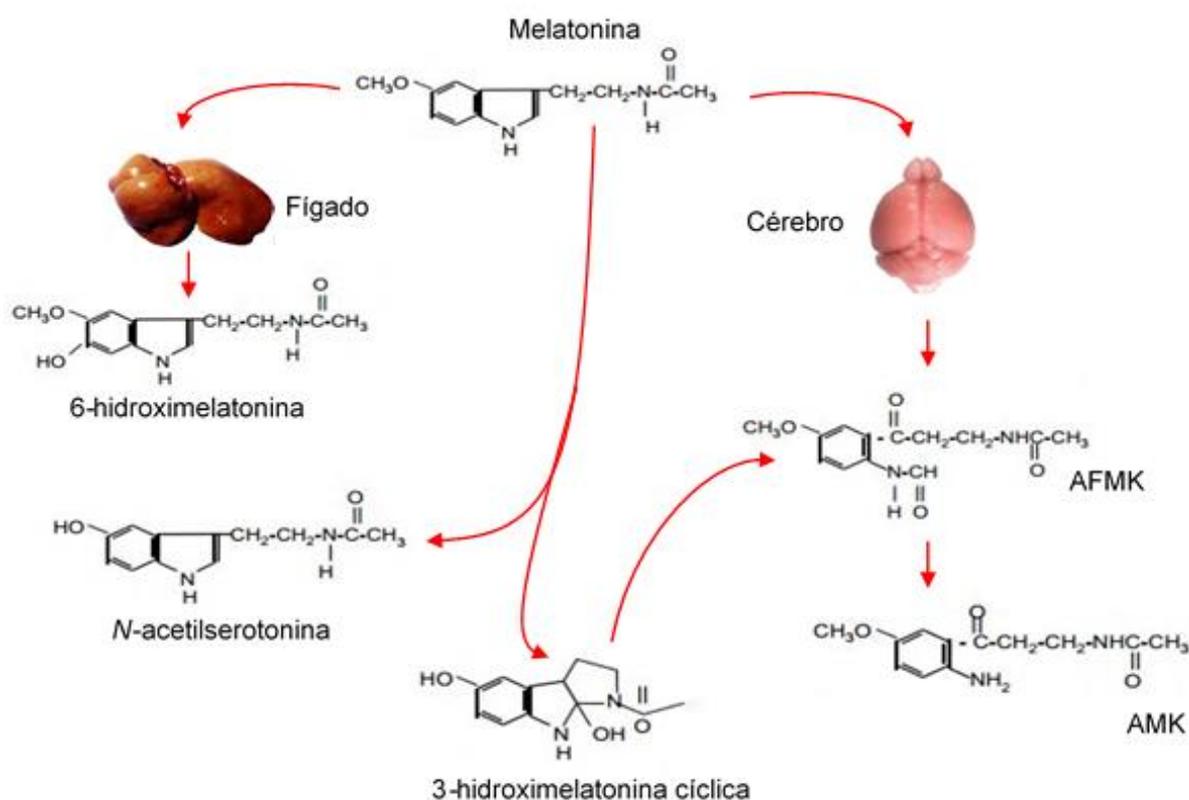


Figura 7. Representação esquemática de vias metabólicas de degradação da MLT. Adaptado de Zlotos et al. (2014).

A MLT é uma molécula com características lipofílicas que pode penetrar em membranas biológicas, incluindo a placenta e a barreira hematoencefálica (SHIDA; CASTRUCCI; LAMY-FREUND, 1994; COSTA; LOPEZ; LAMY-FREUND, 1995; REITER, 1998, REITER et al., 2000), sendo encontrada em fluidos biológicos como a bile (TAN et al., 1999) e no líquido cefaloraquidiano (SKINNER; MALPAUX, 1999; ROUSSEAU et al., 1999) em quantidades maiores que no sangue (REITER, 1991).

Uma vez liberada, a MLT transmite informação sobre o fotoperíodo para os tecidos centrais e periféricos que expressam sítios (receptores de MLT) denominados MT1, MT2 e MT3 para sua ligação, onde inúmeras funções importantes são exercidas no organismo (WITT-ENDERLY et al., 2003; BOUTIN et al., 2005). Além disso, pode regular a expressão de genes atuando em receptores nucleares, interagir com proteínas celulares, sequestrar EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (HORSTMAN; WRONA; DRYHURST, 2002; CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005).

Os sítios de ligação de MLT foram descritos a partir de ensaios *in vitro* com o análogo radioativo (2-[¹²⁵I]-iodomelatonina) em diversas regiões do sistema nervoso central, principalmente no núcleo supraquiasmático do hipotálamo anterior (supraóptico), núcleo paraventricular, em artérias cerebrais e estão presentes em vários tecidos periféricos como nas adrenais, órgãos linfoides primários e secundários, coração, glândulas mamárias, trato gastrintestinal e ducto deferente (REPERT; WEAVER; GODSON, 1996; YU et al., 2000; KOOP et al., 2000; FERREIRA; MARKUS, 2001) na retina (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2014), gônadas (REPERT; WEAVER; EBISAWA, 1994) e tecidos neoplásicos (YING et al., 1993). Estudos ainda apontam para a presença desses sítios em linfócitos T (KONAKCHIEV et al., 1995), neutrófilos (LOPEZ-GONZALEZ et al., 1993) e monócitos (BARJAVEL et al., 1998).

A ação considerada clássica da MLT nos vertebrados está relacionada à sinalização endógena da alternância claro/escuro ambiental. Assim, tem ação cronobiótica indicando ao organismo a ausência de luz ambiental, sendo importante para sincronizar os seres vivos com as condições de iluminação do ambiente, ajustando as diversas funções fisiológicas (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003). Além disso, a MLT atua no sistema de defesa dos organismos, algumas vezes como um antioxidante capaz de anular direta ou indiretamente a ação danosa de radicais livres, EROs e ERNs, oriundos do metabolismo celular e de condições fisiopatológicas. Este tipo de ação seria, inclusive, a principal função da MLT em organismos mais primitivos como bactérias e outros organismos unicelulares, que teriam menos recursos para se proteger contra este tipo de condição (MANCHESTER et al., 1995; REITER et al., 2000; MACCHI; BRUCE, 2004). Além de atuar como um antioxidante, outro efeito importante da MLT é a modulação de diversos aspectos da resposta imunológica de mamíferos (GARCIA-MAURIÑO et al., 1997).

Ainda sobre ação antioxidante, do ponto de vista evolutivo, a função primária da MLT está associada à sua capacidade citoprotetora, pela sua propriedade antioxidante (TAN et al., 2007). As fontes extrapineais de MLT fortalecem esta evidência, pois sua ação local está relacionada às suas propriedades de defesa do organismo. O potencial antioxidante da MLT está associado à sua capacidade de atuar diretamente como um “scavenger”, sequestrando e reduzindo o potencial oxidativo de EROs ou ERNs incluindo ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito ($ONOO^-$) ou ainda à sua atuação sobre a síntese de enzimas antioxidantes (TAN et al., 2010; PAREDES; REITER, 2010).

Por outro lado, a MLT também é reportada em outras pesquisas como agente anti-inflamatório, contribuindo à eliminação de radicais livres e na regulação da síntese da cicloxigenase 2 (COX-2) (MAYO et al., 2005). Assim, a MLT apresenta uma estrutura semelhante a COX-2 e, por isso pode se ligar ao seu sítio ativo, atuando como um inibidor natural das funções dessa enzima, ao modular de maneira natural a sua atividade (DE LA ROCHA et al., 2007), limitando a produção de quantidades excessivas de óxido nítrico, prostanoídes e leucotrienos, bem como outros mediadores do processo inflamatório, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (MAURIZ et al., 2013). Acredita-se que as ações anti-inflamatórias da MLT são decorrentes da formação do metabólito AMK, capaz de causar inibição e infrarregulação da COX-2 (HARDELAND; PANDI-PERUMAL; CARDINALI, 2006).

Finalmente, a MLT é uma molécula evolutivamente conservada, que reduz direta e indiretamente a peroxidação lipídica (LPO) em animais e plantas, especialmente *in vivo*. Assim, não sabe se essa ação protetora é exclusivamente imputável à sua capacidade de eliminar radicais livres ou se é uma consequência desta ação por seus metabólitos o c3OHM, AFMK ou AMK, uma vez que todos os metabólitos são formados durante a cascata antioxidante da MLT. Outro aspecto importante sobre MLT e seus metabólitos é a ausência de qualquer atividade pró-oxidante em células normais, uma característica que ocorre com alguns antioxidantes clássicos (REITER; TAN; GALANO 2014).

2.3.1 Melatonina e Reprodução

A MLT desempenha um importante papel no controle neuroendócrino da fisiologia reprodutiva. Além desse efeito sistêmico, a presença de seus receptores (MT1 e MT2) ao longo do eixo-hipotálamo-hipófise-gonadal e mais especificamente em células ovarianas, sugere um controle intrínseco da reprodução relacionado ao ovário podendo atuar na foliculogênese, principalmente na fase antral, em processos como a diferenciação das células da granulosa (expressão de receptores para hormônio luteinizante) e produção esteroidogênica (ROCHA et al., 2011). A ação da MLT na esteroidogênese gonadal provavelmente ocorra dentro do próprio de ovário, suposição fortalecida pela presença de sítios de ligação da melatonina em frações de membranas das células da granulosa de humanos (YIE et al., 1995) e expressão dos receptores de membrana para melatonina nas células da granulosa e luteais de humanos (WOO et al., 2001).

Para Tamura et al. (1998) a MLT tem um papel importante no metabolismo lipídico, na gravidez, no período do parto e na função do corpo lúteo. Além disso, altos níveis de MLT são encontrados no fluido folicular humano, em concentrações pré-ovulatórias mais elevadas do que nos níveis séricos no plasma. Sabe-se ainda que as concentrações de MLT no fluido folicular aumentam de acordo com o crescimento folicular (NAKAMURA et al., 2003).

Recentemente, estudos têm demonstrado os efeitos antioxidantes da melatonina no folículo, especialmente durante o processo de ovulação, confirmando a diminuição na formação de radicais livres durante a maturação oocitária e no decorrer do desenvolvimento embrionário. A diminuição da produção de ROS, dentro do folículo ou mesmo durante o desenvolvimento embrionário (MOTA et al., 2014)

Outros efeitos incluem a indução da expressão de fatores de crescimento tais como do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 e inibição da atresia folicular (ROCHA et al., 2013), implantação e desenvolvimento embrionário em mamíferos (BRZEZINSKI, 1997; REITER, 2005; DAIR et al., 2008) aperfeiçoamento do processo de maturação e preservação da qualidade do oócito, manutenção da homeostase placentária que protege ao mesmo tempo o sinciciotrofoblasto dos danos oxidativos, melhora a hemodinâmica e transferência de nutrientes na interface placentária-uterina (HALDAR; YADAV, 2006; WANG et al., 2013; CHEN et al., 2013; REITER et al.,

2014a, 2014b). Esses estudos sinalizam que a MLT pode estar envolvida no funcionamento ideal do sistema reprodutor, bem como no desenvolvimento embrionário.

2.3.2 Melatonina e intoxicações por herbicidas

As intoxicações por herbicidas representam, como já mencionado anteriormente, um problema de saúde pública em virtude da elevada incidência. O maior interesse no tratamento das intoxicações por herbicidas tem-se concentrado em medidas que impeçam ou minimizem as lesões celulares (SERRA; DOMINGOS; PRATA, 2003). Nesse sentido, enfatiza-se a utilização de várias substâncias, entre elas a MLT (CAGNOLI et al., 1995; MELCHIORRI et al., 1996).

Durante as duas últimas décadas, muitos estudos têm reportado que a MLT atua como antioxidante e eliminador de EROs (REITER; CARNEIRO; OH, 1997; GALANO; TAN; REITER, 2011). Dessa forma, Bhatti, Sidhu e Bhatti (2011) constataram efeito protetor da MLT contra danos oxidativos em eritrócitos de ratos induzidos pela Atrazina. Ação hepatoprotetora e contra a LPO induzida pelo herbicida Diquat. Além disso, reduziu a taxa de mortalidade em ratos, bem como a toxicidade renal (ZHANG et al., 2006; XU et al., 2007).

A MLT foi capaz de neutralizar a maioria das mudanças redox produzidos pelo herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético nas células granulares do cerebelo reforçando ainda mais a eficácia da MLT como um agente protetor, sendo nesse caso um efeito direto no sistema nervoso central (BONGIOVANNI et al., 2007).

A exposição ao herbicida Atrazina pode causar imunotoxicidade, além de outras consequências adversas para a saúde humana e animal. O papel citoprotetor da MLT sobre o mecanismo imunotóxico desse herbicida foi estudado por Sharma et al. (2014) e reconhecido pela redução do estresse do retículo endoplasmático, da apoptose mitocondrial, bem como dos sinais de autofagia.

O PQ é especialmente tóxico por via inalatória. Já o herbicida Diquat promove maiores danos no intestino e fígado (PAREDES; REITER, 2010). Melchiorri et al. (1995, 1996) reportaram que a MLT foi capaz de suprimir danos oxidativos provocados por ambos os herbicidas. Ainda neste estudo, a MLT recuperou os níveis de

concentração de glutathione reduzida (GSH) hepática e pulmonar, bem como elevou a DL₅₀ dos ratos de 75 mg/kg para 251 mg/kg de PQ.

ORTIZ et al. (2000) observaram que após a administração de MLT em ratos expostos ao PQ houve redução significativamente de micronúcleos em células do sangue periférico e de medula óssea. Esse mesmo resultado foi observado por Melchiorri et al. (1998).

O efeito protetor da MLT também foi demonstrado por García-Rubio, Matas e Míguez (2005) em estudo *in vitro* com hepatócitos expostos ao herbicida PQ, pois, a MLT reduziu o estresse oxidativo melhorando os níveis de GSH hepático.

Atualmente, o uso de Glifosato-Roundup® e o aparecimento de disfunções da glândula pineal foram correlacionados, em que formulações contendo Glifosato podem se ligar a metais como o alumínio e atuar sinergicamente induzindo disfunções na glândula pineal podendo levar a várias doenças neurológicas como autismo, transtorno do déficit de atenção com hiperatividade, depressão, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, desordem de ansiedade e até disbiose (desequilíbrio da flora intestinal). Além disso, esse tipo de associação pode alterar o comportamento das enzimas do sistema citocromo P450, as quais estão envolvidas no metabolismo da MLT (SAMSEL; SENEFF, 2013; SENEFF; SWANSON; LI, 2015).

Associações de herbicidas representam um problema de saúde pública ainda maior em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento com base econômica agroindustrial. Embora o uso associado de herbicidas seja generalizado, o seu perfil toxicológico ainda é desconhecido. Assim, os antioxidantes têm assumido um papel importante contra as intoxicações por herbicidas, sendo na maioria das vezes agravados pelas associações entre herbicidas e até mesmo com metais pesados.

Este quadro mostra a necessidade de realizar estudos relacionados à administração de agrotóxicos, em especial herbicidas em associação, pois sua utilização raramente é realizada individualmente nas lavouras (MATTOS et al., 2002). Contudo, as misturas de herbicidas podem ser tóxicas para várias espécies não-alvos, como organismos aquáticos e mamíferos (TALLARIDA, 2001, CASTRO; CHIORATO, 2007).

Assim, estudos sobre os efeitos da associação de herbicidas coadministrados com MLT são poucos ainda e quando se trata dos herbicidas PQ e Glifosato-

Roundup® existem alguns relatos sobre o efeito protetor da MLT contra os efeitos tóxicos do herbicida PQ, porém não há relatos quando se trata do Glifosato-Roundup® isoladamente ou associado com o PQ. Por isso, são necessários estudos sobre a associação desses herbicidas e seus efeitos sobre os diferentes sistemas biológicos, especialmente no sistema reprodutor e no fígado, bem como o tratamento experimental com a MLT.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; DÍAZ-CASADO, M. E. LIMA-CABELLO, E.; LÓPEZ, L. C.; ROSALES-CORRAL, S.; TAN, D.; REITER R. J. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 17, p. 2997-3025, 2014.
- ADAM, A.; MARZUKI, A.; ABDUL, R. H.; ABDUL, A. M. The oral and intratracheal toxicities of ROUNDUP and its components to rats. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 47-51, 1997.
- ALMEIDA, G. L.; SCHMITT, G. C.; BAIRROS, A. V.; EMANUELLI, T. GARCIA, S. C. Os riscos e danos nas intoxicações por paraquat em animais domésticos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p.1506-1512, 2007.
- ALONZO, H. G. A.; CORRÊA, C. L. **Praguicidas**. In. OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008, p. 623-641.
- AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária (Brasil). **Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA)**. Disponível em: <<http://www.portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 12 jun. 2014.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Legislação**. VisaLegis. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, fica Revogada a Resolução nº 475, de 19 de março de 2002. Disponível em: <<http://egis.anvisa.gov.br/leisref/public/show>>. Acessado em: 11 set. 2014.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - **Monografias de Produtos Agrotóxicos**, atualizada em 09 de julho de 2007. G.01 (glifosato) e P.01 (paraquat). Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>. Acessado em 05 de abril, 2015.
- ARAÚJO, A. J.; LIMA, J. S.; MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; SOARES, M. O.; MONTEIRO, M. C. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 115-30, 2007.
- HAMAYATKHAH, V.; NAJAFIYAN, M.; FARZAM, M.; KARGAR, H. Effects of the paraquat herbicide on oogenesis and ovary structure of Wistar rat strain. **Advances in Environmental Biology**, v. 6, n. 3, p. 1006-1012, 2012.
- BARJAVEL, M. J.; MAMDOUH, Z.; RAGHBATE, N.; BAKOUCHE, O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 3, p. 1191-1197, 1998.

BARR, D.; BISHOP, A.; NEEDHAM, L. Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 3, p. 260-266, 2007.

BENACHOUR, N.; SERALINI, G. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 97-105, 2009.

BENACHOUR, N.; SIPAHUTAR, H.; MOSLEMI, S.; GASNIER, C.; TRAVERT, C.; SÉRALINI, G. E. Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 126-133, 2007.

BHATTI, J. S.; SIDHU, I. P.; BHATTI, G. K. Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 353, n. 1-2, p. 139-149, 2011.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-66, 2007.

BLYSTONE, C. R.; LAMBRIGHT, C. S.; CARDON, M. C.; FURR, J.; RIDER, C. V.; HARTIG, P. C.; WILSON, V. S.; GRAY JR, L. E. Cumulative and antagonistic effects of a mixture of the antiandrogens vinclozolin and iprodione in the pubertal male rat. **Toxicological Sciences**, v. 111, n. 1, p. 179-188, 2009.

BONGIOVANNI, B.; DE LORENZI, P.; FERRI, A.; KONJUH, C.; RASSETTO, M.; EVANGELISTA, D. A. M.; CARDINALI, D. P.; DUFFARD, R. Melatonin decreases the oxidative stress produced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat cerebellar granule cells. **Neurotoxicity Research**, v. 11, n. 2, p. 93-9, 2007.

BOOBIS, A.; BUDINSKY, R.; COLLIE, S.; CROFTON, K.; EMBRY, M.; FELTER, S.; HERTZBERG, R.; KOPP, D.; MIHLAN, G.; MUMTAZ, M.; PRICE, P.; SOLOMON, K.; TEUSCHLER, L.; YANG, R.; ZALESKI, R. Critical analysis of literature on low-dose synergy for use in screening chemical mixtures for risk assessment. **Critical reviews in toxicology**, v. 41, n. 5, p. 369-383, 2011.

BOUTIN, J. A.; AUDINOT, V.; FERRY, G.; DELAGRANGE, P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. **Trends in Pharmacology Sciences**, v. 26, n. 8, p. 412-419, 2005.

BRADBERRY, S. M.; PROUDFOOT, A. T.; VALE, J. A. Glyphosate poisoning. **Toxicological Reviews**, v. 23, n. 3, p. 159-67, 2004.

BREWSTER, D.; WARREN, J.; HOPKINS, W. Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: Tissue distribution, identification and quantification of glyphosate derived materials following a single oral dose. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 43-51, 1991.

BRZEZINSKI, A. Melatonin in humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 3, p. 186-195, 1997.

BURIOLA, A. A.; OLIVEIRA, M. L. F. Famílias de agricultores convivendo com praguicidas clandestinos no Estado do Paraná - Brasil. **Ciencia y Enfermería**, v. 19, n. 1, p. 37-47, 2013.

BUS, J. S.; CAGEN, S. Z.; OLGAARD, M.; GIBSON, J. E. A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 501-513, 1976.

ÇAGLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sib-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 57-62, 2008.

CAGNOLI, C. M.; ATABAY, C.; KHARLAMOVA, E.; MANEV, H. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. **Journal of Pineal Research**, v. 18, n. 4, p. 222-226, 1995.

CARNEIRO, F. F.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A.C. **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. São Paulo: Expressão Popular. p. 624, 2015.

CARRARO, G. **Agrotóxico e Meio Ambiente: uma proposta de ensino de ciências e de química**. Porto Alegre: UFRGS, p. 95, 1997.

CASTRO, V. L. S. S. Uso de misturas de agrotóxicos na agricultura e suas implicações toxicológicas na saúde. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 4, n. 1-3, p. 87-94, 2009.

CASTRO, V.; CHIORATO, S. Evaluation of pesticides mixtures effects on the development of suckling rats. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, n. 2, p. 169-176, 2007.

CHEN, Y.; SHEEN, J.; TIAO, M.; TAIN, Y.; HUANG, L. Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 5380-5401, 2013.

CHOMCHAI, C.; TIAWILAI, A. Fetal poisoning after maternal paraquat ingestion during third trimester of pregnancy: case report and literature review. **Journal of Medical Toxicology**, v. 3, n. 4, p. 182-186, 2007.

CISTERNAS, C. D.; COMPAGNUCCI, M. V.; CONTI, N. R.; PONCE, R. H.; VERMOUTH, N. T. Protective effect of maternal prenatal melatonina administration on rat pups born to mothers submitted to constant light during gestation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 9, p. 874-882, 2010.

CLAPP, R.; HOWE, G.; LEFEVRE, M. J. Environmental and occupational causes of cancer new evidence, 2005–2007. **Reviews on Environmental Health**, v. 23, n. 1, p. 1-37, 2008.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 11-24, 2005.

CLEMENTI, M.; CAUSIN, R.; MARZOCCHI, C.; MANTOVANI, A.; TENCONI, R. A study of the impact of agricultural pesticide use on the prevalence of birth defects in Northeast Italy. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 1, p.1-8, 2007.

COSTA, E. J. X.; LOPEZ, R. H.; LAMY-FREUND, M. T. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. **Journal of Pineal Research**, v.19, n. 3, p.123-126, 1995

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1803-1806, 2006.

DAIR, E. L.; SIMOES, R. S.; SIMOES, M. J.; ROMEU, L. R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; HAIDAR, M. A.; BARACAT, E. C.; SOARES JR, J. M. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 5, p. 1299-1305, 2008.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D. G.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. Acute oral toxicity of glyphosate in Wistar rats. **Journal of Veterinary Research**, v. 1, p. s/n, 29-36, 2002.

DAMS, R. I. Pesticidas: usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, p. 37-44, 2006.

DE LA ROCHA, N.; ROTELLI, A.; AGUILAR, C. F.; PELZER, L. Structural basis of the anti-inflammatory activity of melatonin. **Arzneimittelforschung**, v. 57, n. 12, p. 782-786, 2007.

DELGADO, I. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 180-186, 2004.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 142, n. 1-2, p. 45-52, 2003.

DEMUR, C.; MÉTAIS, B.; CANLET, C.; TREMBLAY-FRANCO, M.; GAUTIER, R.; BLAS-Y-ESTRADA, F.; SOMMER, C.; GAMET-PAYRASTRE, L. Dietary exposure to a low dose of pesticides alone or as a mixture: The biological metabolic fingerprint and impact on hematopoiesis. **Toxicology**, v. 308, s/n, p. 74-87, 2013.

DINIS-OLIVEIRA, R. J.; DUARTE, J. A.; SÁNCHEZ-NAVARRO, A.; REMIÃO, F.; BASTOS, M. L.; CARVALHO, F. Paraquat poisonings mechanisms of lung toxicity, clinical features and treatment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. 1, p.13-71, 2008.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doll's toxicology: the basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 2001.

ELLENHORN, M. J. **Ellenhorn's Medical Toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.

FEBER, A.; CABRAL, R. Toxic epidemics caused by alimentary exposure to pesticides: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.8, n. 6, p.755-776, 1991.

FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. Characterization of P2Y₁-like receptor in cultured rat pineal glands. **European Journal of Pharmacology**, v. 415, n. 2-3, p.151-156, 2001.

FRANCIS, P. L.; LEONE, A. M.; YOUNG, I. M.; STOVELL, P.; SILMAN, R. E. Gas chromatographic-mass spectrometric assay for 6-hydroxymelatonin sulfate and 6-hydroxymelatonin glucuronide in urine. **Clinical Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 453-457, 1987.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 1, p. 1-16, 2011.

GARCIA-MAURIÑO, S.; GONZALEZ-HABA, M. G.; CALVO, J. R.; RAFII-EL-IDRISSI, M.; SANCHEZ-MARGALET, V.; GOBERNA, R.; GUERRRERO, J. M. Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN-gamma production by human circulating CD4⁺ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 2, p. 574-581, 1997.

GARCÍA-RUBIO, L.; MATAS, P.; MIGUEZ, M. Protective effect of melatonin on paraquatinduced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. **Human & Experimental Toxicology**, v. 24, n. 9, p. 475-480, 2005.

GONÇALVES, G. M. S.; GURGEL, I. G. D.; COSTA, A. M.; ALMEIDA, L. R.; LIMA, T. F. P.; SILVA, E. Uso de agrotóxicos e a relação com a saúde na etnia Xukuru do Ororubá, Pernambuco, Brasil. **Saúde e Sociedade**, v. 21, n. 4, p. 1001-1012, 2012.

GRAY, D. L.; WARSHAWSKY, D.; XUE, W.; NINES, R.; WANG, Y.; YAO, R.; STONER, G. D. The effects of a binary mixture of benzo(a)pyrene and 7H-dibenzo(c,g)carbazole on lung tumors and K-ras oncogene mutations in strain A/J mice. **Experimental Lung Research**, v. 27, n. 3, p. 245-253, 2001.

GRISOLIA, C. K. As interações químicas entre misturas de pesticidas e seus potenciais de mutagenicidade. **Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 6, s/n, p. 33-42, 1996.

GUYTON, K. Z.; LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; GHISSASSI, F.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; SCOCCIANI, C.; MATTOCK, H.; STRAIF, K. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet Oncology**, v. 17, s/n, p.1-2, 2015.

HALDAR, C.; YADAV, R. Melatonin, gestation and fetal development. **JER**. v. 1. s/n, p. 1-12, 2006.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S. R.; CARDINALI, D. P. Melatonin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 3, p.313-316, 2006.

HIRATA, F.; HAYAISHI, O.; TOKUYAMA, T.; SENO, S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 4, p. 1311-1313, 1974.

HONORÉ, P.; HANTSON, P. H.; FAUVILLE, J. P. H.; PEETERS, A.; MAHIEU, P. Paraquat poisoning: State of the Art. **Acta Clinica Belgica**, v. 49, n. 5, p. 220-228, 1994.

HORSTMAN, J. A.; WRONA, M. Z.; DRYHURST, G. Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. **Bioorganic Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 371-382, 2002.

HOTCHKISS, A.; PARKS-SALDUTTI, L.; OSTBY, J.; LAMBRIGHT, C.; FURR, J.; VANDENBERGH, J.; GRAY JR, L. E. A mixture of the "antiandrogens" linuron and betyl benzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1852-1861, 2004

HOUZE, P.; BAUD, F. J.; MOUY, R.; BISMUTH, C.; BOURDON, R.; SCHERRMANN, J. M. Toxicokinetics of paraquat in humans. **Human & Experimental Toxicology**, v. 9, n. 1, p. 5-12, 1990.

HOWDESHELL, K. L.; FURR, J.; LAMBRIGHT, C. R.; RIDER, C. V.; WILSON, V. S.; GRAY JR, L. E. Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development: altered fetal steroid hormones and genes. **Toxicological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 190-202, 2007.

IBGE. **Indicadores de desenvolvimento sustentável**. Estudos e Pesquisa - Informação Geográfica, n. 7, Rio de Janeiro, 2010.

IBGE/SIDRA. Brasil, série histórica de área plantada; série histórica de produção agrícola; safras 1998 a 2011. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric> ou <www.mapa.gov.br>. Acessado em: 13 mar 2015.

NEUMEISTER, L.; ISENRING, R. **Paraquat unacceptable health risk for users**. 3 ed. London: Pesticide Action Network, 2011. 67 p.

KONAKCHIEV, R.; KYURKCHIEV, S.; KEHAYOV, I.; TAUSHANOVA, P.; KANCHEV, L. Selective effect of methoxyndoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated lymphoid cells. **The Journal of Neuroimmunology**, v. 63, n. 2, p. 125-132, 1995.

KOOP, C.; VOGEL, E.; RETTORI, M. C.; DELAGRANGE, P.; MISSLIN, R. Anxiolyticlike properties of melatonin receptor agonists in mice: involvement of MT1

and/or MT2 receptors in the regulation of emotional responsiveness.

Neupharmacology, v. 39, n. 10, p.1865-1871, 2000.

KORTENKAMP, A. Low dose mixture effects of endocrine disrupters: implications for risk assessment and epidemiology. **International Journal of Andrology**, v. 31, n. 2, p. 233-240, 2008.

KUNZ, D.; SCHMITZ, S.; MAHLBERG, R.; MOHR, A.; STÖTER, C.; WOLF, K-J.; HERMANN, W. M. A new concept for melatonin deficit: on pineal calcification and melatonin excretion. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 6, p. 765-772, 1999.

KVETNOY, I. M.; SANDVIK, A. K.; WALDUM, H. L. The diffuse neuroendocrine system and extrapineal melatonin. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 1-3, 1997.

LAETZ, C. A.; BALDWIN, D. H.; COLLIER, T. K.; HEBERT V.; STARK, J. D.; SCHOLZ, N. L. The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered pacific salmon. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 3, p. 348-353, 2009.

LANE, E. A.; MOSS, H. B. Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 61, n. 6, p. 1214-1216, 1985.

LEE, W. J.; HOPPIN, J. A.; BLAIR, A.; LUBIN, J. H.; DOSEMECI, M.; SANDLER, D. P.; ALAVANJA, M. C. R. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to Alachlor in the Agricultural Health Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 159, n. 4, p. 373-80, 2004.

LERNER, A. B.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T. H.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587, 1958.

LOPEZ-GONZALEZ, M. A.; CALVO, J. R.; SEGURA, J. J.; GUERRERO, J. M. Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. **Biotechnology Therapeutics**, v. 4, n. 3-4, p. 253-262, 1993.

MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Front Neuroendocrinology**, v. 25, n. 3-4, p. 177-95, 2004.

MAGALHÃES, P. C.; SILVA, J. B.; DURÃES, F. O. M.; KARAM, D.; RIBEIRO, L. S. Efeito de doses reduzidas de glyphosate e paraquat simulando deriva na cultura do milho. **Planta Daninha**, v.19, n. 2, p. 247-253, 2001.

MANCHESTER, L. C.; POEGGELER, B.; ALVARES, F. L.; OGDEN, G. B.; REITER, R. J. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system. **Cellular & Molecular Biology Research**, v. 41, n. 5, p. 391-395, 1995.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BOULBEN, S.; HUREAU, D.; DURAND, G.; BELLÉ, R. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chemicals Research Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 326-331, 2002.

MARONI, M.; FAIT, A.; COLOSIO, C. Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides. **Toxicology Letters**, v. 107, n. 1-3, p. 145-153, 1999.

MARONI, M.; FANETTI, A. C.; METRUCCIO, F. Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. **La Medicina del Lavoro**, v. 97, n. 2, p. 430-437, 2006.

MARTINS, T. Herbicida Paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 175-186, 2013.

MASCARENHA, T. K. S. F.; PESSOA, Y. S. R. Q. Aspectos que potencializam a contaminação do trabalhador rural com agrotóxicos: uma revisão integrativa. **Trabalho & Educação**, v. 22, n. 2, p.87-103, 2013.

MATTOS, M.; OLIVEIRA, J.; HAJI, F.; LIMA, M.; COSTA, N. Avaliação de estratégias com agroquímicos no controle de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Hemiptera: Aleyrodidae) em tomate. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, s/n, p. 131-144, 2002.

MAURIZ, J. L.; COLLADO, P. S.; VENEROSO, C.; REITER, R. J.; GONZÁLES-GALLEGO, J.J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 1, p. 1-14, 2013.

MAYO, J. C.; SAINZA, R. M.; TAN, D.; HARDELANDD, R.; LEON, J.; RODRIGUEZA, C.; REITER, R. J. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages, **Journal of Neuroimmunology**, v. 165, n. 1-2, p. 139-149, 2005.

McCARTY, L.S.; BORGERT, C. J. Review of the toxicity of chemical mixtures: theory, policy, and regulatory practice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 119-143, 2006.

MCCORMACK, A. L.; THIRUCHELVAM, M.; MANNING-BOG, A. B.; THIFFAULT, C.; LANGSTON, J. W.; CORY-SLECHTA, D. A.; DI MONTE, D. A. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicid paraquat. **Neurobiology Disease**, v. 10, n. 2, p. 119-127, 2002.

MELCHIORRI, D.; ORTIZ, G. G.; REITER, R. J.; SEWERYNEK, E.; DANIELS W. M. U.; PABLOS, M. I.; NISTICO, G. Melatonin reduces paraquat-induced genotoxicity in mice. **Toxicology Letters**, v. 95, n. 1, p. 103-108, 1998.

- MELCHIORRI, D.; REITER, R. J.; ATTIA, A. M.; HARA, M.; BURGOS, A.; NISTICO, G. Potent protective effect of melatonin on *in vitro* paraquat-induced oxidative damage en rats. **Life Sciences**, v. 56, n. 2, p. 83-89, 1995.
- MELCHIORRI, D.; REITER, R. J.; SEWERYNEK, E.; HARA, M.; CHEN, L.; NISTICO, G. Paraquat toxicity and oxidative damage reduction by melatonin. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, n. 8, p. 1095-1099, 1996.
- MERHI, M.; DEMUR, C.; RACAUD-SULTANB, C.; BERTRANDB, J.; CANLET, C.; BLAS, F.; ESTRADA, Y.; GAMET-PAYRASTREA, L. Gender-linked haematopoietic and metabolic disturbances induced by a pesticide mixture administered at low dose to mice. **Toxicology**, v. 267, n. 1-3, p. 80-90, 2010.
- MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SÉRALINI, G. E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology**, v. 313, n. 2-3, p. 122-128, 2013.
- MEYER, A.; CHRISMAN, J.; MOREIRA, J. C.; KOIFMAN, S. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research**, v. 93, n. 3, p. 264-271, 2003.
- MOREIRA, M. S.; MELO, M. S. C.; CARVALHO, S. J. P.; NICOLAI, M.; CRHISTOFFOLETI, P. Herbicidas alternativos para controle de biótipos de *Conyza bonariensis* C. *canadensis* resistentes ao glyphosate. **Planta daninha**, v. 28, n. 1, p. 167-175, 2010.
- MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, 1119 mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 157-177, 2013.
- MOTA, L. H. C. M.; MORAES JÚNIOR, F. J.; SOUZA, I. O. T.; CARVALHO, Y. N. T.; CASTELO-BRANCO, M. A.; SOUZA, J. A. T. Melatonina e desenvolvimento embrionário. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n.4, p. 220-224, 2014.
- MUANGPHRA, P.; KWANKUA, W.; GOONERATNE, R. Genotoxic effects of glyphosate or paraquat on earthworm coelomocytes. **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 6, p. 612-620, 2012.
- NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; TAKAYAMA, H.; KATO, H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 4, p. 1012-1016, 2003.
- NASH, R. G. Phytotoxic pesticide interactions in soil. **Agronomy Journal**, v. 59, n. 3, p. 227-230, 1967.
- NEEDHAM, L. L. Assessing exposure to organophosphorus pesticides by biomonitoring in epidemiologic studies of birth outcomes. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 4, p. 494-498, 2005.

OGATA, T.; MANABE, S. Correlation between lipid peroxidation and morphological manifestation of paraquat-induced lung injury in rats. **Archives of Toxicology**, v. 64, n. 1, p. 7-13, 1990.

OPAS/OMS. **Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 1996.

ORTIZ, G. G.; REITER, R. J.; ZÚÑIGA, G.; MELCHIORRI, D.; SEWERYNEK, E.; PABLOS, M. I.; OH, C. S.; GARCÍA, J. J.; BITZER-QUINTERO, O. K. Genotoxicity of paraquat: micronuclei induced in bone marrow and peripheral blood are inhibited by melatonin. **Mutation Research**, v. 464, n. 2, p. 239-245, 2000.

PADHI, B. K.; PELLETIER, G.; WILLIAMS, A.; BERNDT-WEIS, L.; YAUK, C.; BOWERS, W. J.; CHU, I. Gene expression profiling in rat cerebellum following in utero and lactational exposure to mixtures of methylmercury, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 2, p. 93-103, 2008.

PAREDES, S. D.; REITER, R. J. Melatonin: Helping cells cope with oxidative disaster. **Cell Membranes and Free Radical Research**, v. 2, n. 3, p. 99-111, 2010.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p. 1115-1122, 2005.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; LUZ, C. Os impactos dos agrotóxicos sobre a saúde e o ambiente. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 4, 2007.

PORTO, M. F.; SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 17-50, 2012.

DE LA PUERTA C.; CARRASCOSA-SALMORAL, M. P.; GARCÍA-LUNA, P. P.; LARDONE, P. J.; HERRERA, J. L.; FERNÁNDEZ-MONTESINOS, R.; GUERRERO J. M.; POZO, D. Melatonin is a phytochemical in olive oil. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 609-612, 2007.

REITER, R. J. Melatonin and human reproduction. **Journal of Pineal Research**, v. 38, n. 12, p. 217-222, 2005.

REITER, R. J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Progress in Neurobiology**, v.56, n. 3, p. 359-384, 1998.

REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Reviews**, v.12, n. 2, p.151-180, 1991.

REITER, R. J.; CARNEIRO, R. C.; OH, C. S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. **Hormone and Metabolic Research**, v. 29, n. 8, p. 363-372, 1997.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; KORKMAZ, A.; ROSALES-CORRAL, S. A. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 2, p. 293-307, 2014.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; QI, W.; MANCHESTER, L. C.; KARBOWNIK, M.; CALVO, J. R. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress *in vivo*. **Biological Signals and Receptors**, v.9, n. 3-4, p.160-171, 2000.

REITER, R. J.; TAN, D.; GALANO, A. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. **Frontiers in Physiology**, v. 5, s/n, p. 1-4, 2014a.

REITER, R. J.; TAN, D.; TAMURA, H.; CRUZ, M. H. C.; FUENTES-BROTO, L. Clinical relevance of melatonin in ovarian and placental physiology: a review. **Gynecological Endocrinology**, v. 30, n. 2, p. 83-89, 2014b.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; PAREDES, S.D.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M. Melatonin and reproduction revisited. **Biology Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 445-456, 2009.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; EBISAWA, T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. **Neuron**, v. 13, n. 5, p. 1177-1185, 1994.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends Pharmacology Science**, v.17, n. 3, p. 100-102, 1996.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G. Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p 715-720, 2005.

RIDER, C. V.; FURR, J. R.; WILSON, V. S.; GRAY JR, L. E. Cumulative effects of in utero administration of mixtures of reproductive toxicants that disrupt common target tissues via diverse mechanisms of toxicity. **International Journal of Andrology**. v. 33, n. 2, p. 443-462, 2010.

ROCHA, R. M. P.; LIMA, L. F.; ALVES, A. M. C. V.; CELESTINO, J. J. H.; MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; BERNUCI, M. P.; LOPES, C. A. P.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between melatonin and follicle-stimulating hormone promotes in vitro development of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 44, n. 1, p. 1-9, 2013.

ROCHA, R. M. P.; MATOS, M. H. T.; LIMA, L. F.; SARAIVA, M. V. A.; ALVES, A. M. C. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 2, p. 147-157, 2011.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; BERNARDI, M. M.; FURTADO, P. V.; OLIVEIRA, C. A. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate

alters testosterone levels and testicular morphology. **Reproductive Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 309-317, 2010.

ROUIMI, P.; ZUCCHINI-PASCAL, N.; DUPONT, G.; RAZPOTNIK, A.; FOUCHÉ, E.; SOUSA, G.; RAHMANI, R. Impacts of low doses of pesticide mixtures on liver cell defence systems. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 5, p. 718-726, 2012.

ROUSSEAU, A.; PETREN, S.; PLANNTHIN, J.; EKLUNDH, T.; NORDIN, C. Serum and cerebrospinal fluid concentrations of melatonin: a pilot study in healthy male volunteers. **The Journal of Neural Transmission**, v. 106, n. 9-10, p. 883-888, 1999.

ROUSTAN, A.; AYE, M.; DE MEO, M.; DI GIORGIO, C. Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation. **Chemosphere**, v. 108, s/n, p. 93-100, 2014.

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.

SANCHEZ-HIDALGO, M.; DE LA LASTRA, C. A.; CARRASCOSA-SALMORAL, M. P.; NARANJO, M. C.; GOMEZ-CORVERA, A.; CABALLERO, B.; GUERRERO, J. M. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. **Experimental Gerontology**, v. 44, n. 5, p. 328-334, 2009.

SANIN, L. H.; CARRASQUILLA, G.; SOLOMON, K. R.; COLE, D. C.; MARSHALL, E. J. P. Regional differences in time to pregnancy among fertile women from five Colombian regions with different uses of glyphosate. **Journal Toxicology Environmental Health: Part A**, v. 72, n. 15-16, p. 949-960, 2009.

SATOH, M.; NAGANUMA, A.; IMURA, N. Effect of preinduction of metallothionein on paraquat toxicity in mice. **Archives of Toxicology**, v. 66, n. 2, p. 145-148, 1992.

SCHMITT, G. C.; PANIZ, C.; GROTTTO, D.; VALENTINI, J.; SCHOTT, K. L.; POMBLUM, V. J.; GARCIA, S. C. Aspectos gerais e diagnóstico clinicolaboratorial da intoxicação por paraquat. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n. 4, p. 235-243, 2006.

SENEFF, S.; SWANSON, N.; LI, C. Aluminum and glyphosate can synergistically induce pineal gland pathology: connection to gut dysbiosis and neurological disease. **Agricultural Sciences**, v. 6, n. 1, p. 42-70, 2015.

SERRA, A.; DOMINGOS, F.; M. M. PRATA. Intoxicação por paraquat. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, n. 1, p. 25-32, 2003.

SHARMA, S.; SARKAR, J.; HALDAR, C.; SINHA, S. Melatonin Reverses Fas, E2F-1 and Endoplasmic Reticulum Stress Mediated Apoptosis and Dysregulation of Autophagy Induced by the Herbicide Atrazine in Murine Splenocytes. **PLOS One**, v. 9, n. 9, p. 1-11, 2014.

SHIDA, C. S.; CASTRUCCI, A. M. L.; LAMY-FREUND, M. T. High melatonin solubility in aqueous medium. **Journal of Pineal Research**, v.16, n. 4, p. 198-201, 1994.

SHIMIZU, K. Paraquat induces long – lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of fruly moving rats. **Brain Research**, v. 976, n. 2, p. 243-252, 2003.

SILVA, J. B.; RODRIGUES, M. A. T.; BEGLIOMINI, E. Indicações para o controle de plantas daninhas na cultura do milho em pós-emergência com o herbicida Sanson 40 SC e sua mistura 1+2 com atrazine. **O Ruralista**, v.35, n. 440, p. 9-11, 1998.

SILVA, S. O.; RODRIGUES, M. R.; XIMENES, V. F.; BUENO-DA-SILVA, A. E.; AMARANTE-MENDES, G. P.; CAMPA, A. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. **Journal of Neuroimmunology**, v. 156, n. 1-2, p. 146-152, 2004.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 325-395, 2003.

SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. **Dados de produção e consumo de agrotóxicos**. Disponível em: <www.sindag.com.br>. Acessado em: 20 dez. 2014.

SINITOX. **Casos de Intoxicação por Agrotóxicos em Geral por Unidade Federada, Segundo Circunstância Registrado em 2009**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/tab01_agro_geral_2009.pdf> Acessado em: 2 set. 2012.

SKINNER, D. C.; MALPAUX, B. High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood in recirculating through the choroids plexus. **Endocrinology**, v. 140, n. 10, p. 4399-4405, 1999.

SLOMINSKI, R. M.; REITER, R. J.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCHD, N.; OSTROMA, R. S.; SLOMINSKI, A. T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 152-166, 2012.

SMITH, E. A.; OEHME, F. W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Veterinary Human Toxicology**, v. 34, n. 6, p. 531-543, 1992.

SRIBANDITMONGKOL, P.; JUTAVIJITTUM, P.; PONGRAVEEVONGSA, P.; WUNNAPUK, K.; DURONGKADECH, P. Pathological and toxicological findings in glyphosate-surfactant herbicide fatality; a case report. **American Journal of Forensic Medicine & Pathology**, v. 33, n. 3, p. 234-237, 2012.

STEFULJ, J.; HORTNER, M.; GHOSH, M.; SCHAUENSTEIN, K.; RINNER, I.; WOLFLER, A.; SEMMLER, J.; LIEBMANN, P. M. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. **Journal of Pineal Research**, v. 30, n. 4, p. 243-247, 2001.

SURGAN, M. H. Toxicity tests: "inert" and active ingredients. **Environmental Health Perspectives**. v. 113, n. 10, p. 657-658, 2005.

TALLARIDA, R. J. Drug synergism: its detection and applications. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, n. 3, p. 865-872, 2001.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; TAKIGUCHI, S.; KASHIDA, S.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N.; KATO, H. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. **Journal of Pineal Research**, v. 25, n. 3, p. 135-141, 1998.

TAN, D. X.; HARDELAND, R.; MANCHESTER, L. C.; PAREDES, S. D.; KORKMAZ, A.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.; FUENTES-BROTO, L.; REITER, R. J. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 85, n. 3, p. 607-23, 2010.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J.; QI, W.; HANES, M. A.; FARLEY, N. J. High physiological levels of melatonin in bile of mammals. **Life Sciences**, v. 65, n. 23, p. 2523-2529, 1999.

TAN, D.; MANCHESTER, L. C.; TERRON, M. P.; FLORE, J.; REITER, R. J. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **Journal of Pineal Research**, v. 42, n. 1, p. 28-42, 2007.

TOMINACK, R. L.; YANG, G. Y.; TSAI, W. J.; CHUNG, H. M.; DENG, J. F. Taiwan National Poison Center survey of glyphosatesurfactant herbicide ingestions. **Journal of Toxicology. Clinical Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 91-109, 1991.

TREZZI, M. M.; FELIPPI, C. L.; NUNES, A. L.; CARNIELETO, C. E.; FERREIRA, A. R. J. Eficácia de controle de plantas daninhas e toxicidade ao milho da mistura de foramsulfuron e Iodosulfuron isoladamente ou em associação com atrazine e/ou clorpirifós. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 653-659, 2005.

VASILUK, L.; PINTO, L. J.; MOORE, M. M. Oral bioavailability of glyphosate: studies using two intestinal lines. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 153-60, 2005.

VILJOEN, M.; STEYN, M. E.; VAN RENSBURG, B. W.; REINACH, S. G. Melatonin in chronic renal failure. **Nephron**, v. 60, n. 2, p. 138-143, 1992.

VOULTSIOS, A.; KENNAWAY, D. J.; DAWSON, D. Salivary melatonin as a circadian phase marker: validation and comparison to plasma melatonin. **Journal of Biological Rhythms**, v. 12, n. 5, p. 457-66, 1997.

WALSH, L. P.; MCCORMICK, C.; MARTIN, C.; STOCCO, D. M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 8, p. 769-776, 2000.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; TAN, D.; REITER, R. J.; LIU, G. Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 3, p. 267-274, 2013.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification**. Geneva, 2005. 56 p. Disponível em: http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_rev_3.pdf. Acessado em: 15 set. 2015.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental health criteria 159; glyphosate**. Geneva, 1994. p. 177.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WITT-ENDERLY, P. A.; BENNETT, J.; JARZYNKA, M. J.; FIRESTINE, S.; MELAN, M. A. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanism. **Life Sciences**, v.72, n. 20, p. 2183-2198, 2003.

WOO, M. M. M.; TA, C. J.; KANG, S. K.; PARIMAL, S.; NATHWANI, S. F. P.; PETER, C. K. L. Direct action of melatonin in human granulosa luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, n. 10, p. 4789–4797, 2001.

XARAU, S. N.; LAITA, A. D. Intoxicación por paraquat: um puzzle al que le faltan piezas. **Medicina Clínica**, v.115, n. 14, p. 546-548, 2000.

XU, J.; SUN, S.; WEI, W.; FU, J.; QI, W.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; REITER, R.J. Melatonin reduces mortality and oxidatively mediated hepatic and renal damage due to diquat treatment. **Journal Pineal Research**, v. 42, n. 2, p. 166-171, 2007.

YIE, S.; NILES, L.; YOUNGLAI, E. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 80, n. 5, p. 1747-1749, 1995.

YING, S. W.; NILES, L. P.; CROCKER, C. Human malignant melanoma cells express high affinity receptors for melatonin: Antiproliferative effects of melatonin and 6-chloromelatonin. **European Journal of Pharmacology**, v. 246, n. 2, p. 89-96,1993.

YU, C. X.; ZHU, C. B.; XU, S. F.; CAO, X. D.; WU, G. C. Selective MT2 melatonin receptor antagonist blocks melatonin-induced antinociception in rats. **Neuroscience Letters**, v. 282, n. 3, p. 161-164, 2000.

ZHANG, L.; WEI, W.; XU, J. MIN, F.; WANG, L.; WANG, X.; CAO, S.; TAN, D.; QI, W.; REITER, R. J. Inhibitory effect of melatonin on diquat-induced lipid peroxidation in vivo as assessed by the measurement of F2-isoprostanes. **Journal of Pineal Research**, v. 40, n. 4, p. 326-331, 2006.

ZLOTOS, D. P.; JOCKERS, R.; CECON, E.; RIVARA, S.; WITT-ENDERBY, P. A. MT1 and MT2 melatonin receptors: ligands, models, oligomers, and therapeutic potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 3161-3185, 2014.

CAPÍTULO II

Efeito da administração da melatonina em ratas no terço inicial da gestação expostas a doses subletais de herbicidas

Herbicidas/melatonina na gestação

Lécio L. Almeida¹, Álvaro A. C. Teixeira², Natallyanea S. Bezerra³, Anísio F. Soares², Valéria W. Teixeira^{2*}

¹*Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri – Crato-Ceará, Brasil.*

²*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, Brasil.*

³*Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, Brasil.*

*Autor para correspondência. UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos- Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

Endereço de e-mail: valeria@dmfa.ufrpe.br (Valéria W. Teixeira)

RESUMO

A exposição aos herbicidas Paraquat e Glifosato-Roundup[®] pode causar lesões celulares por elevar os níveis de estresse oxidativo nos diferentes sistemas biológicos, inclusive no sistema reprodutor. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da intoxicação aguda materna e embrionária por herbicidas, e sua prevenção pela melatonina. Assim, ratas albinas com 90 dias de idade pesando 200 ± 20 g foram expostas a doses subletais dos herbicidas Paraquat (50 mg/kg de peso corporal) e Glifosato-Roundup[®] (500 mg/kg de peso corporal) por via oral e tratadas com melatonina (10 mg/kg de peso corporal) por via intraperitoneal do primeiro até o sétimo dia de prenhez. Em seguida, as ratas foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg) por via intramuscular e eutanasiadas com tiopental (40 mg/kg) seguida por laparotomia. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética, conforme nº da licença (063/2013). Foram avaliados peso corporal e ovariano, contagem do número de sítios de implantação, de corpos lúteos, das perdas pré-implantação, taxa de implantação, o número de células natural killer uterinas, bem como histopatologia dos sítios de implantação e morfometria dos epitélios superficial e glandular do endométrio. Os resultados a seguir foram observados após exposição aos herbicidas associados (grupo G4) e individuais (grupos G2 e G3). Redução no peso corporal (grupos G2 e G4), bem como no peso ovariano, no número de sítios implantados, na taxa de implantação, no número total de corpos lúteos e aumento do percentual de perdas pré-implantação (grupos G2, G3 e G4). A análise histopatológica dos sítios de implantação dos animais do grupo G4 permitiu identificar desorganização do blastocisto e degeneração do citotrofoblasto localizado dentro da cavidade blastocística. Na histoquímica dos sítios de implantação observou-se redução do número de células natural killer uterinas (NKu) (grupos G2, G3 e G4). Enquanto, a morfometria revelou redução na altura dos epitélios superficial e glandular, bem como no diâmetro das glândulas endometriais (grupos G2, G3 e

G4). Entretanto, os tratamentos com melatonina promoveram prevenção de alterações do perfil reprodutivo avaliado, bem como de lesões nos sítios de implantação e da redução do número de células NKu levando a resultados semelhantes aos animais do grupo controle. Assim, o presente estudo mostrou que o tratamento com melatonina atuou como um agente protetor contra a toxicidade materno/embrionária induzida experimentalmente pelos herbicidas Glifosato-Roundup® e Paraquat favorecendo a prevenção de alterações nos parâmetros reprodutivos, além de promover a manutenção da interação materno-embrionária durante a implantação, invasão trofoblástica, o que representa uma nova perspectiva no campo de estudos da imunologia reprodutiva.

Palavras-chave: glifosato; paraquat; ratas prenhes; implantação embrionária; melatonina; histomorfometria.

Introdução

Exposição a herbicidas representa um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, especialmente naqueles com economias baseadas no agronegócio. A utilização destes produtos tem crescido rapidamente em países emergentes, mas na maioria dos casos não existe controle eficaz sobre sua venda e o uso. Além disso, a utilização incorreta e descontínua dos equipamentos de proteção individual, as limitações no monitoramento da exposição ocupacional e as falhas no diagnóstico e tratamento dos casos de intoxicação agravam ainda mais o problema [1, 2].

Entre algumas das consequências dessa exposição observadas em animais e no homem estão o desequilíbrio endócrino associado ao aparecimento de cânceres, infertilidade, má-formações congênitas no trato genital e modificações na qualidade do sêmen [3], injúrias no

desenvolvimento embrionário, na maturação de sistemas fisiológicos, deficiências anatômicas, entre outras [4, 5]. Assim, alterações durante períodos sensíveis ou críticos de desenvolvimento como o período embrionário podem gerar alterações importantes, as quais podem se manifestar em fases tardias do ciclo de vida ou mesmo serem translocadas às gerações posteriores [6]. Além disso, herbicidas como o Paraquat (PQ) e Glifosato-Roundup® podem promover disfunções na glândula pineal e podem reduzir a produção de melatonina (MLT) [7, 8] e assim, comprometer o processo de implantação embrionária, bem como interferir na gestação [9].

O maior interesse no tratamento das intoxicações por herbicidas, tem se concentrado em medidas que impeçam ou minimizem as lesões celulares provocadas nos diversos sistemas biológicos [10, 11, 12] inclusive no sistema reprodutor durante o desenvolvimento embrionário [13]. Nesse sentido, tem-se enfatizado a utilização de várias substâncias, entre elas as com ação moduladora da reprodução em mamíferos e antioxidante, como a MLT [14, 15, 16].

A literatura relata que a MLT tem um efeito benéfico sobre os processos relacionados com o desenvolvimento de oócitos, ovulação e no desenvolvimento embrionário inicial [17, 18] na morfologia endometrial e manutenção do processo de implantação embrionária [19]. No entanto, não há relatos na literatura sobre os efeitos da MLT em ratas submetidas a intoxicação aguda por doses subletais dos herbicidas (PQ) e Glifosato-Roundup® associados, bem como seu efeito protetor sobre o processo de implantação embrionária. Assim, testou-se a hipótese de que a MLT pode atuar como agente protetor na interface materno/embrionária no terço inicial da gestação prevenindo alterações importantes em parâmetros gestacionais. Dessa forma, analisou-se o ganho de peso das fêmeas, peso dos ovários, número de sítios de implantação, de corpos lúteos, taxa de implantação e perdas pré-implantação, além do número de células NKu, possíveis injúrias celulares no processo de implantação embrionária e morfometria dos epitélios superficial e glandular do endométrio.

Material e Métodos

Reagentes e produtos químicos

Formulações comerciais de glifosato (Glifosato-Roundup[®]) constituído por 360 g/L de glifosato (N-fosfometilglicina) e 16% (w/v) polioxietilenoamina (surfactante); Gramoxone[®] com 200 g/L de Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio); Melatonina da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Dopalen[®] (hidrocloridrato de ketamina); Rompum[®] (xilazina) e Thionembutal[®] (tiopental) foram utilizados durante os experimentos.

Aspectos éticos

Todos os procedimentos envolvendo os animais seguiram as diretrizes do OECD - *Guideline for the Testing of Chemicals* [20], bem como aprovados pelo comitê de ética no uso de animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob o número da licença 063/2013.

Animais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) e no Centro de apoio à pesquisa (Cenapesq) ambos da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Dessa forma, foram utilizadas 35 ratas da linhagem Wistar com 90 dias de idade, pesando 200 ± 20 g provenientes do biotério do DMFA. Todos os animais foram alojados em ambiente controlado ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, humidade $60\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 h claro/escuro) com alimentação e água “*ad libitum*”. Após 10 dias de aclimatação, as fêmeas foram submetidas a exames colpocitológicos para determinação da

regularidade do ciclo estral. Assim, aquelas que apresentaram 3 ciclos estrais regulares foram separadas aleatoriamente e acasaladas para a formação de sete grupos experimentais ($n = 5$ cada). Em seguida foram submetidas aos tratamentos e monitoradas diariamente quanto ao peso corporal e sobrevivência.

Sistema de acasalamento e certificação de cópula

O sistema de acasalamento adotado foi o poligâmico permanente, com duas fêmeas e um macho por gaiola, diariamente, com início às 18 h. Quanto a certificação da cópula foi realizada por meio de exames colpocitológicos, diariamente, com início às 6 h, onde por meio da verificação da presença de espermatozoides no fluido vaginal foi considerado o primeiro dia gestacional. Para a coleta e esfregaço do fluido vaginal, foram utilizados *swabs* estéreis umedecidos em solução salina a 0,9%. Imediatamente após a coleta, cada *swab* foi pressionado sobre a superfície de uma lâmina, onde foram mergulhadas em solução álcool-éter (1:1). A leitura das lâminas foi realizada após coloração pelo método Shorr-Harris [21].

Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram: G1 controle (tratamento com solução salina a 0,9% de NaCl por via intraperitoneal), G2 exposição a dose de 50 mg/kg de peso corporal de PQ, G3 exposição a dose de 500 mg/kg de peso corporal de Glifosato-Roundup[®] por gavagem, G4 exposição associada de PQ e Glifosato-Roundup[®], G5 exposição ao PQ e tratamento com 10 mg/kg de peso corporal de MLT, sendo a via de administração de MLT intraperitoneal, G6 exposição ao Glifosato-Roundup[®] e tratamento com MLT, G7 exposição associada de PQ e Glifosato-Roundup[®] e tratamento com MLT. Após exposição aos herbicidas e tratamentos com

MLT, as ratas, ao sétimo dia de prenhez, entre 9 e 10 h da manhã, foram anestesiadas com hidrocloridrato de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg) por via intramuscular e eutanasiadas com tiopental (40 mg/kg) seguida por laparotomia para remoção dos cornos uterinos, contendo os sítios de implantação, e dos ovários [22, 23]. Logo após foram realizadas análise do ganho de peso das fêmeas, peso dos ovários, número de sítios de implantação, de corpos lúteos, taxa de implantação e perdas pré-implantação, além do número de células NKu, possíveis injúrias celulares no processo de implantação embrionária e morfometria dos epitélios superficial e glandular do endométrio.

Tratamento com melatonina

A MLT (Sigma-Aldrich) em 0,5 mL de volume final foi administrada por via intraperitoneal sempre no início da noite (18 h) na dose de 10 mg/kg de peso corporal do animal do primeiro ao sétimo dia de prenhez. A diluição foi diária por sete dias consecutivos em solução de etanol/salina a 4% [10]. A dose foi escolhida segundo estudos *in vivo*, onde doses utilizadas para o tratamento de intoxicações por herbicidas variavam entre 5 mg/kg até 25 kg/mg, sendo a dose de 10 mg/kg a mais utilizadas.

Exposição aos herbicidas

Para a exposição, os herbicidas foram diluídos em solução salina a 0,9%, sendo o PQ na dose de 50 mg/kg de peso corporal do animal de acordo com a DL₅₀ 100-150 mg/kg [24] e 500 mg/kg de Glifosato-Roundup[®] definida a partir da NOEL-dose de 1000 mg/kg de peso corporal do animal [25] estabelecida para o glifosato em ensaios de teratogênese em ratos [26].

Os herbicidas foram administrados por gavagem no intervalo entre 9 e 10 h da manhã do primeiro ao sétimo dia de prenhez após pesagem das fêmeas.

Análise histopatológica e histoquímica dos sítios de implantação

Após laparotomia e remoção dos cornos uterinos, os sítios de implantação foram quantificados [27], bem como os corpos lúteos nos ovários com o auxílio de estereomicroscópio Olympus® modelo SZ40 e calculadas a taxa de implantação (número total de implantes/ número de corpos lúteos) x100 e as perdas pré-implantes (número de corpos lúteos – número de implantes / número de corpos lúteos) x 100 [28]. Logo após, os sítios de implantação foram mergulhados em formaldeído a 10% tamponado e fixados por 24 horas. Posteriormente à fixação, os tecidos foram lavados em solução tampão PBS, desidratados em uma série de concentração crescente de alcoóis (80, 90, 95 e 2x100%) e incluídos em glicol metacrilato historesina (Historesin Leica®). Os cortes de 4 µm foram obtidos em micrótomo Leica® modelo RM 2245 equipado com navalha de vidro, distendidos em água e colocados sobre lâminas, levados para secagem em estufa a 60°C por 1 minuto e submetidos às técnicas de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H.E.) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). As lâminas em duplicata/animal foram analisadas (10 campos aleatórios) em microscópio de luz, da marca Leica® modelo DM500 e fotografadas mediante o uso de câmera Leica® modelo EC3 acoplada ao microscópio para análise histopatológica. Para análise histoquímica, cinco imagens/grupo dos sítios de implantação corados com PAS foram transferidas para o software de análise de imagem (ImageJ 1.49t, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) para o armazenamento dos dados sobre a estimativa do número de células NKu.

Análise morfométrica

Para a análise morfométrica foram realizadas capturas de imagens (2 lâminas/animal/grupo) mediante o uso de câmera Leica® modelo EC3 acoplada ao microscópio, bem como análise dos parâmetros: altura dos epitélios luminal e glandular do endométrio e diâmetro de glândulas endometriais pelo software Leica® Application Suite (LAS) EZ. Para cada animal/grupo, foram feitas 10 medições / 5 campos dos parâmetros estudados.

Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisadas pelo software SAS® for Windows versão 9.0. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA - oneway), após teste para normalidade (Shapiro-Wilk). As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade.

Resultados

Aferição de ganho de peso das ratas prenhes

Ao final do período de exposição aos herbicidas e tratamento com MLT, as ratas prenhes de cada grupo foram pesadas. As médias obtidas foram analisadas estatisticamente e revelaram ganho de peso no grupo controle ($p < 0,001$), porém a exposição associada dos herbicidas ($p < 0,001$) e individual do PQ ($p < 0,01$) promoveram perda de peso quando comparadas aos do

controle. No entanto, o tratamento com MLT preveniu a perda de peso induzida pelo PQ e associação do PQ mais o Glifosato-Roundup[®] ($p < 0,5$) (Figura 1).

Análise do peso dos ovários, número de sítios de implantação e taxa de implantação

A exposição associada e individual dos herbicidas (PQ + Glifosato-Roundup[®]) promoveram redução no peso dos ovários e no número de sítios implantados quando comparados aos do controle (Tabela 1), porém o número de sítios implantados entre os grupos PQ e Glifosato-Roundup[®] não diferiram. O mesmo comportamento observado no número de sítio de implantação foi também evidenciado para a taxa de implantação (número total de implantes/ número de corpos lúteos) x100. Já entre os grupos tratados com MLT evidenciou-se que os pesos dos ovários foram semelhantes aos do grupo controle. Esse mesmo resultado foi observado para o número de sítios implantados e taxa de implantação (Tabela 1).

Número de corpos lúteos e perdas de pré-implantação

A avaliação dos ovários por meio de estereomicroscópio dos grupos experimentais revelou que a exposição individual e associada dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®] também levou a uma redução do número total de corpos lúteos, bem como aumento do percentual de perdas pré-implantação em relação ao controle (Tabela 1). Ao analisar os mesmos parâmetros observou-se que os valores entre os grupos expostos aos herbicidas Paraquat e Glifosato-Roundup[®] não diferiram. Verificou-se também que o tratamento com MLT promoveu prevenção da redução de corpos lúteos e do aumento do percentual de perdas pré-implantação quando comparados aos valores do grupo controle. (Tabela 1).

Análise histopatológica e histoquímica dos sítios de implantação

A avaliação de peça anatômica de cornos uterinos do grupo controle, bem como dos grupos expostos aos herbicidas e tratados com MLT revelaram sítios de implantação ao 7^a dia pós-coito, ovários e bexiga aparentemente bem preservados (Fig. 2A). Quanto a análise histopatológica dos sítios de implantação visão panorâmica (Fig. 2B) de ratas do grupo controle revelou a presença de blastocisto com citotrofoblasto, embrioblasto e cavidade blastocística preservadas, bem como processo de decidualização bem definido (Fig. 2C). Porém, nas amostras expostas aos herbicidas associados (grupo G4 com lesões mais acentuadas) observaram-se desorganização do blastocisto e degeneração do citotrofoblasto localizado dentro da cavidade blastocística (Fig. 2D). Nas amostras de ratas tratadas com MLT, os sítios de implantação apresentaram organização estrutural semelhante aos observados nas ratas do grupo controle (Fig. 2E) indicando possível ação protetora da MLT. Na histoquímica observou-se redução no número de células NKu dos sítios de implantação das ratas dos grupos expostos aos herbicidas individualmente e associados (Figs. 3B, 3C, 3D e 3H) quando comparadas aos do grupo controle (Figs. 3A e 3H), porém após o tratamento com MLT o número de células NKu foi semelhante ao controle (Figs. 3E, 3F e 3H), menos no grupo exposto aos herbicidas associados (Figs. 3G e 3H).

Análise morfométrica

A análise morfométrica redução na altura dos epitélios luminal e glandular, bem como no diâmetro das glândulas endometriais após exposição individual e associada dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®], porém o tratamento com MLT, promoveu prevenção da redução dos parâmetros estudados quando comparados aos do grupo controle (Tabela 2).

Discussão

No presente estudo observamos que a exposição aguda de doses subletais dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup® associados e o PQ individual promoveu perda de peso em ratas prenhes. Resultados semelhantes foram observados em ratos expostos aos herbicidas Atrazina e PQ [29, 35]. Assim, a perda peso é um forte indicativo de toxicidade sistêmica podendo levar à toxicidade materna com perdas embrionárias [31]. A toxicidade materna é uma das causas de alterações no desenvolvimento embrionário e pós-natal [30, 34], sendo diagnosticada particularmente pela perda de peso corporal [29], embora outras alterações como redução da locomoção, diarreia, piloereção, mortes e redução do consumo de água e alimento também sejam consideradas [32]. Verificou-se ainda, que a associação dos herbicidas reduziu de forma expressiva ($p < 0,001$) o peso corporal das ratas prenhes quando comparados entre os grupos expostos individualmente e ao controle, indicando um possível sinergismo entre os herbicidas. Neste contexto, o efeito sinérgico do PQ observado durante o período pré-natal [33] e do Glifosato-Roundup® entre o princípio ativo glifosato e seu adjuvante polioxietileno amina (POEA) [36, 55] explicariam os resultados do grupo associado. Além disso, os herbicidas promoveram redução no número de corpos lúteos, resultados semelhantes foram observados em ratas Wistar expostas ao herbicida PQ [37], no número de sítios de implantação, no peso dos ovários, menor taxa de implantação e maior percentual de perdas pré-implantação. Resultados semelhantes foram observados em camundongos expostos ao PQ [13]. Verificou-se ainda que a associação dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup® revelou ação sinérgica e os maiores valores nos parâmetros estudados. Resultados semelhantes envolvendo outras associações de herbicidas (*ácido diclorofenoxiacético*, dicamba e mecoprop) promoveram o mesmo comportamento durante a implantação embrionária [42]. No entanto, o tratamento com MLT evidenciou-se que os indicadores reprodutivos foram semelhantes aos do grupo controle.

Assim, a MLT tem sido reconhecida por suas ações benéficas nas gônadas. É sabido que a MLT produzidas nos ovários, auxilia na maturação folicular e na preservação da integridade do óvulo antes e no momento da ovulação, atuando como um importante agente na manutenção ideal da fisiologia reprodutiva [38].

A análise histopatológica dos sítios de implantação de ratas do grupo controle revelou a presença de blastocisto com citotrofoblasto, embrioblasto e cavidade blastocística preservadas, além de processo de decidualização bem definido. No entanto, a exposição aos herbicidas, em especial, a associação evidenciou-se desorganização do blastocisto e degeneração do citotrofoblasto localizado dentro da cavidade blastocística. Esse perfil de lesões pode ser atribuído à vulnerabilidade do blastocisto por concentrações baixas de agroquímicos, dos quais comprometem o processo de diferenciação do embrioblasto e citotrofoblasto, bem como intensifica o processo de apoptose [43]. Além disso, na análise histoquímica observou-se redução no número de células NKu dos sítios de implantação de ratas dos grupos associado e individual. Neste contexto, as células NKu participam da interação materno-embrionária durante a implantação, invasão trofoblástica, placentação e desenvolvimento fetal, o que representa uma nova perspectiva no campo de estudos da imunologia reprodutiva, além disso associar a resposta imune como uma causa de infertilidade [41]. Assim, o tratamento com MLT, promoveu prevenção de alterações estruturais nos sítios de implantação, bem como no número de células NKu quando comparado ao grupo controle. Neste contexto, a transformação do endométrio em decídua ocorre imediatamente após a implantação do blastocisto [39]. Assim, o número de células NKu aumentam no endométrio, particularmente na decídua basal durante a fase de implantação [56, 57, 58], mas também aparecem precocemente durante a fase secretória precoce, indicando um papel primário na implantação e estabelecimento da gravidez [58]. Assim, a MLT pode estar envolvida como agente antioxidante no processo de implantação

embrionária, na decidualização, bem como na remodelação da matriz extracelular uterino [40] o que explicaria os resultados do presente estudo.

A análise morfométrica dos epitélios luminal e glandular do endométrio revelou redução na altura dos epitélios e no diâmetro das glândulas endometriais, porém o tratamento com MLT, promoveu prevenção desses parâmetros com valores semelhantes aos do controle. Neste contexto, o crescimento e desenvolvimento embrionário dependem inicialmente do endométrio, especialmente, das secreções oriundas das glândulas endometriais que fornecem os primeiros nutrientes ao pré-embrião [44, 48]. Além disso, marcadores bioquímicos como as integrinas, mucinas, citocinas, fatores de crescimento, marcadores imunológicos endometriais, bem como a dinâmica dos complexos juncionais promovem a receptividade endometrial entre o sexto e o décimo dia de prenhez [45, 46]. É sabido que os herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®], além de atuarem como disruptores endócrinos [49, 50] produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) [12, 25, 51, 52], assim quando a produção é maior que a capacidade da célula em degradá-las, passamos a ter um quadro de estresse oxidativo. Nesta situação, pode-se verificar inativação enzimática, danos ao DNA, peroxidação lipídica e por fim, morte celular [47, 53] o que explicaria nossos resultados morfométricos. Quanto a MLT, o efeito protetor [54] provavelmente diminui os danos provocados por EROs oriundos dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®].

Conclui-se que o tratamento com MLT, durante o terço inicial da gestação, atua de forma eficiente contra a toxicidade reprodutiva e embrionária induzidas pelos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®], além de promover prevenção de alterações dos indicadores de fertilidade avaliados como prevenção da integridade morfológica do blastocisto, do ganho de peso corporal materno, do peso ovariano, no número de corpos lúteos, na viabilidade da implantação embrionária e manutenção das células NKu.

Referências

1. Forget G (1989) Pesticides: necessary but danferous poisons. IDRC Reports 18: 4-5.
2. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Indicadores de desenvolvimento Sustentável. Brasil 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids2012.pdf>>. Acesso em: 29 de out. de 2014.
3. Koifman S, Hatagima A (2003) Disruptores endócrinos no ambiente: efeitos biológicos potenciais. Rev Bras Mastologia 13: 9-11.
4. Dent MP (2007) Strengths and limitations of using repeat dose toxicity studies to predict effects on fertility. Regul Toxicol Pharm 48: 241-258. doi:10.1016/j.yrtph.2007.04.001.
5. Oliveira NP, Moi GP, Atanaka-Santos M, Silva AMC, Pignati WA (2014) Malformações congênitas em municípios de grande utilização de agrotóxicos em Mato Grosso, Brasil Ciênc Saúde Coletiva, 19: 4123-4130. doi.org/10.1590/1413-812320141910.08512014.
6. Reis Filho RW, Luvizotto-Santos R, Vieira EM (2007) Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos. J Braz Soc Ecotoxicol 2: 283-288.
7. Bartlett RM, Murali D, Nickles RJ, Barnhart TE, Holden JE, et al. (2011) Assessment of fetal brain uptake of paraquat *in utero* using *in vivo* PET/CT imaging. Toxicol Sci 122: 551-556. doi:10.1093/toxsci/kfr104
8. Seneff S, Swanson N, Li C (2005) Aluminum and glyphosate can synergistically induce pineal gland pathology: connection to gut dysbiosis and neurological disease. Agricultural Sci 6: 42-70. doi.org/10.4236/as.2015.61005.

9. Teixeira AAC, Simões MJ, Wanderley-Teixeira V, Soares JR JM (2004) Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *Int J Morphol* 22: 189-94. doi.org/10.4067/S0717-95022004000300003.
10. Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, Burgos A, Nistico G (1995) Potent protective effect of melatonin on *in vitro* paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sciences* 56: 83-89.
11. Xu J, Sun S, Wei W, Fu J, Qi W, et al. (2007) Melatonin reduces mortality and oxidatively mediated hepatic and renal damage due to diquat treatment. *J Pineal Res* 42: 166–171. doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00401.x.
12. Serra A, Domingos F, Martins-Prata M (2003) Intoxicação por paraquat. *Acta Med Port* 16: 25-32.
13. Hausburg MA, Dekrey GK, Salmen JJ, Palic MR, Gardiner CS (2005) Effects of paraquat on development of preimplantation embryos *in vivo* and *in vitro*. *Reprod Toxicol* 20: 239–246. doi:10.1016/j.reprotox.2005.03.006.
14. Soares Júnior JM, Holanda FS, Baracat EC (2008) Melatonin and puberty: what is the evidence? *Rev Bras Ginecol Obstet* 30: 483-485. doi.org/10.1590/S0100-72032008001000001.
15. Maganhin CC, Carbonel AAF, Hatty JH, Fuchs LFP, Oliveira-Júnior IS, et al. (2008) Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. *Rev Assoc Med Bras* 54: 267-71. doi.org/10.1590/S0104-42302008000300022.
16. Reiter RJ, Tan D-X, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, et al. (2009) Melatonin and Reproduction Revisited. *Biol Reprod* 81:445-456. doi 10.1095/biolreprod.108.075655.
17. Manjunatha B, Devaraj M, Gupta P, Ravindra J, Nandi B (2009) Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo *in vitro* embryo development. *Reprod Domest Anim* 44: 12-16. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00982.x.

18. Vázquez MI, Abecia JA, Forcada F, Casao A (2010) Effects of exogenous melatonin on in vivo embryo viability and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrus. *Theriogenology* 74: 618-626. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.03.007.
19. Dair EL, Simoes RS, Simões MJ, Romeu LR, Oliveira-Filho RM, et al. (2008) Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertil Steril* 89: 1299-305. doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.050.
20. OECD, 2008. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 Health Effects. Test No 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, vol. 4 OECD, OECD library
21. Shorr BA 1941. New technic for staining vaginal smears: III, a single differential stain. *Science*. 94: 545-546. doi:10.1126/science.94.2449.545.
22. Damasceno DC, Volpato GT, Person OC, Yoshida A, Rudge MVC, et al. (2002) Efeito do ácido acetilsalicílico na performance reprodutiva e na prole de ratas wistar. *Rev Assoc Med Bras* 4: 312-316. doi.org/10.1590/S0104-42302002000400036.
23. Camargo ICC, Gaspar ALC, FREI F, Mesquita SFP (2009) Efeitos dos esteroides anabólicos androgênicos sobre o útero e parâmetros reprodutivos de ratas adultas. *Rev Bras Ginecol Obstet* 9: 453-460. doi.org/10.1590/S0100-72032009000900006.
24. Kimbrough RD, Gaines TB (1970) Toxicity of paraquat to rats and its effect on rat lungs. *Toxicol Appl Pharmacol* 17: 679-690. doi:10.1016/0041-008X(70)90042-6.
25. Williams GM, Kroes R, Munro IC (2000) Safety evaluation and risk assessment of herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 31: 117-165. doi:10.1016/0041-008X(70)90042-6.
26. U.S.EPA. (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. EPA/630/R-96/009. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

27. Teixeira AAC, Simões MJ, Teixeira VW, Soares-Júnior JM (2004) Avaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *Int J Morphol* 22: 189-119. doi.org/10.4067/S0717-95022004000300003.
28. Lemonica IP, Damasceno DC, Di Stasi LC (1996) Study of the embryotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Braz J Med Biol Res* 29: 223-227.
29. Cummings AM, Rhodes BE, Cooper RL (2000) Effect of Atrazine on Implantation and Early Pregnancy in 4 Strains of Rats. *Toxicol Sci* 58: 135-143. doi: 10.1093/toxsci/58.1.135.
30. Khera KS (1985) Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratology* 31: 129-53.
31. Chernoff N, Rogers EH, Gage MI, Francis BM (2008) The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological significance of the "no observed adverse effect level". *Reprod Toxicol* 25: 192-202. doi:10.1016/j.reprotox.2007.12.001.
32. York RG, Parker RM, Haber LT. Test Methods for assessing female reproductive and development toxicology. In: Hayes WA, Kruger CL. (6^a ed) Principles and methods of toxicology. New York: Taylor & Francis. 2014. Cap. 35, p. 1637-1722.
33. Miranda-Contreras L, Dávila-Ovalles R, Benítez-Díaz P, Peña-Contreras Z, Palacios-Prü E (2005) Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acid synaptic transmission in developing mouse cerebellar córtex. *Dev Brain Res* 160: 19-27. doi:10.1016/j.devbrainres.2005.08.001.
34. Chahoud I, Ligensa A, Dietzel L, Faqi AS (1999) Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod Toxicol* 13: 375-381. doi:10.1016/S0890-6238(99)00035-0.

35. Costa, M. J., Monteiro, D. A., Oliveira-Neto, A. L., Rantin, F. T., Kalinin, A.L (2008). Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicol* 17: 153–163. doi: 10.1007/s10646-007-0178-5.
36. Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C, et al. (2007). Time- and dose-dependent effects of Roundup on human embryonic and placental cells. *Environ. Contam Toxicol* 53: 126-133. doi: 10.1007/s00244-006-0154-8.
37. Hamayatkah A, Najafiyani M, Farzam M, Kargar H (2012) Effects of the Paraquat Herbicide on Oogenesis and Ovary Structure of Wistar Rat strain *Adv Environ Biol* 6: 1006-1012.
38. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Manchester LC, Tan D-X (2013) Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. *Int J Mol Sci.* 14: 7231–7272. doi:10.3390/ijms14047231.
39. Gürsoy E, Bulut HE, Basimoglu-koca, Y (1998) Blastocyst Implantation in Rats: A Morphological Approach. *Okajimas Folia Anat* 74: 293-316.
40. Zhao H, Pang SF, Poon AMS (2002) Variations of mt1 melatonin receptor density in the rat uterus during decidualization, the estrous cycle and in response to exogenous steroid treatment. *J Pineal Res* 33: 140-145. doi: 10.1034/j.1600-079X.2002.02898.x.
41. Fettback PBT, Domingues TS, Hassun Filho PA, Motta ELA, Serafini PC, Baracat EC. Células natural killer uterinas: o que são? O que fazem? O que devemos saber? *Femina*, v. 37, n. 7, p. 373-378, 2009.
42. Cavieres MF, Jaeger J, Porter W (2002) Developmental Toxicity of a Commercial Herbicide Mixture in Mice: I. Effects on Embryo Implantation and Litter Size. *Environ Health Perspect* 110: 1081-1085.

43. Greenlee AR, Ellis TM, Berg RL (2004) Low-Dose Agrochemicals and Lawn-Care Pesticides Induce Developmental Toxicity in Murine Preimplantation Embryos. *Environ Health Perspect* 112: 703-709.
44. Spencer T, Bazer FW (2004) Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J Anim Sci* 82: E4-E13. doi:/2004.8213_supplE4x.
45. Aboubakr M, Elnashar MD, Gamal I, Aboul-Enein MD (2004) Endometrial receptivity Middle East Fertil Soc J 9: 10-24.
46. Preston AM, Lindsay LA, Murphy CR (2006) Desmosomes in uterine epithelial cells decrease at the time of implantation: An ultrastructural and morphometric study *J Morph* 267: 103-108. doi: 10.1002/jmor.10390.
47. El-Shenawy NS (2009) Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol* 28: 379–385. doi:10.1016/j.etap.2009.06.001.
48. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E (2002) Uterine Glands Provide Histirotrophic Nutrition for the Human Fetus during the First Trimester of Pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2954-2959.
49. Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnonb M-C, et al. (2009) Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262: 184-191. doi:10.1016/j.tox.2009.06.006.
50. Benachour N, Clair E, Mesnage R, Séralini G-E (2012) Endocrine disruptors: new discoveries and possible progresso of evaluation. *Adv Med Biol* 29: 1-57.
51. Jasper R, Locatelli GO, Pilati C, Locatelli C (2012) Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. *Interdiscip Toxicol*. 5: 133-140. doi: 10.2478/v10102-012-0022-5.

52. Takenaka A, Annaka H, Kimura Y, Aoki H, Igarashi K (2003) Reduction of paraquat-induced oxidative stress in rats by dietary soy peptide. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 278-283. doi: org/10.1271/bbb.67.278.
53. Hermes-Lima M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, KB. (Ed) *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. 2004. Cap. 12, p. 319-368.
54. Maganhin CC, Carbonel AAF, Hatty JH, Fuchs LFP, Oliveira-Júnior IS, et al. (2008) Melatonin effects on the female genital system: a brief review. *Rev Assoc Med Bras* 54: 267-271. doi:org/10.1590/S0104-42302008000300022.
55. Benachour N, Seralini G-E (2009) Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem Res Toxicol* 22: 97-105. doi: 10.1021/tx800218n.
56. Somigliana E, Viganò P, Vignali M (1999) Endometriosis and unexplained recurrent spontaneous abortion: pathological states resulting from aberrant modulation of natural killer cell function? *Hum Reprod Update* 5:40-51. doi: 10.1093/humupd/5.1.40.
57. Raí R, Sacks G, Trew G (2005) Natural killer cells and reproductive failure: theory, practice and prejudice. *Hum Reprod* 20:1123-6. doi: 10.1093/humrep/deh804.
58. Trundley A, Moffett A. (2004) Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 63:1-12. doi: 10.1111/j.1399-0039.2004.00170.x.

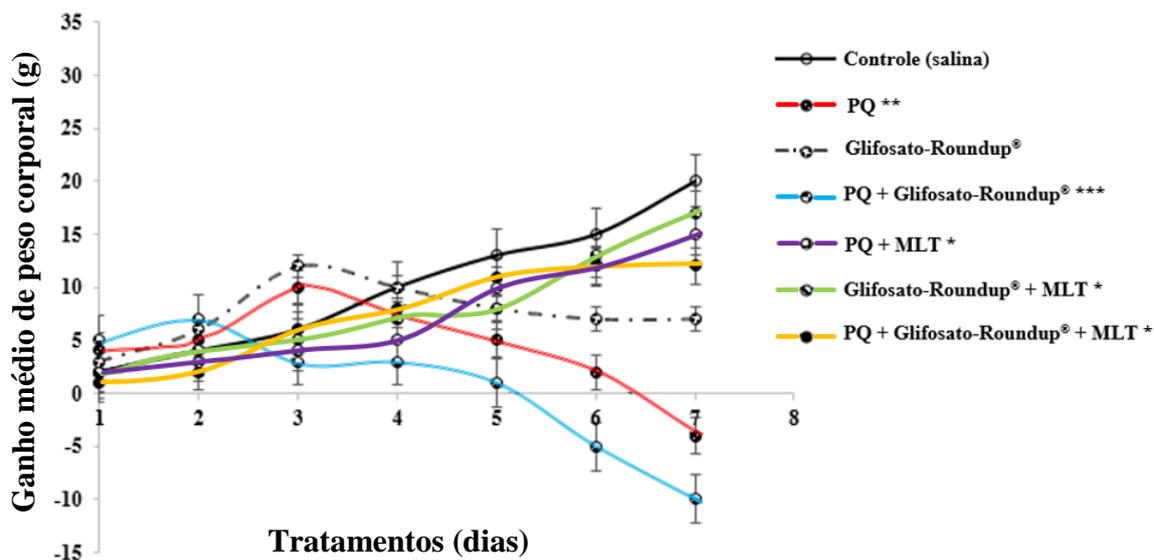


Figura 1. Ganho médio de peso das ratas prenhes durante a exposição aos herbicidas e tratamento com a MLT do primeiro até o sétimo dia de prenhez. Todos os valores representam média \pm erro padrão de sete grupos experimentais. (*) indica diferença significativa entre o grupo controle e os grupos expostos aos herbicidas. Notar que a exposição ao Paraquat (PQ) e sua associação com o Glifosato-Roundup® apresentou perda de peso ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ e prevenção da perda quando tratado com melatonina (MLT) * $p < 0,05$ (ANOVA/Tukey).

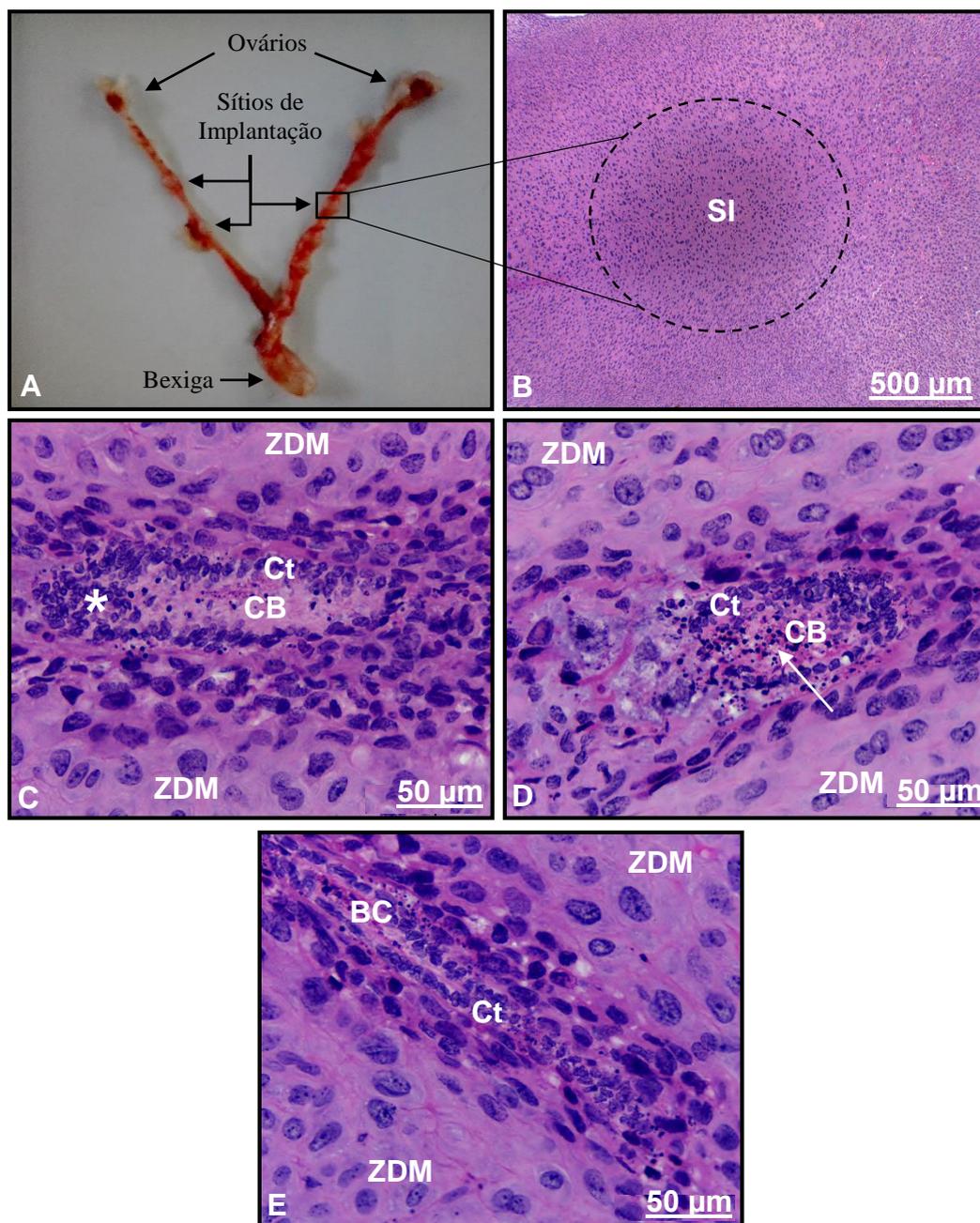


Figura 2. Fotomicrografias de amostras de sítios de implantação de ratas prenhes expostas aos herbicidas Paraquat e Glifosato-Roundup® e tratadas com melatonina. Grupos G1, G4 e G7 (grupos com alterações significativas). Peça anatômica de cornos uterinos ao 7^a dia pós-coito com sítios de implantação, ovários e bexiga aparentemente bem preservados (Fig. 2A). Visão panorâmica de sítio de implantação (SI) do grupo controle (Fig. 2B) e estruturas bem preservadas como citotrofoblasto (Ct), embrioblasto (asterisco), cavidade blastocística (CB) e zona de decidualização madura bem definida (ZDM) também do grupo controle (Fig. 2C). Enquanto no grupo exposto aos herbicidas associados apresentaram desorganização do blastocisto e degeneração do citotrofoblasto (Ct) (seta) localizado dentro da cavidade blastocística (CB) (Fig. 2D). No grupo G7 (herbicidas associados) o tratamento com MLT promoveu proteção da organização estrutural do blastocisto (Fig. 2E). Escalas de barras: 50 e 500µm.

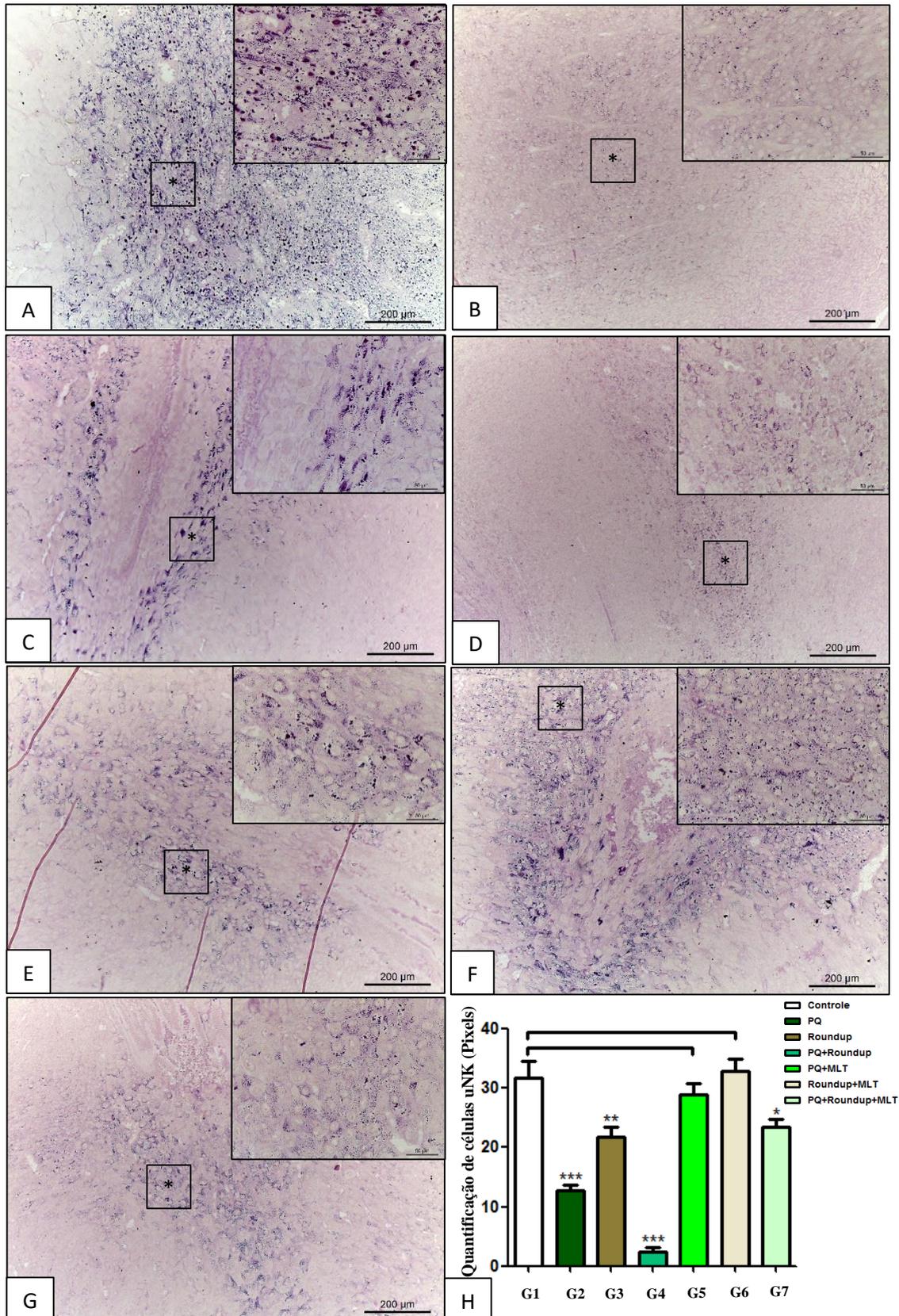


Figura 3: Avaliação histoquímica de células natural killer uterinas de sítios de implantação do blastocisto de ratas dos grupos experimentais. (A) G1 - controle, observar marcação forte; (B) G2 - PQ, (C) G3 - Glifosato-Roundup® e (D) G4 - PQ+Glifosato-Roundup®, marcação leve; (E) G5 - PQ+MLT, (F) G6 - Roundup®+MLT marcação semelhante ao controle, exceto em (G) G7 - PQ+Glifosato-Roundup®+MLT. Quantificação de células natural killer uterinas através da marcação dos grânulos citoplasmáticos PAS positivos em Pixels (Fig. H). Grupos Barras sobre asteriscos diferem significativamente do controle pelo teste de Tukey (*** $p > 0,001$. ** $p > 0,01$ e * $p > 0,05$).

Tabela 1. ¹Indicadores de fertilidade dos grupos experimentais expostos aos herbicidas e tratada com MLT.

³ Parâmetros	² Tratamentos							F Estatística P
	Controle	PQ	Glifosato-Roundup®	Glifosato-Roundup® + PQ	PQ + MLT	Glifosato-Roundup® + MLT	Glifosato-Roundup® + PQ + MLT	
Número de ratas prenhes	5	5	5	5	5	5	5	
Peso dos ovários (mg)	63,2±0,5a	35,4±1,9c	45,0±2,3b	30,6±1,0d	56,0±2,0a	54,4±1,7a	54,6±1,7a	75,45 ^{0,0001}
Número de implantações	12,4±0,5a	5,4±0,4b	7,2±0,6b	2,6±0,4c	11,0±0,7a	11,8±0,7a	9,8±0,6a	41,51 ^{0,0001}
⁴ Taxa de implantação (%)	83,6±2,0a	49,0±2,2b	58,2±1,3b	29,2±4,4d	75,8±3,7a	78,2±4,2a	73,7±2,6a	41,29 ^{0,0001}
Número de corpos lúteos	15,2±0,6a	8,8±0,5b	9,4±0,9b	5,8±0,6c	13,2±0,4a	14,0±0,7a	13,0±0,8a	27,61 ^{0,0001}
⁵ Perdas pré-implantação (%)	16,4±1,5a	40,6±1,0b	35,5±1,2b	55,5±3,1c	23,4±3,6a	18,3±1,3a	22,9±3,0a	37,66 ^{0,0001}

¹Dados apresentados como média ± EPM.

²Roundup (glifosato-Roundup® 500mg/kg/dia), PQ (Paraquat 50mg/kg/dia) via gavagem e MLT (Melatonina 10mg/kg/dia) via intraperitoneal.

³Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey HSD nível de 5% de significância.

⁴(número total de implantes/ número de corpos lúteos) x100.

⁵(número de corpos lúteos – número de implantes / número de corpos lúteos) x 100.

Tabela 2. ¹Análise morfométrica de parâmetros endometriais dos grupos experimentais expostos aos herbicidas e tratada com MLT.

³ Parâmetros	² Tratamentos							F Estatística P
	Controle	PQ	Glifosato-Roundup®	Glifosato-Roundup® + PQ	PQ + MLT	Glifosato-Roundup® + MLT	Glifosato-Roundup® + PQ + MLT	
Número de ratas prenhes	5	5	5	5	5	5	5	
Altura do epitélio superficial (µm)	23,7±0,5a	13,9±0,7c	18,2±0,4b	9,9±0,6d	21,8±0,7a	22,2±0,4a	21,2±0,7a	64,20 ^{0,0001}
Altura do epitélio glandular (µm)	21,9±0,7a	13,1±0,4b	16,1±0,7c	9,8±0,7d	20,4±0,4a	21,3±0,4a	19,2±0,4a	54,17 ^{0,0001}
Diâmetro das glândulas endometriais (µm)	37,1±1,5a	20,0±0,6c	26,9±1,3b	14,0±0,7d	36,0±1,5a	37,2±1,0a	33,8±0,9a	49,57 ^{0,0001}

¹Dados apresentados como média ± EPM.

²Roundup® (500mg/kg/dia), PQ (Paraquat 50mg/kg/dia) via gavagem e MLT (Melatonina 10mg/kg/dia) via intraperitoneal.

³Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey HSD nível de 5% de significância.

CAPÍTULO III

Efeito protetor da melatonina sobre o fígado de ratas prenhes expostas a doses subletais de herbicidas

Lécio Leone de Almeida^{a,b}; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira^b; Valdemiro Amaro da Silva Júnior^d; Franklin Magliano da Cunha^b; Natallyanea Silva Bezerra^a; Leucio Duarte Vieira Filho^c; Valéria Wanderley Teixeira^{b*}.

^a *Laboratório de Biopatologia dos Sistemas Orgânicos – DCB – CCBS - Universidade Regional do Cariri – Crato, CE, Brasil.*

^b *Laboratório de Histologia – DMFA - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, PE, Brasil.*

^c *Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal - DF - Universidade Federal de Pernambuco – Recife, PE, Brasil.*

^d *Laboratório de Patologia. DMV - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, PE, Brasil.*

*Autor para correspondência. UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos- Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

Endereço de e-mail: valeria@dmfa.ufrpe.br (Valéria Wanderley Teixeira)

Resumo

O fígado, sendo o principal sítio de metabolização de substâncias tóxicas é particularmente suscetível aos danos provocados por herbicidas. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da melatonina (MLT) sobre o fígado de ratas prenhes expostas a formulações comerciais de herbicidas. Dessa forma, as ratas foram expostas a doses subletais dos herbicidas Paraquat (PQ) (50 mg/kg) e/ou Glifosato-Roundup® (500 mg/kg) e tratadas com MLT (10 mg/kg) do 1º ao 7º dia de prenhez. Foram realizadas aferições do ganho de peso corporal, análise hematológica e de parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo hepático e histopatologia do fígado. Os resultados revelaram perda de peso corporal nos grupos (G2 e G4), redução no número de eritrócitos, na concentração de hemoglobina, nos valores do hematócrito, na contagem total de leucócitos, no número de neutrófilos segmentados nos grupos (G2, G3 e G4), de eosinófilos no grupo (G4) e redução no número de linfócitos no grupo (G4). Além disso, na análise bioquímica e do estresse oxidativo hepático foram observadas reduções nos níveis séricos de albumina, aumento dos níveis séricos de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como redução dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) nos grupos (G2, G3 e G4). Quanto a histopatologia de amostras de fígado das ratas foi observada a presença de hepatócitos necróticos, infiltrado inflamatório portal e centrolobular, congestão dos capilares sinusoides no grupo (G4) com lesão mais impactantes. Esses resultados foram observados após exposição aos herbicidas associados e individual. Nos grupos tratados com MLT (G5, G6 e G7) verificou-se que os parâmetros estudados foram similares aos do controle, porém os níveis de albumina sérica, percentual de eritrócitos e linfócitos, concentração de hemoglobina, bem como os valores do hematócrito do grupo (G7) a prevenção das alterações nesses parâmetros foi parcial. Assim, o presente estudo mostrou que o tratamento com MLT atua como um agente hepatoprotetor contra a toxicidade hepática induzida experimentalmente, favorecendo uma normalização do ganho de peso corporal, dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e redução do estresse oxidativo hepático.

Palavras-chave: Herbicidas; melatonina; fígado; estresse oxidativo; hematologia; histopatologia

1. Introdução

A ampla utilização de agrotóxicos nas diversas culturas de importância econômica expõe a população em geral ao risco de graves intoxicações. Embora a utilização dos agrotóxicos tenha proporcionado o aumento da produtividade agrícola, possibilitando a produção de alimentos com qualidade a um custo menor (Mascarenha e Pessoa, 2013). O uso indiscriminado desses produtos pode trazer prejuízos à saúde humana e animal, e ao meio ambiente (Cassal et al., 2014).

Na literatura tem-se observado que exposições a herbicidas, em especial as formulações a base de glifosato (Glifosato-Roundup®) produzem alterações hepáticas importantes, como congestão dos capilares, aumento das células de Kupffer (Benedetti et al., 2004), anormalidades funcionais da atividade de enzimas hepáticas (Daruich et al., 2001) e alterações de parâmetros hematológicos (Jasper et al., 2012). Enquanto o herbicida (PQ), produto extremamente tóxico capaz de causar intoxicações fatais tanto para humanos quanto para animais (Melchiorri et al., 1996), produz espécies reativas de oxigênio (EROs) responsáveis pela lipoperoxidação (LPO) das membranas celulares (Peter et al., 1992), degeneração e necrose de hepatócitos (Lheureux et al., 1995), necrose centro-lobular hepática, edema e necrose dos canais biliares tanto intra como extra-hepáticos (Honoré et al., 1994; Serra et al., 2003). Além disso, ambos herbicidas promovem injúrias no desenvolvimento embrionário (Dent et al., 2007; Oliveira et al., 2014).

O tratamento das intoxicações por herbicidas, baseia-se em medidas que diminuam a absorção, aumentem a excreção e modifiquem os efeitos danosos nos sistemas biológicos (Serra et al., 2003). O uso de agentes antioxidantes vem sendo estudado, pois há interesse crescente no estudo de substâncias que possam servir como antídoto nas intoxicações, uma vez que os herbicidas, em especial o PQ aumentam os índices de morbidade e mortalidade (Almeida et al., 2007). Por esta razão, pesquisas têm sugerido a utilização de antioxidantes como a MLT, pela sua atuação contra injúrias morfofuncionais em tecidos e órgãos inclusive no fígado (Melchiorri et al., 1995, 1996; Ohta et al., 2000a, 2000b), bem como no sistema reprodutor e desenvolvimento embrionário (Reiter et al., 2009; Niknafs et al., 2014). Estudos relatam que a MLT estimula a produção de glutatona peroxidase contribuindo para as defesas ao nível celular contra o estresse oxidativo (Reiter et al., 1995; Pablos et al., 1996) promovendo a estabilização da membrana celular tornando-a mais resistente ao ataque oxidativo (Garcia et al., 1998), além disso, atua como agente antiinflamatório (Mauriz et al., 2013).

No Brasil o número de trabalhadores rurais que estão potencialmente expostos aos agrotóxicos, especialmente os herbicidas é bastante expressivo, onde a mão-de-obra feminina constitui, aproximadamente, 60% do total, o que contribui para o aumento da contaminação pelos mesmos, em especial, no período gestacional (Branco e Vainsencher, 2001) e que não há

relatos na literatura sobre os efeitos da MLT em ratas prenhes submetidas a intoxicação aguda por doses subletais dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup® associados. Assim, testou-se a hipótese de que a MLT pode atuar como agente hepatoprotetor, melhorando indicadores morfofuncionais do fígado. Dessa forma, analisou-se o perfil hematológico e bioquímica, estresse oxidativo, histopatologia do fígado, bem como aferição do ganho de peso corporal das fêmeas.

2. Material e Métodos

2.1 Animais e produtos químicos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), no Centro de apoio à pesquisa (Cenapesq) ambos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e no Laboratório Integrado de Neurofisiologia e Farmacologia Renal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Portanto, foram utilizadas 35 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) provenientes do biotério do DMFA, com 90 dias de idade, pesando 200 ± 20 g, alojadas em condições controladas com alimentação e água “*ad libitum*”, temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro. Todos os procedimentos realizados foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética no uso de animal da UFRPE, sob o número da licença 063/2013 e de acordo com OECD - *Guideline for the Testing of Chemicals* - (OECD, 2008).

Formulações comerciais Glifosato-Roundup® (lote: BS 1096/98 da Monsanto do Brasil, constituído por 360 g/L de glifosato (N-fosfometilglicina) e 16 % (w/v) polioxietileno amina (surfactante), Gramoxone® (lote: PLN 3 A 0033-13-56604) do Brasil consistindo de 200 g/L de Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio), MLT da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA), Dopalem® (hidrocloridrato de cetamina), Rompum® (xilazina) e Thionembutal® (tiopental) foram utilizadas durante os experimentos.

2.2 Grupos experimentais e Tratamentos

Após adaptação das ratas no biotério do DMFA/UFRPE foram realizados exames colpocitológicos para determinação da regularidade do ciclo estral (Mattaraia e Moura, 2012). As fêmeas que apresentaram 3 ciclos estrais regulares foram separadas, ao acaso, em sete grupos com cinco ratas em cada. Os grupos foram: G1 controle (tratamento com solução salina a 0,9 % de NaCl), G2 exposição a dose de 50 mg/kg de PQ, G3 exposição a dose de 500 mg/kg de Glifosato-Roundup[®], G4 exposição associada de PQ e Glifosato-Roundup[®], G5 exposição a dose de 50 mg/kg de PQ e tratamento com 10 mg/kg de MLT, G6 exposição a dose de 500 mg/kg de Glifosato-Roundup[®] e tratamento com 10 mg/kg de MLT, G7 exposição associada de PQ e Glifosato-Roundup[®] e tratamento com 10 mg/kg MLT.

A MLT foi administrada por via intraperitoneal sempre às 18 h na dose de 10 mg/kg de peso corporal do animal, sendo diluída diariamente por sete dias consecutivos em solução de etanol/salina a 4 %, (Melchiorri et al., 1995). Para a exposição aos herbicidas foram diluídos em solução salina (0.9 % de NaCl), sendo o PQ na dose subletal de 50 mg/kg de peso corporal do animal de acordo com a DL₅₀ 100-150 mg/kg (Kimbrough et al., 1970) e 500 mg/kg de Glifosato-Roundup[®] definida a partir da NOEL-dose de 1000 mg/kg de peso corporal do animal (Williams et al., 2000) estabelecida para o glifosato em ensaios de teratogênese em ratos (EPA, 1996).

Os herbicidas foram administrados via gavagem sempre às 9 h após pesagem das fêmeas. Ao término da exposição aos herbicidas e tratamento com MLT, as ratas, ao sétimo dia de prenhez foram anestesiadas com hidrocloreto de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular e submetidos a coleta de sangue por punção cardíaca (Parasuraman et al., 2010). Parte do sangue foi utilizado para a estimativa dos parâmetros hematológicos, enquanto o restante foi centrifugado a 3000 rpm a 4 °C durante 15 minutos, em seguida o soro foi removido e armazenado a - 80 °C para análise bioquímica (Benedetti et al., 2004; Jasper et al., 2012). Na etapa seguinte, as ratas foram eutanasiadas com tiopental (40 mg/kg) seguida por laparotomia para remoção do fígado e armazenamento a - 80°C para análise do estresse oxidativo e/ou imediatamente fixados em formol a 10% tamponado para análises histopatológicas.

2.3 Análise hematológica

A estimativa do número de eritrócitos, leucócitos totais, concentração de hemoglobina, hematócrito, bem como contagem diferencial de leucócitos foram realizados de acordo com Garg e Goyal (1992).

2.4 Análise da função hepática

Os níveis séricos de transaminases (alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e Fosfatase alcalina (FA), bem como de Albumina (Al) foram dosados usando analisador químico (BEL Photonics® Spectrophotometer SP 2000 UV) e KIT's comerciais de diagnóstico (LabTest, Minas Gerais, Brasil). Todas as dosagens foram realizadas em triplicata.

2.5 Estresse oxidativo

Para análise do estresse oxidativo por meio da mensuração dos níveis de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), amostras de fígado foram macerados em cloreto de potássio (KCl) 1,15 %, numa proporção de 10 mL/g, até completa homogeneização do material. O homogenato foi transferido para um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 2 mL do reagente (0,375 % ácido tiobarbitúrico e 75 % ácido tricloroacético) para cada mL da mistura. Os tubos em triplicata foram lacrados e aquecidos em banho-maria a 100 °C durante 15 minutos. O sobrenadante foi separado, e a absorbância medida a 535 nm (Buege e Aust, 1978). Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram quantificados por meio da concentração dos grupos sulfidrilo não proteicos nos homogeneizados. A outra metade de cada homogeneizado foi misturado com um volume igual de 10% (w / v) de ácido tricloroacético (TCA) para precipitar as proteínas e, em seguida, centrifugada a 1000 g durante 10 min. Sequencialmente, 1 mL de sobrenadante foi misturado com 1,5 mL de meio de reação contendo Tris a 100 mM (pH 8,9) e 0,4 mM de 5,5'-ditio-bis-2-nitro-benzóico, sendo incubados à temperatura ambiente durante 5 min em placas de 96 poços e a absorvância foi medida a 412 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão, utilizando α -cisteína, e corrigidos para o teor de proteína

dos homogenatos iniciais (Sedlak e Lindsay, 1968). Todas as dosagens foram realizadas em triplicata.

2.6 Análise histopatológica do fígado

Amostras de fígado foram preservadas em formaldeído a 10% tamponado por 24 horas. Logo após, foram lavadas em solução tampão PBS, desidratadas em álcool em série crescente de concentração e incluídas em glicol metacrilato historesina (Historesin Leica®). Os cortes de 4 µm foram obtidos em micrótomo Leica® modelo RM 2245 equipado com navalha de vidro, distendidos em água destilada e colocados sobre lâminas, levados para secagem em estufa a 60°C por 1 minuto e submetidos às técnicas de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H.E.). As lâminas em duplicatas/animal foram analisadas (10 campos aleatórios com espaço porta e veia centrolobular) em microscópio de luz, da marca Leica® modelo DM500 e fotografadas mediante o uso de câmera Leica® modelo EC3 acoplada ao microscópio, bem como do software Leica® Application Suite (LAS) EZ para análise histopatológica (Benedetti et al., 2004; Lemos et al., 2011, 2014; Almeida et al., 2014).

2.7 Análise estatística

Todos os valores foram expressos como média ± erro padrão da média e analisadas pelo software SAS® for Windows versão 9.0. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo previamente testados para normalidade pelo Teste de Shapiro-Wilk. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3. Resultados

3.1 Avaliação do peso corporal

A análise estatística do ganho de peso das ratas prenhes dos grupos experimentais herbicidas associados (PQ + Glifosato-Roundup®) e individual (PQ) revelou valores estatisticamente menores quando comparados ao controle. No entanto, o tratamento com MLT preveniu a perda de peso (Fig. 1).

3.2 Análise hematológica

Ao analisar estatisticamente os valores dos parâmetros hematológicos (Tabela 1) observou-se redução no número de eritrócitos, na concentração de hemoglobina e nos valores do hematócrito nos animais dos grupos expostos aos herbicidas associados e individuais quando comparados aos do controle. Verificou-se ainda que a associação dos herbicidas promoveu os menores valores para os parâmetros citados. Já entre os grupos expostos individualmente e tratados com MLT evidenciou valores semelhantes ao controle, o que não ocorreu no grupo com associação dos herbicidas e tratados com MLT. Na contagem total de leucócitos, evidenciou-se aumento nos grupos expostos aos herbicidas individuais e associados, sendo mais expressivo neste último. Já entre os grupos tratados com MLT os valores foram semelhantes ao do controle. Na contagem diferencial foi observado para o número de neutrófilos segmentados o mesmo comportamento apresentado na contagem total de leucócitos. Para os eosinófilos verificou-se que apenas o grupo associado de herbicidas apresentou aumento significativo quando comparados ao controle, enquanto entre os grupos tratados com MLT todos apresentaram valores semelhantes aos do controle. Quanto ao número de linfócitos houve redução nos grupos expostos aos herbicidas associados e individual, sendo mais expressiva na associação. Já entre os grupos tratados com MLT os valores foram semelhantes aos do controle, exceto no grupo de herbicidas associados, onde a redução foi mantida. Os resultados referentes ao número de monócitos não diferiram entre grupos estudados (Tabela 1).

3.3 Análise da função hepática

A exposição associada e individual dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®] promoveu nas ratas reduções nos níveis séricos de albumina quando comparadas aos do controle. Verificou-se ainda que a associação dos herbicidas promoveu a maior redução. Os grupos tratados com MLT apresentaram níveis séricos da albumina semelhantes aos observados no controle, exceto no grupo associado. Os valores para os níveis séricos de AST, ALT e FA apresentaram-se elevados quando expostos aos herbicidas individualmente e/ou associados, em comparação ao controle. Esses valores foram mais expressivos com a associação. Nos grupos tratados com MLT verificou-se que os níveis desses parâmetros foram similares aos do controle (Tabela 2).

3.4 Estresse oxidativo

As análises dos níveis de TBARS no tecido hepático após exposição associada e individual dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®] revelaram valores elevados quando comparados aos do controle. Verificou-se ainda que a associação dos herbicidas promoveu os maiores valores para os níveis de TBARS. Já entre os grupos tratados com MLT evidenciou valores semelhantes aos do controle (Fig. 2). Para os níveis de GSH a exposição associada e individual dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®] promoveram redução quando comparados aos do controle, porém nos grupos tratados com MLT houve prevenção da redução com valores semelhantes aos do controle (Fig. 3).

3.5 Análise histopatológica do fígado

A análise histopatológica de amostras de fígado (Fig. 4) das ratas prenhes do controle (Fig. 4A e 4A1) revelou a presença de cordões de hepatócitos radialmente dispostos formando placas celulares bem preservadas no interior do lóbulo hepático, entre as quais localizam-se os sinusoides. A exposição associada dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®] (Fig. 4B e 4B1) promoveu maiores danos ao tecido hepático. Nesse mesmo grupo observaram-se hepatócitos necróticos, infiltrado inflamatório portal e centrolobular, congestão dos capilares sinusoides. Nas ratas expostas aos herbicidas e tratadas com MLT, o fígado apresentou-se com características histológicas semelhantes ao controle, porém foi possível observar áreas com reação inflamatória focal e discreta congestão (Fig. 4C e 4C1).

4. Discussão

As ratas prenhes expostas individualmente aos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®] apresentaram perda de peso. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos (Yousef et al., 1995; Aoki et al., 2002; Dallegre et al., 2003; Beuret et al., 2005; Zhang et al., 2013; Malekinejad et al., 2013). Verificou-se ainda que a associação dos herbicidas promoveu os menores valores em relação ao ganho de peso indicando possível efeito sinérgico entre os herbicidas. Trezzi et al. (2005) explicam que essas interações podem se manifestar de forma sinérgica. Assim, justificam-se os resultados observados no grupo associado, onde ocorreu agravamento do quadro de intoxicação.

De acordo com Chahoud et al. (1999), perda de peso é um dos importantes indicadores de toxicidade materna e reprodutiva. Assim, os herbicidas podem estar causando toxicidade

sistêmica associada aos efeitos danosos de *EROs*, sendo estes últimos, altamente prejudiciais ao epitélio gastrointestinal por promoverem redução dos níveis de *GSH*, responsável por sua proteção (Mårtensson et al., 1990). Além disso, estudos recentes revelaram efeitos adversos do herbicida Glifosato-Roundup[®] sobre as bactérias do intestino, reduzindo a fonte de sulfato e causando doença inflamatória intestinal (Samsel e Seneff, 2013a, 2013b, 2015), diminuição da atividade das enzimas protease, lipase e amilase no trato gastrointestinal, desordem das microvilosidades, bem como produção exagerada de mucina (Senapati et al., 2009). Costa et al. (2008) reportaram perda de peso e hipotermia em ratas após exposição ao PQ. Assim, estes estudos corroboram com resultados sobre a perda de peso nas ratas prenhes expostas aos herbicidas, especialmente no grupo associado. No entanto, os grupos tratados com MLT apresentaram prevenção da perda de peso. Dessa forma, a MLT pode levar a um aumento no ganho de peso por uma possível inibição do triptofano pirolase (Walsh et al., 1994; Unkila et al. 1998), enzima capaz de comprometer o metabolismo do triptofano hepático (Ren e Correia, 2000), além de estimular a produção endógena de moléculas antioxidantes como a *GSH* (Urata et al., 1999) responsável pela proteção do epitélio gastrointestinal (Mårtensson et al., 1990) e atuar como antioxidante intestinal (Singh e Jadhav, 2014).

A avaliação de parâmetros hematológicos auxilia na determinação do estado fisiológico e como indicador de estresse oxidativo em humanos e animais (Flaiban et al., 2008). Assim, a redução no número de eritrócitos, na concentração de hemoglobina e nos valores do hematócrito revelou que a exposição individual aos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®] causou um estado anêmico nas ratas prenhes. Resultados semelhantes foram observados por Jasper et al. (2012) e Lalruatfela et al. (2014). Verificou-se ainda agravamento da redução dos valores dos parâmetros estudados após exposição aos herbicidas associados. De acordo com a literatura, os eritrócitos são mais sensíveis às mudanças no equilíbrio antioxidante/pró-oxidante por possuírem um sistema de defesa limitado. Os eritrócitos podem ser destruídos, com isso reduzir a concentração de hemoglobina e os valores do hematócrito. Neste contexto, a medula óssea hematogênica é altamente vulnerável ao estresse oxidativo podendo sofrer danos cromossômicos em suas células hematopoiéticas (Pieniżek et al. 2004; Tan et al., 1999; Prasad et al., 2009) levando a doenças hematológicas. Os grupos (G5 e G6) tratados com MLT houve prevenção das alterações dos parâmetros estudados, porém o mesmo não foi observado no grupo exposto aos herbicidas associados grupo (G7). Resultados semelhantes têm sido relacionados às suas propriedades antioxidantes, imunoestimulantes sobre o tecido mieloide (Singh e Haldar 2007; Koc et al., 2002; Kara et al, 2012; Srinivasan et al., 2011) e lipofilicidade que lhe permite atravessar membranas biológicas e chegar a todos os compartimentos da célula (Reiter et al.,

1999). Quanto ao grupo exposto à associação, provavelmente o sinergismo da mistura potencializou o efeito tóxico prevalecendo durante o tratamento com MLT, o que corrobora os resultados hematológicos do presente estudo.

Na contagem total de leucócitos, evidenciou-se leucocitose nos grupos expostos aos herbicidas individualmente; resultados semelhantes foram reportados por Tominack et al. (1991), Lee et al. (2000) e Neves et al. (2010), sendo mais intenso no grupo associado. Segundo Lee et al. (1995), Glusczak et al. (2006) e Costa et al. (2008), a toxicidade do PQ e Glifosato-Roundup® resultam na superprodução de EROs que destroem os lipídios das membranas celulares (lipoperoxidação), promovem processo inflamatório com recrutamento de leucócitos. Na contagem diferencial, observou-se neutrófilia e linfocitose para os grupos expostos aos herbicidas individualmente. Martínez et al. (2007) reportaram resultados semelhantes. Esses resultados foram mais intensos no grupo associado, além de um quadro de eosinofilia. Provavelmente, esses resultados estão relacionados à capacidade hepatotóxica dos herbicidas (Villadiego et al., 2005; Larsen et al., 2012), especialmente do PQ, onde seu efeito tóxico advém da sua capacidade de induzir estresse oxidativo e processo inflamatório (Ishida et al., 2006; He et al., 2012), bem como do efeito sinérgico após associação dos mesmos (Almeida et al., 2014) e potencial alergênico do Glifosato-Roundup® (Samsel e Seneff, 2013b). Durante tratamento com MLT houve prevenção das alterações dos parâmetros estudados. Esses resultados estão relacionados, provavelmente, à ação reguladora da dinâmica de células, incluindo a proliferação e estágios de maturação de praticamente todas as células hematopoiéticas e de linhagens imunológicas envolvidas na defesa do organismo. Assim, além das células NK (natural killer), os linfócitos T, B, monócitos, granulócitos da medula óssea e outros tecidos participam dessa ação reguladora (Miller et al., 2006). Além disso, a síntese de MLT no tecido mieloide de ratos, camundongos e humanos, bem com a presença de seus receptores nas células sanguíneas podem exercer funções intracelulares e/ou parácrinas, auxiliando a comunicação e dinamismo na defesa imunológica (Conti et al., 2000).

Na análise da função hepática, observou-se que a exposição individual dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup® promoveu nas ratas reduções nos níveis séricos de albumina. Resultados semelhantes foram reportados por Attia e Nasr (2009) e Séralini et al. (2014). Os herbicidas apresentam capacidade de se ligarem à albumina e promoverem alterações na sua conformação levando à fragmentação estrutural e, conseqüentemente, redução dos seus níveis séricos (Jaiswal et al., 1992; Yue et al., 2008). Verificou-se ainda que a associação dos herbicidas promoveu a maior redução, porém o tratamento com MLT revelou valores semelhantes ao controle, exceto no grupo associado.

As análises funcionais do fígado permitiram avaliar a ocorrência de disfunção orgânica, pela alteração dos seus níveis séricos. Além da albumina, as enzimas aminotransferases (AST e ALT), bem com FA também sofrem alterações nos seus níveis séricos. A AST está presente em diferentes tecidos, inclusive no fígado. Na presença de dano celular agudo no fígado, observam-se níveis elevados. A ALT é uma enzima mais específica para a avaliação de dano hepático, pois o conteúdo desta enzima no fígado excede, em muito, a concentração em outros tecidos. A sua elevação acompanha o dano hepatocelular agudo (Chida et al., 2003; Al-habori; Stahmann, 2002). A FA e ALT são utilizados como marcadores da integridade da membrana celular (Perla et al., 2008). Assim, os valores para os níveis séricos de AST, ALT e FA no presente estudo apresentaram-se elevados. Resultados semelhantes foram reportados por Abdel-Hady et al., (2013), El-Shenawy (2009), Benedetti et al., (2004), Lalruatfela **et al.** (2014), Samai et al. (2010) e Akinloye et al. (2011). Estes relataram aumento dos níveis dessas enzimas, sugerindo possíveis danos ao fígado entre outros órgãos. Esses valores foram mais expressivos com a associação dos herbicidas, revelando, portanto, efeito sinérgico e agravamento nos sinais de hepatotoxicidade como demonstrados na (Fig. B1), onde foi evidenciado infiltrado inflamatório portal, necrose de células hepáticas e congestão da vênula porta. Nos grupos tratados com o tratamento MLT verificou-se que os parâmetros estudados foram similares aos do controle. Sigala et al. (2006) e López et al. (2000) confirmaram que a MLT reduz o aumento dos níveis séricos dessas enzimas após quase todos os tipos de lesão, indicando que a extensão do dano celular foi reduzida. Assim, o efeito hepatoprotetor da MLT pode ser atribuído a sua ação antioxidante, que protege a integridade da membrana celular impedindo a fuga dessas enzimas hepáticas, além de restabelecer os níveis de albumina sérica frente à prevenção das alterações das funções hepáticas.

Os níveis de TBARS no tecido hepático após exposição individual dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®] revelaram valores elevados. Suntres (2002) explica que o PQ induz à produção de EROs que interagem com os lipídios da membrana levando ao comprometimento da integridade celular. O Glifosato-Roundup[®] promove a produção excessiva de malonaldeído (MDA), além de estresse oxidativo por meio da geração de EROs e, conseqüentemente, danos à integridade celular (Catalá e Cerruti, 1997; Rikans e Hornbrook, 1997). Verificou-se ainda que a associação dos herbicidas promoveu os maiores valores para os níveis de TBARS. Atividades sinérgicas já foram observados com Glifosato e seu surfactante POEA (Koller et al., 2012; Kocaman and Topaktaş, 2010; Graillot et al., 2012) e PQ em outro estudo (Peng et al., 2007) isso confirma o efeito sinérgico da associação entre os herbicidas. Para os níveis de GSH, a exposição individual dos herbicidas PQ e Glifosato-Roundup[®] promoveu redução.

Resultados semelhantes foram observados por Candan e Alagözli (2001) e Cavalli et al. (2013). Enquanto a exposição associada promoveu os menores valores para os níveis de GSH revelando, portanto, efeito sinérgico e agravamento nos sinais de estresse oxidativo hepático. Neste contexto, a GSH é um importante antioxidante endógeno produzido no fígado, cujos níveis podem estar alterados em diversas situações de estresse oxidativo, especialmente em disfunções hepáticas, pois ela participa de inúmeros processos enzimáticos intra e intercelulares, o que justificaria nossos resultados. Os grupos tratados com MLT (G5, G6 e G7) permitiu identificar valores semelhantes aos do controle nos níveis de TBARS e GSH. A MLT exerce ação antioxidante sequestrando radicais hidroxila e peroxil (Cagnoli et al., 1995; Reiter et al., 1995, 1997) estimula a produção endógena de moléculas antioxidantes como a GSH (Urata et al., 1999), enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase fortalecem o sistema antioxidante (Reiter et al., 1995; Pablos et al., 1996). Além disso, protege a membrana celular tornando-a mais resistente ao ataque oxidativo (Garcia et al., 1998), reduz a LPO, bem como aumenta os níveis de GSH (Melchiorri et al., 1995, 1996), o que confirma os resultados sobre os níveis de TBARS e GSH do presente estudo.

Os indicadores histopatológicos de lesão hepática identificados foram coerentes aos resultados bioquímicos e do estresse oxidativo. Além disso, a exposição associada dos herbicidas promoveu os maiores danos ao parênquima hepático, revelando, portanto, efeito sinérgico e agravamento das lesões. A vulnerabilidade do fígado a toxicantes lipossolúveis e de metabolização hepática, independe da via de absorção, e isso se dá por sua dupla fonte de sangue (veia porta e artéria hepática). Assim, o órgão apresenta quantidades apreciáveis de todos os agentes tóxicos presentes na circulação sistêmica (Jaeschke, 2007). Contudo, no grupo exposto aos herbicidas associados, observaram-se hepatócitos necróticos, infiltrado inflamatório portal e centrolobular, congestão dos capilares sinusoides. Resultados semelhantes foram reportados por Benedetti et al. (2004), Çağlar e Kolankaya (2008), Larsen et al. (2012), Abdel-Hady et al. (2013) e Malekinejada et al. (2013) em exposições individuais dos herbicidas. Nas ratas expostas aos herbicidas e tratadas com MLT, o fígado apresentou-se com características histológicas semelhantes ao controle, porém foi possível observar áreas com reação inflamatória focal leve e congestão discreta dos capilares sinusoides. Dessa forma, podemos inferir que a MLT parece atuar protegendo o tecido pela sua capacidade antioxidante e inibidora de enzimas pró-oxidantes (Kim et al., 2009), especialmente no fígado (Mathes, 2010).

Podemos concluir que o tratamento com MLT atua de forma eficiente prevenindo a toxicidade hepática produzida pela exposição individual e associada dos herbicidas PQ e

Glifosato-Roundup[®], favorecendo a prevenção das alterações dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e estresse oxidativo hepático, bem como na manutenção do ganho de peso corporal.

Referências

- Abdel-Hady EK, Abdel-Rahman GH. Protective role of Coenzyme Q10 against paraquat induced hepatotoxicity in male rats. *Life Sci J* 2013;10:1933-1940.
- Akinloye OA, Adamson I, Ademuyiwa O, Arowolo TA. Supplementation of vitamins C, E and its combination on paraquat-intoxicated rats: effects on some biochemical and markers of oxidative stress parameters. *J Applied Pharm Sci* 2011; 1:85-91.
- Al-Habori M, Stahmann MA. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmacol* 2002;83:209-217. doi:10.1016/S0378-8741(02)00223-4.
- Almeida LL, Teixeira AAC, Wanderley-Teixeira V. Histopathological analysis of the small intestine of pregnant rats exposed to sub-lethal doses of herbicides and treated with melatonin. *Exp Pathol Health Sci* 2014; 6:63.
- Almeida GL, Schmitt GC, Bairros AV, Emanuelli T, Garcia SC. Os riscos e danos nas intoxicações por paraquat em animais domésticos. *Ciência Rural* 2007;37:1506-1512. doi.org/10.1590/S0103-84782007000500051.
- Aoki H, Otaka Y, Igarashi K, Takenak A. Soy protein reduces paraquat-induced oxidative stress in rats. *J Nutr* 2002;132:2258-2262.
- Attia AM, Nasr HM. Evaluation of protective effect of omega- 3 fatty acids and selenium on paraquat intoxicated rats. *Slovak J Anim Sci* 2009;42:180-187.
- Benedetti AL, Vituri CL, Trentin AG, Domingues MAC, Alvarez-413 Silva M. The effects of subchronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb[®]. *Toxicol Lett* 2004;153:227-232.

- Beuret CJ, Zirulnik F, Giménez MS. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reprod Toxicol* 2005;19:501-504. doi:10.1016/j.reprotox.2004.09.009.
- Branco AM, Vainsencher AS. Gênero e globalização no Vale do São Francisco. 2001. <file:///C:/Users/leone40/Downloads/931-995-1-PB.pdf.> Accessed in: 5 June 2014.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-310. doi: 10.1016/S0076-6879(78)52032-6.
- Çağlar S, Kolankaya D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate based herbicide Roundup. *Environ Toxicol Pharmacol* 2008;25:57-62. doi:10.1016/j.etap.2007.08.011.
- Cagnoli MC, Atabay C, Kharlamova E, Manev H. Melatonin protects neurons from singlet oxygen induced apoptosis. *J Pineal Res* 1995;18:222-226. doi:10.1111/j.1600-079X.1995.tb00163.x.
- Candan F, Alagözülü H. Captopril inhibits the pulmonary toxicity of paraquat in rats. *Hum Exp Toxicol* , 2001;20:637-641. doi:10.1191/096032701718890540.
- Cassal VB, Azevedo LF, Ferreira RP, Silva DG, Simão RS. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. *REGET* 2014;18:437-445. doi.org/10.5902/2236117012498.
- Catalá A, Cerruti A. Non-enzymatic peroxidation of lipids isolated from rat liver microsomes, mitochondria and nuclei. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:541-546. doi: 10.1016/S1357-2725(96)00147-1.
- Cavalli VLLO, Cattani D, Rieg CEH, Pierozan P, Zanatta L, Parisotto EB, Wilhelm-Filho D, Silva FRMB, Pessoa-Pureur R, Zamoner A. Roundup disrupts male reproductive functions

by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radic Biol Med* 2013;65:335-346. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.043.

Chahoud I, Ligensa A, Dietzel L, Faqi AS. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod Toxicol* 1999;13:375-381. doi:10.1016/S0890-6238(99)00035-0.

Chida VV, Moreira MB, Leme LFP, Fagundes DJ, Ramalho CEB, Novo NF, Montero EFS. Estudo da função hepática de ratos espontaneamente hipertensos submetidos a diferentes pressões de pneumoperitônio com CO₂. *Acta Cir Bras* 2003;18:1-12. doi.org/10.1590/S0102-86502003000100010.

Chohan MS, Tahir M, Lone KP, Sami W, Munir B. Paraquat induced hepatotoxicity in albino mice. *Pakistan J Zool* 2010;42:69-73.

Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 2000;28:193-202. doi:10.1034/j.1600-079X.2000.280401.x.

Costa MJ, Monteiro DA, Oliveira-Neto AL, Rantin FT, Kalinin AL. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicol* 2008;17:153-163. doi: 10.1007/s10646-007-0178-5.

Dallegrave E, Mantese FD, Coelho RS, Pereira JD, Dalsenter PR, Langeloh A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-roundup in wistar rats. *Toxicol Lett* 2003;30:45-52. doi:10.1016/S0378-4274(02)00483-6.

Daruich J, Zirulnik F, Gimenez MS. Effect of herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ Res* 2001;85:226-231. doi:10.1006/enrs.2000.4229.

- Dent MP. Strengths and limitations of using repeat dose toxicity studies to predict effects on fertility. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007;48:241-258. doi:10.1016/j.yrtph.2007.04.001.
- El-Shenawy NS. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup[®] and its active ingredient glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol* 2009;28:379-385. doi:10.1016/j.etap.2009.06.001.
- Flaiban K, Spohr K, Malanski L, Svoboda W, Shiozawa M, Hilst 463 C, Lúcia S, Aguiar L, Ludwig G, Passos F, Navarro I, Balarin M, Lisbôa J. Hematologic values of free-ranging *cebus cay* and *Cebus nigrinus* in Southern Brazil. *Int J Primatol* 2008;29:1375-1382. doi:10.1007/s10764-008-466 9290-5.
- Garcia JJ, Reiter RJ, Ortiz GG, Oh CS, Tang L, Yu BP, Escames G. Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation. *J Membr Biol* 1998;162:59-65.
- Garg DK, Goyal RN. Haematological and hepatotoxic effects of silken styles of corn in albino rats. *J Appl Toxicol* 1992;12:359-363. doi:10.1002/jat.2550120512.
- Gluszczak L, Miron DS, Crestani M, Fonseca MB, Pedron FA, Duarte MF, Vieira VLP. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Saf* 2006;65:237-241. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.07.017.
- Graillet V, Takakura N, Le Hegarat L, Fessard V, Audebert M, Cravedi JP. Genotoxicity of pesticide mixtures present in the diet of the french population. *Environ Mol Mutagen* 2012;53:173-184. doi:10.1002/em.21676.

- He X, Wang L, Szklarz G, Bi Y, Ma Q. Resveratrol inhibits paraquat-induced oxidative stress and fibrogenic response by activating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;342:81-90. doi:10.1124/jpet.112.194142.
- Honoré P, Hantson P, Fauville JP, Peeters A, Mahieu P. Paraquat poisoning. *Acta Clin Belg* 1994;49:220-228.
- Ishida Y, Takayasu T, Kimura A, Hayashi T, Kakimoto N, Miyashita T, Kondo T. Gene expression of cytokines and growth factors in the lungs after paraquat administration in mice. *Leg Med* 2006;8:102-109.
- Jaeschke H. Toxic responses of the liver. In: Curtis DK, Editor. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York: McGraw-Hill; 2014. p. 639-664.
- Jaiswal R, Khan MA, Musarrat J. Photosensitized paraquat-489 induced structural alterations and free radical mediated fragmentation of serum albumin. *J Photochem Photobiol B* 1992;67:163-170. doi:10.1016/S1011-1344(02)00321-4.
- Jasper R, Locatelli GO, Pilati C, Locatelli C. Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. *Interdiscip Toxicol* 2012;5:133-140. doi:10.2478/v10102-012-0022-5.
- Kara A, Akman S, Ozkanlar S, Tozoglu U, Kalkan Y, Canakci CF, Tozoglu S. Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radic Biol Med* 2012;55:21-26. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.002.
- Kim JB, Jung JY, Ahn JC, Rhee CK, Hwang HJ. Antioxidant and anti-apoptotic effect of melatonin on the vestibular hair cells of rat utricles. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2009;2:6-12. doi:10.3342/ceo.2009.2.1.6.

- Kimbrough RD, Gaines, TB. Toxicity of paraquat to rats and its effect on rat lungs. *Toxicol Appl Pharmacol* 1970;17:679-690. doi:10.1016/0041-008X(70)90042-6.
- Koc M, Buyukokuroglu ME, Taysi S. The effect of melatonin on peripheral blood cells during total body irradiation in rats. *Biol Pharm Bull* 2002;25:656-657. doi.org/10.1248/bpb.25.656.
- Kocaman AY, Topaktas M. Genotoxic effects of a particular mixture of acetamiprid and alpha cypermethrin on chromosome aberration, sister chromatid exchange, and micronucleus formation in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Toxicol* 2010;25:157-168. doi:10.1002/tox.20485.
- Koller VJ, Fürhacker M, Nersesyan A, Mišik M, Eisenbauer M, Knasmueller S. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human derived buccal epithelial cells. *Arch Toxicol* 2012;86:805-813. doi:10.1007/s00204-012-0804-8.
- Lalruatfela PL, Saminathan M, Ingole RS, Dhama K, Joshi MV. Toxicopathology of Paraquat herbicide in female wistar rats. *Asian J Anim Vet Adv* 2014;9:523-542. doi:10.3923/ajava.2014.523.542.
- Larsen K, Najle R, Lifschitz A, Virkel G. Effects of sub-515 lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012;34:811-818. doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.005.
- Lee HL, Chen KW, Chi CH, Huang JJ, Tsai LM. Clinical presentations and prognostic factors of a glyphosate-surfactant herbicide intoxication: a review of 131 cases. *Acad Emerg Med* 2000;7:906-910. doi:10.1111/j.1553-2712.2000.tb02069.x.
- Lee SH, Lee KS, Ahn JM, Kim SH, Hong SY. Paraquat poisoning of the lung: thin-section CT findings. *Radiology* 1995;195:271-274. doi.org/10.1148/radiology.195.1.7892484.

- Lemos AJJM, Peixoto CA, Teixeira AAC, Luna RLA, Rocha SWS, Santos HMP, Silva AKS, Nunes AKS, Wanderley-Teixeira V. Effect of the combination of metformin hydrochloride and melatonin on oxidative stress before and during pregnancy, and biochemical and histopathological analysis of the livers of rats after treatment for polycystic ovary syndrome. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014;280:159-168. doi:10.1016/j.taap.2014.05.015.
- Lemos AJJM, Wanderley-Teixeira V, Teixeira AAC, Silva FCA, Oliveira JV, Siqueira HAA. Response of blastocyst–endometrium interactions in albino rats to sublethal doses of biological and synthetic insecticides. *Food Chem Toxicol* 2011;49:2541-2547. doi:10.1016/j.fct.2011.06.063.
- Lheureux P, Leduc D, Vanbinst R, Askenasi R. Survival in a case of massive paraquat ingestion. *Chest* 1995;107:285-289. doi:10.1378/chest.107.1.285.
- López PM, Fiñana IT, De Agueda MCM, Sánchez EC, Muñoz MCM, Alvarez JP, Lozano EJT. Protective effect of melatonin against oxidative stress induced by ligation of extra-hepatic biliary duct in rats: comparison with the effect of S-adenosyl-L-methionine. *J Pineal Res* 2000;28:143-149. doi:10.1034/j.1600-079X.2001.280303.x.
- Malekinejad H, Rezabakhsh A, Rahmani F, Razi M. Paraquat exposure up-regulates cyclooxygenase-2 in the lungs, liver and kidneys in rats. *Iran J Pharm Res* 2013;12:887-896.
- Mårtensson J, Jain A, Meister A. Glutathione is required for intestinal 541 function. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:1715-1719.
- Martínez A, Reyes I, Reyes N. Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana. *Biomédica* 2007;27:594-604.
- Mascarenha TKSF, Pessoa YSRQ. Aspectos que potencializam a contaminação do trabalhador rural com agrotóxicos: uma revisão integrativa. *Trabalho & Educação* 2013;22:87-103.

- Mathes AM. Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World J Gastroenterol* 2010;48:6087-6097. doi:10.3748/wjg.v16.i48.6087.
- Mattaraia VGM, Moura ASAMT. Productivity of Wistar rats in different mating systems. *Ciência Rural* 2012;42:1490-1496. doi.org/10.1590/S0103-84782012000800026.
- Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, Gallego JG. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res* 2013; 54:1-14. doi:10.1111/j.1600-079X.2012.01014.x.
- Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, Burgos A, Nistico G. Potent protective effect of melatonin on *in vitro* paraquat-induced oxidative damage en rats. *Life Sci* 1995;56:83-89.
- Melchiorri D, Reiter RJ, Sewerynek E, Hara M, Chen L, Nistico G. Paraquat toxicity and oxidative damage reduction by melatonin. *Biochem Pharmacol* 1996;51:1095-1099. doi:10.1016/0006-2952(96)00055-x.
- Miller SC, Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJ. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol* 2006;87:81-87. doi:10.1111/j.0959-9673.2006.00474.x.
- Neves FF, Sousa RB, Pazin-Filho A, Cupo P, Júnior JE, Nogueira-Barbosa MH. Severe paraquat poisoning: clinical and radiological findings in a survivor. *J Bras Pneumol* 2010;36:513-516. doi.org/10.1590/S1806-37132010000400019.
- Niknafs B, Mehdipour A, Mohammadi AR. Melatonin improves development of early mouse embryos impaired by actinomycin-D and TNF- α . *Iran J Reprod Med* 2014;12:799-804.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. 2008. Available from URL <<http://www.oecdilibrary.org/docserver/download/9742501e.pdf?expires=1437358241&i>

d=id&accname=guest&checksum=A39A91E68C794DACA3C2671ABE4A9A03>

(citado em 12 junho 2014).

Ohta Y, Kongo M, Sasaki E, Ishiguro I, Harada N. Protective effect of melatonin against alpha naphthylisothiocyanate induced liver injury in rats. *J Pineal Res* 2000a;29:15-23. doi:10.1034/j.1600-079X.2000.290103.x.

Ohta Y, Kongo M, Sasaki E, Nishida K, Ishiguro I. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *J Pineal Res* 2000b;28:119-126. doi:10.1034/j.1600-079X.2001.280208.x.

Oliveira NP, Moi GP, Atanaka-Santos M, Silva AMC, Pignati WA. Malformações congênitas em municípios de grande utilização de agrotóxicos em Mato Grosso, Brasil. *Ciênc Saúde Coletiva* 2014;19:4123-4130.

Pablos MI, Chuang JI, Reiter RJ, Ortiz GG, Daniels WMV, Sewerynek E, Melchiorri D, Time course of melatonin-induced increase in glutathione peroxidase activity in chick tissues. *Biol Sign* 1996;4:324-330.

Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. *J Pharmacol Pharmacother* 2010;1:87-93. doi:10.4103/0976-500X.72350.

Peng J, Peng L, Stevenson FF, Doctrow S, Andersen JK. Iron and paraquat as synergistic environmental risk factors in sporadic Parkinson's Disease accelerate age-related neurodegeneration. *J Neurosci* 2007;27:6914-6922. doi:10.1523/JNEUROSCI.1569-07.2007.

Perla V, Perrin NA, Greenlee AR. Paraquat toxicity in a mouse embryonic stem cell model. *Toxicol in Vitro* 2008;22:515-524. doi:10.1016/j.tiv.2007.11.008.

- Peter B, Wartena M, Kampinga HH, Konings AW. Role of lipid peroxidation and DNA damage in paraquat toxicity and the interaction of paraquat with ionizing radiation. *Biochem Pharmacol* 1992;43:705-715.
- Pieniżek D, Bukowska B, Duda W. Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. *Pest Biochem Physiol* 2004;79:58-63. doi:10.1016/j.pestbp.2004.03.003.
- Prasad S, Srivastava S, Singh M, Shukla Y. Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of Swiss albino mice. *J Toxicol* 2009;2009:1-6. doi:10.1155/2009/308985.
- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997;29:363-372. doi:10.1055/s-2007-979057.
- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995;18:1-11. doi:10.1111/j.1600-079X.1995.tb00133.x.
- Reiter RJ, Tan D-X, Cabrera J, D'arpa D, Sainz RM, Mayo JC, Ramos S. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol Signals Recept* 1999;8:56-63. doi:10.1159/000014569.
- Reiter RJ, Tan D-X, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod* 2009;81:445-456. doi:10.1095/biolreprod.108.075655.
- Ren S, Correia MA. Heme: a regulator of rat hepatic tryptophan-2,3-dioxygenase? *Arch Biochem Biophys* 2000;377:195-203. doi:10.1006/abbi.2000.1755.
- Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1997;1362:116-127. doi:10.1016/S0925-4439(97)00067-7.

- Samai M, Samai HH, Hague T, Naughton D, Chatterjee PK. Novel superoxide dismutase mimetics for protection against paraquat-induced acute renal injury. *Sierra Leone J Biomed Res* 2010;2:54-64.
- Samsel A, Seneff S. Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases. *Entropy* 2013a;15:1416-1463. doi:10.3390/e15041416.
- Samsel A, Seneff S. Glyphosate, pathways to modern diseases II: celiac sprue and gluten intolerance. *Interdiscip Toxicol* 2013b;6:159-184. doi:10.2478/intox-2013-0026.
- Samsel A, Seneff S. Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. *Surg Neurol Int* 2015;-:45. doi:10.4103/2152-7806.153876.
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25:192-205.
- Senapati T, Mukerjee AK, Ghosh AR. Observations on the effect of glyphosate based herbicide on ultra structure (SEM) and enzymatic activity in different regions of alimentary canal and gill of *Channa punctatus* (Bloch). *J Crop Weed* 2009;5:236-245.
- Séralini G-E, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennequin D, Vendômois JS. Republished Study: long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Env Sci Eur* 2014;26:1-17. doi:10.1186/s12302-014-0014-5.
- Serra A, Domingos F, Prata MM. Intoxicação por paraquat. *Acta Med Port* 2003;16:25-32.
- Sigala F, Theocharis S, Sigalas K, Markantonis-Kyroudis S, Papalabros E, Triantafyllou A, Kostopanagiotou G, Andreadou I. Therapeutic value of melatonin in an experimental model of liver injury and regeneration. *J Pineal Res* 2006;40:270-279. doi:10.1111/j.1600-079X.2005.00310.x.

- Singh M, Jadhav HR. Melatonin: functions and ligands. *Drug Discov Today* 2014;19:1410-1418. doi:10.1016/j.drudis.2014.04.014.
- Singh SS, Haldar C. Peripheral melatonin modulated seasonal immunity and reproduction of Indian tropical bird, *Perdicula asiatica*. *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* 2007;146:446-450. doi:10.1016/j.cbpa.2006.12.024.
- Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Brzezinski 643 A, Bhatnagar KP, Cardinali DP. Melatonin, immune function and cancer. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2011;5:109-123. doi:10.2174/187221411799015408.
- Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 2002;30:65-77. doi:10.1016/S0300-483X(02)00382-7.
- Tan D-X, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W-B, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta* 1999;1472:206-214. doi:10.1016/S0304-4165(99)00125-7.
- Tominack RL, Yang GY, Tsai WJ, Chung HM, Deng JF. Taiwan National Poison Center survey of glyphosate surfactant herbicide ingestions. *J Toxicol Clin Toxicol* 1991;29:91-109. doi:10.3109/15563659109038601.
- Trezzi MM, Felippi CL, Nunes AL, Carnieletto CE, Ferreira ARJ. Eficácia de controle de plantas daninhas e toxicidade ao milho da mistura de foramsulfuron e iodosulfuron isoladamente ou em associação com atrazine e/ou clorpirifós. *Planta Daninha* 2005;23:653-659. doi.org/10.1590/S0100-83582005000400013.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. 1996. Available from URL

<<http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/REPRO51.PDF>> (citado em 4 dezembro 2014).

Unkila M, Pohjanvirta R, Tuomisto J. Body weight loss and changes in tryptophan homeostasis by chlorinated dibenzo-p-dioxin congeners in the most TCDD-susceptible and the most TCDD resistant rat strain. *Arch Toxicol* 1998;72:769-776. doi:10.1007/s002040050572.

Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999;27:838-847. doi:10.1016/S0891-5849(99)00131-8.

Villadiego MS, Sánchez MCM, Sánchez MLS, Rodríguez SG, Kuhn GR. Estudio histopatológico de las lesiones hepáticas inducidas por Paraquat. *Cuad Med Forense* 2005;11:113-117.

Walsh HA, Daya S, Whiteley CG. Mode of inhibition of rat liver 669 tryptophan pyrrolase by melatonin. *J Pineal Res* 1994;16:188-192. doi:10.1111/j.1600-079X.1994.tb00100.x.

Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000;31:117-165. doi:10.1006/rtph.1999.1371.

Yousef MI, Salem MH, Ibrahim HZ, Helmi S, Seehy MA, Bertheussen K. Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. *J Environ Sci Health* 1995;30:513-534. doi:10.1080/03601239509372951.

Yue Y, Zhang Y, Zhou L, Qin J, Chen X. In vitro study on the binding of herbicide glyphosate to human serum albumin by optical spectroscopy and molecular modeling. *J Photochem Photobiol B Biol* 2008;90:26-32. doi:10.1016/j.jphotobiol.2007.10.003.

Zhang Z, Jian X, Zhang W, Wang J, Zhou Q. Using bosentan to treat paraquat poisoning-induced acute lung injury in rats. PLoS ONE 2013;8:e75943. doi:10.1371/journal.pone.0075943.

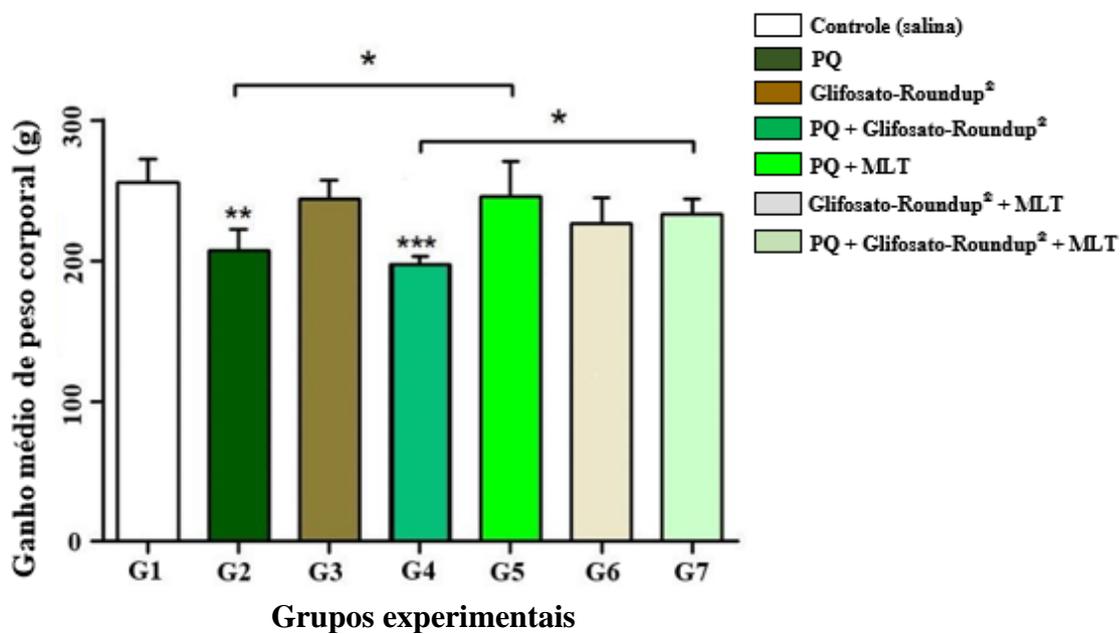


Figura 1. Ganho médio de peso das ratas prenhes durante a exposição aos herbicidas e tratamento com a MLT do primeiro até o sétimo dia de prenhez. Todos os valores representam média \pm erro padrão de sete grupos experimentais. (*) indica diferença significativa entre o grupo controle e os grupos expostos aos herbicidas. Notar que a exposição ao Paraquat (PQ) e sua associação com o Glifosato-Roundup[®] apresentou perda de peso ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ e prevenção da perda quando tratado com melatonina (MLT) * $p < 0,05$ (ANOVA/Tukey).

Tabela 1. ¹Avaliação de parâmetros hematológicos dos grupos experimentais expostos aos herbicidas e tratados com MLT.

³ Parâmetros hematológicos	² Tratamentos							F Estatística P
	Controle	PQ	Glifosato-Roundup®	Glifosato-Roundup® + PQ	PQ + MLT	Glifosato-Roundup® + MLT	Glifosato-Roundup® + PQ + MLT	
Eritrócitos (10⁶/mm³)	8,9±0,4a	3,3±0,2c	5,3±0,3b	1,4±0,3d	7,2±0,6a	8,1±0,4a	5,2±0,3b	47,99 ^{0,0001}
Hemoglobina (g/dL)	17,1±0,5a	7,2±0,6d	10,8±1,0c	3,6±0,5e	14,6±1,0ab	15,4±0,7ab	12,3±0,4bc	43,47 ^{0,0001}
Hematócrito (%)	46,0±0,7a	24,6±2,7c	32,6±1,1b	16,8±1,2d	39,6±1,4a	42,6±0,9a	33,0±1,2b	50,49 ^{0,0001}
Total de leucócitos (mil/mm³)	6,0±0,4a	9,0±2,3c	12,6±0,2b	15,6±1,1d	6,1±0,6a	5,5±0,4a	6,1±0,4a	52,50 ^{0,0001}
Neutrófilos segmentados (%)	44,6±1,4a	68,0±1,9b	57,0±1,9c	78,0±2,0d	43,8±1,2a	47,0±1,0a	42,4±1,0a	79,98 ^{0,0001}
Linfócitos (%)	61,0±1,9a	37,6±1,1c	49,0±2,9b	22,0±1,2d	59,0±1,9a	60,0±2,0a	46,0±1,0b	61,34 ^{0,0001}
Eosinófilos (%)	3,2±0,2a	4,4±0,5a	3,6±0,8a	8,8±0,5b	2,8±0,4a	2,6±0,5a	4,4±0,7a	15,35 ^{0,0001}
Monócitos (%)	1,8±0,4a	2,0±0,4a	1,8±0,4a	3,2±0,6a	4,2±0,9a	2,6±0,8a	3,6±0,7a	2,36 ^{0,0571}

¹Dados apresentados como média ± EPM.

²Glifosato-Roundup® (500mg/kg/dia), PQ (Paraquat 50mg/kg/dia) via gavagem e MLT (Melatonina 10mg/kg/dia) via intraperitoneal. Animais/grupo (n = 5).

³Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey HSD nível de 5% de significância.

Tabela 2. ¹Análise da função hepática dos grupos experimentais expostos aos herbicidas e tratados com MLT.

³ Parâmetros	² Tratamentos							F Estatística P
	Controle	PQ	Glifosato-Roundup [®]	Glifosato-Roundup [®] + PQ	PQ + MLT	Glifosato-Roundup [®] + MLT	Glifosato-Roundup [®] + PQ + MLT	
Número de ratas prenhes	5	5	5	5	5	5	5	
Albumina (g/dL)	5,8±0,4a	1,9±0,2c	3,3±0,2b	0,4±0,1d	5,0±0,4a	5,4±0,3a	3,4±0,3b	43,21 ^{0,0001}
Aspartato Aminotransferase (U/L)	35,0±1,4a	53,7±0,6b	41,7±1,7c	68,6±1,9d	38,6±1,5a	39,0±1,3a	33,0±0,8a	97,68 ^{0,0001}
Alanina Aminotransferase (U/L)	24,0±1,4ab	43,1±1,0d	36,1±1,7c	58,1±1,1e	21,4±1,0a	24,5±0,8ab	27,3±0,8b	133,28 ^{0,0001}
Fosfatase alcalina (U/L)	120,4±10,3a	228,0±12,4b	172,0±8,6c	273,2±5,1d	109,0±5,2a	114,1±5,0a	102,0±7,3a	68,00 ^{0,0001}

¹Dados apresentados como média ± EPM.

²Glifosato-Roundup[®] (500mg/kg/dia), PQ (Paraquat 50mg/kg/dia) via gavagem e MLT (Melatonina 10mg/kg/dia) via intraperitoneal. Animais/grupo (n = 5)

³Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey HSD nível de 5% de significância.

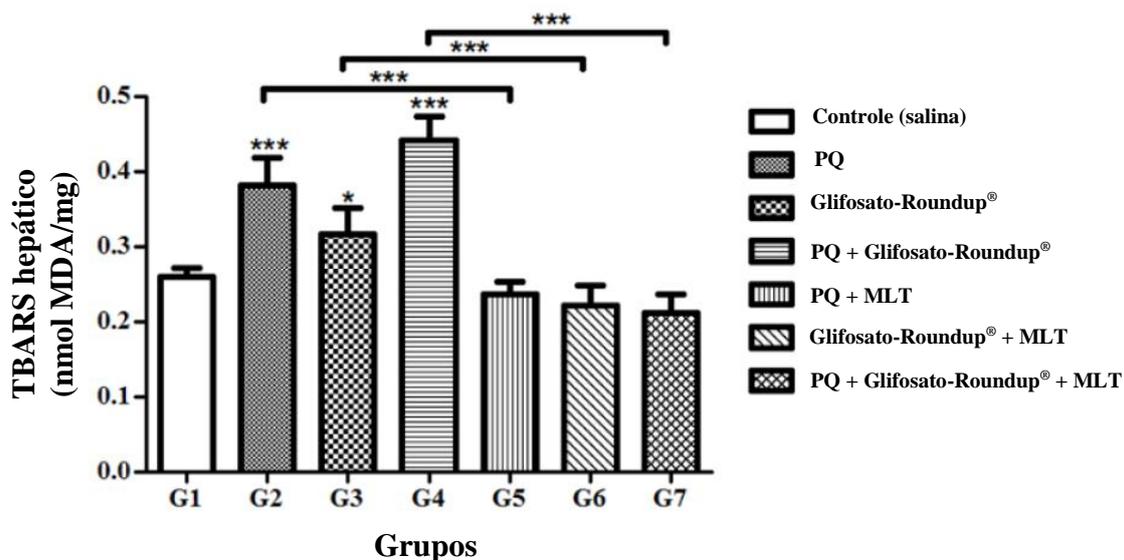


Fig. 2. Avaliação da peroxidação lipídica em fêmeas ao sétimo dia de prenhez (grupos G1-G7). Média \pm erro padrão de TBARS hepático nos grupos experimentais ($n = 5$). (*) indica diferença significativa entre o grupo controle e os grupos expostos aos herbicidas Paraquat (PQ) e Glifosato-Roundup® $*p < 0,05$ $***p < 0,001$ e prevenção da elevação dos níveis quando tratado com melatonina (MLT) $*p < 0,001$ (ANOVA/Tukey).

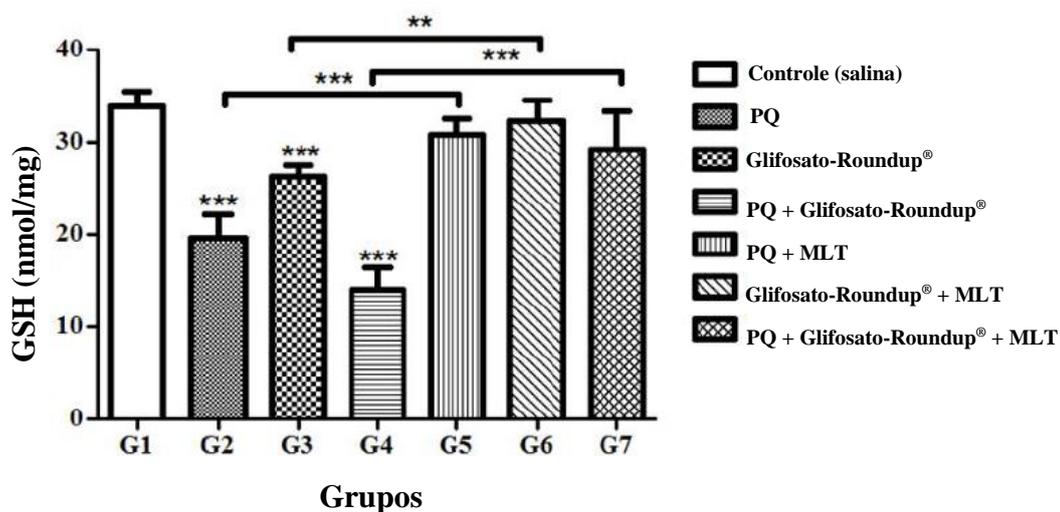


Fig. 3. Avaliação do nível de GSH em fêmeas ao sétimo dia de prenhez (grupos G1-G7). Média \pm erro padrão de GSH hepático nos grupos experimentais ($n = 5$). (*) indica diferença significativa entre o grupo controle e os grupos expostos aos herbicidas Paraquat (PQ) e Glifosato-Roundup® $***p < 0,001$ e prevenção da redução dos níveis de GSH quando tratado com melatonina (MLT) $***p < 0,001$ $**p < 0,01$ (ANOVA/Tukey).

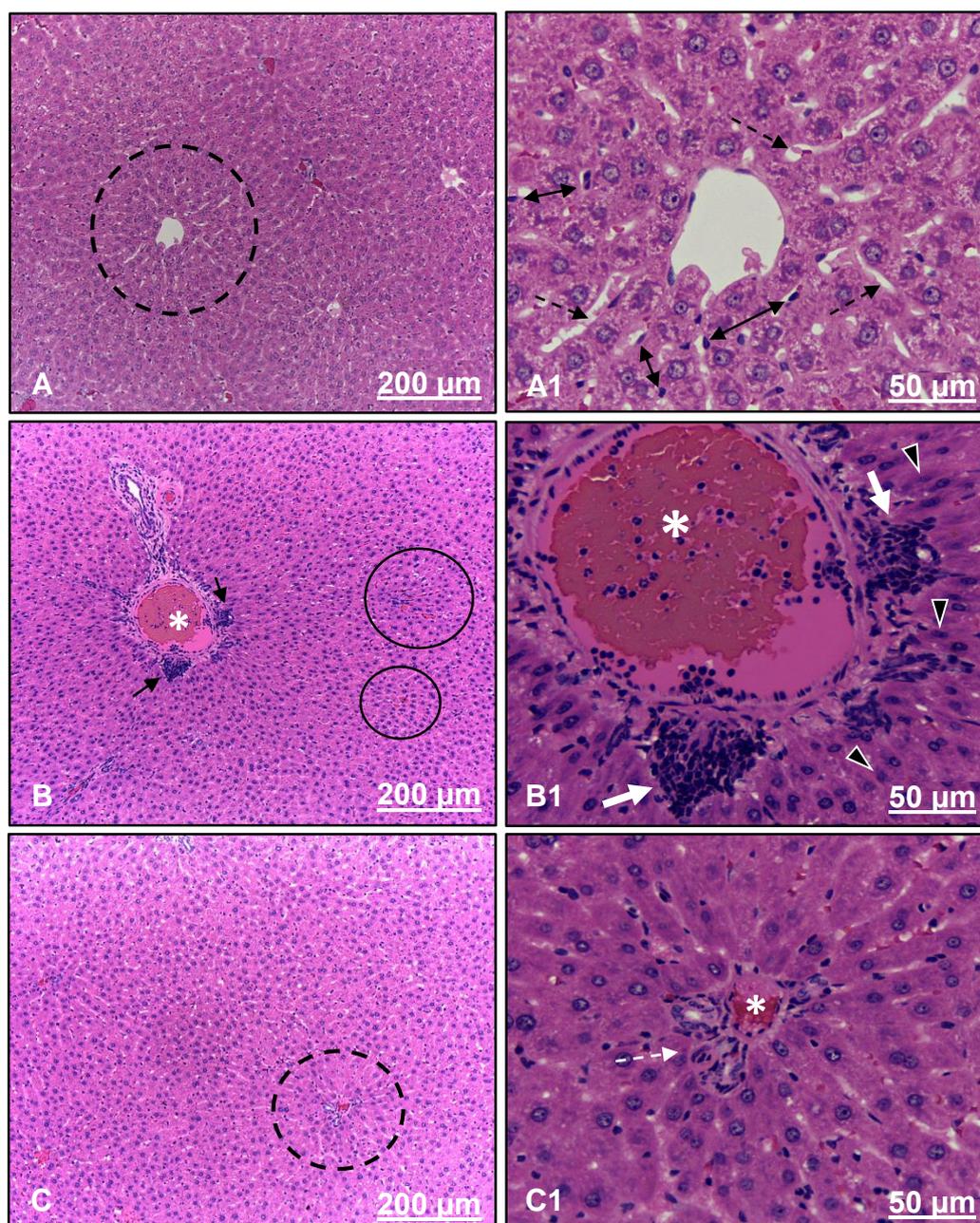
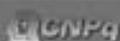


Fig. 4. Fotomicrografias do fígado de ratas prenhes expostas aos herbicidas Paraquat e Glifosato-Roundup® e tratados com Melatonina. (A e A1) Controle. Notar em A veia centro lobular circundada por cordões de hepatócitos (círculo tracejado). Em A1 evidenciar capilares sinusoides (setas tracejadas) entre os hepatócitos e células de Kupffer (dupla seta). Alterações histológicas no grupo exposto aos herbicidas associados (B e B1). Notar em (B) congestão dos capilares sinusoides (círculos contínuos) e na veia porta (asterisco), infiltrado inflamatório portal (setas). Em (B1) hepatócitos necróticos (pontas de setas), além do infiltrado e congestão da veia porta. Grupo tratado com MLT (C e C1). Notar em (C) parênquima preservado com veia centro lobular circundada por cordões de hepatócitos (círculo tracejado), porém com áreas de reação inflamatória focal (seta tracejada) e congestão discretas (asterisco) (Fig. C1). Escalas de barras: 50 e 200 µm.



PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Brazilian Journal of Veterinary Research



- Principal
- Sobre a Revista
- Artigos
- Autores
- Assinatura
- Contatos

Volumes

Volume 35, 2015

SUBMISSÃO DE ARTIGOS



Clique em "Submeter Artigo" e através do "Modelo de Submissão" e das "Instruções aos Autores", confira ou adapte rigorosamente seu artigo às normas da revista

SUBMETER ARTIGO

ASSINATURA



Mantenha-se atualizado!



ASSINE AGORA!



35(1): 1-104



35(2): 105-207



35(3): 209-318



35(4): 319-389



35(5): 391-490



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc.manuscriptcentral.com/pvbscielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob a forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (*paper charge*) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;

c) o ABSTRACT deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de "INDEX TERMS" que incluem palavras do título;

d) o RESUMO deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos "TERMOS DE INDEXAÇÃO" que incluem palavras do título;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome

do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do "Inserir nota de fim", do Word. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corradamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois artigos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada em caixa alta e baixa, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. As legendas explicativas das Figuras devem conter informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).

5. Os Quadros devem ser explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. Não há traços verticais, nem fundos cinzas. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Symbol Legend		
Symbol	Name	Definition
†	Pilcrow (paragraph symbol)	1st set of equal contributors
&	Ampersand	2nd set of equal contributors
*	Asterisk	Corresponding author(s)
#a	Pound/number sign	First Current address
#b	Pound/number sign	Second Current address
‡	Dagger/Cross	Deceased
^	Caret	Consortium/Group Authorship

This is the Article Title

John Doe[†], Antonie Data[†], Johannes van Stat^{1,4*}, Marie Testperson², David Ribosome Jr.³, Gregory H.T. McBio^{4,5}, Angela Reviewerson^{1,2*}, Marina Measure^{1*}, on behalf of The Bunny Genome Sequencing Consortium[^]

¹ Department, Institution, City, State, Country

² Department of Dermatology, Division of Rabbit Health, Section of Veterinary Medicine, St. Hare Hospital, San Francisco, California, United States of America

³ Department of Libraries and Archives, National Contemporary Bunny Museum, Lagomorph, Connecticut, United States of America

⁴ Department of Restoration, National Contemporary Bunny Museum, Lagomorph, Connecticut, United States of America

⁵ Department of Archaeology, Bunny University, Lagomorph, Connecticut, United States of America

^{4*}Current Address: Department of Carrot Science, Bunny University, Lagomorph, Connecticut, United States of America

^{4*}Current Address: Department of Canine Evasion, Bunny University, Lagomorph, Connecticut, United States of America

* Corresponding author

E-mail: testperson@university.ed (MT)

[†]These authors contributed equally to this work.

^{4*}These authors also contributed equally to this work.

[^]Membership of the Bunny Genome Sequencing Consortium is provided in the Acknowledgments.

Article Title

- Italics, bold type, symbols, and other text formatting will all be reproduced in the published article as submitted.
- Capitalization will be automatically formatted in the published article according to PLOS style.

Author Byline

- Author names will be published exactly as they appear in the accepted manuscript.
- Indicate affiliations by number only.
- Affiliation footnotes should appear in numerical order at first mention.
- Please use the symbols provided in this document for other designations.
- Numbers and symbols should be in superscript.
- Do not include titles (Dr., PhD, Professor, etc.).

Affiliations

- Affiliations will be published as they appear in the accepted manuscript.
- Include each component in order of small to large (Department, Division, Section, Institution, City, State, Country).
- Do not include ZIP or Postal Codes, street addresses, or building/office numbers.
- Do not use abbreviations (e.g. Dept.).
- Do not list positions within an institution (e.g. Department Chair, Professor, etc.).
- List each affiliation individually and in full.

Corresponding Authorship

- Do not include physical addresses; only email addresses are required.
- List corresponding author's initials in parentheses after the email address.

Contributorship

- Use the symbols provided here to indicate equal contributions.
- If you would like the equal contributions notes to read differently, please specify in your manuscript (e.g., "AR and MM are Joint Senior Authors").

Consortia or other Group Authors

- If there is a consortium or group author on your manuscript, please provide a note that describes where the full membership list is available for the readers.
- The membership list can be listed in the Acknowledgments, in Supporting Information, or on the internet.
- Consortia/Group authors can have affiliations, but it is not required.

Modified January 2015

Abstract ←

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce sodales vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris vel pulvinar. Suspendisse sagittis malesuada urna. Praesent mauris diam, fringilla id fringilla ac, posuere non lorem. Vestibulum mauris ante, fringilla quis tortor sit amet, accumsan fermentum quam. Nulla dictum consectetur leo. Ut vulputate ipsum purus, a interdum nibh viverra et. Praesent aliquam sapien vel massa sodales bibendum. Nulla interdum accumsan lectus, sed auctor elit accumsan a. Suspendisse quis rhoncus nibh. The verum est de illic.

Introduction ←

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec pharetra quam, vitae convallis nunc.

Materials and Methods

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae (Fig 1) interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce sodales vulputate auctor. Nam sit amet nulla lacus a, (Figs 1 and 2) ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum magna pellentesque vitae.

Fig 1. This is the Fig 1 Title. This is the Fig 1 legend.

Fig 2. This is the Fig 2 Title. This is the Fig 2 legend.

File Naming for Figures

- Figure files should be saved as "Fig1.tif", "Fig2.eps", etc.
- Acceptable file formats for figures are ".tif", ".tiff", and ".eps"
- Figures should be uploaded separately as individual files.
- PLOS ONE guidelines for figures can be found here: <http://journals.plos.org/plosone/s/figures>

Level 1 Heading

- Use Level 1 heading for all major sections (Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, etc.).
- Bold type, 18pt font.
- Only use italics and text formatting where needed (e.g. genus and species names, genes, etc.).
- Do not use ALL CAPS.

NOTE: Do not cite figures, tables, supporting information, or references in the Abstract.

Figure Citations

- Cite figures as "Fig 1", "Fig 2", etc.
- Cite figures and tables in order.
- Do not cite "Fig 2" before "Fig 1".
- Cite multiple figures as "Figs 1 and 2", "Figs 1-3", etc.

Figure Legends

- Each figure legend should appear directly after the paragraph in which they are first cited or listed at the end of the manuscript.
- Do not include tables within legends.
- Use bold type for the figure titles.

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor interdum. Donec p^2 et q^2 tincidunt porta sem nec hendrerit.

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad (1)$$

Vestibulum nec pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce sodales vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris vel pulvinar dolor sit amet en $(p+q)^2 = 1$.

Display/Numbered Equation

- Format display equations in Mathtype or Equation Tools.
- Do not use Graphic Objects.

Inline Equation

- Format in regular text or as an inline equation in Mathtype or Equation Tools
- Do not use Symbol Font.
- Do not use Graphic Objects.

Genotyping

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Omnes tuum basi sunt pertinent ad nos. Mauris in mattis sapien. Fusce sodales vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris vel pulvinar et alst.

Whole genome RFLP analysis

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce sodales vulputate auctor. Numquam iens dare tibi up.

Level 2 Heading

- Use Level 2 headings for sub-sections of major sections.
- Bold type, 16pt font.
- Only use italics and text formatting where needed.
- Do not use ALL CAPS.

Level 3 heading

- Use Level 3 headings for sub-sections within Level 2 headings.
- Bold type, 14pt font.
- Only use italics and text formatting where needed.
- Do not use ALL CAPS.

Results and Discussion

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, et bland [Table 1](#). Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec pharetra quam, vitae convalli. Fido nemo.

Table 1. This is the Table 1 Title.

	Chemical W	Chemical X	Chemical Y	Chemical Z
Chemical 1	Reaction 1W	Reaction 1X	Reaction 1Y	Reaction 1Z
Chemical 2	Reaction 2W	Reaction 2X	Reaction 2Y	Reaction 2Z
Chemical 3	Reaction 3W ^a	Reaction 3X	Reaction 3Y ^b	Reaction 3Z
Chemical 4	Reaction 4W	Reaction 4X	Reaction 4Y	Reaction 4Z
Chemical 5	Reaction 5W	Reaction 5X	Reaction 5Y	Reaction 5Z

This is the Table 1 legend.

^aTable footnotes belong here.

^bFootnotes should have corresponding symbols in the table.

Tables and Table Citations

- Tables should be cited as "Table 1", "Table 2", etc.
- Cite multiple tables as "Tables 1 and 2", "Tables 1-3", etc.
- Tables should be included directly after the paragraph in which they are first cited.
- Tables must be cell-based in Microsoft Word or embedded with Microsoft Excel
- No vertically merged cells.
- No hard returns.
- Do not use empty rows to create spacing.
- Do not include graphic objects, images, colored text, or shading patterns.
- Typeset tables will be formatted to match PLOS ONE style.
- See PLOS ONE Table Guidelines for more complete instructions: <http://journals.plos.org/plosone/s/tables>

Conclusions

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing [\[1-5\]](#). Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce sodales vulputate auctor [S1 Fig](#). Dolor sit amet [S1 and S2 Tables](#).

Reference Citations

- Cite references in brackets (for example, "[1]" or "[2-5]" or "[3,7,9]").
- References must be cited in order at first mention.

Supporting Information Citations

- Format Supporting Information Citations as "S1 Fig", "S1 Table", etc
- Cite multiple files as "S1 and S2 Figs", "S1-S3 Figs", etc.
- It is not required to cite each supporting information file
- Supporting information should be uploaded separately as individual files.

Acknowledgments

Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit. Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor interdum.

Acknowledgments

- Do not include funding or competing interests information in Acknowledgments.

References

1. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr, McBio GHT, et al. This is the article title. PLoS One 2014 Dec 18; 9(12).
2. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr, McBio GHT, et al. Bunny dynamics in cartoon landscapes. PLoS One. Forthcoming 2015.

References

- References should be listed after the main text, before the supporting information.
- References with more than six authors should list the first six author names, followed by "et al."
- Please see the PLOS ONE guidelines for References here: <http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines#loc-references>

Supporting Information

S1 Fig. This is the S1 Fig Title. This is the S1 Fig legend.

S2 Fig. This is the S2 Fig Title. This is the S2 Fig legend.

S1 Table. This is the S1 Table Title. This is the S1 Table legend.

S2 Table. This is the S2 Table Title. This is the S2 Table legend.

S1 File. This is the S1 File Title. This is the S1 File legend.

File Naming for Supporting Information

- Supporting Information files should be saved as "S1_Fig.tif", "S1_File.pdf", etc.
- All file types are supported.

Supporting Information Legends

- List Supporting Information legends at the end of the manuscript in a section titled "Supporting Information"
- Use a Level 1 heading.
- Use bold type for the titles.
- Supporting Information files do not require full legends, only titles are required.

Please also see the PLOS ONE Submission Guidelines which can be found here: <http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>

For assistance preparing figures, please contact figures@plos.org

For assistance with other formatting requirements, contact plosone@plos.org



TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0940-2993

DESCRIPTION

The international multidisciplinary journal is devoted to the publication of studies covering the whole range of experimental research on disease processes and toxicology including cell biological investigations. Its aim is to support progress in the interdisciplinary cooperation of researchers working in pathobiology, toxicology, and cell biology independent of the methods applied. During the past decades increasing attention has been paid to the importance of toxic influence in the pathogenesis of human and animal diseases. This is why *Experimental and Toxicologic Pathology* meets the urgent need for an interdisciplinary journal felt by a wide variety of experts in medicine and biology, including pathologists, toxicologists, biologists, physicians, veterinary surgeons, pharmacists, and pharmacologists working in academic, industrial or clinical institutions.

AUDIENCE

Pathologists, pathophysiologists, toxicologists, pharmacologists, pharmacists, veterinary surgeons, veterinary pathologists, specialists in animal experimentation

IMPACT FACTOR

2014: 1.860 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS

Chemical Abstracts
Current Advances in Cancer Research
Current Advances in Ecological and Environmental Sciences
Current Contents/Life Sciences
Dairy Science Abstracts
MEDLINE®
Index to Dental Literature
Index to Scientific Reviews
Helminthological Abstracts
INIS Atomindex
Referativnyi Zhurnal VINTI-RAN (Russian Academy of Sciences)
Research Alert
Review of Medical and Veterinary Mycology
SCISEARCH
Science Citation Index
Biological Abstracts
Elsevier BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences
EMBASE/Excerpta Medica
Scopus

EDITORIAL BOARD

Executive Editor

Ulrich Mohr, Cultex-Laboratories GmbH, Hannover, Germany

Editorial Office

Christine Weidl

Editorial Board

Clemens Allgaler, ACA-pharma concept GmbH, Leipzig, Germany
Michaela Aufderheide, Cultex-Laboratories GmbH, Hannover, Germany
Gary A. Boorman, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), Research Triangle Park, North Carolina, USA
Daniel L. Costa, U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Research Triangle Park, North Carolina, USA
Clemens Dasenbrock, Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Hannover, Germany
Makito Emura, Hannover Medical School, Hannover, Germany
Makoto Enomoto, Nishichiyoda, Shizuoka, Japan
Heinrich Ernst, Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Hannover, Germany
Christian Fleck, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany
Ellen Fritsche, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany
Per Gerde, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden
Axel Hahn, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Germany
Takanori Harada, The Institute of Environmental Toxicology, Ibaraki, Japan
Jerry F. Hardisty, Experimental Pathology Laboratories, Inc., Research Triangle Park, NC, USA
Jack R. Harkema, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA
Wolf-Dieter Heller, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe, Germany
Wolfgang F. Hölderich, RWTH Aachen University, Aachen, Germany
Eberhard Karbe, Wülfrath, Germany
Hajime Kojima, National Institute of Health Sciences (NIHS), Tokyo, Japan
Georg Josef Krinke, Frenkendorf, Switzerland
Wenli Li, Fourth Military Medical University, Xi'an, China
Amelie Lupp, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany
Robert Maronpot, Maronpot Consulting, LLC, Raleigh, NC, USA
Lutz Müller, Dresden, Germany
Dai Nakae, MD, PhD, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan
Yasuo Ohno, National Institute of Health Sciences (NIHS), Tokyo, Japan
Jürgen Pauluhn, Bayer HealthCare AG, Wuppertal, Germany
Jessica Rach, Deutsches Rotes Kreuz Springe, Springe, Germany

Susanne Rittinghausen, Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Hannover, Germany
Stefanie Scheffler, Garbsen, Germany
Gerhard Scherer, ABF Analytically-Biological Research Lab GmbH, Munich, Germany
Jean-Claire Seagrave, Lovelace Respiratory Research Institute, Albuquerque, NM, USA
Hasso Selbert, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel, Germany
Troy Seidle, Humane Society International, Toronto, Canada
Toshio Sofuni, National Institute of Health Sciences (NIHS), Tokyo, Japan
Richard Vogel, Berlin Toxicology Office GmbH, Berlin, Germany
Klaus Wettig, Berlin, Germany
Jyoji Yamate, Osaka Prefecture University, Osaka, Japan
Midori Yoshida, National Institute of Health Sciences (NIHS), Tokyo, Japan
Katsuhiko Yoshizawa, Kansai Medical University, Osaka, Japan

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The international multidisciplinary journal *Experimental and Toxicologic Pathology* is devoted to the publication of studies covering the whole range of experimental research on disease processes and toxicology including cell biological investigations. Its aim is to support progress in the interdisciplinary cooperation of researchers working in pathobiology, toxicology, and cell biology independent of the methods applied. During the past decades increasing attention has been paid to the importance of toxic influence in the pathogenesis of human and animal diseases. This is why *Experimental and Toxicologic Pathology* has accepted the challenge to meet the urgent need for an international multidisciplinary journal felt by a wide variety of experts in medicine and biology, including pathologists, toxicologists, biologists, physicians, veterinary surgeons, pharmacists, and pharmacologists working in academic, industrial or clinical institutions. *Experimental and Toxicologic Pathology* publishes original articles, short communications and reviews, and particularly welcomes contributions addressing *in vitro* studies.

Types of paper

Full Length Article, Short Communication, Review Article, Erratum, Editorial, Letter to The Editor.

Contact details for submission

All manuscripts should be submitted online to <http://ees.elsevier.com/etp>

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of Interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Clinical trial results

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2050**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and begins from the publication date of the issue your article appears in.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the *Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals*, <http://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/etp>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/experimental-and-toxicologic-pathology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated in wheat (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51-9.

Reference to a book:

Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc; 2009. p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/about/content-innovation/virtual-microscope>. Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual

Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Additional information

Manuscripts should not exceed 30 typewritten pages for original articles and 6 typewritten pages for short communications (incl. tables and figure legends). The editors reserve to themselves the right of condensing any paper submitted.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 9 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>