

## ASPECTOS DA EXPOSIÇÃO AMBIENTAL AOS AGROQUÍMICOS NO DESENVOLVIMENTO ANIMAL

*Vera Lúcia Scherholz Salgado de Castro<sup>1</sup>*

### RESUMO

A busca de indicadores da exposição de organismos não-alvo a agroquímicos vem cada vez mais se intensificando. As alterações neurocomportamentais estão entre as medidas de eventos biológicos estudadas como possíveis indicadores da exposição a tais substâncias. Entretanto, muitos dos agroquímicos aplicados corriqueiramente em nossa agricultura não possuem indicadores de exposição claramente definidos. Assim, os parâmetros usados tradicionalmente, como porcentagem de fertilidade, abortos e taxa de natalidade, deverão ser complementados com outros parâmetros como o desenvolvimento físico e avaliações comportamentais. Nos últimos anos tem crescido também a busca por técnicas genéticas. De forma semelhante, os indicadores para a avaliação das alterações genéticas também estão sendo aprimorados. Os resultados de tais avaliações podem, então, ser interpretados com base em uma visão abrangente do desenvolvimento, voltada para a detecção de prejuízos iniciais no organismo. Os testes utilizados, além de sua aplicação na identificação de efeitos prejudiciais à saúde, poderão também ter aplicação no monitoramento de populações humanas expostas a agroquímicos. Além disso, os resultados obtidos poderão ser usados como um dos parâmetros para avaliação de sustentabilidade do modelo agrícola, em relação ao equilíbrio ambiental.

**Palavras-chave:** agricultura, pesticidas, toxicologia, efeitos neurocomportamentais, reprodução, monitoramento.

### ASPECTS OF ENVIRONMENTAL EXPOSURE TO AGROCHEMICALS ON ANIMAL DEVELOPMENT

### ABSTRACT

The identification of biomarkers of exposure in non-target organisms is growing. The neurobehavioral changes are among the studied biological events as possible

---

<sup>1</sup> Aceito para publicação em novembro de 2004.

<sup>2</sup> Médica Veterinária, Doutora em Patologia Experimental e Comparada, Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiental, Rod. SP 340, Km 127,5, CEP 13.820-000 Jaguariúna, SP. castro@cnpmma.embrapa.br

biomarkers of agrochemical exposure. However, many of the agrochemicals applied frequently in our agriculture fields do not have a well defined exposure biomarker. In this way, the biomarkers traditionally utilized as fertility, abortion and birth rates will be joining other parameters as physical development and behavioral evaluations. In the last years, as the search for genetic methodologies is also growing, the biomarkers for genetic changes are improving. The results of such studies may be interpreted in a holistic basis of the development, detecting initial damage in the organism. The tests utilized for that, besides the identification of health harm, will be used in monitoring of risks for human population exposed to agrochemicals. Beyond that, the obtained results may be used as sensitive endpoints of the sustainability evaluation of the agricultural model in relation to environmental health.

**Key-words:** agriculture, pesticides, toxicology, neurobehavioral effects, reproduction, monitoring.

## INTRODUÇÃO

O processo de difusão de tecnologia agrícola ocorreu dentro de um contexto de extrema diversidade ecológica e socioeconômica. A profunda transformação na base técnica da agropecuária brasileira, a partir do final dos anos 60, apoiou-se no pacote tecnológico, cujo uso em larga escala ainda hoje está na raiz de muitos de seus problemas ambientais. Todavia, ainda não existe total conhecimento sobre o impacto ambiental dos agroquímicos.

A contaminação ambiental por agroquímicos causa efeitos negativos aos recursos naturais, à saúde humana, além de trazer problemas para a exploração agrícola; fato que leva preocupação quanto ao seu impacto na saúde humana e na qualidade ambiental. Em alguns casos, ainda há falta de conhecimento dos processos mediante os quais os agroquímicos possam afetar os organismos alvo e não-alvo. Em virtude da complexidade, interações e variabilidade dos ecossistemas e seus organismos, é difícil prever riscos mesmo com base em respostas biológicas. Uma mesma perturbação pode levar a diferentes respostas dependendo das variações das condições ambientais.

Mas ainda, muitas vezes, o baixo nível socioeconômico do trabalhador rural, em especial no que se refere a saúde e educação, resulta em um padrão de exploração do meio ambiente além da capacidade de suporte, causando impactos negativos sobre a biodiversidade e sobre os recursos naturais, num

ciclo vicioso de pobreza e degradação ambiental. Os sistemas de produção intensivos elevam a necessidade de uso de agroquímicos, os quais aumentam as concentrações residuais e a deriva de agroquímicos ocorridos durante o processo de aplicação dos produtos, causando entre outros problemas, prejuízo à saúde do trabalhador rural e às comunidades vizinhas.

Em meados dos anos 80, a noção de sustentabilidade se estabelece como relevante para a sociedade moderna e passa a concentrar a interface produção alimentar/meio ambiente. Assim é que a proposta de um desenvolvimento sustentável, incluindo a atividade agrícola, contempla a conservação dos recursos naturais, a utilização de tecnologias apropriadas e a viabilidade econômica e social.

O desenvolvimento sustentável tornou-se parte integrante de decisão política de saúde ambiental. A relação saúde-ambiente é multidisciplinar e comporta uma infinidade de abordagens e articulações interdisciplinares e transdisciplinares. Assim, os parâmetros selecionados para o seu estudo devem refletir considerações integradas dos processos e impactos nas dimensões socioeconômicas, de saúde pública e ambiental; uma vez que os agroecossistemas incluem o homem produtor e consumidor. Nesse caso, no que se refere à saúde, são estabelecidos parâmetros para o planejamento e avaliação da eficácia dessas políticas.

A exposição humana aos agroquímicos, seja através de exposição ambiental ou ocupacional, pode ocasionar danos à saúde se as exposições forem freqüentes, inclusive em pequenas doses (CASTRO et al., 1999). A análise do risco de contaminação de populações expostas envolve o conhecimento das fontes de emissão, dos contaminantes, das transformações, transporte e acúmulo no ambiente, das rotas de ingresso no organismo, das doses potenciais e internas, da biodisponibilidade, da dose biologicamente efetiva e de possíveis efeitos prejudiciais à saúde dos organismos.

O biomonitoramento das possíveis conseqüências da exposição aos agroquímicos é uma linha de pesquisa importante no que se refere a efeitos no desenvolvimento animal e potencial neurotoxicidade (NEWLAND et al., 2003; CHELONIS et al., 2004) e efeitos genotóxicos (TAIOLI; BONASSI, 2002). A seguir, serão considerados alguns aspectos relativos à avaliação dos efeitos decorrentes da exposição aos agroquímicos, como exemplificado no decorrer do texto.

## AVALIAÇÃO DOS RISCOS DA EXPOSIÇÃO A AGROQUÍMICOS

O risco refere-se à probabilidade de dano que um organismo ou uma determinada população venha a sofrer. Essa avaliação é realizada, quanto à saúde ambiental, identificando órgãos ou sistemas afetados que podem levar a enfermidades e desequilíbrios, e estabelecer as condições e níveis de exposição do homem aos agroquímicos que causam danos e enfermidade. A avaliação de risco de uma determinada substância envolve portanto a determinação de efeitos de exposição de espécies sensíveis ao produto avaliado e a extrapolação desses efeitos além das decisões para o seu gerenciamento.

Na avaliação de risco de agroquímicos sobre organismos não-alvo, são sugeridos estudos com organismos representativos de ecossistemas do Brasil pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar. Na escolha das espécies desses organismos para estudos de patogenicidade-toxicidade considera-se a ampla distribuição no território nacional, a facilidade de criação e manipulação em condições laboratoriais, ou em outra forma de cativeiro.

A avaliação do risco da ocorrência de danos à saúde dos organismos consiste basicamente de quatro fases. Essas fases permitem o estudo comparativo entre os agentes de risco, diferentes populações e diversos tempos de exposição. A seguir, as fases são descritas sucintamente, a saber: identificação do risco, análise dose-resposta, avaliação da exposição, e caracterização e gerenciamento do risco.

**Identificação do risco** – Caracterização do agente e sua dispersão ambiental. A caracterização precisa do agente sob todas as condições ambientais. É uma tarefa difícil, portanto é necessário fazer testes toxicológicos prévios aos experimentos em campo. A exposição está associada à quantidade do agroquímico encontrado no ambiente.

**Análise dose-resposta** – Relação entre a dose-quantidade do agente e a resposta biológica, a partir de testes toxicológicos e epidemiológicos. Considerando que a avaliação de risco toxicológico depende de uma comparação dos níveis de exposição com níveis que causem uma resposta biológica mensurável é, portanto, necessário se tomar conhecimento dos níveis de concentração esperados ou níveis reais dos compostos em questão. Pode ser definida como a quantificação da exposição humana e dos animais.

**Avaliação da exposição** – Análise da magnitude e duração da exposição ao agente e das diferentes rotas de ingresso no organismo. A avaliação da exposição requer informações quanto ao método de liberação, sua frequência e quantidade, além de características geográficas, climáticas e hidrogeológicas da área de liberação. São também valiosas as informações pertinentes à identidade, tamanho e localização de populações suscetíveis.

**Caracterização e gerenciamento do risco** – A caracterização resulta do estabelecimento da quantificação da exposição e da relação dose–resposta para cada efeito estudado, o que poderá resultar na quantificação do risco sob a forma de um número. Baseia-se em modelos matemáticos que combinam a exposição em humanos com dados de animais de laboratório e na avaliação das consequências políticas, sociais, econômicas e na saúde pública.

A melhor situação para avaliar os possíveis prejuízos gerados pelos agroquímicos no homem seria a realização desses estudos no próprio ser humano. Entretanto, em nossa realidade nem sempre há dados disponíveis para avaliação de produtos que já venham sendo utilizados, pois a coleta de dados da exposição humana deriva de casos acidentais quando relatados. Nessas ocasiões, nem sempre é possível precisar, por exemplo, a natureza e a duração da exposição, uma vez que as populações podem migrar do local de exposição, onde estão expostas a múltiplos fatores ambientais.

A avaliação dos efeitos da exposição humana aos agroquímicos, conta atualmente com um número limitado de indicadores biológicos ou biomarcadores reconhecidos e validados como para os inseticidas organofosforados. O estudo de alguns dos mecanismos envolvidos na exposição aos agroquímicos é essencial para o desenvolvimento de parâmetros a serem empregados na avaliação dos riscos à saúde pública e na tomada de decisões quanto à segurança de seu uso (BUCHELI; FENT, 1995; LESKO; ATKINSON, 2001). Para o estabelecimento de políticas, esses indicadores devem expor os problemas e suas causas e serem úteis para alcançar os objetivos das mesmas. Os indicadores biológicos ou biomarcadores devem possuir determinadas características como mensurabilidade, sensibilidade, reprodutibilidade, boa fundamentação teórica e ser passível de melhorias (AMORIM, 2003; CASTRO et al., 1999). É essencial também que eles forneçam informações simples e de mais rápida compreensão que os sistemas complexos de dados.

O monitoramento da população exposta ambientalmente a compostos tóxicos, como os agroquímicos, pode ser feito de forma direta ou indireta. O monitoramento ambiental é uma avaliação direta, quali e quantitativa da exposição, realizada mediante a determinação de agroquímicos presentes no ambiente (água, ar, solo, etc.), e o risco à saúde enquanto que o monitoramento biológico é uma avaliação indireta, quali e quantitativa da exposição de um indivíduo ou de uma amostra da população exposta aos agroquímicos ocupacional ou ambientalmente. Para a realização do monitoramento biológico é necessário o conhecimento de um indicador biológico ou biomarcador (AMORIM, 2003).

O indicador biológico deve, portanto, prover uma análise dos efeitos de estressantes ambientais, envolvendo a medida de respostas biológicas em uma escala temporal que evidencie alterações sutis, além de trazer informações quanto ao seu mecanismo de ação. A observação desses efeitos pode indicar sinais iniciais de alerta (AITIO; KALLIO, 1999). Nesse aspecto, é adequado desenvolver escalas de respostas biológicas em relação ao tempo, que sejam sensíveis a severidade da exposição (efeito dose-resposta) e que espelhem a suscetibilidade de dano; principalmente aquele que se reflete no desenvolvimento dos jovens da população após a exposição aos agroquímicos.

Deve-se contudo lembrar que nem sempre é possível obter uma resposta dose-efeito inequívoca. Às vezes, há dificuldade de obtenção da curva dose-resposta ou de estabelecer o poder estatístico dos parâmetros usados nas correlações entre os efeitos observados e a exposição em amostras populacionais (ALONSO et al., 2004; CONOLLY; LUTZ, 2004; GAYLOR et al., 2004).

O biomonitoramento realizado de forma eficiente envolve o estudo da biodisponibilidade do agroquímico e a utilização de indicadores apropriadamente selecionados. Geralmente são utilizados dois tipos de biomarcadores ou indicadores biológicos para esse fim: a) os de dose interna, acúmulo ou depósito que quantificam a substância e/ou seus metabólitos no organismo; e b) os de efeito (DECAPRIO, 1977; AITIO; KALIO, 1999; AMORIM, 2003). A monitorização da exposição é um procedimento que consiste em uma rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais, com a finalidade de detectar os possíveis riscos à saúde. A exposição pode ser avaliada por medida da concentração do agente químico em amostras ambientais, como o ar (monitorização ambiental), ou através da medida de parâmetros biológicos (monitorização biológica), denominados indicadores biológicos ou biomarcadores.

Os biomarcadores podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo e da exposição química. Outro tipo de biomarcador que pode ser utilizado é o de suscetibilidade ou genético que procura o entendimento dos mecanismos relacionados à ação tóxica e o grau de resposta nos indivíduos. Assim, os efeitos dos agroquímicos na modulação do sistema reprodutivo e a indução de genotoxicidade e/ou efeitos cancerígenos são alvo de vários estudos (AMORIM, 2003).

Os biomarcadores de dose interna constituem-se na quantificação do produto no organismo e/ou de seu metabólito. Porém, de forma geral, seus métodos de detecção são complexos, custosos e exigem equipamentos e pessoal especializado. Já os de efeito são aqueles que avaliam os efeitos biológicos que se traduzem em alterações funcionais celulares capazes de evidenciar as alterações que se instalam no órgão-alvo, como alterações bioquímicas e celulares (AMORIM, 2003). Para alguns compostos, a estimativa da exposição é baseada em estudos com resultados uniformes, enquanto para outros a incerteza ocorre de forma mais acentuada (AITIO; KALLIO, 1999).

O reconhecimento dos fatores que influenciam a toxicidade de um determinado nível de exposição a um agroquímico é fundamental na determinação do risco de exposição a estes agentes em populações. Para a maioria dos agentes, a avaliação dose-resposta envolve principalmente a análise de dados obtidos em animais de laboratório em razão de sua difícil obtenção em humanos. Além da variação individual, outros fatores podem contribuir ou modificar essas funções neurocomportamentais, interferindo assim na análise do possível potencial tóxico de uma determinada substância química (CLEWELL et al., 2004; VIBERG et al., 2004; STEIMER; DRISCOLL, 2005).

Há diversos fatores que podem contudo afetar a toxicidade de uma substância. Algumas das variáveis são: a) intrínsecas aos animais, como espécie, sexo, idade, características genéticas, hábitos alimentares, etc; b) referentes à substância, como a via de exposição, veículo empregado, frequência de exposição, dose; e c) relativas ao ambiente como temperatura, umidade e fotoperíodo.

Esses fatores podem também atuar como possíveis fatores de risco para um determinado agente tóxico ambiental qualquer, tornando-se, muitas vezes, fundamentais para a definição de um padrão de segurança ou para a análise de

risco mais apurada. Eles são importantes ainda para determinar uma maior sensibilidade ou suscetibilidade aos efeitos tóxicos de uma substância química, para um determinado grupo de risco.

Algumas variáveis importantes a serem consideradas em um estudo dos possíveis efeitos decorrentes da exposição de determinada população a um xenobiótico são: a) determinação representativa da população a ser examinada; b) características da população examinada (hábitos alimentares, fumo, atividade física, etc.); c) controle da situação pré-analítica, fontes e dispersão do produto no espaço e no tempo; d) escolha adequada do método analítico ou estatístico; e) parâmetro a ser mensurado; f) conhecimento da toxicocinética do elemento analisado.

Em crianças, a sensibilidade a possíveis efeitos tóxicos dos agroquímicos é, por vezes, maior que nos adultos, podendo sofrer danos com doses menores (COSTA, 2004; MOSER et al., 2001, POHL et al., 1998, SCHEUPLEIN, 2002). O feto é especialmente vulnerável a danos em virtude da exposição a produtos químicos que atravessam a placenta e/ou a barreira cerebral imatura. Além disso, durante o desenvolvimento de um organismo, há períodos que são críticos para a sua maturação normal (BORTOLOZZI et al., 1999; RICE; BARONE JÚNIOR, 2000; COSTA et al., 2004). Baseado no fato de que as crianças são geralmente mais sensíveis que os adultos aos efeitos neurotóxicos e comportamentais (POHL et al., 1998; COSTA et al., 2004), a reversibilidade dos efeitos neurotóxicos com o amadurecimento do organismo deve ser avaliada com critério, mesmo na ausência da observação de sinais evidentes de dano neurológico (KIMMEL, 1998).

A necessidade de avaliação de efeitos precoces por exposição a compostos químicos em crianças é reforçada pela observação de que essas crianças expostas a esses produtos de uso doméstico ou agrícola, mesmo que não apresentem sintomas clínicos, podem apresentar pior desempenho em testes neurocomportamentais em relação a crianças da mesma comunidade que nunca foram expostas a esses compostos (DAM et al., 2000). Essa sensibilidade seria resultante da diferença entre a fisiologia dos recém-nascidos, crianças e adultos decorrente da área corporal, relação da massa cerebral e corporal, período de desenvolvimento, ventilação, função renal, atividade enzimática (GENTRY et al., 2003). Contudo, diferentes suscetibilidades não implicam

necessariamente em maiores riscos. O efeito real vai depender dos mecanismos fisiometabólicos e das características do produto em estudo (SCHEUPLEIN et al., 2002; ZWART et al., 2004). Assim, os modelos de estudo com animais têm sido amplamente utilizados e o risco de um efeito prejudicial para o ser humano é avaliado baseado em modelos toxicocinéticos e fisiológicos de comparação. A validade do modelo escolhido depende de sua sensibilidade e reprodutibilidade.

Entretanto, a avaliação dos resultados dos testes toxicológicos, incluindo a extrapolação para humanos, é um ponto controverso da avaliação da segurança de uso dos compostos químicos. Na extrapolação dos animais de laboratório para os seres humanos, apesar da similaridade na fisiologia dos organismos, deve-se atentar para alguns aspectos como variações interespecies e limitações experimentais (DOURSON et al., 2002). Por vezes, restam dúvidas e questões quanto à apropriação e à suficiência dos dados toxicológicos que fornecem a base para a extrapolação dos dados dos animais para o ser humano.

Baseado no conceito de ingestão diária aceitável (IDA), originalmente concebido para aditivos alimentares e depois estendido a outros compostos como os agroquímicos, foi proposto que um nível seguro da substância em estudo possa ser derivado do valor do NOAEL (*no-observed-adverse-effects level*) crônico (mg/kg), obtido de estudos com animais, dividido por um fator de segurança.

O propósito do fator de segurança é permitir que as incertezas no conhecimento, a respeito de um composto tóxico, obtidas em um estudo com animais de laboratório não afetem o estabelecimento de doses seguras para uma população humana heterogênea. A validade do uso de um fator de segurança tem sido alvo de debates recentes, devido a muitos fatores, como o avanço dos métodos experimentais e a falta de critérios científicos para estipular seu valor (VERMEIRE et al., 1999; KIMMEL; MAKRIS, 2001).

Contudo, os fatores de segurança são usados em avaliações de risco quanto à saúde das crianças, pela necessidade do estabelecimento de testes adicionais relacionados a elas; porém a subpopulação é potencialmente mais sensível a danos tóxicos, em especial aos compostos cujos dados toxicológicos apontam para um potencial efeito neurotóxico (SCHILTER et al., 1996; HUBAL et al., 2000; COSTA et al., 2004, ZWART et al., 2004).

Alguns parâmetros poderão auxiliar no estudo dessas diferenças para diminuir a incerteza das avaliações: a) identificação da idade ou estágio de desenvolvimento para cálculo do nível de exposição que ocasione o efeito; b) desenvolvimento de métodos para monitoramento da exposição e das atividades infantis; c) coleta de padrões de atividade de crianças para identificar a exposição por diversas vias; d) identificação das concentrações dos toxicantes no ambiente; e) identificação de indicadores e coeficientes a serem usados nos modelos de exposição (HUBAL et al., 2000).

Assim, estão sendo desenvolvidos modelos de avaliação da toxicocinética, (*Physiologically Based Pharmacokinetic Models*) à semelhança daqueles utilizados para extrapolação de dados entre os organismos–teste e humanos; a fim de obter uma avaliação de risco mais realista para ajustar diferenças cinéticas entre adultos e crianças e recém-nascidos (DOURSON et al., 2002; SCHEUPLEIN et al., 2002; GENTRY et al., 2003).

Também, alguns órgãos oficiais sensíveis a essas questões têm requerido testes toxicológicos mais específicos, geralmente em roedores, a fim de auxiliar a avaliação de potenciais danos causados pela exposição do homem a compostos tóxicos.

Tem-se procurado melhorar os protocolos experimentais disponíveis e adicionar alvos de estudo que possam fornecer uma melhor caracterização dos efeitos da exposição a esses compostos (LIMA, 2003). A fim de determinar os riscos da exposição de humanos a substâncias químicas, muitas agências nacionais (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama)) e internacionais (U.S. Environmental Protection Agency (Usepa) e *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD)) requerem testes toxicológicos específicos.

Uma revisão dos protocolos de testes, requeridos pela Usepa, levou à extensão do período de exposição, a termo, nos estudos de toxicidade pré-natal, neurotoxicidade, carcinogenicidade, entre outros, consistindo numa bateria de estudos de toxicidade, utilizando roedores e não roedores (KIMMEL; MAKRIS, 2001; REUTER et al., 2003). Como consequência, atualmente, os ensaios de monitoramento biológico podem definir com maior propriedade os riscos genotóxicos dos contaminantes ambientais para o ser humano.

## ASPECTOS RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO E À NEUROTOXICIDADE

O estudo da neurotoxicidade nos organismos em desenvolvimento se apresenta como um alvo sensível a ser usado como indicador; porém seu estudo é, em parte, qualitativamente preditivo, em virtude do uso de múltiplos focos para sua avaliação em vários sistemas neurológicos. Portanto, deve haver um esforço visando incluir testes alternativos ou adicionais para extrapolar apropriadamente os riscos aos seres humanos, em níveis realisticamente encontrados no ambiente, e que, em alguns casos, não causam sinais de toxicidade materna evidente.

A evolução dos métodos de avaliação referentes aos testes de efeitos reprodutivos e no desenvolvimento animal aliada à adequação da legislação elevaram a importância relativa do estudo desses efeitos e encorajaram a melhora dos protocolos de avaliação de neurotoxicidade capazes de detectar os efeitos decorrentes da exposição aos agroquímicos. O melhoramento dos protocolos de estudo, referentes aos potenciais efeitos neurotóxicos durante o desenvolvimento animal; será capaz de otimizar a habilidade desse estudo em detectar os possíveis efeitos relacionados à exposição (SELEVAN et al., 2000; MEYER, 2003).

Apesar da diversidade de estudos existentes, os efeitos dos agroquímicos na saúde nem sempre são bem conhecidos. Muitos desses agentes afetam o sistema reprodutivo, efeitos esses confirmados em testes experimentais incluindo gestação, parto, lactação, desmame, crescimento e desenvolvimento da prole (CLAUDIO et al., 1999; GREENLEE et al., 2004). Sabe-se, por exemplo, que a exposição de fêmeas a agroquímicos durante a prenhez e a lactação pode causar alterações refletidas em aspectos físicos e comportamentais, de acordo com a ocorrência de períodos críticos no desenvolvimento animal. A exposição perinatal pode envolver efeitos latentes, observáveis tardiamente, que se manifestam após um estímulo ambiental mesmo nos casos em que a exposição ocorra em doses menores que aquelas que promovem efeitos evidentes em adultos. (KIMMEL, 1998; CHELONIS et al., 2004; COSTA et al., 2004).

O período perinatal pode ser dividido em quatro etapas: implantação, organogênese, desenvolvimento fetal e período neonatal. O início da prenhez, da fertilização até a implantação, é um período crítico durante o qual podem

ocorrer perdas gestacionais. O período neonatal tem seu início ao nascimento da prole, sendo finalizado com o término da lactação. Nesse período ocorrem a maturação funcional e o ganho de peso corporal, peso este que pode sofrer redução com a exposição do filhote a substâncias químicas, bem como desordens funcionais e carcinogênese (BERNARDI et al., 1997). Existem também evidências de que a excreção pelo leite pode alterar o desenvolvimento pós-natal, de forma tal que algumas dessas alterações possam perdurar até a idade adulta (VOGEL; HAGLER, 1996; MEERTS et al., 2004; VIBERG et al., 2004).

Em mamíferos, é indispensável o desempenho normal das funções maternas para a saúde dos filhotes durante o desenvolvimento embrionário e logo após o nascimento. Os sinais tradicionalmente observados de toxicidade materna em estudos experimentais são: decréscimo no ganho de peso, diminuição do consumo de água e alimento, sinais clínicos e mortalidade. A avaliação da possível influência materna no desenvolvimento dos filhotes é alvo de preocupação na literatura há algum tempo (SÖDERSTEN; ENEROTH, 1984; CHAMPAGNE et al., 2003; POPESKI; WOODSIDE, 2004).

As avaliações cuidadosas sobre o desenvolvimento animal freqüentemente incluem, além das observações quanto ao aparecimento de sinais físicos, os aspectos referentes ao desenvolvimento neurocomportamental (ALDER, 1983). Ambas avaliações são freqüentemente usadas para identificar as alterações causadas por exposições pré e/ou pós-natal a compostos tóxicos.

A melhor situação para lidar com aspectos relativos a toxicidade reprodutiva, como riscos do desenvolvimento na progênie de fêmeas expostas a agroquímicos, é desenvolver uma estratégia para a confecção de índices comportamentais de desempenho que, por sua vez, estariam relacionados à idade, características importantes para o bom desempenho da espécie testada e sua correlação com os efeitos tóxicos (AITIO; KALLIO, 1999). Assim, alterações sutis de comportamento e mudanças neurológicas podem ser indicadores iniciais de dano à saúde dos animais jovens em desenvolvimento.

Portanto, devem ser identificados e validados modelos apropriados para a identificação de possíveis efeitos decorrentes da exposição aos agroquímicos que possam afetar o processo de maturação física e neurocomportamental animal em relação a sua idade. Tais parâmetros podem-se evidenciar como bioindicadores sensíveis da toxicidade no organismo em desenvolvimento e, portanto, como útil ferramenta de análise (CASTRO et al, 2000a; 2000b;

KIMMEL; MAKRIS, 2001). Tanto os procedimentos desenvolvidos quanto os fenômenos observados desses estudos podem ser aplicados em larga escala em vários setores, como as iniciativas privadas (indústrias) e governamentais (NEWLAND et al. 2003).

Uma das dificuldades, contudo, em se estabelecer efeitos neurocomportamentais é definir em qual nível a mudança do parâmetro em estudo deva ser considerada como prejuízo em decorrência da exposição, uma vez que há vários sistemas fisiológicos em desenvolvimento ao mesmo tempo e com diferentes períodos críticos para a ocorrência de efeitos tóxicos (LEVY; HUSMANN, 1995). Algumas vezes, os dados disponíveis são limitados àqueles coletados em diferentes fases do desenvolvimento, por diferentes vias de exposição e em cenários diferentes.

Na maioria das vezes, a toxicidade e, em especial, a neurotoxicidade ocasionada pela exposição a substâncias tóxicas é avaliada de acordo com algumas baterias de testes, descritas na literatura internacional. Contudo, tais baterias variam de acordo com as recomendações e/ou legislação de cada país ou de acordo com critérios estabelecidos pelos pesquisadores envolvidos no trabalho. Essas baterias de testes podem ser realizadas da seguinte forma: a) no caso de seres humanos podem ser feitas mediante aplicação de questionários, exames clínicos (ex: dano de condutividade nervosa periférica) e avaliação de alterações de funções cognitivas e comportamentais. As funções cognitivas, como aprendizagem e memória, têm sido utilizadas em indivíduos expostos a solventes e metais pesados no caso de seres humanos. As dimensões comportamentais mais documentadas são sociabilidade, cooperação, estado emocional, nível de atividade, atenção, impulsividade, ansiedade e irritabilidade. Outras funções motoras também podem ser avaliadas, como postura e reflexos, entre outros (DESPRÉS et al., 2005); (b) da realização de protocolos experimentais em animais de laboratório, como por exemplo a FOB (*Functional Observational Battery*) (MOSER et al., 2001; MOSER et al., 2004), essas baterias têm se mostrado úteis na avaliação da neurotoxicidade (LUFT; BODE, 2002). Os estudos neurotoxicológicos dessas baterias experimentais em animais incluem avaliações preliminares (*screening*), que se constituem por bateria de observação funcional, quando são avaliados reflexos e algumas reações como salivação, piloereção, etc, além da medida automatizada da atividade motora. Ainda podem ser conduzidas avaliações do desenvolvimento cognitivo

(aprendizado e memória). O uso de indicadores específicos pode verificar a validade de um modelo utilizado na correlação entre a medida dos mesmos e a exposição real. Assim, o estudo de indicadores de exposição em animais de laboratório é considerado como parte integrante de qualquer estudo epidemiológico ambiental.

Os fungicidas estão entre os agroquímicos que mais são passíveis de produzir efeitos em longo prazo, incluindo o câncer. Esses produtos apresentam aproximadamente 60% de risco estimado de carcinogênese (NRC, 1987). Os agroquímicos podem ocasionar prejuízos ao desenvolvimento embrionário, provocando aborto ou deficiências na formação do feto, alterações fisiológicas como alterações na modulação do sistema endócrino de animais silvestres e do ser humano, além de alterações comportamentais; pois na ocasião do nascimento os animais não possuem todos os sistemas fisiológicos maduros (VOGEL; HAGLER, 1996; POHL et al., 1998). Um dos possíveis mecanismos de ação para esse efeito é a interferência com a síntese de esteróides, mais precisamente com a enzima CYP19 aromatase, que catalisa a conversão de androgênios em estrogênios, sendo responsável pelo balanço homeostático entre o que tradicionalmente são considerados hormônios femininos e masculinos (SIMPSON; DAVIS, 2001).

Como exemplo pode-se citar o fungicida fenarimol. Em alguns estudos foi observado que o transporte placentário de fenarimol ocorre ao redor de 0,1% da dose administrada, embora a partir do 18º dia de prenhez sua taxa de concentração chegue a 1,0%. Já no leite materno a taxa de concentração é de 3 a 5 vezes maior do que a encontrada no plasma materno. Após a administração de [<sup>14</sup>C] fenarimol a ratas no quinto dia de lactação aparecem altas concentrações de radioatividade no hipotálamo dos neonatos que aumentam rapidamente e decrescem mais lentamente. Essas altas concentrações do fungicida coincidem com a época do desenvolvimento do comportamento sexual, o que inibiria o aumento de receptores estrogênicos nucleares no cérebro, o que normalmente ocorre no início do período pós-natal (HIRSCH et al., 1987; HONDA et al., 1998; VINGGAARD et al., 2000; ANKLEY et al. 2005). Tais observações em relação ao desenvolvimento e/ou expressão do sistema reprodutor masculino enfatizam a importância do estudo prospectivo dos efeitos desse fungicida. Alguns trabalhos citam ainda a ausência de efeitos do fungicida como inibidor na comunicação intracelular, embora seja capaz de induzir a mesma isoenzima do citocromo P450 induzida pelo fenobarbital, e causar

hepatomegalia após administração de 1000 ppm na dieta (FLODSTROM et al., 1990; PALUT et al., 1992).

A diferença entre machos e fêmeas no comportamento espontâneo ou induzido por droga também é um fator importante que vem sendo estudado cuidadosamente nos últimos anos. Já estão bem estabelecidas diferenças sexuais com relação ao metabolismo, neuroanatomia, endocrinologia, bioquímica e comportamento (BEATTY et al., 1982; HAAREN et al., 1990; McCARTNEY et al., 1999; TROPP; MARKUS, 2001; WALKER et al., 2001; HUGHES, 2001; HU et al., 2004).

As respostas que envolvem atividade e comportamento são atualmente estudadas em roedores no contexto de exploração e aprendizagem, memória, novidade e ansiedade. O efeito inicial neuroquímico no cérebro pode ter conseqüências comportamentais em longo prazo para o organismo em desenvolvimento (BEKKEDAL et al., 1999; SARTER, 2004). A atividade exploratória é freqüentemente usada como um índice de reatividade de um animal a uma situação nova e, até certo ponto, em situações de estresse (ZIMMERMANN et al., 2001; COSTOLI et al., 2005). Por essas razões, é importante o planejamento dos estudos para investigar a relação potencial entre os efeitos de agroquímicos na saúde e os indicadores de desenvolvimento neurocomportamental, como a atividade locomotora. A exposição materna a um produto pode alterar a maneira através da qual a progênie reage e se adapta a testes em ambientes novos (KISHI et al., 1995; CHAMPAGNE et al., 2003). Porém, a relação da dose com os efeitos dos agroquímicos não é sempre clara. As experiências iniciais com um animal jovem durante a manipulação e o desempenho de muitos testes podem ser vividas como um estresse e, como conseqüência, a sua resposta pode ficar irregular, indiferentemente de qual teste seja aplicado (MUNEOKA et al., 1997).

#### ASPECTOS RELACIONADOS A GENOTOXICIDADE

Há evidências, já a algum tempo, de que a exposição aos agroquímicos resulta em alterações genéticas da população em questão; desde o aumento da incidência de anormalidades de desenvolvimento até as quebras cromossômicas e na estrutura do gene (HEBERT; LUIKER, 1996; JOKSIC et al, 1997;

BOLOGNESI, 2003). A partir da década de 50, vários estudos mostraram que a incidência de diversos tipos de câncer apresentavam variações geográficas e temporais em diferentes comunidades e grupos de migrantes. Esses efeitos foram, em grande parte, devido a fatores culturais, ocupacionais e estilo de vida, indicando que em vários tipos de câncer há um importante fator ambiental envolvido. Assim, é que a dose do produto a qual o organismo está exposto pode alterar o indicador a ser monitorado (GOODMAN, 1998). Apesar da observação e da coleta de dados clínicos ou epidemiológicos das populações expostas serem uma boa forma de avaliação dos prejuízos à saúde, a interpretação desses dados torna-se difícil uma vez que, na maioria dos casos, e, em especial, em nossa realidade agrícola, não há dados disponíveis para tal avaliação. Desta forma, o estudo de possíveis efeitos genotóxicos devem ser incluídos na avaliação de uma substância química, mesmo que esta possua um mecanismo de ação secundário que não produza uma alteração primária no material genético.

A integridade do genoma celular é crucial para a viabilidade celular e sua atividade funcional. Entretanto, os genomas celulares estão constantemente sujeitos a uma variedade de agentes químicos e físicos que podem ocasionar mutações ou deleções de informações genéticas vitais. A prevenção primária de tais efeitos implica em ações de saúde pública destinadas a reduzir ou eliminar os fatores de risco para a doença. Essas ações se voltam primariamente para os fatores de risco que são considerados, em princípio, evitáveis, ou seja, aqueles que são extrínsecos ao indivíduo e são, por isso, denominados também de fatores ambientais. Os fatores ambientais compreendem todas as influências externas que se fazem sentir sobre o indivíduo, como a condição social, a ocupação, os hábitos alimentares, o estilo de vida, a exposição a agentes físicos e químicos, etc. (THEIR et al., 2003).

Atualmente, os testes para detecção de substâncias genotóxicas são realizados mediante avaliação de mutações gênicas, danos ao DNA e alterações cromossômicas em análises *in vitro* e *in vivo* (POLI et al., 2003). A importância dessa análise reside no fato de que as substâncias genotóxicas são capazes de induzir a carcinogenicidade ao iniciar a transformação da célula (iniciador), enquanto um outro grupo de substâncias não genotóxicas (promotores) potencializam o efeito carcinogênico dos iniciadores, quando aplicados depois das substâncias genotóxicas (NGUYEN-BA; VASSEUR, 1999).

No modelo de carcinogênese em multiestágios, os três estágios operacionalmente definidos na formação de tumor são: iniciação, promoção e progressão. Iniciação é a interação entre um genotóxico carcinogênico (iniciador) com o DNA de uma célula, resultando no dano citogenético que leva à mutação. O DNA danificado pode reverter para o normal se os mecanismos de reparo do DNA tiverem sucesso; senão, as células transformadas podem evoluir para um tumor que se torna aparente, clinicamente.

A progressão do tumor é induzida por fatores sistêmicos (hormônios e outros promotores de crescimento), ou exógenos (ambientais) que facilitam o crescimento e o desenvolvimento de células dormentes ou latentes. Assim, um promotor ou co-carcinogênico não é normalmente um carcinogênico em si, mas ele potencializa os efeitos de um carcinogênico. Além disso, para os fatores promotores, os co-promotores podem representar um papel importante na carcinogênese. Fatores co-promotores não são promotores de tumores mas aumentam a progressão do tumor, em resposta aos promotores. Contudo, na análise dos testes *in vitro* há a necessidade de extrapolação do resultado obtido para a situação *in vivo*. As diferenças interespecies dos animais aos genotóxicos devem-se, em grande parte, a diferenças na capacidade metabólica de conversão das substâncias pró-carcinogênicas.

Na tentativa de superar a capacidade metabólica limitada dos sistemas *in vitro*, utiliza-se a fração S9 microsomal para a ativação metabólica. Porém, algumas vezes o emprego dessa fração não reproduz de maneira totalmente satisfatória a biotransformação da substância que ocorria no animal íntegro (MALLING, 2004).

Para a redução dos fatores de risco é importante o conhecimento dos mecanismos biológicos envolvidos na genotoxicidade, que contribuem para a incidência atual de diversos tipos de neoplasias. Nessa direção, os testes toxicológicos experimentais devem voltar-se para o esclarecimento do modo de ação dos fatores predisponentes. Os testes experimentais toxicológicos permitem também a avaliação do potencial genotóxico de agroquímicos, participando de forma complementar na investigação epidemiológica. Contudo, os próprios estudos epidemiológicos possuem limitações metodológicas que, às vezes, tornam difícil o estabelecimento de relações causa-efeito como múltiplas exposições.

Atualmente, as agências que trabalham na harmonização e revisão dos protocolos experimentais relacionados a genotoxicidade recomendam uma bateria mínima de testes a ser utilizada na avaliação de produtos farmacêuticos, aditivos de alimentos, agroquímicos e outros agentes químicos industriais e ambientais.

Os testes do Micronúcleo e o de Ames têm sido tradicionalmente usados para esse fim. O primeiro é um ensaio rápido que avalia a mutagenicidade cromossômica pela habilidade de um determinado produto de induzir micronúcleos em eritrócitos pela formação de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos das células na anáfase. O efeito da substância a ser testada é, então, verificado em esfregaços de medula óssea. Já o segundo é realizado com a *Salmonella typhimurium*, na presença de ativação metabólica ou não (fração S9) e detecta troca de pares de bases do DNA (his- em his+). O teste de Ames, o qual detecta mutação gênica em *Salmonella typhimurium*, é um teste de mutação reversa, o qual utiliza várias linhagens testes específicas para detecção de mutações de ponto. Uma vez que a genética de cada linhagem teste é bem definida, é possível identificar o tipo específico de efeito genético (substituição de base) induzido por agentes que são ativos neste sistema. Outros testes são também bastante utilizados como o SOS cromoteste. Trata-se de um teste quantitativo/colorimétrico baseado na resposta SOS bacteriana (*Escherichia coli*), a qual se caracteriza pela ativação de um grande número de genes em resposta a situações de estresse, nas quais a replicação do DNA encontra-se comprometida em virtude da ocorrência de um grande número de lesões que bloqueiam a replicação (RABELLO-GAY et al., 1991; RIBEIRO et al., 2003).

Apesar do emprego de inúmeras técnicas valiosas, nos últimos anos houve um aumento de interesse na metodologia do teste do cometa, pois este teste pode ser usado em vários estudos, tanto *in vivo* como *in vitro*, para avaliar reparo e dano do DNA. Este interesse decorre do fato de se tratar de um método rápido, no qual as lesões no DNA podem ser vistas na ausência da atividade mitótica. Essa técnica possui as vantagens da utilização de um pequeno número de células, ter boa reprodutibilidade e ser aplicável em qualquer organismo eucarioto, além de poder ser realizada tanto *in vitro* como *in vivo*. Acrescente-se que esse teste vem demonstrando ser sensível na detecção de

danos ao DNA mesmo em células expostas a baixas concentrações de agroquímicos (TICE et al, 2000). Esse teste é amplamente utilizado para se testar agentes genotóxicos, indução de danos e reparos no DNA, biomonitoramento de populações expostas, bem como em investigações clínicas de indivíduos (POLI et al., 2003).

A quantificação das quebras em DNA no teste do cometa (Single Cell Gel assay – SCG) pode mostrar facilmente o efeito biológico de agentes genotóxicos ambientais. As partes do DNA que foram quebradas, em função da exposição ao agente genotóxico, migram num processo de eletroforese, formando uma figura obtida para cada núcleo celular composta de “cabeça” e “cauda”, o que ocasiona a semelhança a uma imagem de cometa. Assim, quanto maior for o dano causado no DNA, maior o número de partes de menor peso molecular livres e, portanto, maior será a cauda do cometa (PLAPPERT et al, 1994; NAVARRETE et al, 1997; SASAKI et al, 1997).

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos tóxicos dos agroquímicos associados à reprodução, à exposição materna e a recém-nascidos e jovens pode ocorrer com certa frequência em decorrência do uso generalizado desses compostos. A proteção destes para evitar danos requer uma estratégia capaz de monitorar os padrões de uso desses compostos de maneira contínua (BARR et al., 1999; LANDRIGAN et al., 1999). Entretanto, com o aumento da severidade do impacto ambiental devido à ação humana, torna-se necessária a aplicação de esforços para sofisticar o monitoramento e avaliar os efeitos dessa entrada de estressantes químicos no ambiente (GOLDEN; RATTNER, 2003).

Os testes relativos a aspectos comentados aqui, além de sua aplicação na identificação de efeitos prejudiciais à saúde, poderão ser utilizados na avaliação de risco de novos produtos por agências regulatórias e no monitoramento de populações humanas expostas a agroquímicos. A obtenção de dados de alvos biológicos significativos poderá contribuir para o aprimoramento dos instrumentos, por meio dos quais os riscos ao ser humano e ao ambiente, causados pelos agroquímicos, possam ser minimizados.

Em virtude das considerações descritas acima, fica clara a importância da confecção de protocolos experimentais contendo índices relacionados a

genotoxicidade e desenvolvimento embrionário e de animais jovens que identifiquem efeitos em doses menores do que outros testes rotineiramente utilizados. As considerações aqui apresentadas poderão estimular futuros estudos, com o objetivo de melhorar os programas de monitoramento biológico, para caracterizar os efeitos antrópicos em condições ambientais, contribuindo assim para o correto gerenciamento dos riscos identificados, resolvendo problemas práticos da forma mais adequada possível. Tal conhecimento poderá levar a melhores escolhas na prevenção do risco à saúde humana por causa do uso de agrotóxicos.

Dessa forma, pode-se sugerir que um enfoque específico que estude efeitos sutis através de novas baterias de testes experimentais seja complementar à abordagem da avaliação da exposição a agroquímicos em animais jovens e que privilegia os índices toxicológicos tradicionalmente utilizados. Ambos enfoques devem compartilhar informações a fim de facilitar uma avaliação mais criteriosa para viabilizar a implementação de políticas que visem a sustentabilidade ambiental.

Como desafios para novos estudos, podem-se citar: a) conhecer as diferenças cinéticas de um agroquímico em jovens e adultos, a fim de subsidiar informações quanto à exposição desses produtos em crianças; b) realizar investigação apropriada para sustentar o uso seguro dos compostos em relação à população infantil, por exemplo em relação à dieta (PENNYCOOK et al., 2004); c) aprimorar a avaliação de parâmetros de desenvolvimento pré e pós-natal (SNC, sistemas reprodutivos e imunes); d) promover o estudo de bioindicadores mais específicos; e) promover avanços na ecogenética através do estudo da interação gene-ambiente-saúde.

A adoção de decisões envolvendo o uso dos agroquímicos será, então, facilitada por esses estudos, atentando para: a) a análise das informações e recomendações obtidas pela fase de avaliação; b) a análise de elementos da realidade econômica, social, política, tecnológica, etc. da área de estudo; c) a análise de possíveis perdas econômicas em confronto com possíveis benefícios; d) os riscos à saúde e ao meio ambiente; e) a análise da percepção e aceitação social do risco; f) a análise dos recursos disponíveis e necessários ao desenvolvimento e planejamento de estratégias de manejo de risco. A partir daí é possível estabelecer normas de exposição ambientais e humanas e, conseqüentemente,

estabelecer um programa de prevenção e educação da população. Por último, deve ser realizada a avaliação dos resultados do programa adotado.

## REFERÊNCIAS

- AITIO, A.; KALIO, A., Exposure and effect monitoring: a critical appraisal of their practical application, **Toxicology Letters**, Clare, v. 108, p.137-147, 1999.
- ALDER, S. Behavioral teratology. In: ZBINDEN, Q.; RACAGNI, G.; CUOMO, V. E WEISS, B. **Application of Behavioral Pharmacology in Toxicology**. New York: Raven Press, 1983. p. 57-66.
- ALONSO, A.; GEYS, H.; MOLENBERGHS, G; KENWARD, M.; VANGENEUGDEN, T. Validation on surrogate markers in multiple randomized clinical trials with repeated measurements: canonical correlation approach. **Biometrics**, Oxford, v.60, p.845-853, 2004.
- AMORIM, L. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 6, supl. 1, p. 1-13, 2003.
- ANKLEY, G.; JENSEN, K.; DURHAN, E.; BUTTERWORTH, B.; KAHL, M.; VILLENEUVE, D.; LINNUM, A.; EARÇ GRAY, L.; CARDON, M.; WILSON, V. Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Toxicologicas Science**, Oxford, Advance Access published on May 18, 2005.
- BARR, D.; BARR, J.; DRISKELL, J.; HILL JÚNIOR, R.; ASHLEY, D.; NEEDHAM, L.; HEAD, S.; SAMPSON, E. Strategies for biological monitoring of exposure for contemporary-use pesticides, **Toxicology and Industrial Health**, Little Rock, v. 15, p. 168-179, 1999.
- BEATTY, W. W.; DODGE, A. M.; TRAYLOR, K. L. Stereotyped behavior elicited by amphetamine in the rat: Influences of the testes. **Pharmacology and Biochemistry Behavior**, Oxford, v. 16, p. 565-568, 1982.
- BEKKEDAL, M.; ROSSI, J; PANKSEPP, J. Fetal and neonatal exposure to trimethylolpropane phosphate alters rat social behavior and emotional responsivity. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v. 21, p. 435-443, 1999.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H.; GÓNIAS, S.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1997. p. 517- 524.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research, Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 543, p. 251-272, 2003.

BORTOLOZZI, A., DUFFARD, R., DUFFARD, A. Behavioral alterations induced in rats by a pre- and postnatal exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v. 21, p. 451-465, 1999.

BUCHELI, T.; FENT, K. Induction of cytochrome P-450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v.25, n.3, p.201-268, 1995.

CASTRO, V.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Biological monitoring of embryo-fetal exposure to methamidophos or chlorothalonil on rat development. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 42, p. 361-365, 2000a.

CASTRO, V.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. **Toxicology Letters**, Clare, v. 118, p. 93–102, 2000b.

CASTRO, V.; SILVEIRA, M.; PEREZ, M. Application of clinical indicators of exposition in the evaluation of family agriculture health: the Sumaré case – Brazil. **International Journal of Sustainable and Development World Ecology**, Lancaster, v. 6, p.172-184, 1999.

CHAMPAGNE, F.; FRANCIS, D.; MAR, A.; MEANEY, M. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development, **Physiology & Behavior**, Oxford, v. 79, p. 359-371, 2003.

CHELONIS, J.; FLAKE, R.; BALDWIN, R.; BLAKE, B.; PAULE, M. Developmental aspects of timing behavior in children. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v. 26, p. 461–476, 2004.

CLAUDIO, L.; BEARER, C. F.; WALLINGA, D. Assessment of the U.S. Environmental Protection Agency methods for identification of hazards to developing organisms, part I: The reproduction and fertility testing guidelines. **American Journal of Industrial Medicine**, New York, v. 35, p. 543-553, 1999.

CLEWELL, H.; GENTRY, P.; COVINGTON, T.; SARANGAPANI, R.; TEEGUARDEN, J. Evaluation of the Potential Impact of Age- and Gender-Specific Pharmacokinetic Differences on Tissue Dosimetry, **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 79, p. 381-393, 2004.

CONOLLY, R.; LUTZ, W. Nonmonotonic Dose-Response Relationships: Mechanistic Basis, Kinetic Modeling, and Implications for Risk Assessment, **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 77, p. 151-157, 2004.

COSTA, L.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Copenhagen, v. 44, p. 87-110, 2004.

COSTOLI, T., SGOIFO, A., STILLI, D., FLUGGE, G., ADRIANI, W., LAVIOLA, G., FUCHS E., PEDRAZZINI T., MUSSO E., Behavioural, neural and cardiovascular adaptations in mice lacking the NPY Y1 receptor, **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 29, p. 113-123, 2005.

DAM, K.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T.A. Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. **Developmental Brain Research**, Amsterdam, v. 121, p. 179-187, 2000.

DECAPRIO, A. Biomarkers: Coming of age for environmental health and risk assessment. *Environmental Science and Technology*, Washington, 31, 1837-1848, 1997.

DESPRÉS C.; RICHER, F.; ROBERGE, M. C.; LAMOUREX, D.; BEUTER, A. Standardization of quantitative tests for preclinical detection of neuromotor dysfunctions in pediatric neurotoxicology. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 385-395, 2005.

DOURSON, M.; CHARNLEY, G.; SCHEUPLEIN, R.; Differential Sensitivity of Children and Adults to Chemical Toxicity II. Risk and Regulation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 35, p. 448-467, 2002.

FLODSTROM, S.; HEMMING, H.; WARNGARD, L.; AHLBORG, U. Promotion of altered hepatic foci development in rat liver, cytochrome P450 enzyme induction and inhibition of cell-cell communication by DDT and some structurally related organohalogen pesticides. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 11, p. 1413-1417, 1990.

GAYLOR, D.; LUTZ, W.; CONOLLY, R. Statistical Analysis of Nonmonotonic Dose-Response Relationships: Research Design and Analysis of Nasal Cell Proliferation in Rats Exposed to Formaldehyde. **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 77, p. 158-164, 2004.

GENTRY, P.; COVINGTON, T.; CLEWELL III, H. Evaluation of the potential impact of pharmacokinetic differences on tissue dosimetry in offspring during pregnancy and lactation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 38, p. 1-16, 2003.

GOLDEN, N.; RATTNER, B. Ranking terrestrial vertebrate species for utility in biomonitoring and vulnerability to environmental contaminants. **Reviews of Environment Contamination Toxicology**, New York, v. 176, p. 67-136, 2003.

GOODMAN, J. The tradicional toxicologic paradigm is correct: dose influences mechanism, **Environmental Health Perspectives**, Triangle, v. 106, p. 285-288, 1998.

GREENLEE, A.; ELLIS, T.; BERG, R. Low-dose agrochemicals and lawn-care pesticides induce developmental toxicity in murine preimplantation embryos. **Environmental Health Perspectives**, Triangle, v. 112, p. 703-709, 2004.

HEBERT, P.; LUIKER, M. Genetic effects of contaminant exposure – towards na assessment of impacts on animal populations. **The Science of the Total Environment**, v. 191, p. 23 – 58, 1996.

HIRSCH, K.; WEAVER, D.; BLACK, L.; FALCONE, J.; MACLUSKY, N. Inhibition of central nervous system aromatase activity: a mechanism for Fenarimol-induced infertility in the male rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Orlando, v. 91, p. 235 – 245, 1987.

HONDA, S.; HARADA, N.; ITO, S.; TAKAGI, Y.; MAEDA, S. Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 252, p. 445-449, 1998.

HU, M.; CROMBARG, H.; ROBINSON, T.; BECKER, J. Biological basis of sex differences in the propensity to self-administer cocaine. **Neuropsychopharmacology**, London, v.29, p.81-85, 2004.

HUBAL, E.; SHELDON, L.; BURKE, J.; MCCURDY, T.; BERRY, M.; RIGAS, M.; ZARTARIAN, V.; FREEMAN, N. Children's Exposure Assessment: A Review of Factors Influencing Children's Exposure, and the Data Available to Characterize and Assess That Exposure, **Environmental Health Perspective**, Triangle, v. 108, p. 475-486, 2000.

HUGHES, I. Minireview: sex differentiation. **Endocrinology**, Bethesda, v. 142, p.3281-3287, 2001.

JOKSIC, G., VIDA KOVIC, A.; SPASOJEVIC-TISMA, V., Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. **Environmental Research**, San Diego, v. 75, p. 113 – 118, 1997.

KIMMEL, C.; MAKRIS, S. Recent developments in regulatory requirements for developmental toxicology. **Toxicology Letters**, Clare, v. 120, p. 73-82, 2001.

KIMMEL, C. Current approaches to risk assessment for developmental neurotoxicology. In SLIKKER, W.; CHANG, L. **Handbook of Developmental Neurotoxicology**. San Diego: Academic Press. p. 675 – 685, 1998.

KISHI, R., CHEN, B., KATAKURA, Y., IKEDA, T., MIYAKE, H., Effect of prenatal exposure to styrene on the neurobehavioral development, activity, motor coordination, and learning behavior of rats. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v. 17, p. 121 – 130, 1995.

LANDRIGAN, P.; CLAUDIO, L.; MARKOWITZ, S.; BRAKOWITZ, G.; BRENEER, B.; ROMERO, H.; WETMUA, J.; MATTE, T.; GORE, A.; GODBOLD, J.; WOLFF, M. Pesticides and inner-city children: exposures, risk and prevention. **Environmental Health Perspective**, Triangle, v. 107, p. 431-437, 1999.

LESKO, L.; ATKINSON, JÚNIOR., J. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: Criteria, Validation, Strategies. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 41, p. 347-366, 2001.

LEVY, J.; HUSMANN, D. The hormonal control of testicular descent. **Journal of Andrology**, Laurence, v. 16, p. 459–463, 1995.

LIMA, B. **Juvenile animals in safety testing: the european regulatory perspective Reproductive Toxicology**, Oxford, v. 17, p. 476-477, 2003.

LUFT, J.; BODE, G. Integration of safety pharmacology endpoints into toxicology studies, **Fundamental and Clinical Pharmacology**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 91-103, 2002.

MALLING, H., Incorporation of mammalian metabolism into mutagenicity testing **Mutation Research, Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 566, p. 183-189, 2004.

McCARTNEY, M.; SCINTO, P.; WANG, S.; ALTAN, S. Developmental effects of phenytoin may differ depending on sex of offspring, **Neurotoxicology and Teratology**, v. 21, Oxford, p. 119-128, 1999.

MEERTS, I.; LILIENTHAL, H.; HOVING, S.; BERG, J.; WEIJERS, B.; BERGMAN, Å.; KOEMAN, J.; BROUWER, A. Developmental Exposure to 4-hydroxy-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (4-OH-CB107): Long-Term Effects on Brain Development, Behavior, and Brain Stem Auditory Evoked Potentials in Rats **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 82, p. 207-218, 2004.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches, **Toxicology Letters**, Clare, v. 140-141, p. 21-30, 2003.

MOSER, V.; PHILLIPS, P.; LEVINE, A.; McDANIEL, K.; SILLS, R.; JORTNER, B.; BUTT, M. Neurotoxicity Produced by Dibromoacetic Acid in Drinking Water of Rats, **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 79, p. 112-122, 2004.

MOSER, V.; SHAFER, T.; WARD, T.; MEACHAM, C.; HARRIS, M.; CHAPIN, R. Neurotoxicological outcomes of perinatal heptachlor exposure in the rat, **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 60, p. 315-326, 2001.

MUNEOKA, K.; OGAWA, T.; KAMEI, K.; MURAOKA, S.; TOMIYOSHI, R.; MINURA, Y.; KATO, H.; SUZUKI, M.; TAKIGAWA, M. Prenatal nicotine exposure affects the developmental of the central serotonergic system as well as the dopaminergic system in rat offspring: involvement of route of drug administrations. **Developmental Brain Research**, Amsterdam, v. 102, p. 117-126, 1997.

NAVARRETE, M.; CARRERA, P.; MIGUEL, M.; TORRE, C. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 389, p. 271-277, 1997.

NEWLAND, M.; PENNYPACKER, H.; ANGER, W.; MELE, P. Transferring behavioral technology across applications. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v. 25, p. 529-542, 2003.

NGUYEN-BA, G.; VASSEUR, P. Epigenetic events during the process of cell transformation induced by carcinogens. **Oncology Reports**, Athens, v. 6, p. 925-932, 1999.

PALUT, D.; LUDWICK, J.; SZLEZAK-KOPEC, J. The influence of Fenarimol on DNA synthesis and mitotic activity in rat liver. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 12, p. 275 - 279, 1992.

PENNYCOOK, F.; DIAMAND, E.; WATERSON, A., HOWARD, C. V. Modeling the dietary pesticide exposures of young children. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, [San Francisco], v. 10, n. 3, p 304-309, 2004.

PLAPPERT, U.; BARTHEL, E.; RADDATZ, K.; SEIDEL, H. Early effects of benzene exposure in mice: hematological versus genotoxic effects. **Archives of Toxicology**, New York, v. 68, p. 284-290, 1994

POHL, H.; SMITH-SIMON, C.; HICKS, H. Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels: developmental effects. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 28, p. 55-60, 1998.

POLI, P.; MELLO, M.A.; BUSCHINI, A.; CASTRO, V.; RESTIVO, F.; ROSSI, C.; ZUCCHI, T., Evaluation of the genotoxicity induced by the fungicide fenarimol in mammalian and plant cells by use of the single-cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 540, p. 57-66, 2003.

POPESKI, N.; WOODSIDE, B. Central Nitric Oxide Synthase Inhibition Disrupts Maternal Behavior in the Rat. **Behavioral Neuroscience**, Washington, v. 118, p 1305–1316, 2004.

RABELLO-GAY, N.; RODRIGUES, M.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagenese, teratogenese e carcinogenese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991, 246 p.

REUTER, U.; HEINRICH-HIRSCH, B.; HELLWIG, J.; HOLZUM, B.; WELSCH, F. Evaluation of OECD screening tests 421 (reproduction/developmental toxicity screening test) and 422 (combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test), **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 38, p.17–26, 2003.

RIBEIRO, L.; SALVADORI, D.; MARQUES, E. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. 356 p.

RICE, D.; BARONE JÚNIOR., S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives Supplements**, Triangle, v. 108, S3, 2000

SARTER, M., Animal cognition: defining the issues. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 28, p. 645-650, 2004.

SASAKI, Y.; TSUDA, S.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E. Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 388, p. 33–44, 1997.

SCHEUPLEIN, R.; CHARNLEY, G.; DOURSON, M.; Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity I. biological basis. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. San Diego, v. 35, p. 429–447, 2002.

SCHILTER, B.; RENWICK, A.; HUGGETT, A. Limits for pesticide residues in infant foods: a safety based proposal. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 24, p. 126–140, 1996.

SELEVAN, S., KIMMEL, C., MENDOLA, P., Identifying Critical Windows of Exposure for Children's Health, **Environmental Health Perspectives**, Triangle, v.108, Supplement 3, 2000.

SIMPSON, E.; DAVIS, S. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis - some new perspectives. **Endocrinology**, Bethesda, v. 142, p. 4589–4594, 2001.

SÖDERSTEN, P. e ENEROTH, P., Effects of exposure to pups on maternal, behaviour sexual and serum prolactin concentrations in male rats, **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 102, p. 115 - 119, 1984.

STEIMER, T., DRISCOLL, P., Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected Roman High-(RHA) and Low-(RLA) Avoidance rats: neuroendocrine and behavioural aspects, **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 29, p. 99–112, 2005.

TAIOLI, E., BONASSI, S., Methodological issues in pooled analysis of biomarker studies, **Mutation Research, Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v.512, p.85–92, 2002.

TICE, R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.-C.; SASAKI, Y. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, p. 206–221, 2000.

THEIR, R.; BRUNING, T.; ROOS, P.; RIHS, H.; GOLKA, K.; KO, Y.; BOLT, H.; Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of

selected CYP, NAT and GST genes. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, [Jena], v. 206, n. 3, p. 149-171, 2003.

TROPP, J.; MARKUS, E. Sex differences in the dynamics of cue utilization and exploratory behavior. **Behavioral Brain Research**, New York, v. 119, p. 143-154, 2001.

HAAREN, F. van; HEST, A. van; HEINSBROEK, R. P. W. Behavioral differences between male and female rats effects of gonadal hormones on learning and memory. **Neuroscience and Biobehavior Reviews**, Oxford, v. 14, p. 23-33, 1990.

VERMEIRE, T.; STEVENSON, H.; PIETERS, M.; RENNEN, M.; SLOB, W.; HAKKERT, B. Assessment factors for human health risk assessment: a discussion paper. **Critical Reviews in Toxicology**, Flórida, v. 29, p. 439-490, 1999.

VIBERG, H.; FREDRIKSSON, A.; ERIKSSON, P. Investigations of Strain and/or Gender Differences in Developmental Neurotoxic Effects of Polybrominated Diphenyl Ethers in Mice, **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 81, p. 344-353, 2004.

VINGGAARD, A.; HNIDA, C.; BREINHOLT, V.; LARSEN, J. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro, **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 14, p. 227-234, 2000.

VOGEL, G.; HAGLER, M. Effects of neonatally administered inpridole on adult behaviors of rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Oxford, v. 55, p. 155 - 161, 1996.

WALKER, Q.; CABASSA, J.; KAPLAN, K.; LI, S.; HAROON, J.; SPOHR, H.; KUHN, C. Sex Differences in Cocaine-Stimulated Motor Behavior Disparate Effects of Gonadectomy. **Neuropsychopharmacology**, London, v. 25, p. 118-130, 2001.

ZIMMERMANN, A.; STAUFFACHER, M.; LANGHANS, W.; WÜRBEL, H. Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. **Behavior and Brain Research**, New York, v. 121, p. 11-20, 2001.

ZWART, L.; HAENEN, H.; VERSANTVOORT, C.; WOLTERINK, G.; VAN ENGELEN, J.; SIPS, A. Role of biokinetics in risk assessment of drugs and chemicals in children, **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 39, p. 282-309, 2004.