

A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos

Renata Marino ROMANO¹
 Marco Aurélio ROMANO²
 Maurício Osvaldo MOURA³
 Cláudio Alvarenga de OLIVEIRA¹

1 - Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP
 2 - Departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava-PR
 3 - Departamento de Biologia da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava-PR

Correspondência para:

Renata M. Romano, Rua Afonso Botelho, 1208, 85012-030, Guarapuava-PR, mromano@unicentro.br

Recebido para publicação: 19/04/2007
 Aprovado para publicação: 29/05/2008

Resumo

Os efeitos causados pelas substâncias contidas nos pesticidas e adjuvantes podem ser responsáveis por inúmeras alterações no sistema reprodutivo de machos e de fêmeas. A partir do momento que o glifosato-Roundup penetra na célula ele reduz a atividade da proteína StAR e da enzima aromatase. Este trabalho avaliou a possível correlação entre o desenvolvimento das características puberais em animais expostos diariamente ao herbicida glifosato, pela observação do crescimento e desenvolvimento e do início do período púbere. Utilizou-se 32 ratos machos divididos em 4 grupos de tratamentos (0, 5, 50 e 250 mg/kgPV), dos 23 aos 53 dias de idade. Utilizou-se análise de MANCOVA para a comparação dos pesos corporais, Kruskal-Wallis para o dia e ANOVA para o peso ao descolamento do prepúcio. Não houve interferências do tratamento sobre o crescimento dos animais em nenhum grupo. A idade à puberdade foi significativamente diferente entre os grupos 50 mg/kg e 0 mg/kg ($36,6 \pm 0,5$; 36 dias; $p < 0,05$), 250 mg/kg e 0 mg/kg ($37,2 \pm 0,4$; 36 dias; $p < 0,001$) e 5 mg/kg e 250 mg/kg ($36,5 \pm 0,53$; 36 dias; $p < 0,05$). O peso à puberdade foi maior no grupo de 250 mg/kg em relação aos grupos de 0 mg/kg e 5 mg/kg ($142,7 \pm 9,3$; $128,9 \pm 5,4$; $126,1 \pm 8,8$ g, respectivamente; $p < 0,001$). O peso do grupo de 50 mg/kg ($134,1 \pm 9,2$ g) não foi diferente dos outros grupos. É provável que a exposição crônica ao herbicida glifosato-Roundup cause a disfunção endócrina no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal durante a maturação sexual, pela evidência do atraso no início da puberdade.

Palavras-chave:

Puberdade.
 Glifosato.
 Disruptor endócrina.

Introdução

Os efeitos causados pelas substâncias contidas nos produtos químicos existentes nos pesticidas, herbicidas, inseticidas e fertilizantes, bem como seus adjuvantes, podem ser responsáveis por inúmeras alterações no sistema reprodutivo de machos e fêmeas. Estes efeitos podem ser agudos ou crônicos, na dependência do tempo de exposição, concentração no ambiente, modo de contato com o produto e tipo de degradação.¹

O sistema endócrino é um alvo

principal da manifestação tóxica dos pesticidas e pode levar a alterações reprodutivas, principalmente nas funções hormônio esteróides dependentes. As alterações endócrinas podem ser decorrentes de antagonismos e sinergismos bioquímicos ou em receptores específicos para os hormônios esteróides. Contemplam aumento do clearance metabólico da testosterona, decréscimo na síntese de testosterona, ação anti-androgênica de alguns pesticidas como o DDE (metabólito do DDT) e aumento da secreção dos estrógenos pela ação de substâncias como o

DDT, dieldrin, metoxicloro e toxafeno.²

Os herbicidas contendo glifosato como base são os mais amplamente utilizados no mundo. As alterações causadas em quatro tipos de sapos norte americanos expostos a cinco formulações a base de glifosato demonstraram incremento no tempo de metamorfose, danos na cauda e anormalidades nas gônadas causadas por disrupção dos hormônios, comprovados pelo aumento na transcrição de mRNA nos animais expostos, com maior efeito nos animais expostos ao surfactante politoxilado tallowamine POEA.³

O glifosato é um herbicida não seletivo que inibe o crescimento da planta através da interferência com a produção de aminoácidos aromáticos essenciais pela inibição da enzima enolpiruvilshikimate fosfato sintase, a qual é responsável pela biossíntese de chorismato, um intermediário na biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano. Esta via para a biossíntese de aminoácidos aromáticos não é expressa por nenhum membro do reino animal, tornando esse mecanismo de ação exclusivo às plantas.⁴

Com relação ao sistema reprodutivo não há evidências que doses orais de 0 a 30mg/kg e de 0 a 30.000 ppm levem a alterações reprodutivas significativas na capacidade de ratos se reproduzirem. Porém, observou-se a redução nas concentrações espermáticas no epidídimo em cerca de 20% em animais expostos a dosagens orais de 25.000 ppm e 50.000 ppm.⁴

Dellegrave et al.⁵ observaram o retardo no desenvolvimento do esqueleto fetal em ratos Wistar causado pelo Glifosato-Roundup e comprovaram esse efeito tóxico sobre o desenvolvimento fetal em exposições agudas induzidas utilizando-se as dosagens orais diárias de 0, 500, 750 ou 1.000 mg/kg entre o 6.^a e 15.^o dia de gestação. Observou-se a mortalidade de 50% das fêmeas que receberam a dose de 1.000 mg/kg.

Tem-se observado que algumas agricultoras que utilizam glifosato têm problemas para engravidar, mas o

mecanismo de ação do glifosato em mamíferos ainda é questionado. Richard et al.⁶ demonstraram que o glifosato em baixas concentrações não tóxicas causa efeito de disrupção sobre a enzima aromatase em células de placenta humana *in vitro*. A partir do momento que o glifosato penetra na célula, e isso é facilitado nas formulações de Roundup com adjuvantes, ele reduz a atividade da enzima aromatase, responsável pela síntese de estrógenos.

Walsh et al.⁷ observaram em cultivo celular de Leydig da linhagem tumoral MA-10 a exposição ao herbicida Roundup (Monsanto) provocou a redução de 90% dos níveis dessa proteína, implicando em que de cada 100 moléculas de colesterol disponíveis para o transporte ao interior da membrana mitocondrial, apenas 10 atingiram o sistema enzimático na membrana mitocondrial (P450scc). Em seguida, a conversão de colesterol em pregnenolona foi reduzida em 71% pela inibição da atividade de P450scc. No passo seguinte, a conversão de pregnenolona em progesterona não foi alterada (enzima 3 β -HSD). Ao final das transformações bioquímicas observou-se a redução de 94% na esteroidogênese total. É evidente o efeito de poluentes ambientais como o Roundup sobre a esteroidogênese, principalmente sobre o início das reações com o bloqueio da transferência de colesterol à mitocôndria.

O presente trabalho tem como objetivos avaliar a possível correlação entre o desenvolvimento das características púberes em animais expostos diariamente ao herbicida glifosato, pela observação do crescimento e desenvolvimento e do início do período púbere dos animais em estudo.

Material e Método

Foram utilizados 32 ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) machos recém-desmamados com 23 dias de idade, distribuídos em quatro grupos de tratamento. Cada grupo foi formado por oito animais subdivididos em três gaiolas de criação por grupo (dois a três animais por

gaiola). O delineamento experimental foi o de blocos completos ao acaso, sendo que o fator para a formação de blocos foi o peso corporal aos 23 dias de idade. Todos os animais foram pesados e calculou-se a média e o desvio-padrão. Os animais que apresentaram peso corporal abaixo ou acima de dois desvios-padrões em torno da média foram retirados e enviados para utilização em outros experimentos. Dividiram-se então, de forma aleatória os animais nos grupos de tratamentos. Cada animal de cada grupo recebeu identificação individual durante todo o período experimental. O período de lactação estendeu-se até o 21º dia após o nascimento e após esse período os animais foram alimentados com ração comercial balanceada para ratos e com água mineral disponível *ad libitum*. O início dos tratamentos deu-se no 23º dia de idade e encerrou-se no 53º dia, com duração total e ininterrupta de 31 dias. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em fotoperíodo de igual duração de noite e dia e temperatura ambiente controlada entre 23 a 25°C. O período experimental está em conformidade com o sugerido por Stocker et al.⁸ à EDSTAC (Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee). O produto comercial utilizado para o tratamento foi o Roundup Transorb® (Monsanto Co., St. Louis, MO) cuja composição é de 648 g/L de sal de isopropilamina de glifosato, 480 g/L de equivalente ácido de N-fosfonometilglicina (glifosato) e 594 g/L de ingredientes inertes. A administração do herbicida iniciou-se aos 23.º dia de idade, sendo realizada por gavagem, nas doses de 0 (G1), 5 (G2), 50 (G3) e 250 (G4) mg/kg de peso vivo (PV), entre 7:00 e 9:00h da manhã. O volume oral diário de suspensão aquosa de glifosato foi de 0,25 mL/100g PV.

A monitoração da separação balanoprepucial e exposição da glândula do pênis foi iniciada no 33º dia de idade para todos os animais de todos os grupos, realizada uma vez ao dia, no momento da pesagem, até a constatação da separação da

pele e exposição da glândula, visto que a puberdade é considerada como um fenômeno continuado que mostra como marco de referência a separação balanoprepucial.⁹

A análise dos dados relativos às pesagens diárias foi realizada pela análise de variâncias de duas vias para medidas repetidas com cofator (MANCOVA), através do modelo linear generalizado (GLM). O peso foi comparado entre os diferentes grupos, considerando-se a evolução esperada pelo crescimento corporal, utilizando-se o peso ao início do experimento (23 dias de idade) como cofator. O dia do descolamento do prepúcio foi comparado entre os grupos utilizando-se análise não-paramétrica pelo método de Kruskal-Wallis, pois os dados apresentaram-se heterocedásticos pela análise de Bartlett e não normais pela análise de Komolgorov-Smirnov. O pós-teste realizado foi o de Mann-Whitney. O peso dos animais quando do descolamento do prepúcio da glândula foi comparado entre os grupos pela análise de variâncias (ANOVA) de uma via e o pós-teste utilizado foi o Tukey. Considerou-se diferença estatística quando o valor de p foi inferior a 0,05. Os valores estão expressos em média \pm desvio-padrão ($\bar{x} \pm D.P.$). Todas as análises foram efetuadas com a utilização do software Statistica 6.0, StatSoft Inc¹⁰.

Resultados

A análise de MANCOVA mostrou que o peso dos animais não variou entre os grupos estudados, havendo a variação esperada relativa à idade ($p > 0,05$ para pesos x grupos e $p < 0,001$ para pesos x idades). O cofator peso aos 23 dias de idade não foi considerado relevante pelo teste, demonstrando que nesse experimento a idade inicial não influenciou no desenvolvimento dos animais.

A exposição diária ao herbicida glifosato-Roundup Transorb causou atraso significativo no início da puberdade. O resultado do teste de Kruskal-Wallis foi KW = 17,98 (corrigido para empates); $p < 0,001$.

O pós-teste de Mann-Whitney mostrou que houve diferenças significativas entre os grupos G3 ($p < 0,05$) e G4 ($p < 0,001$) em comparação ao G1 e entre os grupos G2 e G4 ($p < 0,05$). Os grupos G3 e G4 não diferiram entre si ($p = 0,08$). O grupo recebendo a dose de 5,0 mg/kg apresentou alguns animais com atraso ao início da puberdade, resultando em teste estatístico de tendência ($p = 0,09$) (Tabela 1 e Figura 1).

O peso dos animais quando da separação balanoprepucial foi significativamente diferente entre os grupos ($F_{3, 32} = 6,34$; $p < 0,001$). O peso dos animais do grupo 4 foi maior que o dos grupos 1 e 2. O peso entre os grupos 1, 2 e 3 não diferiu entre si, nem entre os grupos 3 e 4. O grupo 3 apresentou resultado

intermediário, pois não diferiu do grupo 2 nem do grupo 4 (Tabela 1 e Figura 2).

Discussão e Conclusões

Os resultados obtidos indicam que o glifosato-Roundup Transorb causa atraso na progressão da puberdade quando administrado durante a fase juvenil e peripuberal. O protocolo utilizado foi desenvolvido para verificar alterações nas funções dos eixos hipotalâmicos e produção hormonal de estrógenos, andrógenos, T3 e T4.⁸

Para a observação de alguma alteração sobre os efeitos hormonais não era desejado que alterações no crescimento ocorressem entre os grupos, pois ficaria

Tabela 1 – A exposição ao herbicida glifosato-Roundup causou alterações tanto na idade quanto no peso observados à separação balanoprepucial para os animais tratado com o herbicida Roundup. São Paulo, 2007

Grupos	Idade (dias)	Peso corporal (g)
RU 0 mg/kgPV	36±0,0 ^{a,c}	128,9 ± 5,4 ^c
RU 5 mg/kgPV	36,5±0,5 ^a	126,1 ± 8,8 ^c
RU 50 mg/kgPV	36,6±0,5 ^b	134,1 ± 9,2 ^{c,d}
RU 250 mg/kgPV	37,2±0,4 ^{b,d}	142,7 ± 9,3 ^d

RU = Roundup; a e b ($p < 0,05$) e c e d ($p < 0,001$) diferem na coluna

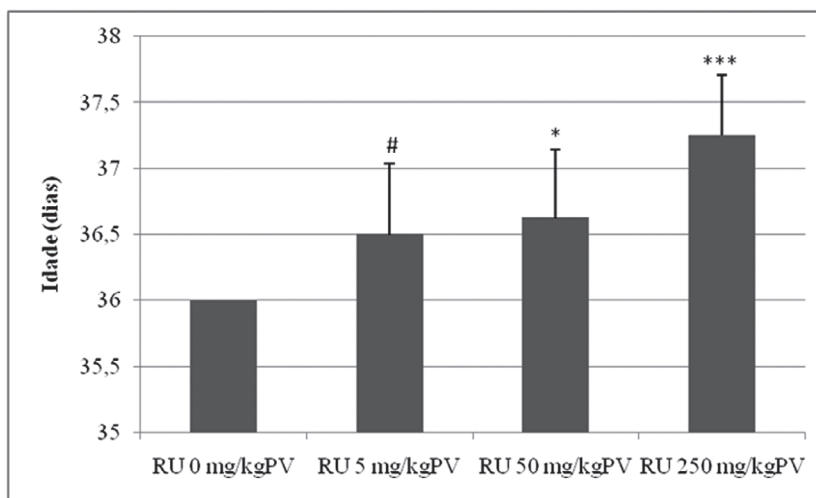


Figura 1 – Idade à separação balanoprepucial (média ± D.P.) para os animais nos grupos de tratamentos de 0, 5, 50 e 250 mg/kgPV. Nota-se que o herbicida glifosato-Roundup causa atraso na separação balanoprepucial desde a dose de 5 mg/kgPV (RU = Roundup; # $p < 0,05$ difere de 250mg/kgPV; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ diferem de 0 mg/kgPV). São Paulo, 2007

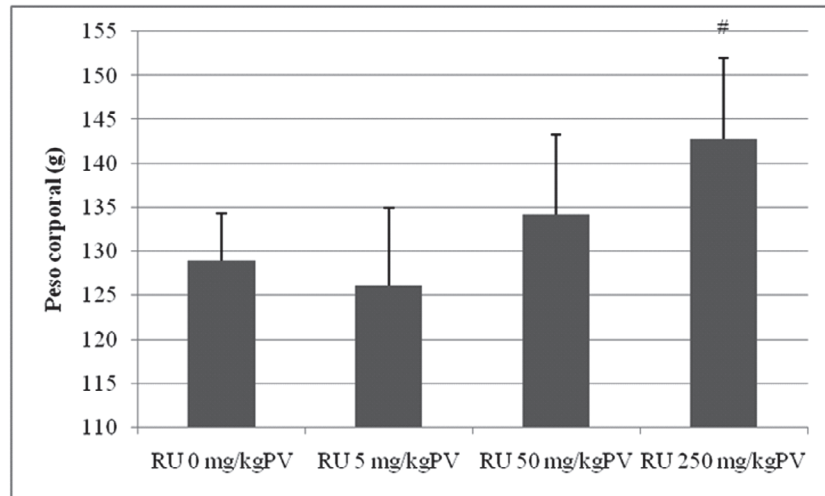


Figura 2 – Peso corporal à separação balanoprepucial (média \pm D.P.) para os animais nos grupos de tratamentos de 0, 5, 50 e 250 mg/kgPV. O herbicida glifosato-Roundup ocasionou a elevação no peso corporal nos animais do grupo de 250 mg/kgPV (RU = Roundup; # $p < 0,001$). São Paulo, 2007

impossibilitada a diferenciação de efeitos nutricionais sobre o perfil endócrino. A análise dos dados obtidos demonstrou que o peso dos animais não variou entre os grupos estudados com $p > 0,05$ para pesos \times grupos e $p < 0,001$ para pesos \times idades. Isso torna as alterações subsequentemente analisadas nesse trabalho independente de alterações nutricionais. Estas observações estão de acordo com Goldman et al.¹¹ demonstrando que somente o perfil endócrino foi alterado.

Até o final do período experimental os animais ainda se encontravam em período de crescimento e, pela idade, na fase inicial da puberdade. Apesar disso, a observação dos efeitos endócrinos pesquisados são evidentes mesmo ainda antes de se completar a puberdade, uma vez que a presença de hormônios e seus receptores são altos no período estudado, justificando o período experimental empregado e as análises desenvolvidas.⁸

A influência do tratamento com o glifosato-Roundup Transorb sobre a progressão da puberdade pode ser notada nas doses de 50 e 250 mg/kgPV (Tabela 1). Essas doses são muito inferiores à considerada pela OMS como Limite de Não-Efeito (NOAEL) para toxicidade crônica (409 mg/kg/dia).⁴ Mas o

estabelecimento de uma dose segura para o glifosato normalmente não considera o efeito dos adjuvantes.¹²

Nota-se neste resultado que a exposição diária ao herbicida causou atraso significativo na idade à puberdade ($p < 0,001$). Houve diferenças significativas entre os grupos G3 ($p < 0,05$) e G4 ($p < 0,001$) quando comparados ao G1 e entre os grupos G2 e G4 ($p < 0,05$). Estes dados confirmam as observações de Ojeda e Bilger¹³, Ojeda e Urbanski⁹ e Stocker et al.⁸ demonstrando atraso na idade à puberdade causado por um *disruptor* endócrino químico, glifosato-Roundup Transorb.

Vários estudos conduzidos ao longo dos anos com o sal de glifosato não evidenciaram alterações sobre os alvos pesquisados, mas quando os pesquisadores utilizaram a preparação comercial, vários efeitos tóxicos puderam ser identificados, tanto em intoxicações agudas quanto crônicas. Isso sugere que as preparações comerciais apresentam toxicidade maior que o princípio ativo considerado isoladamente.^{5,14,15,16}

O retardo na separação balanoprepucial sugere alterações na produção de testosterona pelo testículo, uma vez que esse evento é andrógeno dependente. De acordo com os resultados de Walsh et al.⁷ é possível que alterações observadas no

transporte intracelular de colesterol *in vitro* tenha se repetido nesse ensaio *in vivo*. Se essa alteração ocorreu, é esperado que todas as etapas da esteroidogênese tenham sido alteradas, tanto nos testículos quanto na adrenal. É necessário que se realize dosagens hormonais para a confirmação dessa hipótese.

O peso dos animais quando da ocorrência da separação balanoprepucial foi significativamente diferente, sendo maior nos animais do grupo 4 (250 mg/kgPV) como pode ser observado na tabela 1 e na figura 2. O grupo 3 (50 mg/kgPV) mostrou comportamento intermediário, pois não diferiu do grupo 2 (5 mg/kg) nem do grupo 4. Pode-se afirmar que os animais do grupo 4 foram mais tardios na progressão da puberdade e também mais pesados. Estes dados demonstram que houve ação do herbicida sobre o peso à puberdade pela possível alteração em vias metabólicas dos esteróides, conforme descrito por Walsh et al.⁷.

Essa constatação indica que o sistema envolvido no processo de desenvolvimento da puberdade, que inclui fatores nutricionais, status de leptina, grelina, não conseguiu superar os efeitos sobre a esteroidogênese. Pois, se houve sinalização ao hipotálamo via tronco cerebral do estímulo efetuado pela leptina, este não foi capaz de realizar o início de sua atividade pulsátil. Ou essa atividade foi iniciada e as células testiculares não foram capazes de sintetizar testosterona em concentrações suficientes.

Quando analisamos os dias em que se observou o descolamento do prepúcio isoladamente não se observam diferenças significativas entre os pesos, indicando que o processo de crescimento normal não foi afetado. Isso mais uma vez sugere que as alterações observadas na progressão da puberdade são decorrentes de alterações hormonais.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a exposição diária ao herbicida Roundup Transorb Monsanto não causou diferenças significativas no crescimento e desenvolvimento corporal nos grupos tratados, mas causou atraso significativo no início da puberdade dos animais tratados desde a dose de 50 mg/kgPV. É provável que a exposição prolongada ao herbicida Roundup Transorb Monsanto cause a desregulação endócrina no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal durante a maturação sexual, pela evidênciação do atraso no início da puberdade, mas estudos referentes à funcionalidade e morfologia das gônadas devem ser desenvolvidos para que se confirme essa alteração.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro dessa pesquisa (Edital Universal 2006/processo n. 471651/2006-0) e a CAPES pela bolsa de estudos de Renata Marino Romano.

Glyphosate-Roundup exposure delays puberty onset in male rats

Abstract

The effects of herbicides and its adjuvants can be responsible for several alterations in reproductive organs of male and female. Since glyphosate-Roundup penetrates in the cell, it reduces the activity of StAR protein and aromatase enzyme. This study evaluated the development of pubertal characteristics in animals receiving oral dosages of glyphosate-Roundup by gavage, by daily body weight measurement and verification of preputial separation (PPS). 32 male rats were allocated in 4 groups of treatments (0, 5, 50 e 250 mg/kg) from 23 to 53 days of age. The body weight from 23 to 53 days was compared using analysis of MANCOVA, Kruskal-Wallis was used to compare the day at PPS and ANOVA was used to compare the

Key words:

Puberty.
Glyphosate.
Endocrine disruptor.

body weight at PPS. Age at PPS was different between groups 50 mg/kg and 0 mg/kg ($36,6 \pm 0,5$; 36 days; $p < 0,05$), 250 mg/kg and 0 mg/kg ($37,2 \pm 0,4$; 36 days; $p < 0,001$) and 5 mg/kg and 250 mg/kg ($36,5 \pm 0,5$; 36 days; $p < 0,05$). The body weight at PPS was higher in group of 250 mg/kg in comparison to groups of 0 mg/kg and 5 mg/kg ($142,7 \pm 9,3$; $128,9 \pm 5,4$; $126,1 \pm 8,8$ g, respectively; $p < 0,001$). The body weight of group 50 mg/kg ($134,1 \pm 9,2$ g) wasn't differ from another groups. Probably, the daily exposure to glyphosate-Roundup causes endocrine disruption in hypothalamic-pituitary-gonad axis during sexual maturation, because it delayed the onset of puberty.

Referências

- 1 AKINGBEMI, B. T.; GE, R.; KLINEFELTER, G. R.; ZIRKIN, B. R.; HARDY M. P. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. **PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 3, p. 775-780, 2004.
- 2 LE BLANC, G. A.; BAIN, L. J.; WILSON, V. S. Pesticides: multiple mechanisms of demasculinization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 126, n. 1, p. 1-5, 1997.
- 3 HOWE, C. M.; BERRILL, M.; PAULI, B. D.; HELBING, C. C.; WERRY, K.; VELDHOEN, N. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1928-1938, 2004.
- 4 WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.
- 5 DELLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 142, n. 1-2, p. 45-52, 2003.
- 6 RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 716-720, 2005.
- 7 WALSH, L. P.; MCCORMICK, C.; MARTIN, C.; STOCCO, D. M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 8, p. 769-776, 2000.
- 8 STOCKER, T. E.; PARKS, L. G.; GRAY, L. E.; COOPER, R. L. Endocrine-disrupting chemicals: pubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. **Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee. Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 197-252, 2000.
- 9 OJEDA, S. R.; URBANSKI, H. F. Puberty in the rat. In: Knobil, E.; Neill, J.D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. 2 ed. New York: Raven Press, 1994. v.2, p. 363-410.
- 10 STATSOFT, INC. **Statistica** (data analysis software system), version 6. 2001. Disponível em <<http://www.statsoft.com>>.
- 11 GOLDMAN, J. M.; LAWS, S. C.; BALCHAK, S. K.; COOPER, R. L.; KAVLOCK, R. J. Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. **Endocrine Disrupting Screening and Testing Advisory Committee. Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 135-196, 2000.
- 12 SURGAN, M. H. Toxicity tests: "inert" and active ingredients. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 10, p. A657-8, 2005.
- 13 OJEDA, S. R.; BILGER, M. Neuroendocrine regulation of puberty. In: Conn, P. M.; Freeman, M. E. (Ed.). **Neuroendocrinology in physiology and medicine**. 1. ed. New Jersey: Humana Press, 2000. p. 197-224.
- 14 BELLES, D.; SHANER, D.; WESTRA, P.; BRUNK, G. Comparison of efficacy absorption and translocation of three glyphosate formulations on velvetleaf. **Pesticide Management Science**, v. 62, p. 1177-1181, 2006.
- 15 BENEDETTI, A. L.; VITURI, C. D.; TRENTIN, A. G.; DOMINGUES, M. A. C.; ALVAREZ-SILVA, M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 2, p. 227-232, 2004.
- 16 MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BOULBEN, S.; HUREAU, D.; DURAND, G.; BELLÉ, R. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chemicals Research Toxicology**, v. 15, p. 326-331, 2002.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Normas editoriais

O periódico *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* é publicado bimestralmente pela Fundação de Medicina Veterinária (FUMVET) e destina-se a publicar trabalhos científicos sobre medicina veterinária e ciências afins. Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Comissão Editorial, com assessoria de especialistas da área (*peer review*). A lista de colaboradores (relatores) é publicada no último fascículo/ano de cada volume. Os trabalhos cujos textos necessitem de revisões ou correções que não puderem ser feitas pelos editores serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade dessa revista. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. No momento da submissão do trabalho à revista é obrigatório apresentar a aprovação do protocolo experimental por Comitê de Ética. Qualquer que seja o tipo do trabalho, deverá ser inédito e destinar-se exclusivamente a esse periódico, sendo obrigatório anexar declaração assinada por todos os autores expressando concordância no pagamento de tarifa como condicionante à sua publicação.

Os trabalhos para publicação deverão ser encaminhados a: *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* Setor de Publicação Av. Prof. Dr. Orlando de Marques Paiva, 87 Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-270 – São Paulo – SP – Brasil Telefone: 0055 11 3091 1472/ 3091 7636 Fax: 0055 11 3091 7636 e-mail: bjvras@fumvet.com.br <http://www.fumvet.com.br>

Artigo completo

1 - Limitar-se ao máximo de dez páginas digitadas, dentro da estrutura do item cinco, não sendo contadas as páginas onde constem tabelas e ilustrações. 2 - Ser escrito em língua portuguesa ou em língua inglesa. 3 - Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo. 4 - Ser estruturado dentro dos seguintes itens: a) Introdução; b) Materiais e Métodos; c) Resultados; d) Discussão; e) Conclusões; f) Referências; g) Resumo/Palavras-chave; Abstract/Key-words. 5 - Apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, não devendo ultrapassar 250 (duzentas e cinquenta) palavras, seguidos das palavras-chave, limitadas a cinco, que correspondem a palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo.

Nota prévia

1 - Limitar-se ao máximo de três páginas digitadas. 2 - Ser escrita em língua portuguesa ou em língua inglesa. 3 - Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não

empregando abreviaturas no título do artigo. 4 - Não devem ser subdivididos em seções separadas (Introdução, Materiais e Métodos etc.), mas devem apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, com palavras-chave, conforme descrito na apresentação de Artigo completo, além de referências.

Artigos de revisão

Só poderão ser publicados por especialistas de renome a convite da Comissão Editorial. Não devem ser subdivididos em seções separadas (Introdução, Materiais e Métodos etc.), mas devem apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, com palavras-chave, conforme descrito na apresentação de Artigo completo, além de referências.

Apresentação dos trabalhos

1 - **Digitação:** original em CD, devidamente identificado com o título do artigo e nome do(s) autor(es) e três cópias impressas, inclusive suas tabelas e referências; deve ser digitado, obrigatoriamente, em formato A4 (21,0 x 29,7cm), espaço duplo, em uma só face de papel, margens de 2,5cm, fonte Times New Roman tamanho 10 e numeração consecutiva das páginas. Ilustrações e legendas devem ser relacionadas em folhas separadas. O texto dos artigos deve ser apresentado utilizando-se o editor de texto Microsoft Word. 2 - **Página de rosto:** elemento obrigatório, onde deve conter o título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e instituição de origem. **Observar que unicamente nesta página conste a identificação dos autores, para o devido sigilo e imparcialidade.** No rodapé da página deve-se mencionar o endereço completo (inclusive e-mail) do autor para correspondência. Se o artigo for subvencionado, mencionar a instituição que o patrocinou, assim como os agradecimentos; 3 - **Tabelas:** devem ser numeradas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, seguido de local e data. Na montagem das tabelas seguir: IBGE. **Normas de apresentação tabular.** 3. ed. Rio de Janeiro: IBGE, 1993. 61 p. O limite de tabelas por trabalho é de cinco. Em casos excepcionais, conhecida a opinião da Comissão Editorial, este número poderá ser ultrapassado. No texto devem ser indicadas pela palavra Tabela (por extenso). 4 - **Ilustrações** (fotografias, gráficos, quadros, desenhos ou esquemas): devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras no texto. As fotografias devem ser identificadas somente com o título do artigo, além de conter no verso a indicação de seu correto posicionamento. Fotos fornecidas em papel fotográfico devem ter ótima resolução, em CD com a extensão .TIF e resolução mínima de 300 dpi's. As legendas de ilustrações coloridas devem estar referenciadas somente por setas, símbolos e pontos quando publicadas em preto e branco. Gráficos, desenhos ou esquemas devem ser fornecidos no CD, impressos em folha à parte identificada somente com o título do artigo, além das respectivas legendas.

Todas as ilustrações devem ser fornecidas em três vias. Os gráficos devem trazer sempre os valores numéricos que lhes deram origem. Desenhos e esquemas devem apresentar boa qualidade técnica e artística. Aceitar-se-á um número máximo de nove ilustrações por artigo, sugerindo-se a seguinte distribuição: três fotografias, três gráficos e três desenhos/esquemas. Acima deste limite, as despesas com reprodução correrão por conta do autor. Ilustrações coloridas, independentemente do número, serão cobradas. No texto devem ser indicadas pela palavra Figura (por extenso). Indicar junto ao título da ilustração o local e data. 5 - **Referências:** devem ser numeradas, ao final do artigo, de forma consecutiva de acordo com a ordem em que forem sendo citadas no texto. Os títulos de periódicos devem ser mencionados de maneira uniforme, de preferência todos por extenso. As referências seguem a normalização da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023, que deve ser consultada para outros tipos de documentos aqui não exemplificados.

Exemplos de Apresentação dos Autores nas Referências:

BONAGURA, J. D. (um autor)
SANTOS, J. A.; MELLO, M. R. (dois autores)
BENNETT, B. T.; ABEE, C. R.; HENRICKSON, R. (três autores)
VILELA, D.; MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; CARVALHO, L. A. [...] (quatro autores ou mais)

Exemplo de periódico

1 KOTZEKIDOV, P.; BLOUKAS, J. G. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelflife of sliced vacuum-pocked cooked ham. *Meat Science*, v. 42, n. 3, p. 333-345, 1996.

Exemplo de livro

2 HALLIWELL, R. E. W.; GORMAN, N. T. *Veterinary clinical immunology*. London: W. B. Saunders, 1989. 548 p.

Exemplo de autor diferente para o livro e capítulo

3 FENNER, W. R. Avaliação neurológica dos pacientes. In: ETTINGER, S. J. *Tratado de medicina interna veterinária*. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 577-606.

Exemplo de mesmo autor para o livro e capítulo

4 THORTON, H. Deleterious changes in meat. In: THORTON, H. *Aspects of meat inspection*. London: Thindall & Cassel, 1973. p. 63-72.

Exemplo de tese

5 BIRGEL, E. H. *Estudo do quadro eritrocitário de caprinos (Capra hircus, L.) normais criados no Estado de São Paulo: influências de fatores raciais, sexuais, etários e alimentares*. 1973. 92 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1973.

Exemplo de evento

6 OLIVEIRA, C. A. Hormonoterapia em cadelas e gatas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p. 100-111.

Exemplo de livro eletrônico

7 POORE, M. H. *Alternative feeds for beef cattle*. North Carolina: North Carolina Corporate Extension Service, 1994. Disponível em: <<http://www.ces.ncsu.edu/drought/dro-28.html>>. Acesso em: 23 abr. 2007.

Exemplos de artigos de periódicos eletrônicos

8 MENDONÇA JR., C. X.; MARTINS, A. P.; MORI, A. V.; SILVA, A. B.; MORI, C. S. Efeito da adição de óleo de peixe à dieta sobre o desempenho e níveis de lipídeos plasmáticos e de colesterol no ovo de galinhas poedeiras. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 37, n. 1, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/cgi_bin/wxis.exe/iach/scielo>. Acesso em: 31 jan. 2001

6 - **Citações:** utilizar o Sistema Numérico. As citações devem ser feitas por numeração única e consecutiva em sobrescrito, utilizando-se algarismos arábicos, remetendo à lista de referências na mesma ordem em que aparecem no texto. Quando indispensável para a compreensão do texto, combinar o(s) sobrenome(s) do(s) autor(es) com a indicação do número. Neste caso, a citação será pelo sobrenome de cada autor ou pelo nome da entidade responsável que aparece na respectiva referência. Quando se tratar de três autores, todos devem ser citados. No caso de mais de três autores, a citação deve ser acompanhada pelo sobrenome do primeiro autor seguido da expressão et al. (sem itálico). Se a citação estiver inserida no texto utilizar letras maiúsculas e minúsculas; se estiver entre parênteses utilizar somente letras maiúsculas. Exemplos:

Um autor

Segundo Yanaguita⁹ ou (YANAGUITA⁹)

Dois autores

Soares e Alves¹³ ou (SOARES; ALVES¹³)

Três autores

Bennett, Abee e Henrickson¹² ou (BENNETT; ABEE; HENRICKSON¹²)

Quatro ou mais autores

Vilela, Martins, Bressan e Carvalho²⁶ ou Vilela et al.²⁶ (VILELA; MARTINS; BRESSAN; CARVALHO²⁶) OU (VILELA et al.²⁶)

Tarifa de publicação: A tarifa de publicação de R\$ 40,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Mission and Editorial policy

The *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* publishes scientific complete articles and high quality previous notes relative to the field of veterinary medicine as well as to veterinarians. Studies of the basic and applied sciences relative to veterinary medicine are welcome. Only previous notes that address matters of veterinary science and provide supporting scientific evidences will be published. The manuscripts will be analyzed by the Editorial Board, provided they adhere to the manuscript guidelines.

It is the official publication of Fundação Medicina Veterinária – FUMVET. The journal follows the guidelines established by the Editorial Board designated by the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Articles and their concepts are sole responsibility of author (s).

Articles will be accepted for publication provided they adhere to the Author's guidelines and receive approval from the Scientific Committee and the Editorial Board, after hearing the reviewers.

Reviewers maintain confidentiality of the information presented in the manuscript. Reviewers should render their opinions in an unbiased and ethical manner. Identity of reviewers is kept secret.

Once an article is approved for publication by the Scientific Committee, a fee (R\$) will be charged which will be calculated on the basis of number of pages. All authors should sign a form declaring they are aware and obliged to this payment when submitting a manuscript. After approval for publication, provided no payment was made, manuscript course of action will stop and manuscript returned to the authors.

Historical background

This periodical was founded in 1938 by the Faculdade de Medicina Veterinária which was part of Universidade de São Paulo. The periodical's former name was *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo*. In 1974, its name was changed to *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, following the name change of the school. In 1990, its name was again changed, bearing the present denomination of *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. In 2000, the journal became the official publication of the Fundação Medicina Veterinária – FUMVET, setting away the institutional link with the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Correspondence address

Manuscripts and all letters should be sent to the following address:
Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science
Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção de Publicação
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 -
Cidade Universitária Armand de Salles Oliveira
05508-270 - São Paulo - SP - Brasil
Telephone: (0XX11) 3091-7636
Fax: (0XX11) 3032-2224; 3031-3074; 3091-7672/7678
e-mail: brazvet@edu.usp.br
versão on line: <http://www.scielo.br/bjvras>

AUTHOR'S GUIDELINES

Complete article

1 – Articles must describe original research and should be submitted only to Brazilian Journal of

Veterinary Research and Animal Science. It is necessary to include a form, signed by all authors, in which authors agree to the payment of publication fees.

2 – Manuscripts should be limited to ten written pages following the structure depicted in the item #5. Page tables and figures are not counted.

3 – Articles must be written in Portuguese or in English.

4- Use only official nomenclature. The use of author-defined abbreviations and acronyms is discouraged. Abbreviations in the titles should be avoided.

5 – Articles must be structured within the following sections:

- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions
- References
- Abstract/Key-words

The items Results, Discussion and Conclusions may be included in a single section, except otherwise indicated by the Editorial Board.

6 – Authors must submit two abstracts, one in Portuguese and another in English, which should consist of no more than 250 words. The Abstract is followed by up to five key-words which should correspond to words or expressions that identify the contents of the article.

Previous note

1 - All Previous Notes must describe original research and should be submitted only to Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. It is necessary to include a form, signed by all authors, in which authors agree to the payment of publication fees.

2 – Should be up to three typed pages.

3 – Articles must be written in Portuguese or in English.

4- Use only official nomenclature. The use of author-defined abbreviations and acronyms is discouraged.

5 – Previous Notes must not be divided into major headings (Introduction, Materials and Methods, etc.), but should present two abstracts followed by key-words as it was described for complete manuscript submission, including a list of References.

Review articles

Unsolicited review manuscripts will not be accepted; however, a draft may be submitted to the Editorial Board, without previous consent, aiming at appropriateness for publication. The Editorial Board may invite renowned specialists to submit review manuscripts.

These reviews must adhere to the guidelines of a complete article, though without division into major headings (Introduction, Materials and Methods, etc.). They should present two abstracts followed by key-words as it was described for complete article submission, including a list of References.

Manuscript submission

1 – **Typesetting:** manuscripts should be submitted in CD-ROM or 3½" high density diskette. They have to bear manuscript's title and

author's name (s). Authors must submit three copies of the manuscript, including tables and references, double-space typed and pages numbered consecutively. Page size is A4 (21.0 x 29.7 cm) and 2.5 cm for all margins. Use only front page and fixed character width (Times New Roman 10 cpi). Illustrations and legends must come on separate sheets. Authors must choose Microsoft Word as text editor.

2 – **Cover page:** all manuscripts must include a cover page containing the manuscript's title, author's name (s) and institution. In the footnote should be given the complete address (including e-mail) of the corresponding author. Care should be observed that author's identification is supposed to appear only in the cover page to assure unbiased and ethical reviews. If the work received financial assistance from the industry, mention to it as well as acknowledgment should be provided.

3 – **Tables:** tables are numbered consecutively in Arabic numbers. For table construction follow: IBGE. Normas de apresentação tabular. 3. ed. Rio de Janeiro: IBGE, 1993. 61 p. Upper limit of tables per work is five. Exceptionally, after hearing the Editorial Board, this number might be increased. In the text, reference to the table content is indicated by the word Table.

4 – **Illustrations** (photographs, graphics, drawings or artwork): illustrations must be numbered consecutively in Arabic numbers and be cited in the text as Figures. The photographs shall be identified only by the manuscript's title and on the back contain description of correct positioning in the text. Graphics, drawings or artwork should be provided in separate sheets, identified by the manuscript's title and respective legends. All illustrations must be provided in three copies. Be sure that each mean and some index of variation is presented in the figures, the figure legend, or the text. Drawings and other artworks must have good technical quality and artistically accepted (in the case they are computer generated, printed originals must be included). Upper limit of figures per work is nine and it is suggested the following distribution: three photographs, three graphics and three drawings or artworks. Beyond this limit expenses with reproduction shall be the author's responsibility. Color photographs, independently of number, will be charged.

5- **References:** they must appear in the order they were cited in the text. Periodical or journal names must be uniform, preferentially not abbreviated. In the case, periodical or journal names are abbreviated, follow the NBR 6032. For references that are not illustrated in this Instructions to Authors follow instructions contained in the NBR 6023/2002. Indicate authors by last name, in capital letters, followed by initials of first and middle names. Authors are separated by semicolon and space.

Examples: BONAGURA, J. D. [...] (1 author)
SANTOS, J. A.; MELLO, M. R. [...] (2 authors)
BENNETT, B. T.; ABE, C. R.; HENRICKSON, R. [...] (3 authors)
VILELA, D.; MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; CARVALHO, L. A. [...] (4 authors or more)

Example of periodical or journal
KOTZEKIDOV, P.; BLOUKAS, J. G. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelf-life of sliced vacuum-pouched cooked ham. *Meat Science*, v.42, n.3, p. 333-45, 1996.

Example of book
HALLIWELL, R. E. W.; GORMAN, N. T. **Veterinary clinical immunology.** London: W. B. Saunders, 1989. 548 p.

Example of chapter and book with different authors

FENNER, W. R. Avaliação neurológica dos pacientes. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de medicina interna veterinária.** 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 577-606.

Example of same authorship for chapter and book

THORTON, H. Deleterius changes in meat. In: THORTON, H. **Aspects of meat inspection.** London: Thindall & Cassel, 1973. p. 63-72.

Example of thesis

BIRGEL, E. H. **Estudo do quadro eritrocitário de caprinos (Capra hircus, L) normais criados no Estado de São Paulo:** influências de fatores raciais, sexuais, etários e alimentares, 1973. 92 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Example of meeting

OLIVEIRA, C. A. Hormoterapia em cadelas e gatas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p. 100-111.

Example of electronic publication

AUTHOR. **Title.** Edition. Local of publication: Publisher, year of publication. (Type and characteristics of media support, producer, citation date, availability and access).

ONLINE

POORE, M. H. **Alternative feeds for beef cattle.** North Carolina: North Carolina Corporative Extension Service, 1994. Disponível em: <<http://www.ces.ncsu.edu/drought/dro-28.html>> . Acesso em: 23 abr. 1997.

Online – must cite web page address and date it that was accessed.

Example of articles from electronic journals

AUTHOR. **TITLE OF ARTICLE. Title of periodical,** volume, issue (number), pages, year of publication. (Type and characteristics of media support, producer, citation date, availability and access).

ONLINE

MENDONÇA JR., C.X.; MARTINS, A.P.; MORI, A.V.; SILVA, A.B.; MORI, C.S. Efeito da adição de óleo de peixe à dieta sobre o desempenho e níveis de lipídeos plasmáticos e de colesterol no ovo de galinhas poedeiras. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.37, n.1, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/cgi_bin/wxis.exe/fach/scielo> . Acesso em: 31 jan. 2001

Online – must cite web page address and date it that was accessed.

6- **Citations in the text:** must be consecutively numbered with Arabic numerals as superscripts in the order they first appear in the text. When absolutely necessary to use author's name, combine author's last name with its corresponding numeral as superscript. References containing up to three authors must cite all of them. References with more than three authors must cite the first one's last name followed by the expression et al. (not italic). Only the first letter of name is capitalized; however, if author's last name is inserted between parenthesis, all letters must be capitalized. **Examples:** According to Yanaguita⁹ [...] [...] (YANAGUITA⁹) [...] Bennett, Abee and Henrickson¹² [...]

Vilela, Martins, Bressan and Carvalho²⁶ [...] (4 authors or more) or (VILELA et al.²⁶) [...]

ORDER FORM

Please send me 1 year (6 issues) of Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, for US\$ 160,00 surface mail.

Payment enclosed by:

Check nº _____ Bank _____ Date _____

Addressed to: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

NAME (Please print): _____

Address: _____ City: _____

State: _____ ZIP: _____ Country: _____

Mail this order with the check in U.S. funds, made payable to the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Address the envelope as follows:

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87

Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira

CEP 05508-900 - São Paulo - SP - Brasil

e-mail: bjvras@fumvet.com.br



PEDIDO DE ASSINATURA (SOMENTE DENTRO DO BRASIL)

Sim, quero assinar a Revista Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science por 1 ano (6 números) no valor equivalente a R\$ 210,00. Remeto, anexo:

Cheque nº _____ Banco _____ Data _____

A favor da: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

NOME (letra de fôrma): _____

Endereço: _____ Cidade: _____

_____ Estado: _____ CEP: _____ Brasil

Remeta esta ordem acompanhada do cheque em moeda nacional, pagável à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Enderece o envelope da seguinte forma:

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87

Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira

CEP 05508-900 - São Paulo - SP - Brasil

e-mail: bjvras@fumvet.com.br

