



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

ROSE MEIRE RIÇATO UEDA

**NEUROTOXICIDADE ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO CRÔNICA VIA INALATÓRIA E
VIA ORAL AO ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D) EM RATOS**

Presidente Prudente - SP
2020

ROSE MEIRE RIÇATO UEDA

**NEUROTOXICIDADE ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO CRÔNICA VIA INALATÓRIA E
VIA ORAL AO ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D) EM RATOS**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai

616.8
U22n

Ueda, Rose Meire Riçato.

Neurotoxicidade associada à exposição crônica via inalatória e via oral ao ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) em ratos / Rose Meire Riçato Ueda. – Presidente Prudente, 2020.

80 f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)
- Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.

Bibliografia.

Orientador: Gisele Alborghetti Nai

1. Herbicida. 2. Cérebro. 3. Exposição Ambiental. I. Nai, Gisele Alborghetti. II. Título.

Catálogo na fonte: Michele Mogni – CRB 8-6204

ROSE MEIRE RIÇATO UEDA

NEUROTOXICIDADE ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO CRÔNICA VIA INALATÓRIA E VIA ORAL AO ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D) EM RATOS

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 16 de novembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Giovana Rampazzo Teixeira
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Karina Maria Basso
Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL
Londrina - PR

Profa. Dra. Cecilia Laposy Santarém
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho, pelo carinho, pelo apoio e companheirismo de sempre; por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Dra. Gisele Alborghetti Nai, por toda orientação, pelo grande incentivo e pela confiança no meu trabalho.

A veterinária Gracielle Vieira Gonçalves do Biotério de Experimentação de Ciência Animal, da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, pela colaboração e disponibilidade constante.

A bibliotecária Jakeline Queiroz Ortega da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, pela maneira prestativa e eficiente com que sempre acolheu às minhas necessidades.

Aos professores da banca de qualificação e que participaram também da defesa, Profa.Dra. Cecilia Laposy Santarém e Profa.Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira, e aos que estiveram presentes somente na banca de defesa Profa.Dra. Giovana Rampazzo Texeira e Profa. Dra. Karina Maria Basso agradeço pelas considerações ao presente trabalho e sugestões de aprimoramento.

A Prof. Dra Regina Gioconda Andrade, coordenadora do Curso de Psicologia da Unoeste, por sua amizade e pelo incentivo

A Dra. Angela Patricia França, pelo acolhimento no Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universtitário -Trindade.

Ao prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, pela oportunidade, de acompanhamento das atividades no Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas e realização de disciplinas no Programa de Pós- Graduação em Farmacologia, na Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universtitário - Trindade.

Aos amigos Rogério Buchalla, Maria Olivia Belfort e Rosimeire Carvalho pelo apoio nos momentos solicitados.

Aos professores e funcionários do curso de Pós Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade convívio e pelos ensinamentos.

A todos os colegas da Pós Graduação em Ciência Animal, com quem passei bons momentos no decorrer do curso.

“A terra, abandonada à sua fertilidade natural e coberta de florestas imensas que o machado nunca mutilou, oferece a cada passo provisões e abrigos aos animais de toda espécie. Dispersos entre eles, os homens observam, imitam seu engenho e elevam-se até o instinto dos animais, com a vantagem de que cada espécie tem apenas seu próprio instinto, enquanto o homem, não tendo talvez nenhum que lhe pertença, apropria-se de todos, alimentando-se igualmente da maior parte dos alimentos diversos que os animais dividem entre si e, portanto, encontrando sua subsistência mais facilmente, como nenhum deles pode fazer.”

Jean-Jacques Rousseau

RESUMO

Neurotoxicidade associada à exposição crônica via inalatória e via oral ao ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) em ratos

Os herbicidas são agentes constituídos por uma grande variedade de compostos químicos ou biológicos, desenvolvidos para eliminar, combater, repelir ou controlar insetos. A ingestão, respiração ou contato dérmico com agrotóxicos da classe dos ácidos fenoxiacéticos, como o ácido diclorofenóxiacético (2,4-D), pode causar perda de apetite, enjôo, vômito, fasciculação muscular e até mesmo câncer. A neurotoxicidade associada ao 2,4-D é controversa. O objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito neurotóxico da exposição crônica por via oral e inalatória do herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D). Para a realização dos experimentos, foram utilizados 80 ratos adultos, machos (200-250g) divididos em oito grupos (n=10): Grupo 1: nebulização com solução de cloreto de sódio (NaCl); Grupo 2: ração nebulizada com solução de cloreto de sódio (NaCl); Grupo 3: nebulização com herbicida com $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha); Grupo 4: ração nebulizada com herbicida na concentração de $3,71 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha; Grupo 5: nebulização com herbicida com $6,19 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha; Grupo 6: ração nebulizada com herbicida na concentração de $6,19 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha; Grupo 7: nebulização com herbicida com $9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha; Grupo 8: ração nebulizada com herbicida na concentração de $9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha. Nebulização diária por 15 minutos durante 6 meses. Para avaliação comportamental os testes comportamentais utilizados foram: Teste de campo aberto e Labirinto em Cruz Elevado, cujo objetivo será a observação do estado geral de saúde, dos reflexos neurológicos, das habilidades sensoriais e da função motora dos animais utilizados. Animais de todos os grupos foram eutanasiados 6 meses após o início do experimento. Foi coletado cérebro para análise histológica e imunoistoquímica. A administração do 2,4-D por seis meses acarretou em déficit aos testes neurocomportamentais que avaliaram locomoção e nível de ansiedade, independente da via de exposição (oral ou inalatória). Houve necrose individual de neurônios e diminuição da espessura do córtex cerebral associada a aumento da expressão do anticorpo BAX (um marcador pró-apoptótico). Este estudo demonstrou que o 2,4-D leva a neurodegeneração do sistema nervoso central por desregulação de proteínas pró-apoptóticas.

Palavras-chave: herbicidas, cérebro, modelo experimental, exposição ambiental, testes neuropsicológicos

ABSTRACT

Neurotoxicity associated with chronic inhalation and oral exposure to dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rats

Herbicides are agents made up of a wide variety of chemical or biological compounds designed to eliminate, fight, repel or control insects. Ingestion, respiration, or dermal contact with pesticides of the phenoxyacetic acid class, such as dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), can cause loss of appetite, nausea, vomiting, muscle fasciculation, and even cancer. 2,4-D-associated neurotoxicity is controversial. The aim of this study was to evaluate the possible neurotoxic effect of chronic oral and inhalation exposure of the herbicide dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). For the experiments, 80 male adult rats (200-250g) were divided into eight groups (n = 10): Group 1: nebulization with sodium chloride solution (NaCl); Group 2: food nebulized with sodium chloride solution (NaCl); Group 3: herbicide nebulization with 3.71×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (g.i.a / ha); Group 4: nebulized feed with herbicide at a concentration of 3.71×10^{-3} g.i.a / ha; Group 5: 6.19×10^{-3} g.i.a / ha herbicide nebulization; Group 6: herbicide nebulized feed at a concentration of 6.19×10^{-3} g.i.a / ha; Group 7: 9.28×10^{-3} g.i.a / ha herbicide nebulization; Group 8: Nebulized herbicide feed at a concentration of 9.28×10^{-3} g.i.a / ha. Daily nebulization for 15 minutes for 6 months. For behavioral evaluation the behavioral tests were: Open Field Test and High Cross Maze, whose objective will be the observation of the general health, neurological reflexes, sensory skills and motor function of the animals used. Brain was collected for histological and immunohistochemical analysis. **Results:** The administration of 2,4-D for six months led to a deficit in the neurobehavioral tests that evaluated locomotion and anxiety level of animals, regardless of the exposure route (oral or inhaled). There was individual necrosis of neurons and a decrease in the thickness of the cerebral cortex associated with increased expression of the BAX antibody (a pro-apoptotic marker). **Conclusion:** This study demonstrated that 2,4-D leads to neurodegeneration of the central nervous system by deregulation of pro-apoptotic proteins.

Key words: herbicides, brain, experimental model, environmental exposure, neuropsychological tests

LISTA DE SIGLAS

acetilCoA	- Acetil coenzima A
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAK	- <i>BCL-2 relative bak</i>
BAX	- <i>BCL-2 associated protein X</i>
BCL-2	- <i>B-cell lymphoma protein 2</i>
CID10	- Código Internacional de Doenças
CONFINS	- Contribuição para o Financiamento da Seguridade Social
DATASUS	- Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
2,4-D	- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ELA	- Esclerose Lateral Amiotrófica
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMS	- Imposto Sobre Circulação de Mercadorias e Serviços
IPI	- Imposto Sobre Industrializados
MDF	- <i>Medium Density Fiberboard</i>
NHL	- Linfoma não-Hodgkin
PNDA	- Programa Nacional de Defensivos Agrícolas
PIS/PASEP	- Programa de Integração Social e do Programa de Formação de Patrimônio do Servidor Público
OMS	- Organização Mundial de Saúde
SINAN	- Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SINITOX	- Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SNC	- Sistema Nervoso Central
VSA	- Vigilância em Saúde Ambiental

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA.....	11
1.1	Agrotóxicos: definição e classificação dos agrotóxicos.....	11
1.2	Linha do tempo do uso de agrotóxicos no Brasil.....	13
1.3	Impacto dos agrotóxicos à saúde e ao meio ambiente.....	14
1.4	Intoxicação por agrotóxicos.....	18
1.5	Herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D).....	20
1.6	Contaminação dos trabalhadores pelo herbicida 2,4-D.....	22
1.7	Efeitos e agravos à saúde humana causados pelo 2,4-.....	23
1.8	Sistema Nervoso Central.....	24
1.9	Neurotoxicidade.....	24
1.10	Testes Comportamentais.....	25
1.10.1	Teste de Campo Aberto.....	25
1.10.2	Teste Labirinto em Cruz Elevado.....	26
1.11	Herbicida 2,4-D e neurotoxicidade.....	27
1.12	Apoptose e neurodegeneração.....	27
	REFERÊNCIAS.....	30
2	ARTIGO.....	38
	ANEXOS.....	65
	ANEXO A - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA O USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA - UNOESTE).....	65
	ANEXO B - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA A QUAL O ARTIGO SERÁ SUBMETIDO.....	66

1 REVISÃO DA LITERATURA

As substâncias químicas utilizadas no controle de pragas (animais e vegetais) e doenças de plantas são denominadas como agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios de planta ou veneno. Os agrotóxicos são utilizados nas florestas nativas e plantadas, nos ambientes híbridos, urbanos e industriais, e em grande escala na agricultura e nas pastagens, sendo também utilizados em campanhas sanitárias no combate a vetores de doenças (FUNDACENTRO, 1998).

Segundo Itho (2002), os agrotóxicos podem ser definidos como substâncias de origem biológica, física ou química, assim como, uma mistura de substâncias naturais ou sintéticas, destinadas a prevenir, destruir, exterminar, matar, controlar ou inibir a presença de pragas, tais como: insetos, ervas daninhas, fungos ou plantas aquáticas. Podem ser de uso domiciliar ou agrícola.

1.1 Agrotóxicos: definição e classificação dos agrotóxicos

A Lei Federal nº 7.802 de 11/07/1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074 de 04/01/2002, Artigo 1º, Inciso IV, define o termo "agrotóxico" da seguinte forma:

Consideram-se os agrotóxicos e afins como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, híbridos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento. (BRASIL, 1989).

De acordo com o Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, publicado no ano de 1996, o termo "agrotóxico" era antes conhecido como "defensivo agrícola". Posteriormente, houve a mudança da terminologia, devido a grande mobilização da sociedade brasileira que colocou em destaque a ação tóxica do produto para os seres humanos e para o meio ambiente (OPAS, 1996).

No entanto, as indústrias fabricantes de agrotóxicos preferem chamá-los de defensivos agrícolas, conferindo assim um valor de "proteção" ao produto agroquímico (VILLARDI, 2008).

Os agrotóxicos possuem uma variedade de substâncias químicas e também biológicas que são classificadas de acordo com o tipo de praga que combate e o grupo químico a que pertence. Essa classificação é importante para o diagnóstico e tratamento pela instituição de saúde (ITHO, 2002).

O Ministério da Saúde é o órgão responsável pela classificação toxicológica dos agrotóxicos vendidos no mercado, ou seja, estes são classificados conforme seu poder tóxico. O conhecimento da toxicidade do agrotóxico é fundamental, para o entendimento de seus efeitos agudos (ITHO, 2002).

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) é responsável pela avaliação e classificação da periculosidade ambiental dos agrotóxicos. Essa avaliação foi normatizada pela Portaria Normativa IBAMA nº84/1996, que através de estudos físico-químicos, toxicológicos e outros determina o grau de periculosidade, restrições de uso, alterações, concessão ou não de registro. De acordo com os critérios estabelecidos pela Portaria Normativa IBAMA nº84/1996 a classificação ambiental varia em quatro classes, conforme descrito a seguir (BRASIL, 1996):

Art.3º- A classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental baseia-se nos parâmetros bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico, carcinogênico, obedecendo à seguinte graduação: Classe I - Produto Altamente Perigoso; Classe II - Produto Perigoso; Classe III - Produto Muito Perigoso e Classe IV - Produto Pouco Perigoso.

De acordo com a Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992, a classificação toxicológica é definida pela DL50 - Dose letal 50, que é a estimativa estatística da quantidade de substância tóxica necessária para matar 50% de uma população de animais utilizados em ensaios toxicológicos (BRASIL, 1992).

1.2 Linha do tempo do uso de agrotóxicos no Brasil

O uso intensivo de agrotóxicos começou após a Segunda Guerra Mundial, momento em que as indústrias químicas passaram a utilizar os seus elementos químicos em outras áreas que não a militar em razão do término do conflito, mudando a natureza de sua ação comercial para novos cenários produtivos. Uma das principais seria a agricultura que necessitava de um controle efetivo das pragas e doenças que acometiam as lavouras, permitindo assim a produção de alimentos em larga escala, de modo que a agricultura se tornaria um novo mercado para a atuação desse segmento industrial (BULL; HATHAWAY, 1986).

No contexto brasileiro, é necessário compreender a trajetória da utilização dos agrotóxicos e a sua relação com as políticas de estado. Com isso se busca compreender melhor a dinâmica dos processos de industrialização, crescimento no setor agrícola e o uso de agrotóxicos (RUEGG *et al.*, 1991; CARNEIRO *et al.*, 2015). Na década de 1960, houve uma grande transformação no modelo agrário brasileiro através do fenômeno da Revolução Verde, fenômeno este, cujo início ocorreu na década de 1950 nos Estados Unidos, caracterizado pela modernização das técnicas empregadas na produção de alimentos, tais como o melhoramento genético e grande utilização de agrotóxicos (RUEGG *et al.*, 1991; CARNEIRO *et al.*, 2015).

O movimento da Revolução Verde chega no Brasil, na década de 1960 e ganha força na década de 1970, com a implantação do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA), cujo funcionamento se baseava na concessão do crédito agrícola vinculado à aquisição de agrotóxicos, essa dinâmica tinha como objetivo reduzir o trabalho dispensado ao controle das pragas e traria consequentemente melhorias na produção (CARNEIRO *et al.*, 2015). Outra forma de introduzir tais produtos no país foi por meio das isenções fiscais e tributárias que favoreceram sua comercialização no Brasil e faziam parte da política expansionista do agronegócio. Segundo Londres (2011), o governo federal concedia redução de 60% da alíquota de cobrança do ICMS (Imposto Sobre Circulação de Mercadorias e Serviços) a todos os agrotóxicos e isentava completamente de IPI (Imposto sobre Produtos Industrializados), PIS/PASEP (Programa de Integração Social e do Programa de Formação do Patrimônio do Servidor Público) e COFINS (Contribuição para o Financiamento da Seguridade Social) de agrotóxicos fabricados à partir de uma lista de dezenas de ingredientes ativos.

Naquele período, o incentivo ao uso dos agrotóxicos também foi estendido a agricultura familiar através do estímulo a substituição da semente tradicional, que era selecionada pelos próprios agricultores e plantada, pela semente híbrida, recomendada como mais produtiva. Dessa maneira, o agricultor familiar, substituiu a sua semente adaptada ao meio de cultivo por sementes melhoradas que muitas vezes não estavam adaptadas ao meio de cultivo.

Logo, essas sementes exigiam grandes quantidades de insumos para garantir uma produção efetiva, conduzindo, portanto, os agricultores a consumir cada vez mais produtos químicos em suas lavouras para manter uma produção viável. Desse modo, então, o agrotóxico passa a compor a vida diária dos trabalhadores do campo, que se expõem ocupacionalmente e com suas famílias no contato com esses produtos (GIRALDO, 2011). Assim, o fornecimento de créditos aos produtores rurais visando a modernização da agricultura, buscando mudança da produção artesanal para um modelo moderno, com uso da mecanização, uso de insumos e sementes modernas e os fertilizantes e defensivos, passa ser o elo de surgimento e ligação do agricultor com os agrotóxicos. (KLEIN; LUNA, 2019).

1.3 Impacto dos agrotóxicos à saúde e ao meio ambiente

O uso dos agrotóxicos no Brasil impacta diversos setores da sociedade como o meio ambiente, o trabalhador do campo e sua família, o trabalhador das fábricas que produzem esses compostos, bem como também afeta a saúde da população urbana, sendo, dessa forma, caracterizado como um problema de saúde pública. O uso do agrotóxico traz preocupações relacionadas desde os índices de intoxicação, passando pela sua toxicidade que acarretam danos à saúde das pessoas até a toxicidade dos produtos químicos. (RIGOTTO; VASCONCELO; ROCHA, 2014;). De acordo com o Ministério da Saúde (1996), a população tem probabilidade de intoxicação devido a estar exposta por três vias: ambiental, alimentar e ocupacional. (BRASIL, 1996).

A exposição ambiental é caracterizada pela disseminação e distribuição dos agrotóxicos nos diversos componentes do meio ambiente, como a contaminação das águas, através da migração de resíduos de agrotóxicos para os lençóis freáticos, leitos de rios, córregos, lagos e lagoas próximas; a contaminação atmosférica que resulta da dispersão de partículas durante o processo de pulverização ou de

manipulação de produtos e da evaporação de produtos mal estocados e ainda pela contaminação dos solos (MOREIRA, 2002).

Em relação à contaminação das águas por agrotóxicos, segundo pesquisa realizada por Rigotto *et al.* (2009) no estado do Ceará, com o título "Estudo epidemiológico da população da região do Baixo Jaguaribe exposta à contaminação ambiental em área de uso de agrotóxicos", verificou-se a intensificação do consumo de agrotóxico no estado. O estudo também investigou a contaminação de alimentos e a contaminação da água para consumo humano, tendo como base as preocupações demonstradas pelas comunidades da Chapada do Apodi, nos municípios de Limoeiro do Norte e Quixeré, que apontam uma possível contaminação da água por esses compostos químicos decorrentes de sua pulverização e o de descarte de embalagens de modo inadequado (CARNEIRO *et al.*, 2015).

Estudo do potencial de contaminação da água subterrânea por pesticidas na Bacia Hidrográfica do Rio Dourados, MS apontou os agrotóxicos mais usados nessa bacia no ano de 2002. Entre eles estão o glifosato, 2,4-D, fipronil, metamidofós, imazaquim, parationa, metílico, trifluralina, atrazina, cipermetrina, clorpirifós, monocrotofós, tiodicarbe, carbendazim e paraquate. E os que mais contaminaram a água foram: tiodicarbe, monocrotofós, imazaquim, metamidofós, bentazona, fomesafem, imazetapir e o 2,4-D (SCORZA JÚNIOR; SILVA, 2007).

Em relação aos riscos na ingestão de alimentos contaminados por agrotóxicos, estudo realizado sobre os Resíduos de agrotóxicos em alimentos no Brasil, pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) avaliou amostras de 25 alimentos de origem vegetal e encontrou a presença de diferentes tipos de pesticidas. Dos agrotóxicos utilizados nas lavouras estavam incluídos o glifosato, o endosulfan, o metamidofós, o acefato, o paration – metílico e o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (ANVISA, 2016). Estudo do Município de Lucas do Rio Verde, realizado por Pignati, Machado e Cabral (2007), após acidente com agrotóxicos foram encontrados índices de contaminação no leite materno de mulheres do município que amamentavam no período e não eram da zona rural.

A presença de compostos químicos na atmosfera e seus consequentes riscos à saúde humana foi revisado por Souza *et al.* (2017) com o objetivo de fornecer elementos para subsidiar a atuação da Vigilância em Saúde Ambiental (VSA) no

âmbito do Sistema Único de Saúde nos casos relacionados com a contaminação atmosférica por agrotóxicos. Os artigos selecionados avaliaram a exposição e monitoramento ambiental do ar contaminado por agrotóxico e os possíveis efeitos à saúde. Os resultados indicam que o modelo de Vigilância Ambiental em Saúde necessita ser reavaliado com o intuito de ser mais abrangente e levar em consideração a contaminação do ar.

Os impactos do agrotóxico na saúde humana e ambiental foram analisados através de revisão sistemática realizada por Lopes e Albuquerque (2018), cujos estudos científicos encontraram casos de intoxicações e agravos a saúde humana e exposição ocupacional. Os resultados apontaram também para: danos nos mecanismos de defesa celular, distúrbios respiratórios, lesões musculares e doenças mentais em cultivadores de fumo; danos ao DNA (ácido desoxirribonucleico) de agentes comunitários de saúde e perda auditiva em trabalhadores rurais. Foi possível observar a presença de sintomas e doenças em populações residentes em áreas de uso agrotóxicos, tais como: doença de Alzheimer, distúrbios neurológicos, diabetes, boca seca e visão alterada.

Com relação à exposição ocupacional os profissionais que tem maior contato com agrotóxicos, segundo o Ministério da Saúde (2006), são os trabalhadores da agricultura, do setor de saúde pública, de combate a vetores, dos setores do transporte e comércio e da indústria de formulação e síntese.

No trabalho agrícola, os riscos ocupacionais estão relacionados às intoxicações, problemas reprodutivos, danos ambientais e doenças crônicas (DIAS, 2006). No Quadro 1, é possível observar os tipos de riscos que os trabalhadores rurais estão expostos (físicos, de organização do trabalho e químicos) e o possível agravo à sua saúde.

Quadro 1 - Principais atividades desenvolvidas pelos trabalhadores rurais e seus possíveis riscos ocupacionais e agravos à saúde.

Exposição a Riscos		Condições de Trabalho	Possível Agravo
Tipo	Fator		
Físico	Calor	Trabalham a céu aberto, ou em estufas, em horários variados, com exposição a variações climáticas, com trator; com triturador	Choque térmico; Insolação.
	Frio, vento e chuva		Afecções de vias aéreas superiores, resfriados.
	Raios		Choque elétrico.
	Ruído		Perda auditiva; distúrbio do sono.
	Radiação solar		Câncer de pele
Organização Do Trabalho	Relações de Trabalho	Permanecem em posições desconfortáveis por longos períodos, seja na produção vegetal ou na produção animal; percorrem solo irregular; trabalham por conta, sem supervisão.	Acidentes provocados pelos animais; Distúrbios Osteomusculares Relacionados ao Trabalho (DORT).
Químico	Inseticida Acaricida Herbicida Rodenticida Fungicida Nematicida	Realizam tratamentos culturais da produção vegetal; Manipulam diversos tipos de agrotóxicos; Utilizam pulverizador costal para aplicá-los; manipulam adubos químicos e orgânicos e aplicam corretivos e fertilizantes.	Intoxicação por uso direto ou acumulativa; Agressão ao meio ambiente (contaminação do solo e da água); Câncer.

Fonte: (DIAS, 2006).

O estudo de Cerqueira *et al.* (2010) na cidade de Cajazeiras, PB, com trabalhadores atendidos por uma unidade básica de saúde e expostos aos agrotóxicos demonstraram que os agrotóxicos mais utilizados foram os inseticidas e herbicidas. Partindo do ponto de vista dos agrotóxicos e seus impactos na saúde física e mental do trabalhador rural Morin e Stumm (2016) em um estudo transversal de dezembro de 2015 a março de 2016, com objetivo de verificar os transtornos mentais em trabalhadores rurais que utilizam agrotóxicos, mostraram que os pesticidas acarretam distúrbios mentais. Já de acordo com Ramos e Silva (2004) com referência aos efeitos neuropsiquiátricos desencadeados pelos pesticidas, os relacionados aos sintomas cognitivos são: diminuição da concentração e vigilância e aos afetivos: transtorno de humor e depressão.

Na lista de Doenças Relacionadas ao Trabalho, editada pelo Ministério da Saúde (MS) em 2001, o 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) aparece como um elemento de agravos e adoecimento relacionados ao trabalho, no Capítulo 8 - Doenças do Sangue e dos Órgãos Hematopoiéticos relacionadas ao Trabalho Grupo III do Código Internacional de Doenças (CID)-10, Outras Anemias devidas a Transtornos Enzimáticos - CID-10 D55.8; Capítulo 9 – Outras Porfirias - CID-10 E80.2; Capítulo 11, Doenças do Sistema Nervoso Relacionadas ao Trabalho - Grupo VI do CID-10, no item, Lista de Doenças do Sistema Nervoso Relacionadas ao Trabalho, de acordo com a Portaria/MS n.º 1.339/1999, no tópico, Encefalopatia Tóxica Aguda e CID-10 G92.1, que define esta doença como uma síndrome neuropsiquiátrica secundária, em decorrência à exposição a agentes tóxicos, com sinais e sintomas inespecíficos e danos cerebrais difusos (BRASIL, 2001).

1.4 Intoxicação por agrotóxicos

Com base em dados do SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – Ministério da Saúde/FIOCRUZ), no período de 1999 a 2009, foi realizadas 62 mil notificações relacionadas a intoxicações por agrotóxicos, por ano 5.600 intoxicações, por conseguinte uma média de 15,5 intoxicações diárias, ou uma a cada 90 minutos (BOMBARDI, 2011). No que diz respeito às intoxicações e os agravos, Pignati *et al.* (2017) ao analisar dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil (DATASUS), referente ao ano de 2015, sobre os agravos a saúde relacionado à exposição a agrotóxicos, através de indicadores de

intoxicação aguda, subaguda e crônica, informa que estes ocuparam o segundo lugar dentre as intoxicações exógenas.

Com relação aos efeitos dos agrotóxicos sobre a saúde humana estão sujeitos a forma e o tempo de exposição, e o tipo de produto com sua toxicidade específica. De acordo com Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos (OPAS, 1996), os efeitos das intoxicações por agrotóxicos sobre a saúde humana podem causar quadros de intoxicação aguda, subaguda e crônica que poderão se manifestar de forma leve, moderada ou grave.

A intoxicação aguda é segundo o Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a agrotóxicos, uma alteração no estado de saúde de um indivíduo, que resulta da exposição de uma substância nociva com o organismo vivo. Pode ocorrer de forma leve, moderada ou grave, isso dependerá da quantidade de toxina absorvida, do tempo de absorção, da toxicidade do produto e do tempo transcorrido entre a exposição e o atendimento ambulatorial. Manifesta-se por meio de um conjunto de sinais e sintomas, que se apresentam de forma repentina, alguns minutos ou algumas horas após a exposição excessiva de um indivíduo a um agrotóxico (BRASIL, 2006).

O Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a agrotóxicos apresenta a classificação geral para quadros leves, moderados ou graves de intoxicação aguda por agrotóxicos (BRASIL, 2006):

- Intoxicação aguda leve: Quadro clínico caracterizado por cefaléia, irritação cutâneo-mucosa, dermatite de contato irritativa ou hipersensibilização, náusea e discreta tontura.
- Intoxicação aguda moderada: Quadro clínico caracterizado por cefaléia intensa, náusea, vômitos, cólicas abdominais, tontura mais intensa, fraqueza generalizada, parestesia, dispnéia, salivação e sudorese aumentadas.
- Intoxicação aguda grave: Quadro clínico grave, caracterizado por miose, hipotensão, arritmias cardíacas, insuficiência respiratória, edema agudo de pulmão, pneumonite química, convulsões, alterações da consciência, choque, coma, podendo evoluir para óbito.

A intoxicação subaguda acontece pela exposição moderada ou leve a substâncias altamente ou medianamente tóxicas. Os sintomas são vagos, tais como dor de cabeça, fraqueza, mal-estar, dor de estômago e sonolência, entre outros (OLIVEIRA; KASPARY; MICNOV, 2008).

A intoxicação crônica é uma alteração no estado de saúde de um indivíduo, que também resulta da interação nociva de uma substância com o organismo vivo. No entanto, as consequências sobre a saúde, surgem no decorrer de repetidas exposições ao produto, que geralmente ocorrem por longos períodos. Manifesta-se através de várias patologias, que atingem diversos órgãos e sistemas, com ênfase para os problemas imunológicos, hematológicos, hepáticos, neurológicos, malformações congênitas e tumores. Assim, o diagnóstico é difícil de ser estabelecido e há uma grande dificuldade na associação causa/efeito, principalmente quando há exposição a vários tipos de produtos, situação comum na agricultura brasileira (BRASIL, 2006).

1.5 Herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D)

Com a pressão exercida por pragas resistentes e substâncias que perdem sua ação há aumento no número de aplicações e tipos de agrotóxicos com princípios ativos diferentes e potentes, sendo, os herbicidas, os mais usados na agricultura brasileira. Os principais compostos dos herbicidas são: compostos clorofenoxi, dinitrofenóis, metano arseniato de sódio, alaclor e acetoclor, grupo das triazinas, ácido 2,4 – diclorofenoxiacético, glifosato e trifenil hidróxido de estanho (PRIMEL *et al.*, 2005).

Os altos índices de produção agrícola alcançados pelo Brasil demandam o uso intenso de agrotóxicos de variadas composições químicas. Com constante abertura de novas fronteiras, a agricultura intensiva praticada no país vem batendo recordes de produção que, paralelamente, refletem num crescente volume de agrotóxicos comercializados em território brasileiro. Segundo estatísticas, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo e o grupo dos herbicidas é o mais comercializado mundialmente. No Brasil, 127 mil toneladas desse grupo foram comercializadas em 2009, sendo os ingredientes ativos glifosato e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) os mais comercializados oficialmente (MACEDO NETO; FROEHNE; MACHADO, 2012). De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) em seu Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil - Total das Vendas de Agrotóxicos e Afins nas Regiões e Estados Brasileiros Ano a Ano, no ano

de 2019, o 2,4-D foi o segundo ingrediente ativo de agrotóxico mais vendido, com mais de 52.426,92 mil toneladas de produtos comerciais vendidos (IBAMA, 2020).

Primeiro herbicida seletivo desenvolvido ainda nos anos 1940, o ácido diclorofenóxiacético, 2,4-D ($C_8H_6Cl_2O_3$) é largamente utilizado para aplicação na pré- ou pós-emergência de plantas infestantes em cultivos de trigo, soja, milho, arroz, cana-de-açúcar e pastagens e é classificado como extremamente tóxico (MACEDO NETO; FROEHNE; MACHADO, 2012). O herbicida 2,4-D é um ácido orgânico, com pKa 2,6, e possui uma solubilidade de 45 g/L em água. Sua dose letal (DL50) oral é de 370 mg/kg (em coelhos) e por via dérmica é de 1400 mg/kg (em camundongos) (VIEIRA *et al.*, 1999).

Os herbicidas ácidos são uma importante classe de pesticidas, dos quais se destaca o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), por sua ampla utilização em todo o mundo. Este composto tem sido usado no controle de uma variedade de ervas daninhas, em culturas de cereais, cana-de-açúcar, pomares e em controle florestal. Não é recente a larga aplicação do 2,4-D, pertencente à classe dos ácidos fenoxiacéticos. Desde a guerra do Vietnã, quando foi usado pela força aérea norte-americana como agente desfolhante, junto com o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) e o pentaclorofenol (PCF), formando o “agente laranja”, o 2,4-D vem substituindo a capina manual e mecânica, diminuindo a mão-de-obra e resultando no aumento da produtividade agrícola (AMARANTE JÚNIOR; SANTOS; NUNES, 2003).

O 2,4-D pode ser absorvido, ou seja, penetrar no organismo através da respiração (via inalatória), da pele (via dérmica), da ingestão de água ou de alimentos contaminados, incluindo o leite materno (via oral), ou através da placenta. Além disso, as pessoas podem ser expostas ao 2,4-D em diferentes momentos da vida, como intra-útero, lactação, infância, adolescência, fase adulta e senescência (FRIEDRICH, 2014).

A ingestão, respiração ou contato dérmico com agrotóxicos da classe dos ácidos fenoxiacéticos, como o 2,4-D, pode causar perda de apetite, enjôo, vômito, fasciculação muscular e até mesmo câncer (RIBAS; MATSUMURA, 2009). Segundo Bradberry *et al.* (2000), os efeitos sobre o sistema nervoso central após ingestão em grandes quantidades do 2,4-D são: hipertonia, coma, convulsão, paralisia, alucinações, entre outras.

1.6 Contaminação dos trabalhadores pelo herbicida 2,4-D

Segundo os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), entre 2007 e 2011, apontam para um crescimento de 67,4% de novos casos de acidentes de trabalho não fatais devido a agrotóxicos. Todavia, a subnotificação e o subdiagnóstico são encontrados para os casos agudos e de avaliação dos efeitos crônicos. A esse respeito, Augusto *et al.* (2012) ressalta que grande parte dos efeitos crônicos sobre a saúde dos agricultores não seja relacionado à ingestão dos agrotóxicos pela ausência de notificação no sistema de informação no Brasil em face da subnotificação. Sabe-se que, em 2009, houve seis mil casos de intoxicação por agrotóxicos em todo o país. No entanto, a OMS (Organização Mundial de Saúde) faz uma estimativa de que para cada caso notificado, outros cinquenta não foram notificados. (AUGUSTO *et al.*, 2012).

O número de casos de intoxicações por 2,4-D e seus derivados registrados no SINAN para o período de 2007-2017 foram de 768 notificações, sendo 118 (15,16%) relacionadas à tentativa de suicídio, 265 (34,5%) e 224 (29,17%) associadas, respectivamente, ao uso habitual ou a um acidente com o produto. Sendo que 49% (n= 377) ocorreram no local de trabalho (BRASIL, 2019)

A respeito da exposição ocupacional ao 2,4-D, os dados do SINAN apontam para os dados registrados nos anos de 2007-2017, a maior parte das intoxicações por 2,4-D ocorreram na área rural, com trabalhadores não registrados e autônomos. Neste sentido, o estudo de Zhang *et al.* (2011) mostrou 2,4-D na urina e alterações na densitometria óssea de trabalhadores autônomos rurais aplicadores de herbicidas com pulverizadores costal. Estudo realizado Lerda e Rizzi (1991), que objetivou estudar a função reprodutiva em pessoas ocupacionalmente expostas ao ácido 2,4-D, também revelou a presença deste herbicida na urina dos trabalhadores.

Por outro lado, Burns *et al.* (2011) investigaram a toxicidade do 2,4 – D em funcionários da indústria de produção do herbicida com registro de câncer em três estados dos Estados Unidos. Este trabalho demonstrou que o contato com o herbicida provocou câncer de próstata e doenças respiratórias, porém não foi observado linfoma não-Hodgkin (NHL), um câncer comumente descrito em pessoas expostas ao 2,4-D.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em sua Nota Técnica de reavaliação do 2,4-D, em 2018, no tópico conclusões sobre a avaliação de risco

ocupacional e de residentes e de transeuntes, os riscos de operadores, risco de trabalhadores de reentrada, risco de transeuntes e residentes, destaca pontos em relação a avaliação aos riscos de exposição e as recomendações de segurança (ANVISA, 2018).

1.7 Efeitos e agravos à saúde humana causados pelo 2,4-D

Verifica-se uma inquietação a respeito do herbicida 2,4-D e sua toxicidade em relação à saúde humana aos indivíduos expostos. Os efeitos do herbicida decorrentes da exposição podem ser divididos em dois grupos conforme a frequência de exposição. No caso de exposição única podem causar efeitos classificados como agudos e no caso da exposição repetida, em doses menores e com frequência semanal e mensal podem causar efeitos crônicos e estes são podem ser subdividido em efeitos subagudos, subcrônicos de acordo com a periodicidade ser em dia, semana ou meses. Estudos epidemiológicos buscam verificar a associação do herbicida 2,4-D com doenças e agravos a saúde humana (FRIEDRICH, 2014).

A relação entre exposição e resposta a mutagenicidade e toxicidade do 2,4-D foram recentemente revisadas por Zuanazzi, Castilhos Ghisi e Oliveira (2020). A maioria dos artigos avaliou a exposição humana ao pesticida 2,4-D e outros artigos avaliaram mistura de pesticidas de alguns herbicidas, incluindo o 2,4-D e observaram a ocorrência de mutagenicidade e toxicidade.

Segundo Friedrich (2014), os agrotóxicos desse tipo são capazes de induzir mutação no material genético (DNA), interferindo nos mecanismos que controlam a morte celular e o crescimento celular. Em três estudos de caso controle, dois sobre sarcomas de partes moles (McDUFFIE *et al.*, 2001; MILIGI *et al.*, 2006) e um sobre linfoma (HARTGE *et al.*, 2005), a exposição ao herbicida 2,4-D aumentou o riscos desses tipos de cânceres.

Friedrich (2014) em Parecer Técnico a respeito do herbicida 2,4-D, destaca os efeitos e agravos à saúde humana deste herbicida, através da análise dos seus efeitos tóxicos enfatizando para mutagênese e câncer, toxicidade sobre o sistema hormonal ou desregulação endócrina e aspectos sobre a toxicocinética, toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento, inserindo neste item neurotoxicidade do desenvolvimento.

1.8 Sistema Nervoso Central

O Sistema Nervoso Central (SNC) é o conjunto de órgãos constituído por duas partes, medula espinal e o encéfalo. O encéfalo é subdividido em cérebro, tronco encefálico e cerebelo. O cérebro é composto pelo telencéfalo e diencéfalo e o tronco encefálico composto pelo mesencéfalo, ponte e bulbo (SILVERTHORN, 2010; KANDEL, 2014).

No cérebro temos cinco partes definidas como lobo cerebral dividido em: lobo frontal, parietal, occipital e lobo temporal (TORTORA; DERRICKSON, 2016). O lobo frontal é constituído pelo córtex pré-frontal e córtex pré-motor, responsável pelo planeamento da ação e controle do movimento (KANDEL, 2014). No córtex pré-frontal encontram-se três áreas: orbital ou inferior, medial / cingulada e lateral; a região medial do córtex pré-frontal abrange as áreas 25 e 32 e também o tecido motor (KOLB et al. 2003). Para Holtzer et al. (2011), o córtex pré-frontal tem participação em duas vias de controle do andar em indivíduos. No tocante a ansiedade-traço, o córtex pré-frontal medial tem sido apontado como a região encefálica envolvida. Em um estudo com seres humanos, observou-se uma menor espessura do córtex pré-frontal em indivíduos com alto traço ansioso enquanto encontramos uma maior espessura em indivíduos com baixo traço ansioso (SPAMPINATO et al., 2009; GORKA et al., 2014).

1.9 Neurotoxicidade

A neurotoxicidade tem sido descrita como um conjunto de alterações bioquímicas, funcionais e estruturais e que se expressa pela manifestação de efeitos adversos como resultado da exposição a um produto químico. O efeito adverso consiste em uma modificação que gera uma desregulamentação ou alteração do sistema nervoso, a despeito dessas mudanças, estas podem ser morfológicas, relacionadas ao comportamento e neuroquímica, manifestada de forma permanente ou transitória. O agente que provoca efeito adverso sobre o sistema nervoso, central ou periférico, é denominado agente neurotóxico (COSTA, 2017).

Costa (2017) acrescenta que sua ação dependerá de fatores relacionados as propriedades físico-químicas do agente químico, a forma de exposição a dose recebida e a aspectos relacionados a saúde, sexo e idade do indivíduo. E finaliza,

esclarecendo que um grande número de produtos químicos é considerado neurotóxico para os humanos dentre eles metais, solventes orgânicos e pesticidas.

London *et al.* (2012) ao analisar crianças expostas a pesticidas e os efeitos neurocomportamentais e do desenvolvimento neurológico aponta para a associação de déficits de memória de curto prazo, habilidades motoras e tempo de reação. Com relação a neurotoxicidade, no Sistema Nervoso Central, ocasionado por exposição a pesticidas Mangas *et al.* (2016) assinala como efeitos cognitivos: déficit de atenção, habilidades visomotoras, perceptivas e construtivas reduzidas, aprendizado verbal, velocidade de processamento, memória; neuropsiquiátricos: depressão, fadiga, ansiedade, irritabilidade e estado emocional e neurocomportamentais alterações em funções sensório-motoras.

1.10 Testes Comportamentais

Os testes comportamentais, são testes empregados na avaliação de regiões específicas do cérebro, sua função neuronal e o comportamento apresentado, sendo realizado em ambiente controlado (Krakauer et al.,2017).Dentre os modelos animais usados em pesquisas neurocomportamentais estão os Ratos e os Camundongos, em virtude desses animais apresentarem comportamentos importantes para as pesquisas com doenças em humanos (Cryan J, Holmes A.,2005). Atualmente há uma grande variedade de testes comportamentais disponibilizados para esses roedores de laboratório, com o objetivo de avaliar características tais como: função sensório-motora, interações sociais, emocionalidade - comportamento tipo ansiedade e depressivo e função cognitiva. O teste comumente empregado para avaliar a função motora e sensorial, é o de campo aberto e em relação a Emocionalidade: ansiedade e depressão é o Labirinto em cruz elevado. (CHOI et al,2018, TEEGARDEN,2012).

1.10.1 Teste de Campo Aberto

O Teste de campo aberto foi o criado por Hall (1934) e permite avaliar atividade locomotora e ansiedade (MELLO, 2008). O teste consiste em colocar o animal em uma arena circundada por parede. As dimensões e o formato do campo aberto variam entre os modelos quadrado ou redondo. O modelo quadrado, possui

paredes altas, feitas de madeira compensada branca com uma parede frontal de vidro. O soalho do campo aberto é dividido em 12 quadrantes iguais por linhas pretas. Ser observado por 5 minutos o número de vezes que o animal cruzara as linhas pretas e o número de vezes que o animal se elevou sobre as patas traseiras (MELLO, 2008).

1.10.2 Teste Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus Maze) foi elaborado por Pellow e colaboradores (1985), com o objetivo de avaliar comportamentos relacionados à ansiedade (ITO, 2010; MEZADRI, 2011). Consiste em um aparato de madeira com cor natural em formato de cruz, com quatro braços, elevados 50 cm do chão. Dois braços possuem paredes, sendo chamados de braços fechados (49 x10x 30 cm) e outros dois não possuem as paredes, correspondendo aos braços abertos (49x 10 cm), dispostos em forma de cruz. Dois dos braços são abertos e contornados por uma pequena borda de acrílico transparente de 0,5 cm de altura para diminuir eventuais quedas dos animais. Os outros dois braços, dispostos perpendicularmente aos abertos, são revestidos por paredes laterais de 50 cm de altura, sendo denominados braços fechados. Uma arena central de 10x10cm une os quatro braços entre si. Os animais são colocados individualmente na área central, voltados para um dos braços fechados e são observados durante cinco minutos (ITO, 2010; MEZADRI, 2011)

1.11 Herbicida 2,4-D e neurotoxicidade

O mecanismo de toxicidade do herbicida 2,4-D está relacionado à interferência nas rotas metabólicas celulares que envolvem a acetil coenzima A (acetil CoA) e fosforilação oxidativa (BRADBERRY, 2000).

Os estudos a respeito da neurotoxicidade do 2,4-D têm sido voltados para observações do Sistema Nervoso Central (SNC) e o seu comprometimento. A neurotoxicidade pode ser resultante da inalação aguda e da ingestão oral. (PEREIRA, 2006).

Diamante *et al.* (2014), assinalam que as pesquisas tem sido voltadas para análises do sistema nervoso central, contudo, neurotoxicidade do 2,4-D ainda não está esclarecida.

Segundo Bongiovanni *et al.* (2011), o estudo dos efeitos decorrentes do 2,4-D no sistema nervoso central em ratas recém-nascidas mostraram mudanças citoarquitetura astrogliar e função neuronal, bem como, algumas alterações comportamentais.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2015) ao reavaliar os riscos à saúde humana do ingrediente ativo 2,4-D, cita que este herbicida tem como alvo o sistema nervoso central.

Em relação aos estudos sobre neurotoxicidade subcrônica e crônica, foi observada degeneração retiniana quando os animais foram expostos a altas doses do herbicida 2,4-D (JEFFRIES *et al.*, 1995). Fatores relacionados à neurotoxicidade no desenvolvimento, também foram destacados, através da citação, de um grupo de pesquisadores que realizam discussões relacionadas ao tema e procuram mostrar os impactos causado no desenvolvimento, sobretudo as consequências a altas doses no período gestacional ou pós natal que causam desde estresse oxidativo, diminuição da mielinização a alterações comportamentais, em estudos realizado com ratos. (BORTOLOZZI; DUFFAR; EVANGELISTA DE DUFFARD, 1999, 2003; FERRI; DUFFARD; DE DUFFARD, 2007; 2008; ROSSO *et al.*, 1998, 2000).

Entre os relatos de casos apresentados no parecer da ANVISA (ANVISA, 2015) foram encontrados alguns fatores que estão relacionados à neurotoxicidade do 2,4-D, tais como: neuropatia periférica, neurite periférica, diminuição da velocidade de condução no nervo sural.

Em um estudo epidemiológico com trabalhadores expostos cronicamente ao 2,4-D, observou-se que estes apresentaram esclerose lateral amiotrófica, doença neurológica progressiva, que acarreta a degeneração dos neurônios motores do córtex motor primário, medula espinha e tronco cerebral (FRIEDRICH, 2014; ANVISA, 2015).

1.12 Apoptose e neurodegeneração

A apoptose é o processo de morte celular programada no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que levarão a dissolução nuclear, degradação

de proteínas nucleares e citoplasmáticas, e a fragmentação da célula em corpos apoptóticos (porções de citoplasma de núcleo). Nesta cascata de reações, a membrana plasmática da célula permanece íntegra, porém sua estrutura é alterada tornando-se alvos para fagócitos. Os restos celulares são rapidamente fagocitados e removidos, evitando o início e a progressão de um processo inflamatório por essa via no hospedeiro (ABBAS *et al.*, 2010). Esse recurso pode ocorrer tanto em situações fisiológicas, eliminando as células que não são necessárias e mantendo seu número constante, quanto em situações patológicas. Sob condições patológicas, a apoptose pode ser desencadeada (ABBAS *et al.*, 2010). Seu mecanismo de ação pode ocorrer por via intrínseca (mitocondrial) e via extrínseca (morte iniciada por receptor). Na via intrínseca, determinados estímulos levam ao aumento de permeabilidade mitocondrial e liberação de moléculas mitocondriais pró-apoptóticas que induzirão o processo de apoptose. A liberação dessas moléculas é controlada por proteínas pertencentes à superfamília de proteínas BCL-2, classificadas como pró-apoptóticas (BAX) e anti-apoptóticas (BCL-2), que residem no citoplasma e nas membranas mitocondriais (ABBAS *et al.*, 2010).

A perda dos sinais de sobrevivência, lesões no DNA e outros estímulos ativam essas proteínas presentes no citoplasma (sensores de lesão da família BCL-2) as quais por sua vez, ativam efetores BAX e BAK pró-apoptóticos, formando canais na membrana mitocondrial permitindo que as proteínas internas extravasem para o citoplasma, como o *citocromo c*, e ativem a cascata de caspases, enzimas capazes para degradar componentes celulares críticos gerando a morte celular. Acredita-se que a apoptose seja o principal mecanismo de morte celular em doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica (ELA) e retinite pigmentosa, obtendo como indutores principalmente o *stress oxidativo*, com o aumento de cálcio intracelular, defeitos mitocondriais, toxicidade por aminoácidos excitatórios, deficiências de fatores de crescimento ou aumento da concentração de glutamato no meio extracelular (CORDEIRO, 1999).

O aumento moderado (200-400 nM) e a liberação do estoque de cálcio armazenado no retículo endoplasmático é indutor de apoptose pela ativação da calpaína, protease dependente de cálcio. Já o estresse oxidativo, de maneira semelhante ao cálcio, pode promover ou inibir a apoptose de acordo com sua intensidade. Nele, a produção de agentes oxidantes ultrapassa a capacidade antioxidante gerando dano oxidativo de constituintes celulares acarretando na morte

celular. De maneira geral, o encéfalo e os tecidos nervosos estão mais propensos aos danos oxidativos devido a fatores como o alto fluxo de cálcio pelos neurônios, presença de neurotransmissores excitatórios, principalmente o glutamato e o fato de possuir poucas defesas antioxidantes (GARCIA, 2009).

Desse modo, lesões e degenerações de tecidos nervosos mantém relação próxima com a apoptose. De acordo com Teive e Menezes (*apud* PAIXÃO *et al.*, 2013) a doença de Parkinson apresenta possíveis fatores associados ao surgimento, sendo o processo de apoptose um deles. As manifestações clínicas características dessa patologia estão associadas à depleção de dopamina, decorrente da morte dos neurônios dopaminérgicos que compõe a substância negra compacta do mesencéfalo (PAIXÃO *et al.*, 2013).

Relacionado com a doença de Alzheimer, os neurônios entram em processo de morte celular por apoptose precocemente, o que resulta em demência progressiva e perda da cognição e da memória (ANAZETTI; MELO, 2007). Na doença de Huntington, a atividade de caspases e calpaínas encontra-se aumentadas e fragmentos de huntingtina mutante (proteína mutante presente nessa patologia), podem induzir diretamente o aumento da permeabilidade mitocondrial, ativando o processo apoptótico por via intrínseca (GIL-MOHAPEL; REGO, 2011).

Através de evidências que ainda não foram totalmente esclarecidas, buscamos responder alguns questionamentos como a relação entre a neurotoxicidade associada à exposição do herbicida 2,4-D, considerado um dos produtos mais utilizados para a pulverização de lavouras no Brasil. Na literatura vigente, poucos estudos têm demonstrado uma relação efetiva entre os parâmetros aqui propostos, desta forma, fazem-se necessários estudos mais aprofundados a fim de esclarecer a via de ação e seus efeitos no sistema nervoso central. Contudo, a associação entre as proteínas reguladoras do ciclo celular, BAX e BCL-2, podem ser consideradas promissoras em uma combinação relacionando os seus efeitos no sistema nervoso central.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito neurotóxico da exposição crônica por via oral e inalatória do herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) em ratos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. *et al.* **Robbins e Cotran: patologia - bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.11-30.
- AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; NUNES, G. S. Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 223-229, 2003.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007. Disponível em: www.metrocamp.com.br/pesquisa. Acesso em: 20 set. 2019.
- ANVISA. **Nota técnica nº 24/2018/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIARE/ANVISA**. Nota Técnica conclusiva de reavaliação do ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), com as respectivas recomendações e proposta de minuta de RDC para esse ingrediente avo (atualiza e substitui o Parecer SEI nº 5/2018). Brasília: ANVISA, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 12 maio 2020.
- ANVISA. **Parecer Técnico de Reavaliação Nº 07, de 2015/GGTOX/ANVISA**. Reavalia os riscos à saúde humana do ingrediente ativo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Brasília: ANVISA, 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 12 maio 2020.
- ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (para): relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016.
- AUGUSTO, L. G. S. *et al.* **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde: Parte 2 – Agrotóxicos, Saúde, Ambiente e Sustentabilidade**. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.
- BRADBERRY, S. M *et al.* Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 38, n. 2. p. 111-122, 2000.
- BOMBARDI, L. M. Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado. **Boletim DATALUTA**, set. 2011.
- BONGIOVANNI, B. *et al.* Adverse effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on rat cerebellar granule cell cultures were attenuated by amphetamine. **Neurotoxicity research**, v. 19, n. 4, p. 544-55, May 2011.
- BORTOLOZZI, A.; DUFFARD, R.; EVANGELISTA DE DUFFARD, A. M. Behavioral alterations induced in rats by a pre- and post-natal exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 21, p. 451–65, 1999.

BORTOLOZZI, A.; DUFFARD, R.; EVANGELISTA DE DUFFARD, A.M. Asymmetrical development of the monoamine systems in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid treated rats. **Neurotoxicology**, v. 24, n. 1, p. 149-157, 2003.

BRADBERRY, S.M.; WATT, B. E.; PROUDFOOT, A.T.; VALE, J. A. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, v. 38, n. 2, p. 111-122, 2000. DOI: 10.1081/ct-100100925

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Portaria SNVS nº 03/1992**. Legislação federal de agrotóxicos e afins. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1998. p.153-177.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde (Brasil). **Doenças relacionadas ao trabalho**: manual de procedimentos para os serviços de saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde; OPAS, 2001. 508 p. Disponível em: <http://renastonline.ensp.fiocruz.br/recursos/doencas-relacionadas-trabalho-manual-procedimentos-os-servicos-saude>. Acesso em: 16 maio 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº05 de 21 de fevereiro de 2006**. Inclui doenças na relação nacional de notificação compulsória, define doenças de notificação imediata, relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional e normas para notificação de casos. Disponível em: <http://pegasus.fmrp.usp.br/projeto/legislacao/portaria/202005.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Portaria nº 16, de 25 de março de 2019. Diário Oficial da União**, Publicado em: 26/03/2019, Edição: 58, Seção: 1, p. 74. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/68563892. Acesso em: 28 abr. 2020.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Portaria Normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996**. Legislação Federal de Agrotóxicos e Afins. Brasília: Ministério da Agricultura, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal, 1996. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/mma_ibama/1996/prt0084_15_10_1996.html. Acesso em: 17 dez. 2019.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. **Lei n.7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm. Acesso em: 18 dez. 2019.

BULL, D.; HATHAWAY, D. **Pragas e venenos**: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo. Petrópolis: Vozes, 1986.

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

BURNS, C. *et al.* Cancer incidence of 2, 4-D production workers. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n.9, p. 3579-3590, 2011.

CARNEIRO, F. F. *et al.* (org.). **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV, 2015.

CERQUEIRA, G. S. *et al.* Dados da exposição ocupacional aos agrotóxicos em um grupo assistido por uma unidade básica de saúde na cidade de cajazeiras, PB. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo, v. 3, p. 16-28, 2010.

CHOI, S. H., BYLYKBASHI, E., CHATILA, Z. K., LEE, S. W., PULLI, B., CLEMENSON, G. D., *et al.* Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model. **Science**, 2018,361(6406).

CRYAN JF, HOLMES A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nature Reviews Drug Discovery** , 2005 Sep;4(9):775-90. doi: 10.1038/nrd1825. PMID: 16138108.

CORDEIRO, M. P. **Apoptose**: o suicídio das células. 1999. Monografia (Especialização) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

COSTA, L. G. Overview of neurotoxicology. **Current protocols in toxicology**, v. 74, n. 1, Nov 2017.

DIAMANTE, N. A. *et al.* Investigação dos efeitos do ácido 2, 4 diclorofenoxiacético sobre diferentes populações de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos.

Arquivos de ciências veterinárias e zoologia da UNIPAR, v. 17, n. 2, p. 97-105, abr./jun., 2014.

DIAS, E. C. Condições de vida, trabalho, saúde e doença dos trabalhadores rurais no Brasil. *In*: PINHEIRO, T. M. M. (org.). **Saúde do trabalhador rural –RENAST**. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. p. 1-27.

EVANGELISTA DE DUFFARD, A. M.; BORTOLOZZI, A.; DUFFARD, R. Altered behavioral responses in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid treated and amphetamine challenged rats. **NeuroToxicology**, v. 16, p. 479–488, 1995.

FERRI, A.; DUFFARD, R.; DE DUFFARD, A. M. E. Selective Oxidative Stress in Brain Areas of Neonate Rats Exposed to 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Through Mother's Milk. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 30, p. 17–30, 2007.

FRIEDRICH, K. **Avaliação dos efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo, hormonal e câncer para seres humanos após o uso do herbicida 2,4-D**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2014. (Parecer técnico). Disponível em:

file:///D:/Downloads/parecer%20herbicida%2024-D%20Karen%20Friedrich.pdf.
Acesso em: 22 abr. 2020.

FUNDACENTRO. **Prevenção de acidentes no trabalho com agrotóxicos:** segurança e saúde no trabalho, n. 3. São Paulo: Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, Ministério do Trabalho, 1998.

GARCIA, R. C. T. **Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo.** 2009. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GIL-MOHAPPEL, J. M.; REGO, A. C. Doença de Huntington: uma revisão dos aspectos fisiopatológicos. **Revista Neurociências**, Coimbra, PO, 04 mar. 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Joana_Gil-Mohapel/publication/281721733_Huntington's_disease_A_review_on_the_physiopathological_aspects/links/5757489e08ae05c1ec16d1e6.pdf. Acesso em: 27 mar. 2018.

GIRALDO, L. **Há muitas evidências de danos dos agrotóxicos à saúde.**

FIOCRUZ, 2011. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm>
Acesso em: 22 abr. 2020.

GORKA, A.X.; HANSON, J.L.; RADTKE, S.R.; HARIRI, A.R. Reduced hippocampal and medial prefrontal gray matter mediate the association between reported childhood maltreatment and trait anxiety in adulthood and predict sensitivity to future life stress. **Biology of Mood and Anxiety Disorders**, v. 4, p. 1-10, 2014.

GUIMARÃES, A. T. B. *et al.* Memory and depressive effect on male and female Swiss mice exposed to tannery effluente. **Neurotoxicology and teratology**, v. 61, p. 123-127. 2017.

HARTGE, P. *et al.* Residential herbicide use and risk of non-Hodgkin lymphoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v. 14, n. 4, p. 934–937, 2005.

HILDEBRAND, L. C. **Quantificação de AgNors nos distúrbios de maturação epitelial presentes em leucoplasias da mucosa bucal.** 2005. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

IARC. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs, v. 1 to 42. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 1987. (IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, N°. Supplement 7.) **Chlorophenoxy herbicides (Group 2B)**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK533638/>. Acesso em: 20 set. 2019.

IBAMA. **Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil.** Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/>. Acesso em: 30 de novembro de 2020

KANDEL, E. et al. **Princípios de neurociências**. 5. ed. Porto alegre: AMGH, 2014

KRAKAUER, J. W.; GHAZANFAR, A. A.; GOMEZ-MARIN, A.; MALCVLER, M. A. Poeppel, D. Neuroscience Needs Behavior: Correcting a Reductionist Bias. **Neuron.**, v.93, n.3, p.480-490, 2017.

KOLB, B.; WHISHAW. Q. **Fundamentals of Human Neuropsychology**. New York: Worth Publishers. 2003.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385, 1934. ISSN 0093-4127

ITHO, S. F. **Intoxicações por inseticidas inibidores da colinesterase organofosforados e carbamatos**: diagnóstico e tratamento. Vitória: CCI-ES, 2002. v. 1. 104 p.

ITO, P. H. **Avaliação comportamental de ratos submetidos à anóxia neonatal**. 2010. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) - Instituto de Psicologia, Université de São Paulo, São Paulo, 2010.

JEFFRIES, T. K.; YANO, B. L.; ORMAND, J.R.; BATTJES, J.E. 2,4-**Dichlorophenoxyacetic acid**: Chronic toxicity/oncogenicity study in fischer 344 rats – final report. K-002372-064; Washington, 1995.

LADOU J.; HARRISON, R. J. (org.). **Current Medicina ocupacional e ambiental**: diagnóstico e tratamento. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.

LERDA, D.; RIZZI, R. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D). **Mutation research**, v. 262, n. 1, p. 47-50. Jan. 1991.

LONDON, L. *et al.* Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. **Neurotoxicology**, v.33, p.887–896, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.01.004>

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil**: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde debate**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 117, p. 518-534, jun. 2018. <https://doi.org/10.1590/0103-1104201811714>.

LUNA, F.V e KLEIN, H. Transformações da agricultura brasileira desde 1950. **História econômica & história de empresas** vol. 22 no 2 (2019), 277-307 |

- MACEDO NETO, D.; FROEHNE, S.; MACHADO, K. S. Avaliação do transporte do ácido 2,4-diclorofenoxiacético através de um lisímetro. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1809-1813, 2012.
- MANGAS, I. *et al.* Efeitos neurotóxicos associados ao uso atual de compostos organofosforados. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 809-825, maio 2016. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160084>.
- MCDUFFIE, H. H. *et al.* Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: crossCanada study of pesticides and health. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 10, n. 11, p.1155-1163, Nov. 2001.
- MELLO, P. B. **Efeitos do exercício físico sobre diferentes tipos de memória em ratos normais e com prejuízo mnemônico causado pela separação maternal.** 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- MEZADRI, T. J. *et al.* Avaliação do comportamento de ratos alojados em caixas de cores diferentes. **Revista de Etologia**, v. 10, n. 1, p. 21-26, jun., 2011.
- MILIGI, L. *et al.* Cancer and pesticides: an overview and some results of the Italian multicenter case-control study on hematolymphopietic malignancies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1076, p. 366-377, 2006.
- MOREIRA, J. C. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.
- MORIN, P. V.; STUMM, E. M. F. Transtornos mentais comuns em trabalhadores rurais que usam pesticidas: um estudo transversal. **Revista Brasileira de Enfermagem Online**, v. 15, p. 553-5, nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.17665/1676-4285.20165576> Acesso em: 11 maio 2020.
- OLIVEIRA, C. S. O.; KASPARY, N. L B.; MICNOV, T. C. **Comparação dos dados existentes no SINAN, SINITOX e CIVITOX sobre os casos de intoxicação por agrotóxicos no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de 1998 a 2000.** 2008. Monografia (Especialização) - ENSP/FIOCRUZ, Campo Grande, MS, 2008.
- OPAS. **Manual de Vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos** Brasília: OPAS, 1996.
- PAIVA, F. P.; MAFILLI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de manipulação de animais de laboratório.** Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, 2005. Disponível em: http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf. Acesso em: 22 out. 2019.
- PAIXÃO, A. O. *et al.* Doença de Parkinson: uma desordem neurodegenerativa. **Caderno de Graduação – Ciências Biológicas e da Saúde**, Aracaju, v.1, n. 16, p. 57-65, mar., 2013.

PEREIRA, A. P. C. Revisão a respeito da neurotoxicidade periférica do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético. **Revista UNINGÁ**, n.8, p. 173-183, abr./jun., 2006.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E, BRILEY, M. 1985. "Validation of Open: Closed Arm Entries in an Elevated plus-Maze as a Measure of Anxiety in the Rat." **Journal of Neuroscience Methods** 14(3): 149–67.

PIGNATI, W. A *et al.* Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017.

PIGNATI, W. A.; MACHADO, J. M. H.; CABRAL, J. F. Acidente rural ampliado: o caso das "chuvas" de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde – MT. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 105-114, 2007.

PRIMEL, E. G. *et al.* Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 605-609, Aug., 2005.

RAMOS, A.; SILVA, J. F. Exposição a pesticidas, atividade laborativa e agravos à saúde. **Revista Medica de Minas Gerais**, v. 14, n. 1, p. 41-5, 2004.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

RIGOTTO, R. M. *et al.* Estudo epidemiológico da população da região do baixo Jaguaribe exposta à contaminação ambiental em área de uso de agrotóxicos. *Tempus. Actas em Saúde Coletiva*, v. 4, n. 4, p. 142-143, 2009.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Caderno de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1-3, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311XPE020714>

ROSSO, S. B. *et al.* 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in developing rats alters behaviour, myelination and regions brain gangliosides pattern. **Neurotoxicology**, v. 21, n. 1\2, p.155-63, 2000.

ROSSO, S. B. *et al.* Evidence of a strong interaction of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide with human serum albumin. **Life Sciences**, v. 63, p. 2343–2351, 1998.

RUEGG, E. F. *et al.* **Impacto dos agrotóxicos sobre ambiente, a saúde e a sociedade**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991.

SCORZA JÚNIOR, R. P.; SILVA, J. P. Potencial de contaminação da água subterrânea por pesticidas na bacia do rio Dourados, MS. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, dec. 2007. <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v17i0.10666>

SILVERTHORN D. **Fisiologia Humana** - uma Abordagem Integrada. 5.ed. Artmed, 2010.

SPAMPINATO, M.V.; WOOD, J.N.; DE SIMONE, V.; GRAFMAN, J. Neural correlates of anxiety in healthy volunteers: a voxel-based morphometry study. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 21, p. 199–205, 2009.

SOUZA, G. S. *et al.* Presença de agrotóxicos na atmosfera e risco à saúde humana: uma discussão para a Vigilância em Saúde Ambiental. **Ciência & saúde coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3269-3280, out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.18342017>. Acesso em: 05 maio 2020.

TEEGARDEN,S. Behavioral Phenotyping in Rats and Mice. **MATER METHODS** 2012; 2: 122

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano** - Fundamentos de Anatomia e Fisiologia. Artmed Editora, 2016.

VIEIRA, E. M. *et al.* Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 305-308 1999.

VILLARDI, J. W. R. **Informações sobre intoxicações por agrotóxicos no Estado de Mato Grosso do Sul no período de 2001 a 2005 e identificação de indicadores de exposição e efeito para a vigilância ambiental**. 2008. Dissertação (Mestrado) - ENSP/FIOCRUZ, Campo Grande, MS, 2008.

XI, Y.; MALLAVARAPU, M.; NAIDU, R. Adsorption of the herbicide 2,4-D on organo-palygorskite. **Applied Clay Science**, v. 49, n. 3, p. 255-261, 2010.

ZHANG, X. *et al.* Concurrent 2, 4-D and triclopyr biomonitoring of backpack applicators, mixer/loader and field supervisor in forestry. **Journal of environmental science and health. Part. B**, v. 46, n. 4, p. 281–293, 2011.

ZUANAZZI, N. R.; CASTILHOS GHISI, N.; OLIVEIRA, E. C. Analysis of global trends and gaps for studies about 2, 4-D herbicide toxicity: A scientometric review. **Chemosphere**, v. 241, p. 125016, Feb, 2020.

2 ARTIGO

NEUROTOXICIDADE ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO CRÔNICA VIA INALATÓRIA E VIA ORAL AO ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D) – UMA SIMULAÇÃO DE EXPOSIÇÃO AMBIENTAL EM RATOS

Título resumido: NEUROTOXICIDADE ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO AO 2,4-D

Rose Meire Riçato Ueda¹, Verena Miranda de Souza², Leticia Rocha Magalhães², Pedro Henrique Nahas Chagas², Aalice Santos Cruz Veras³, Giovana Rampazzo Teixeira⁴, Gisele Alborghetti Nai⁶.

¹MSc, doctoral student of the Graduate Program in Animal Science, University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

²Graduate student in Medicine, Faculty of Medicine of Presidente Prudente (FAMEPP), University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

³MSc, Department of Physical Education, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Presidente Prudente, SP, Brazil

⁴PhD, Professor of the Department of Physical Education, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Presidente Prudente, SP, Brazil

⁵PhD, MD, professor of the Department of Pathology and the Graduate Program in Animal Science, University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

Correspondence: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil. Phone: +55-18-3229-1059. Fax: +55-18-3229-1194. E-mail: patologia@unoeste.br

HIGHLIGHTS

- O herbicida 2,4-D causa dano cerebral independente da via de exposição.
- Altas doses do 2,4-D causam mais danos cerebrais que doses baixas.
- Há dano neurocomportamental e lesão histológica associada à exposição ao 2,4-D.
- O dano cerebral está associado à alteração na expressão de marcadores apoptóticos.

RESUMO

O herbicida 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) é o segundo herbicida mais utilizado no mundo. O 2,4-D pode gerar formação de espécies reativas de oxigênio no cérebro e assim acarretar em neurodegeneração por induzir apoptose. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito neurotóxico e o possível papel da desregulação da apoptose na gênese das alterações do sistema nervoso central mediante a exposição crônica ao 2,4-D. Foram utilizados 80 ratos adultos e machos, distribuídos em oito grupos (n=10), expostos por via oral (ração contaminada) e inalatória, sendo dois grupos expostos a água destilada (controle) e seis ao 2,4-D em três doses distintas (baixa concentração: $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha); média concentração: $6,19 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha; e alta concentração: $9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha). Os animais foram expostos por 6 meses. Foi realizada avaliação neurocomportamental e o cérebro foi coletado para análise histopatológica e imunohistoquímica. Os animais dos grupos controle apresentaram maior motilidade no teste de campo aberto e maior número de entradas no teste do labirinto em cruz elevado do que os expostos ao 2,4-D ($p < 0,05$). Necrose neuronal foi observada apenas nos animais expostos ao 2,4-D ($p < 0,05$). Houve correlação negativa entre a expressão de BAX e a medida da espessura do córtex cerebral ($r = -0,713$; $p = 0,047$). Não houve diferença entre as vias de exposição para todos os parâmetros avaliados ($p > 0,05$). Independente da via de exposição, o 2,4-D acarretou em déficit aos testes neurocomportamentais e diminuição da espessura do córtex cerebral associada a aumento da expressão de marcador pró-apoptótico.

Palavras-chave: sistema nervoso central, ciclo celular, pesticidas, comportamento, meio ambiente.

1. Introdução

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) pertence à classe dos fenoxerbicidas e vem sendo comercializado desde 1945. O 2,4-D é um dos componentes do “agente laranja” que foi utilizado durante a Guerra do Vietnã como desfolhante nas áreas da selva. Atualmente, o 2,4-D é o segundo herbicida mais utilizado no mundo como inibidor de crescimento de plantas (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2018). Seus efeitos imunossupressores, neurotóxicos e hepatotóxicos têm sido documentados (Tayeb et al., 2011). O 2,4-D pode causar vários efeitos sobre o sistema nervoso, como miotonia, interrupção da atividade neuronal e alterações comportamentais, hiperreatividade nos neonatos, catalepsia e tendência de virar à direita (Bortolozzi et al., 2004).

Pesquisas sobre a neurotoxicidade do 2,4-D vêm ocorrendo há vários anos, mas a maior parte delas se concentra em seus efeitos no desenvolvimento do sistema nervoso dos roedores. Os estudos frequentemente usaram altas doses de 2,4-D que resultaram em mudanças adversas no sistema nervoso em desenvolvimento - tanto neuroquímicas quanto comportamentais. A injeção de 2,4-D diretamente no cérebro de ratos resultou em toxicidade nos núcleos da base, mas essa via de administração não é uma via comum de exposição do ser humano. Assim como, a maioria dos estudos foi sobre o sistema nervoso em desenvolvimento, não sobre o sistema nervoso maduro (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2018). O sistema nervoso em desenvolvimento é mais susceptível aos contaminantes ambientais do que o sistema nervoso de um adulto (Ferri et al., 2007). O diferencial de nosso estudo, é que utilizamos doses semelhantes àquelas da exposição ambiental (por via oral e inalatória) e utilizamos animais adultos, sendo possível analisar os efeitos do 2,4-D sobre o cérebro já desenvolvido.

Atualmente, há uma grande preocupação com a contaminação ambiental por herbicidas que podem contaminar ar, solo e mananciais de água e que assim podem provocar a contaminação de plantas, animais e do ser humano, acarretando em danos à saúde. O mecanismo de ação do 2,4-D ainda não é bem esclarecido, mas se sabe que ele atua na fosforilação oxidativa e nas rotas metabólicas que podem

acarretar em toxicidade ao sistema nervoso central (Bradberry et al., 2004; Tayeb et al., 2011; Pannu et al., 2018).

Embora as observações toxicológicas não possam estabelecer uma conclusão de que os pesticidas produziram efeitos neurotóxicos em humanos, elas estabelecem plausibilidade biológica e apontam para mecanismos potenciais de ação (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2018). Neste estudo, avaliamos a possibilidade do 2,4-D acarretar neurodegeneração e atrofia cerebral.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito neurotóxico, segundo parâmetros comportamentais e histopatológicos, e o possível papel da desregulação da apoptose na gênese das alterações do sistema nervoso central mediante a exposição crônica ao herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) em ratos adultos.

2. Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade do Oeste Paulista (Protocolo n° 4485).

2.1 Protocolo de exposição ao herbicida 2,4-D

A exposição ao herbicida ácido diclorofenoxiacético foi feita com 2,4-D (Nortox S.A., Arapongas, Paraná, Brasil) [composto por: sal de dimetilamina de (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D): 806 g/L dimethylamine salt of 2,4-dichlorophenoxyacetic (80.6% m/v), 670 g/L 2,4-D acid equivalent (67.0% m/v) and 424 g/L inert ingredients (42.4% m/v)] em três diferentes concentrações: baixa concentração: $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) (correspondendo a 187,17 mg/m³); média concentração: $6,19 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha (correspondendo a 313,31 mg/m³); e alta concentração: $9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha (correspondendo a 467,93 mg/m³). Estas três concentrações do 2,4-D foram baseadas na bula do produto, e são utilizadas para diferentes tipos de lavoura (Mello et al., 2018).

Para a nebulização dos animais e da ração foram utilizadas duas caixas (32x24x32cm) ligadas a nebulizadores ultrassônicos (Pulmosonic Star[®], Soniclear Ind. Com. Imp. e Exp. Ltda., São Paulo, Brasil) (Mello et al., 2018). Cada

concentração do 2,4-D foi ajustada a área da caixa para simulação da exposição ambiental.

2.1.2 Protocolo de exposição inalatória

Os animais expostos por via inalatória foram nebulizados durante cinco dias consecutivos na semana para simulação da exposição ocupacional na lavoura.

Os animais de um mesmo grupo foram colocados juntos de corpo inteiro dentro de uma mesma caixa para a nebulização.

2.1.2 Protocolo de exposição oral

A exposição oral foi realizada mediante o fornecimento de ração nebulizada com as três diferentes concentrações de 2,4-D (grupos expostos) ou com água destilada (grupos controle).

A nebulização da ração foi realizada um dia antes de ser ofertada aos animais, sendo trocada a cada dois dias. A ração residual foi pesada a cada troca para a avaliação da quantidade de ingestão.

Os animais de todos os grupos foram pesados mensalmente. Todos os animais foram expostos durante 6 meses e após este período foram eutanasiados. A eutanásia foi realizada com Tiopental sódico (Syntec, EUA), na dose de 100 mg/Kg de peso, via intraperitoneal (Paiva et al., 2005).

2.2 Protocolo animal

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 80 ratos Wistar adultos, machos (200-250g), os quais foram alocados em gaiolas plásticas grandes, em biotério climatizado (temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$; umidade relativa de $50 \pm 15\%$) e com ciclos de claro e escuro (12 horas cada).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos (n=10):

- GI - grupo controle inalatório: animais expostos à nebulização com água destilada;
- GII - grupo controle oral: ração nebulizada com água destilada;
- GIII - grupo de baixa concentração inalatório: animais expostos à nebulização com baixa concentração de 2,4-D;
- GIV - grupo de baixa concentração oral: ração nebulizada com baixa concentração de 2,4-D;

- GV - grupo de média concentração inalatório: animais expostos à nebulização média concentração de 2,4-D;
- GVI - grupo de média concentração oral: ração nebulizada com média concentração de 2,4-D;
- GVII - grupo de alta concentração inalatório: animais expostos à nebulização com alta concentração de 2,4-D;
- GVIII - grupo de alta concentração oral: ração nebulizada com alta concentração de 2,4-D.

2.3 Avaliação comportamental

Para avaliação comportamental, os testes comportamentais utilizados foram: Teste de campo aberto e Labirinto em Cruz Elevado, cujo objetivo foi a observação do estado geral de saúde, dos reflexos neurológicos, das habilidades sensoriais e da função motora dos animais utilizados. Foi realizado um teste por dia e em ordem crescente de estresse, visando evitar a influência do teste anterior.

2.3.1 Teste de campo aberto

O Teste de campo aberto tem como objetivo avaliar atividade locomotora e emocionalidade/ansiedade dos animais (Pandolfo et al., 2007). Este teste foi realizado uma semana antes da última administração do herbicida 2,4-D, no período entre 08h00 e 17h00, conforme descrito por Prediger et al. (2008).

O teste foi realizado em uma caixa medindo 100x100cm. O assoalho foi dividido em 25 quadrantes iguais de 20x20cm cada [Fig.1]. A caixa foi limpa com álcool 10% após cada teste. A sala onde o teste foi realizado possuía uma luz vermelha de 15-W que fornecia 3 lux de iluminação sobre o centro do aparato. O animal passou por um período de adaptação a caixa com duração de 10 minutos antes da realização do teste. Os experimentos foram gravados em vídeo, por cinco minutos, através de uma câmera de 8MP, gravação de vídeo: 1080p e resolução: 640 x 960px, posicionada sobre o campo aberto. Durante todo o experimento o mesmo observador ficou dentro da sala, onde estava a caixa, para realização da gravação, ficando em uma posição superior a caixa.

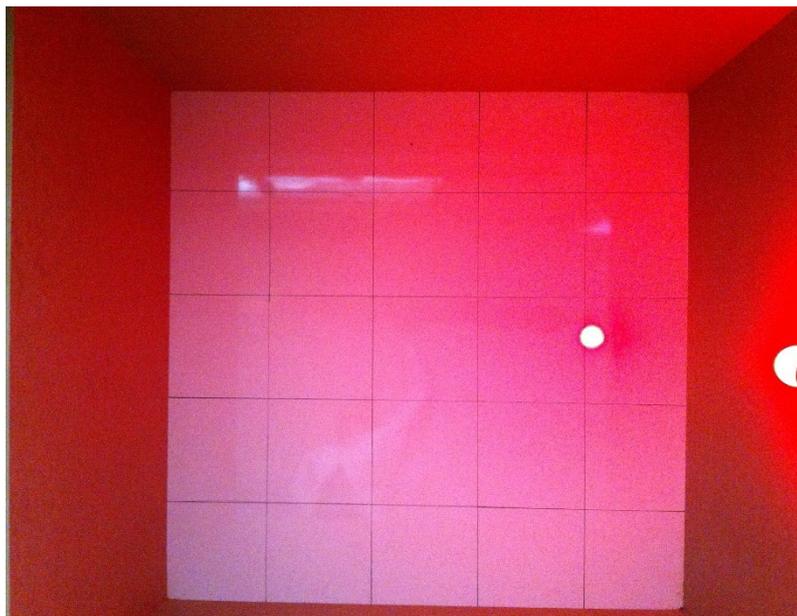


Fig. 1. Caixa utilizada para a realização do Teste de campo aberto iluminada com luz vermelha de 15-W.

Os parâmetros avaliados nas gravações foram: número de entradas no centro e tempo de permanência no centro do aparato e distância total percorrida, contabilizando a locomoção total de cada animal (Pandolfo et al., 2007).

Neste experimento a locomoção total, foi mensurada por meio da contagem do número de quadrantes cruzado com as quatro patas pelo animal. A área central do aparato definida como sendo 20x20 cm (Mack et al., 2018). O teste se iniciava quando o animal era colocado individualmente no centro do campo aberto e explorava de forma livre o aparato durante o tempo estabelecido de 5 minutos.

2.3.2 Teste do labirinto em cruz elevado

O Teste de Labirinto em Cruz Elevado tem como objetivo avaliar o nível de ansiedade. Este teste foi realizado uma semana antes da última administração do herbicida 2,4-D, no período entre 08h00 e 17h00, conforme descrito por Pellow et al. (1985).

O labirinto é feito de madeira e apresenta dois braços abertos (50 cm × 10 cm) um de frente um para o outro e não possuem parede para cercá-los. Perpendicular aos braços abertos, ficam dois fechados (50 cm × 10 cm × 40 cm). Os braços abertos e fechados são unidos por uma plataforma central de (10 cm × 10 cm)

colocado a 50cm acima do chão [Fig. 2]. O Labirinto foi limpo com álcool 10% após cada teste.



Fig. 2. Labirinto em cruz elevado utilizado no experimento. A – Visão frontal. B – Visão superior.

A sala onde o teste foi realizado possuía uma luz cuja intensidade não ultrapassava 44lux. Os experimentos foram gravados em vídeo, por cinco minutos, através de uma câmera de 8MP, gravação de vídeo: 1080p. e resolução: 640 x 960px, posicionada acima do labirinto. Durante todo o experimento o mesmo observador ficou dentro da sala, onde estava o labirinto, para realização da gravação, ficando em uma posição superior ao labirinto em cruz elevado.

Os parâmetros avaliados nas gravações foram: frequência de entradas nos braços abertos e fechados, tempo de permanência em ambos os braços e no centro e suas porcentagens, calculadas segundo as fórmulas abaixo (Pellow et al., 1985):

- % de entrada no braço aberto =
$$\frac{\text{entrada no braço aberto} \times 100}{\text{entrada no braço aberto} + \text{entrada no braço fechado}}$$
- % de tempo no braço aberto =
$$\frac{\text{tempo no braço aberto} \times 100}{\text{tempo no braço} + \text{tempo no braço fechado}}$$

Neste experimento, a ansiedade foi mensurada através da contagem de entradas nos braços abertos, nos fechados, sendo uma entrada contada quando o

animal colocava as quatro patas em um braço do labirinto. Sendo o efeito ansiogênico definido como uma diminuição na frequência de entradas de braço abertos e o tempo de permanência. O teste se iniciava quando o animal era colocado individualmente no centro do labirinto de frente para um dos os braços fechados e explorava de maneira livre o labirinto por 5 minutos (Pellow et al.,1985).

2.4 Análise histopatológica

Após a eutanásia, foi coletado o cérebro, cujos cortes foram fixados em formol tamponado a 10% (Cinética Indústria Química, São Paulo, Brasil) durante 24 horas e submetidos a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil). Cortes seriados do córtex frontal com espessura de 5 μ foram obtidos através de micrótomo LEICA RM2265 (Leica Biosystems Nussoch GmbH, Alemanha) e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil).

A análise histopatológica foi cega e realizada por um observador experiente, utilizando-se microscópio óptico comum (NIKON Labophot, Japão) e foram avaliados os seguintes parâmetros, com seus respectivos escores: congestão tecidual (0=ausente; 1=leve; 2=moderada; 3=acentuada); infiltrado inflamatório (0=ausente; 1=leve; 2=moderado; 3=acentuado) e tipo de célula inflamatória presente (polimorfonucleares e/ou monucleares); necrose tecidual (0=ausente; 1=presente); necrose vascular (0=ausente; 1=presente); gliose (0=ausente; 1=presente); e número de neurônios apoptóticos contados em 10 campos de grande aumento (CGA), o que corresponde a 1mm² de área.

Uma imagem original corada por hematoxilina-eosina de cada animal foi capturada no aumento de 200x pelo fotomicroscópio Leica (Leica Microsystems, Suíça). As medidas da espessura do córtex frontal cerebral foram realizadas em duas áreas para cada animal, utilizando-se o software Image J[®], do *National Institute of Health* (NIH) dos Estados Unidos, disponível gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

2.5 Análise imunoistoquímica

Cortes adicionais do córtex frontal do cérebro foram feitos para realização da imunohistoquímica. De acordo com as características de cada antígeno, a recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6,0) na panela de pressão (Electrolux Chef, AB Electrolux, Curitiba, Paraná, Brasil). Para o bloqueio da peroxidase endógena os cortes foram submetidos a solução de peróxido de hidrogênio e metanol (metanol 3%) durante 15 minutos. Posteriormente, o bloqueio proteico foi realizado pela incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (BSA 3%) durante 1 hora em temperatura ambiente, diluído em tampão TBS-T. Na etapa seguinte, as seções foram submetidas à reação com os anticorpos primários específicos BAX (P-19, Santa Cruz sc-526, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, EUA) na diluição 1:100 e BCL-2 (N-19, Santa Cruz sc-492, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, EUA) na diluição 1:100 e incubadas em câmara úmida durante a noite a 4°C em geladeira. Posteriormente, após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário *goat anti-rabbit HRP* (Santa Cruz sc-2030, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, EUA), revelados com diaminobenzidina (DAB) por 2 minutos, contra-corados com Hematoxilina de Harris durante 4 minutos e avaliados no fotomicroscópio Zeiss Axio photo (Zeiss, Munique, Alemanha). Os cortes do cérebro de cinco animais de cada grupo experimental foram avaliados através do precipitado acastanhado de DAB que indica a imunorreatividade dos anticorpos.

Dez imagens originais coradas por imunoistoquímica de cada antígeno e de cada animal foram capturadas no aumento de 400x pelo fotomicroscópio Leica (Leica Microsystems, Suíça) e a intensidade da imunorreatividade dos antígenos foi avaliada utilizando o software Image J[®]. Utilizou-se a ferramenta de análise de imagem "*IHC profiler-cytoplasmic stained image*" e foi computada a porcentagem de área marcada (Varghese et al., 2014).

2.6 Análise estatística

Os dados foram processados com o pacote SPSS 22.0 e realizados com 5% de significância.

Para comparar os grupos foi utilizado Análise de Variância (ANOVA) quando os dados apresentaram normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) ou o teste de Kruskal-Wallis (KW), caso contrário. Para as comparações múltiplas da ANOVA foi utilizado o teste DSM

(Diferença Mínima Significativa) e para o KW foi utilizado o teste de Student-Newman-Keuls. Para as comparações entre Inalatório x Oral, foi utilizado o teste-t (quando os dados apresentaram normalidade e homogeneidade das variâncias) ou o teste de Mann-Whitney, caso contrário. Para as variáveis qualitativas foi utilizado o teste da Razão de Verossimilhança.

As correlações utilizadas foram a de Pearson (quando as variáveis apresentaram normalidade) ou de Spearman (quando não apresentaram normalidade).

3. Resultados

Um animal do grupo GVIII foi a óbito durante o estudo devido à infecção do conduto auditivo.

Não houve diferença no consumo da ração entre os grupos de estudo ($p>0,05$), assim como não houve diferença no peso dos animais ao longo do estudo ($p>0,05$).

3.1 Avaliação comportamental

3.1.1 Teste de campo aberto

Os animais dos grupos GI, GII e GIV perfizeram um maior número total de cruzamentos em relação aos outros grupos ($p<0,001$) [Fig. 3A]. Em relação ao número de cruzamentos centrais e tempo total de permanência no centro, os animais dos grupos expostos apresentaram menor número de cruzamentos e menor tempo de permanência, diferentemente dos animais dos grupos GI e GII que apresentaram o maior número de cruzamentos e o maior tempo ($p<0,001$) e para ambos os parâmetros; o grupo GIV apresentou maiores índices do que o grupo GVIII ($p<0,05$) [Fig. 3B e 3C]. Não houve diferença entre as vias de exposição (oral e inalatória) para todos os parâmetros avaliados ($p>0,05$).

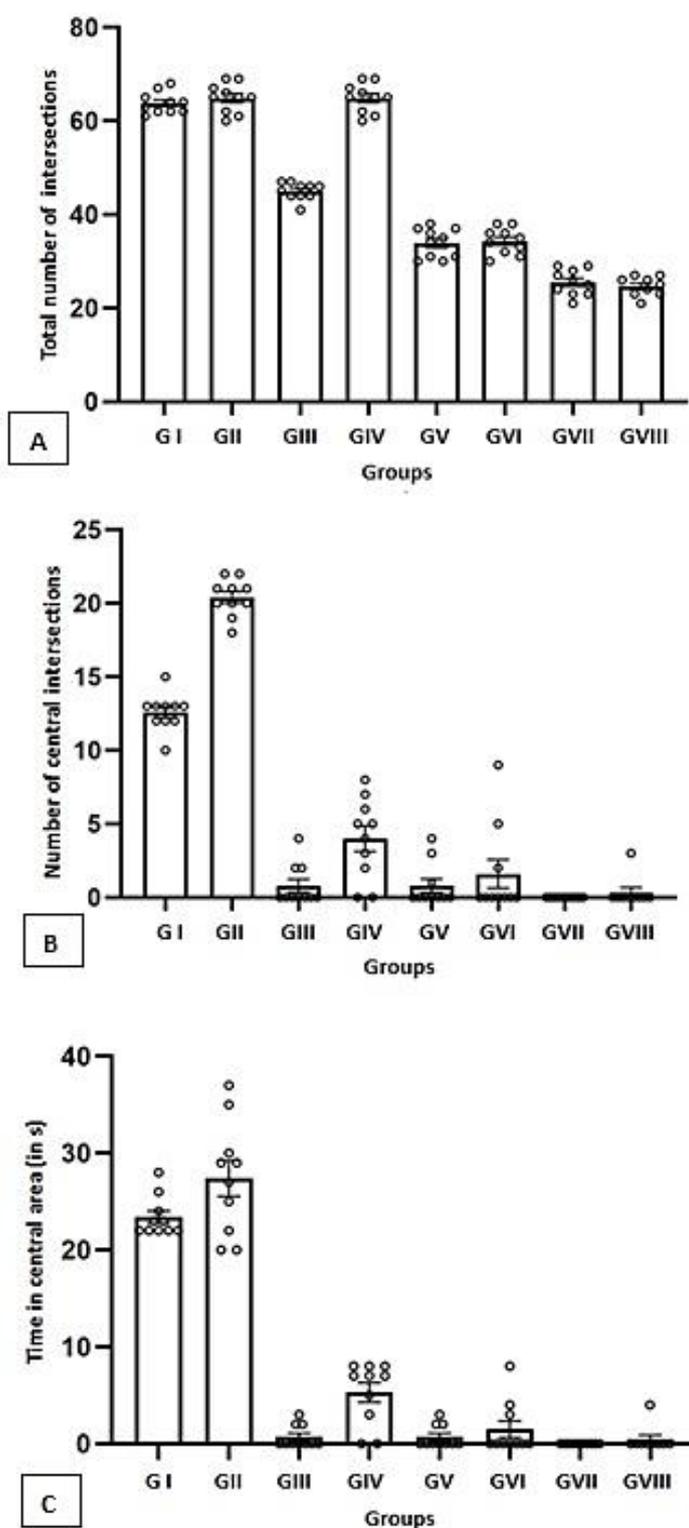


Fig. 3. A - Número total de cruzamentos por grupo de estudo. B - Número de cruzamentos centrais por grupo de estudo. C - Tempo total de permanência no centro [em segundos (s)] por grupo de estudo. GI: Controle inalatório; GII: Controle oral; GIII: Baixa concentração inalatório de 2,4-D; GIV: Baixa concentração oral de 2,4-D; GV: Média concentração inalatório de 2,4-D; GVI: Média concentração oral de 2,4-D; GVII: Alta concentração inalatório de 2,4-D; GVIII: Alta concentração oral de 2,4-D.

3.1.2 Teste do labirinto em cruz elevado

O número de entradas no braço aberto foi significativamente maior no grupo GI, quando comparado ao grupo GVII e no grupo GII quando comparado aos grupos GVI e GVIII ($p < 0,05$). Em relação à porcentagem de entrada no braço aberto, os animais do grupo GI apresentaram maior porcentagem que os dos grupos expostos ao 2,4-D por via inalatória (grupos GIII, GV e GVII), os animais do grupo GII apresentaram maior porcentagem quando comparado aos dos grupos expostos à média e alta concentração oral do 2,4-D (grupos GVI e GVIII) e os animais do grupo GIV apresentaram maior porcentagem de entrada do que os dos grupos GVI e GVIII ($p < 0,05$). A porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos foi maior nos grupos controle em relação à porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos dos grupos expostos ao 2,4-D ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos na avaliação do número de entradas no braço fechado ($p = 0,093$). Não houve diferença entre as vias de exposição (oral e inalatória) para todos os parâmetros avaliados ($p > 0,05$) [Fig. 4].

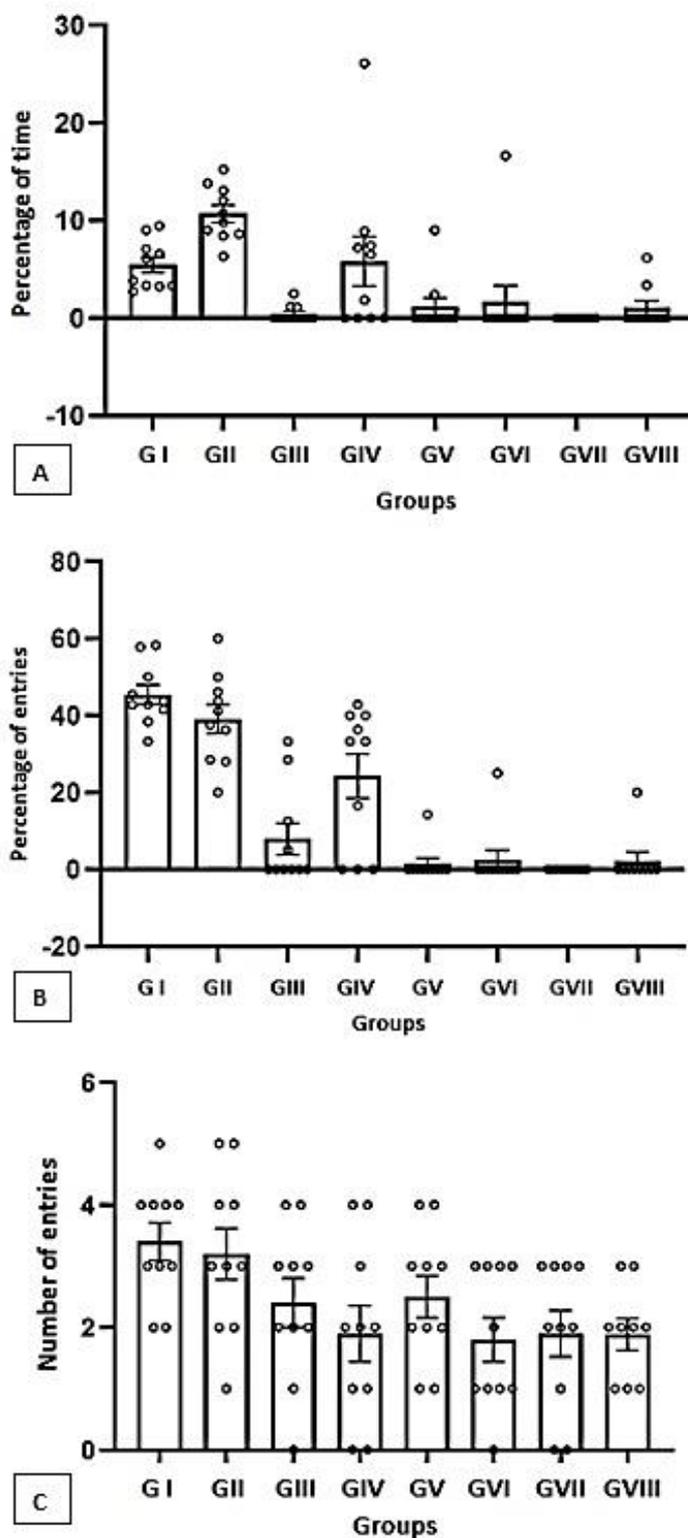


Fig. 4 - Teste do labirinto em cruz. A - Percentual do tempo de permanência nos braços abertos. B - Percentual do número de entradas nos braços abertos. C – Número de entradas nos braços fechados. GI: Controle inalatório; GII: Controle oral; GIII: Baixa concentração inalatório de 2,4-D; GIV: Baixa concentração oral de 2,4-D; GV: Média concentração inalatório de 2,4-D; GVI: Média concentração oral de 2,4-D; GVII: Alta concentração inalatório de 2,4-D; GVIII: Alta concentração oral de 2,4-D.

3.2 Análise histopatológica

Não foram observadas congestão tecidual, infiltrado inflamatório, necrose tecidual ou necrose vascular. Apenas dois animais do grupo GIII e um do grupo GIV apresentaram gliose ($p > 0,05$).

Presença de necrose individual de neurônios foi observada apenas nos animais expostos ao 2,4-D, sendo que a menor incidência ocorreu no grupo GIV ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os tipos de exposição (oral ou inalatória) ($p > 0,05$) [Tab. 1, Fig. 5].

Tab.1. Média (\pm desvio padrão) de neurônios apoptóticos (por mm^2) segundo o grupo de estudo (n=79).

Grupos	Neurônios apoptóticos
GI	2,27 ($\pm 0,55$) ^a
GII	3,44 ($\pm 0,76$) ^a
GIII	45,32 ($\pm 2,37$) ^b
GIV	6,81 ($\pm 1,13$) ^a
GV	42,82 ($\pm 2,10$) ^b
GVI	43,65 ($\pm 1,54$) ^b
GVII	46,28 ($\pm 1,67$) ^b
GVIII	39,34 ($\pm 2,79$) ^b

Grupos: GI: Controle inalatório; GII: Controle oral; GIII: Baixa concentração inalatório de 2,4-D; GIV: Baixa concentração oral de 2,4-D; GV: Média concentração inalatório de 2,4-D; GVI: Média concentração oral de 2,4-D; GVII: Alta concentração inalatório de 2,4-D; GVIII: Alta concentração oral de 2,4-D. Letras minúsculas comparam os grupos ao mesmo tempo e na mesma coluna. Letras diferentes: $p < 0,05$.

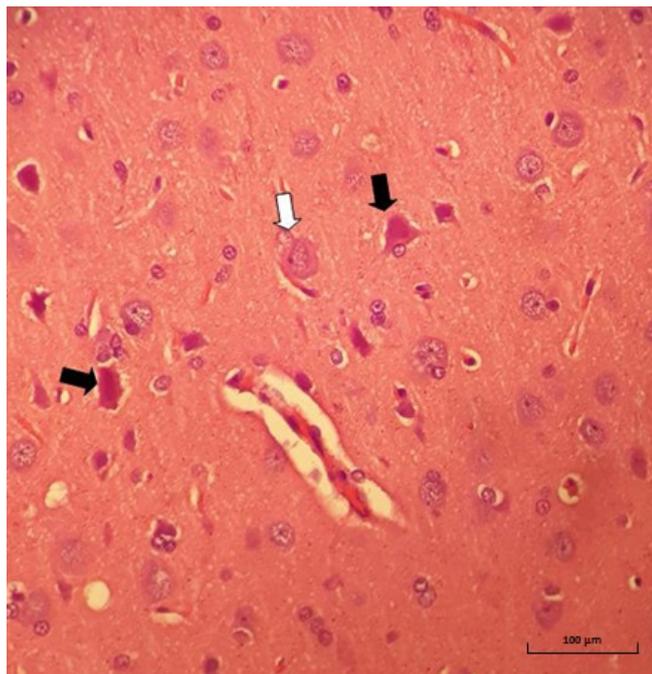


Fig. 5. Fotomicroscopia do córtex cerebral de um animal do grupo GIII (Baixa concentração inalatório de 2,4-D) mostrando neurônios apoptóticos (setas pretas), próximo a neurônio normal (seta branca). Hematoxilina-eosina, aumento de 400x. Barra de escala: 100 μ m.

3.3 Medida da espessura do córtex

A média da medida da espessura do córtex cerebral foi significativamente menor no grupo GV, o qual diferiu dos grupos GI e GIII ($p < 0,05$). A espessura do córtex também foi menor nos grupos GIV e GVI quando comparados aos grupos GII e GVIII ($p < 0,05$) e menor no grupo GVII quando comparado aos grupos GI e GIII ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística em relação ao tipo de exposição (inalatória ou oral) ($p = 0,495$) [Fig. 6].

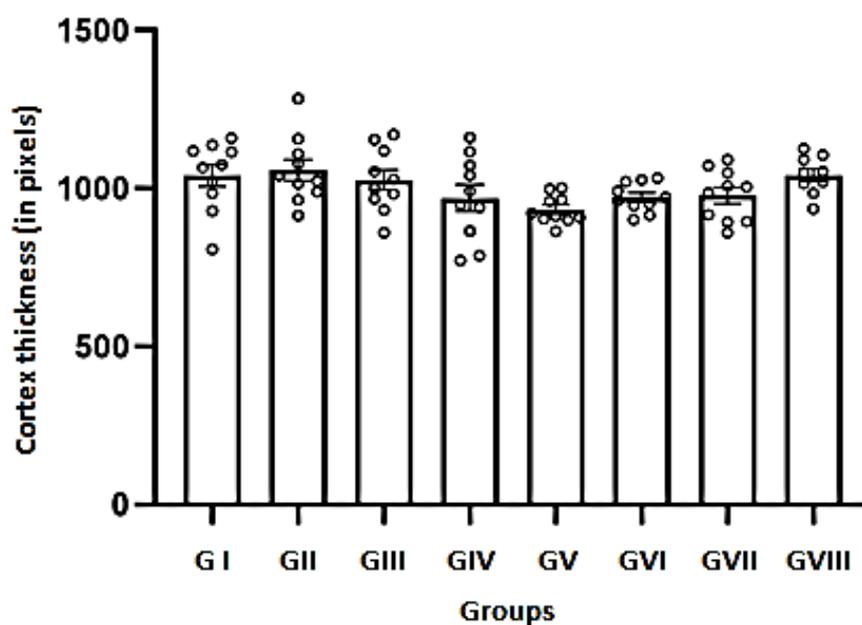


Fig. 6. Média da medida da espessura (em pixel) do córtex cerebral dos animais por grupo de estudo (n=79). GI: Controle inalatório; GII: Controle oral; GIII: Baixa concentração inalatório de 2,4-D; GIV: Baixa concentração oral de 2,4-D; GV: Média concentração inalatório de 2,4-D; GVI: Média concentração oral de 2,4-D; GVII: Alta concentração inalatório de 2,4-D; GVIII: Alta concentração oral de 2,4-D.

3.4 Análise imunoistoquímica

A expressão de BAX foi significativamente maior nos grupos GV e GVII quando comparada ao grupo GI e foi maior em GVI e GVIII quando comparados ao grupo GII e em GVI comparando-se a GIV ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa em relação ao tipo de exposição (inalatória ou oral) ($p = 0,641$) [Fig. 7].

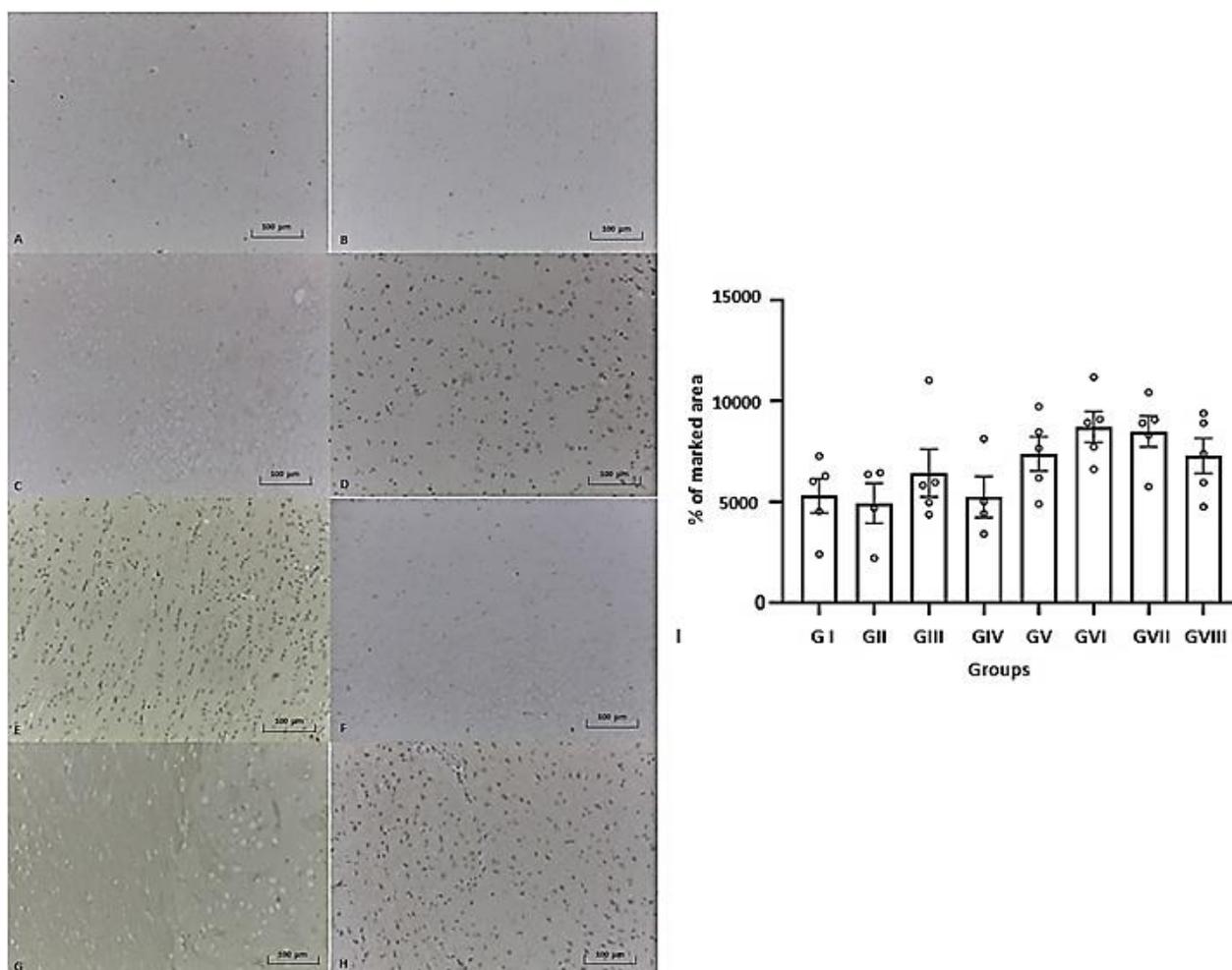


Fig. 7. Imunomarcção com anticorpo anti-BAX (aumento de 400x - Barra de escala: 100µm.): A – Animal do grupo GI; B – Animal do grupo GII; C – Animal do grupo GIII; D – Animal do grupo GIV; E – Animal do grupo GV; F – Animal do grupo GVI; G – Animal do grupo GVII; H – Animal do grupo GVIII; I - Média da porcentagem de área cerebral marcada para BAX por grupo de estudo (n=79). GI: Controle inalatório; GII: Controle oral; GIII: Baixa concentração inalatório de 2,4-D; GIV: Baixa concentração oral de 2,4-D; GV: Média concentração inalatório de 2,4-D; GVI: Média concentração oral de 2,4-D; GVII: Alta concentração inalatório de 2,4-D; GVIII: Alta concentração oral de 2,4-D.

A expressão de BCL-2 foi significativamente maior nos grupos GI, GVII e GVIII quando comparada aos demais grupos ($p < 0,05$) e GIV foi significativamente maior que GVI ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística em relação ao tipo de exposição (inalatória ou oral) ($p = 0,515$) [Fig. 8].

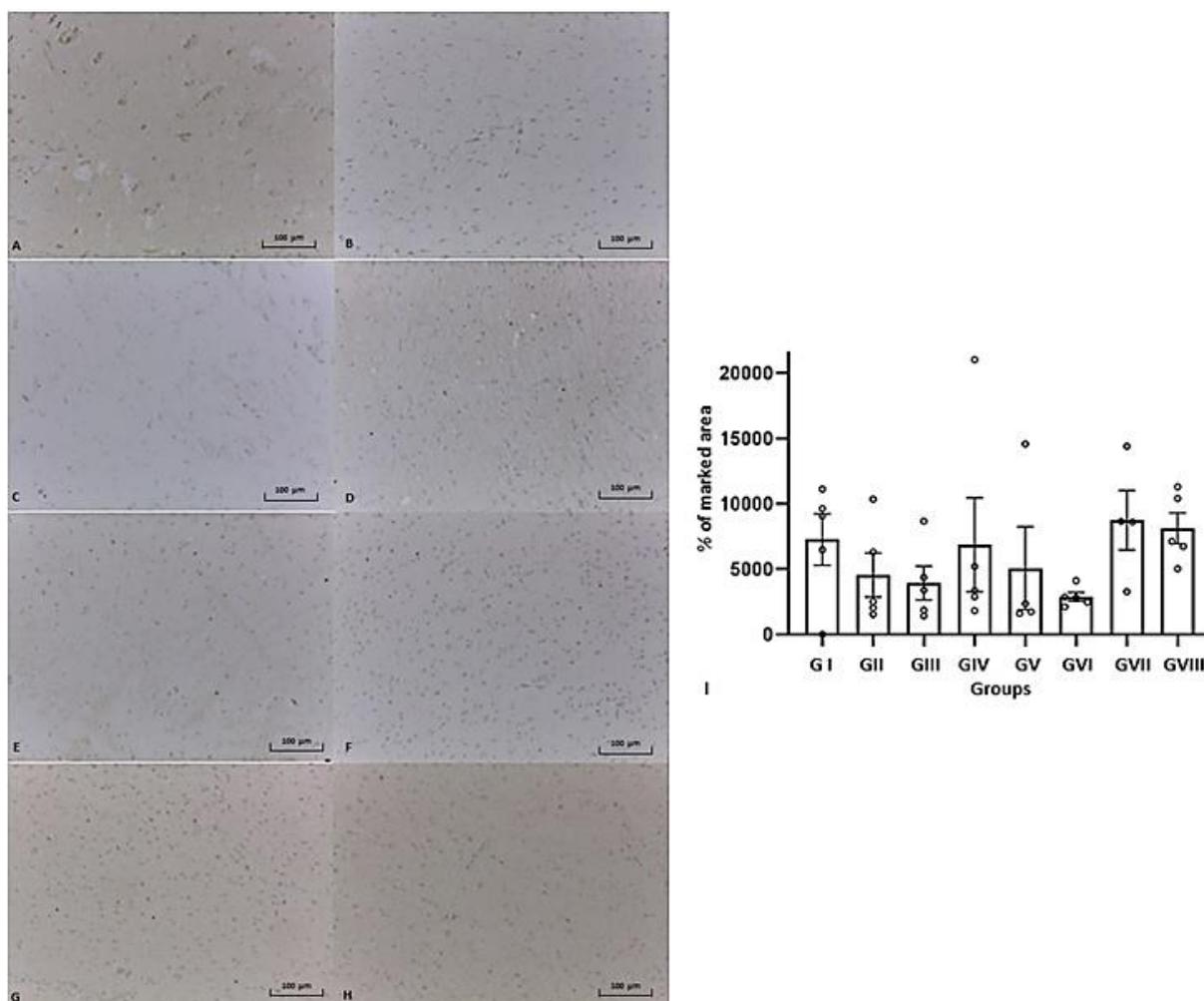


Fig. 8. Imunomarcaco com anticorpo anti-BCL-2 (aumento de 400x - Barra de escala: 100µm.): A – Animal do grupo GI; B – Animal do grupo GII; C – Animal do grupo GIII; D – Animal do grupo GIV; E – Animal do grupo GV; F – Animal do grupo GVI; G – Animal do grupo GVII; H – Animal do grupo GVIII; I - Média da porcentagem de área cerebral marcada para BCL-2 por grupo de estudo (n=79). GI: Controle inalatório; GII: Controle oral; GIII: Baixa concentrao inalatório de 2,4-D; GIV: Baixa concentrao oral de 2,4-D; GV: Média concentrao inalatório de 2,4-D; GVI: Média concentrao oral de 2,4-D; GVII: Alta concentrao inalatório de 2,4-D; GVIII: Alta concentrao oral de 2,4-D.

3.5 Correlao entre a expressão dos marcadores BAX e BCL-2

Não houve correlao entre a média de expressão dos marcadores BAX e BCL-2 ($\rho = -0,278$; $p = 0,235$).

3.6 Correlação entre a espessura do córtex cerebral e a expressão dos marcadores BAX e BCL-2

Houve correlação negativa entre a média da espessura do córtex cerebral e a média da expressão de BAX ($r = -0,713$; $p=0,047$) [Fig. 9], porém não para BCL-2 ($r = 0,167$; $p=0,692$).

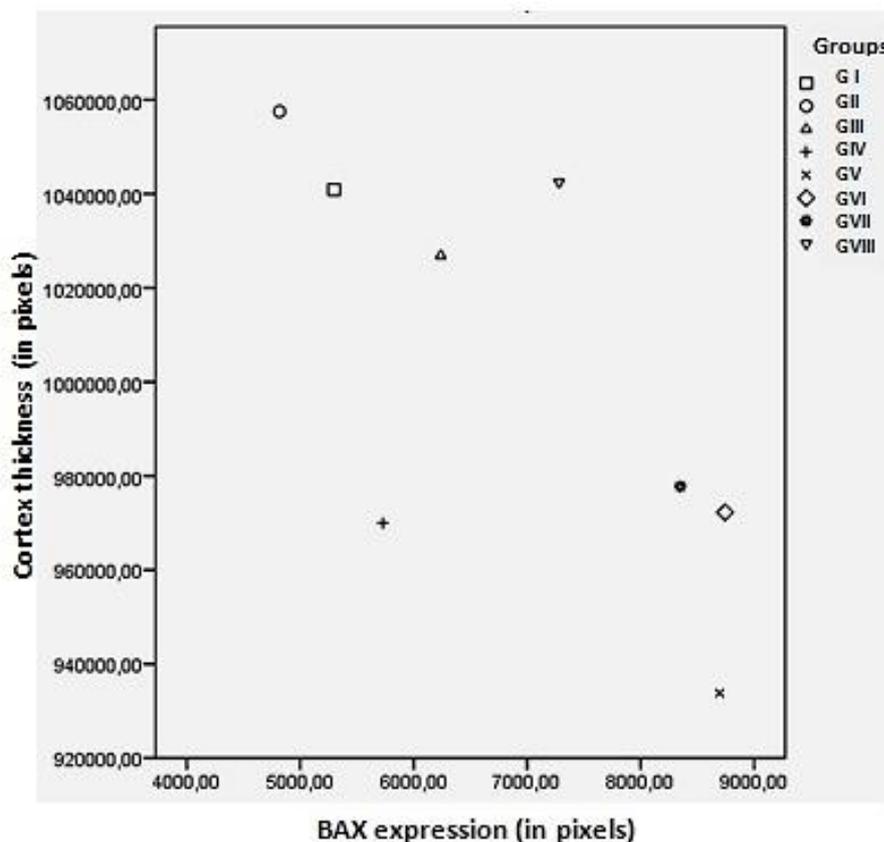


Fig. 9. Correlação entre a média da espessura do córtex cerebral (em pixel) e a média da expressão de BAX (em pixel) por grupo de estudo ($n=79$) ($p=0,047$). GI: Controle inalatório; GII: Controle oral; GIII: Baixa concentração inalatório de 2,4-D; GIV: Baixa concentração oral de 2,4-D; GV: Média concentração inalatório de 2,4-D; GVI: Média concentração oral de 2,4-D; GVII: Alta concentração inalatório de 2,4-D; GVIII: Alta concentração oral de 2,4-D.

4. Discussão

A exposição crônica ao 2,4-D, independente da via de exposição (oral ou inalatória), acarretou em déficit aos testes neurocomportamentais que avaliaram locomoção e nível de ansiedade dos animais, ocasionou necrose individual de neurônios e diminuição da espessura do córtex cerebral associada a aumento da expressão de BAX (um marcador pró-apoptótico).

Vários estudos têm avaliado mecanismos de neurotoxicidade que podem ser atribuídos aos pesticidas, principalmente ao 2,4-D e ao TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina). Diversos estudos sugerem que os pesticidas, principalmente o 2,4-D, têm efeitos neurológicos, tanto neuroquímicos quanto comportamentais, em modelos animais, se a exposição ocorrer durante o desenvolvimento ou em células nervosas cultivadas (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2018). A neurotoxicidade do 2,4-D pode ser resultante da inalação aguda e da ingestão oral deste herbicida (Bongiovanni et al., 2011). Um estudo que avaliou o sistema nervoso central de ratas recém-nascidas mostrou alterações na citoarquitetura astrogliar e função neuronal, bem como algumas alterações comportamentais nos animais expostos ao 2,4-D (Bongiovanni et al., 2011).

Um estudo anterior mostrou hiperatividade de animais expostos ao 2,4-D na fase pré-natal ao teste do campo aberto, enquanto que os animais que foram expostos desde a gestação até a idade adulta (90 dias) mostraram uma diminuição da deambulação e da postura ereta (Bortolozzi et al., 1999). Em nosso estudo, onde a exposição ao 2,4-D se iniciou na vida adulta, observamos que os animais dos grupos expostos apresentaram menor número de cruzamentos e menor tempo de permanência no centro do campo aberto. Este dado demonstra uma diminuição da atividade locomotora e maior ansiedade nestes animais, e que esta é uma alteração que ocorre em animais adultos independente da fase de início da exposição. Além disso, também observamos um menor número de entradas e um menor tempo de permanência dos animais expostos ao 2,4-D nos braços abertos no teste do labirinto em cruz, o que corrobora o aumento de ansiedade nestes animais observado ao teste de campo aberto.

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela disfunção e morte de populações neuronais específicas. Além do componente genético de diferentes alterações moleculares e celulares, a degeneração neuronal pode ocorrer por estresse metabólico e oxidativo, interrupção da homeostase ou lesão traumática (Alberghina e Colangelo, 2006). Um dos efeitos causados pela exposição a pesticidas é um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo tem sido implicado como um mecanismo patogênico comum em neurodegeneração (Ferri et al., 2007; Fotokun et al., 2008).

Em altas concentrações, as espécies reativas de oxigênio são capazes de induzir necrose, enquanto que em doses menores induzem apoptose (Fotokun et al., 2008). A apoptose clássica é a expressão fenotípica mais conhecida da morte celular programada, apresentando duas vias receptoras de morte, a extrínseca e a mitocondrial (intrínseca) (Krantic et al., 2007). A formação de radicais livres pode levar a apoptose pela via intrínseca, ou seja, a via da disfunção mitocondrial, independente de caspases (Fotokun et al., 2008).

O 2,4-D mostrou alterar os níveis de íons de ferro, cobre e zinco no cérebro de filhotes expostos ao 2,4-D através da amamentação e estes íons estão associados à regulação de sistemas de neurotransmissores e homeostase de espécies reativas de oxigênio (Ferri et al., 2007).

A degeneração neuronal secundária pode estar associada a mecanismos inflamatórios, ser mediada por glutamato, e outros mecanismos como isquemia pós-traumática, desequilíbrio iônico, metabólitos, radicais livres e outros neurotransmissores e também tem sido associada a doenças neurodegenerativas crônicas e neurológicas, como acidente vascular cerebral isquêmico, epilepsia e doença de Alzheimer. Na degeneração neuronal secundária há formação de células excitotóxicas e a morte destas células é regulada pela família de proteínas do linfoma de células B-2 (BCL-2) (D'Orsi et al., 2017). A família BCL-2 (*B-cell lymphoma protein 2*) apresenta moléculas pró-apoptóticas: BAX (*BCL-2 associated protein X*), BAK, BCL-xS, BAD, BID, BIK, HRK, BIM e BOK) e antiapoptóticas (BCL-2, BCL-xL, BCL-w, BFL-1, BRSAG-1, MCL-1, A1, E1B19K, LMW5-HL e EBV BHRF1) (Faria et al., 2006). Os membros da família das proteínas BCL-2 mediam a via da apoptose intrínseca, controlando a integridade da membrana externa mitocondrial e também a homeostase neuronal do Ca^{2+} , o que também pode levar a morte neuronal (D'Orsi et al., 2017). No presente estudo, observamos um aumento da expressão da proteína BAX (uma proteína pró-apoptótica da família BCL-2) nos grupos expostos à média e alta concentração de 2,4-D, correlacionada a uma diminuição de espessura do córtex cerebral. Bem como, observamos um aumento da incidência de necrose individual de neurônios nos grupos expostos ao 2,4-D. Este dado mostra que o 2,4-D pode ocasionar apoptose cerebral devido à provável formação de células excitotóxicas, o que acarreta em aumento da expressão de BAX para a eliminação destas. Todo este processo possivelmente está associado à formação de radicais livres ocasionada pelo 2,4-D.

A exceção foi o grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via oral, onde observamos uma menor incidência de necrose individual de neurônios nos animais, associado a um não aumento de expressão de BAX, como os demais expostos, e concentração de BCL-2 em níveis semelhantes ao grupo controle. Além disto, este grupo também não apresentou alteração no teste do campo aberto. Porém, animais deste grupo apresentaram menor espessura do córtex cerebral do que o grupo controle e alterações ao teste do labirinto em cruz. Isto mostra que o 2,4-D em baixas concentrações por via oral pode ocasionar menos danos e que o mecanismo de atrofia cerebral associada ao 2,4-D pode ter outro mecanismo e não somente apoptose neuronal.

O herbicida 2,4-D parece acarretar numa desregulação na expressão das proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas, o que ocasionar as alterações neurocomportamentais e histopatológicas observadas neste estudo. O 2,4-D pode gerar formação de espécies reativas de oxigênio no cérebro e assim possivelmente induzir apoptose de neurônios por ativação de proteínas pró-apoptóticas associadas à família BCL-2.

5. Conclusões

Com os dados deste estudo, podemos concluir que, a exposição crônica ao 2,4-D em altas doses, independente da via (oral ou inalatória), causa alterações de locomoção e no nível de ansiedade dos animais expostos, associada a neurodegeneração causada por aumento de apoptose neuronal por ativação da proteína pró-apoptótica BAX.

Contribuições dos autores

Rose Meire Riçato Ueda: investigação, administração de projetos, análise formal, redação - redação do rascunho original. Verena Miranda de Souza: investigação, análise formal. Letícia Rocha Magalhães: investigação, análise formal. Allice Santos Cruz Veras: investigação, análise formal. Giovana Rampazzo Teixeira: recursos, supervisão, revisão. Gisele Alborghetti Nai: recursos, administração do projeto, conceitualização, supervisão, aquisição de fundos, redação, revisão e edição.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram que não têm interesses financeiros concorrentes ou relacionamentos pessoais que possam influenciar o trabalho relatado neste artigo.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por fundos de pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).

Os autores agradecem aos técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia da UNOESTE, Carlos Alexandre Santana de Oliveira, Mariana Fonseca Motta Borges e Talita Rizo Pereira, pelo processamento histológico dos espécimes, e ao Professor *Rui* Daniel Schroder Prediger do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brasil) pelas orientações para execução dos testes comportamentais.

V. M. Souza foi bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC / CNPq).

Referências

- Alberghina, L., Colangelo, A.M., 2006. The modular systems biology approach to investigate the control of apoptosis in Alzheimer's disease neurodegeneration. *BMC Neurosc.* 7 (Suppl 1), S2. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-S1-S2>
- Bongiovanni, B., [Ferri, A.](#), [Brusco, A.](#), [Rassetto, M.](#), [Lopez, L. M.](#) [Evangelista de Duffard, A. M.](#), Duffard, [R., 2011](#). Adverse effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on rat cerebellar granule cell cultures were attenuated by amphetamine. *Neurotox Res.* 19(4), 544-555. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9188-9>
- Bortolozzi, A.A., Duffard, R.O., Evangelista de Duffard, A.M., 1999. Behavioral alterations induced in rats by a pre- and postnatal exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Neurotoxicol Teratol.* 21(4), 451-465. [https://doi.org/10.1016/s0892-0362\(98\)00059-2](https://doi.org/10.1016/s0892-0362(98)00059-2).
- Bortolozzi, A.A., Evangelista De Duffard, A.M., Duffard, R.O., Antonelli, M.C., 2004. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid exposure on dopamine D2-like receptors in rat brain, *Neurotoxicol. Teratol.* 26 (4), 599–605.
- Brad Berry, S.M., Proudfoot, A.T., Vale, J.A., 2004. Poisoning Due to Chlorophenoxy Herbicides. *Toxicol Rev.* 23, 65-73. <https://doi.org/10.2165/00139709-200423020-00001>
- D'Orsi, B., Mateyka, J., Prehn, J.H.M., 2017. Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bok. *Neurochem Int.* 109,162-170. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.03.010>

- Faria, M.H.G., Patrocínio, R.M.C.V., Moraes Filho, M.O., Rabenhorst, S.H.B., 2006. Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. *J Bras Patol Med Lab.* 42 (4), 271-278.
- Fatokun, A.A., Stone, T.W., Smith, R.A. 2008. Oxidative stress in neurodegeneration and available means of protection. *Front Biosci.* 13, 3288–3311. <https://doi.org/10.2741/2926>
- Ferri, A., Duffard, R., de Duffard, A.M. 2007. Selective oxidative stress in brain areas of neonate rats exposed to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid through mother's milk. *Drug Chem Toxicol.* 30(1), 17–30. <https://doi.org/10.1080/01480540601017629>
- Krantic, S., Mechawar, N., Reix, S., Quirion, R. 2007. Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death. *Prog Neurobiol.* 81(3),179-196. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.12.002>**
- Mack, J.M., Moura, T.M., Lanznaster, D., Bobinski, F., Massari, C.M., Sampaio, T.B., Schmitz, A.E., Souza, L.F., Walz, R., Tasca, C.I., Poli, A., Doty, R.L., Dafre, A.L., Prediger, R.D. 2018. Intranasal administration of sodium dimethyldithiocarbamate induces motor deficits and dopaminergic dysfunction in mice. *NeuroToxicology.* 66, 107-120. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.03.011>**
- Mello, F.A., Quinallia, G., Marion, A.L., Jorge, F.C., Marinelli, L.M., Salge, A.K.M., Fagiani, M.A.B., Mareco, E.A., Favareto, A.P.A., Rossi e Silva, R.C. 2018. Evaluation of the nasal cavity mice submitted to the inhalation exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Medicina (Ribeirão Preto, Online.)* 51(4), 247-253. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v51i4p00-00>
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Population Health and Public Health Practice; Committee to Review the Health Effects in Vietnam Veterans of Exposure to Herbicides (Eleventh Biennial Update). *Veterans and Agent Orange: Update 11 (2018)*. Washington (DC): National Academies Press (US). [citado 2019/7/10]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30629395>**
- Paiva, F.P., Mafilli, V.V., Santos, A.C.S. 2005. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz.

[citado 2019/7/9]. Disponível em: http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf.

- Pandolfo, P., Pamplona, F.A., Prediger, R.D.S., Takahashi, R.N. 2007. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55, 212-2. *Eur J Pharmacol.* 563(1-3),141-148. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.02.013>
- Pannu, A.K., Saroch, A., Agrawal, J., Sharma, N. 2018. 2,4-D envenenamento: uma revisão com ilustração de dois casos. *Doutor Tropical.* 48(4), 366–368. <https://doi.org/10.1177 / 0049475518786834>.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M. 1985. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 14(3),149-167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Prediger, R.D., [Fernandes, M.S.](#), [Rial, D.](#), [Wopereis, S.](#), [Pereira, V.S.](#), [Bosse, T.S.](#), [Da Silva, C.B.](#), [Carradore, R.S.](#), [Machado, M.S.](#), [Cechinel-Filho, V.](#), [Costa-Campos, L.](#) 2008. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J Ethnopharmacol.* 120(3),465-473. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.018>
- Tayeb, W., Nakbi, A., Chargui, I., Cheraief, I., Miled, A., Hammami, M., 2011. Subacute effects of 2,4-dichlorophenoxyaceticherbicide on antioxidant defense system and lipidperoxidation in rat erythrocytes. *Pest. Biochem. Physiol.* 99, 256–264.
- Varghese, F., Bukhari, A.B., Malhotra, R., De A (2014). IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. *PLoS ONE* 9(5), e96801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096801>

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE).

27/04/2018

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "NEUROTOXICIDADE ASSOCIADA A EXPOSIÇÃO CRÔNICA VIA INALATÓRIA E VIA ORAL AO ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 4485 e tendo como participante(s) ROSE MEIRE RICATO UEDA (discente), LETICIA ROCHA MAGALHAES (discente), VERENA MIRANDA DE SOUZA (discente), GIOVANA RAMPAZZO TEIXEIRA (participante externo), GISELE ALBORGHETTI NAI (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 11/04/2018.

MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhe: armazenamento
3761	17/05/2017	UNOESTE	NÃO	Biotério de experimentação animal

Presidente Prudente, 27 de Abril de 2018.



Prof. Dr. César Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI



Prof. Ms. Adriana Fekko de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

valide este documento em www.unoeste.br/app informando o código de segurança bb079a88c6787456db7cc39460274949

ANEXO B

NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA A QUAL O ARTIGO SERÁ SUBMETIDO.

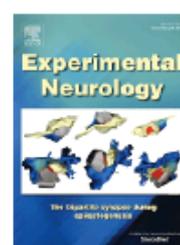


EXPERIMENTAL NEUROLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.1
• Guide for Authors	p.5



ISSN: 0014-4886

DESCRIPTION

Experimental Neurology, a Journal of **Neuroscience** Research, publishes original research in neuroscience with a particular emphasis on novel findings in **neural development, regeneration, plasticity** and **transplantation**. The journal has focused on research concerning basic mechanisms underlying **neurological disorders**.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Experimental Neurology and Elsevier facilitate the author's response to the NIH Public Access Policy. For more details please see the [Guide for authors](#)

AUDIENCE

Clinicians, neurologists, experimental neurologists

IMPACT FACTOR

2019: 4.691 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.



Introduction

Experimental Neurology, a Journal of Neuroscience Research, publishes original research in neuroscience with a particular emphasis on novel findings in neural development, regeneration, plasticity and transplantation. The journal has focused on research concerning basic mechanisms underlying neurological disorders.

Types of Paper

Research Articles — the Journal publishes Research Articles focusing on experimental models of neurological and psychiatric diseases. These should describe significant, new and carefully confirmed findings with attention to mechanisms of diseases and/or treatments. Adequate experimental details, including specific information about the reagents such as antibodies, primers etc should be provided. At the minimum, catalogue numbers and preferably lot numbers should be included in the methods section.

Commentaries - the Journal publishes invited commentaries up to a maximum of 3000 words on published articles. The goal of the commentary format is to advance the field by providing a forum for varying perspectives on a topic. While a commentary may be critical of a focal article, it is important to maintain a respectful tone that is critical of ideas, not of authors. Authors of the focal article will be given the opportunity to reply to the Commentary.

Brief Communications — these should be reserved for manuscripts that are very novel and timely. It should not be used for incremental work that is incomplete. The manuscripts should be limited to 3000 words, one figure or table and no more than 10 references.

Review Articles - these are exhaustive reviews on a specific topic of neuroscience. Authors should always endeavor to make their reviews understandable to a broad range of neuroscientists. The length is at the discretion of the author but as guidance review submissions are typically 8,000 words.

Special Issues - The journal welcomes proposals for special issues on topics that fall within the scope of the journal. Those wishing to guest edit a special issue should prepare a proposal that explains the anticipated contribution of the special issue in advancing our understanding in this area. The proposal should also identify prospective papers and authors and give an indication of the time-scale in which the special issue could be produced. Proposals should be sent to Editor-in-Chief Professor Ahmet Hoke.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

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:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)

- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print
Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)
Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- 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)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.



Before You Begin

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration 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 competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must

disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

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, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), 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 Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

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.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). 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. 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.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

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.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

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 Author Services.

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.

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

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

The Neuroscience Peer Review Consortium

Experimental Neurology is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium (NPRC). The NPRC has been formed to reduce the time expended and, in particular, the duplication of effort by, and associated burden on reviewers involved in the peer review of original neuroscience research papers. It is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from other Consortium journals. By reducing the number of times

that a manuscript is reviewed, the Consortium will reduce the load on reviewers and Editors, and speed the publication of research results.

If a manuscript has been rejected by another journal in the Consortium, authors can submit the manuscript to *Experimental Neurology* and indicate that the referees' reports from the first journal be made available to the Editors of *Experimental Neurology*.

It is the authors' decision as to whether or not to indicate that a set of referee's reports should be forwarded from the first journal to *Experimental Neurology*. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to *Experimental Neurology* without reference to the previous submission. No information will be exchanged between journals except at the request of authors. However, if the original referees' reports suggested that the paper is of high quality, but not suitable for the first journal, then it will often be to an author's advantage to indicate that referees' reports should be made available.

Authors should revise the original submission in accordance with the first journal's set of referee reports, reformat the paper to *Experimental Neurology* specification and submit the paper to *Experimental Neurology* with a covering letter describing the changes that have been made, and informing the Editors that the authors will ask for the referees' reports to be forwarded from the first Consortium journal. The authors then must contact the first journal, and ask that reviews be forwarded, indicating they have submitted to *Experimental Neurology*, and providing the new manuscript ID number.

The Editors of *Experimental Neurology* will use forwarded referees' reports at their discretion. The Editors may use the reports directly to make a decision, or they may request further reviews if they feel such are necessary.

Visit <http://nprc.incf.org> for a list of Consortium journals, as well as further information on the scheme.

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). 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 details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

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. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. 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. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **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.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

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.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 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.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

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.

Minimal Data Standards

Resources reported in neuroscience articles often lack sufficient detail to enable reproducibility or reuse. To facilitate resource identification in the neuroscience literature, we recommend to include relevant accession numbers and identifiers in your article, which will be converted into links to corresponding data repositories and embedded enrichments once the article is published and appears on SciencDirect. Please consider inclusion of GenBank accession numbers, antibody identifiers, species specific nomenclatures, and software identifiers in the method section of your article. The complete set of recommendations with detailed instructions is available at: <https://www.elsevier.com/about/content-innovation/minimal-data-standards>

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should

this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

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

Formats

Regardless of the application used, 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 the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- 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) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's Author Services 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. 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.

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 and shading in table cells.

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 highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

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.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

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, such as Mendeley. Using citation 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. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

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-neurology>

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

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

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 can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... 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, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in:

Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1.

<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

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

Video

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 file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. 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. 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.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate

research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.



After Acceptance

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The

environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. 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. 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 will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. 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 Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



Author Inquiries

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.