

Daiane Cattani

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E DE
ESTRESSE OXIDATIVO NO MECANISMO DE
NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR HERBICIDA À BASE
DE GLIFOSATO EM CÉLULAS NEURAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Farmácia
Orientador: Prof.^a Dr.^a Ariane
Zamoner Pacheco de Souza

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cattani, Daiane

Envolvimento do Sistema Glutamatérgico e de Estresse Oxidativo no Mecanismo de Neurotoxicidade Induzida por Herbicida à Base de Glifosato em Células Neurais / Daiane Cattani ; orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza, 2017.

219 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Glifosato. 3. Estresse oxidativo. 4. Sistema glutamatérgico. 5. Toxicologia. I. Zamoner Pacheco de Souza, Ariane. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**“Envolvimento do Sistema Glutamatérgico e de Estresse Oxidativo
no Mecanismo de Neurotoxicidade Induzida por Herbicida à Base
de Glifosato em Células Neurais”**

POR

Daiane Cattani

**Tese julgada e aprovada em sua
forma final pela Orientadora e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores
Doutores:**

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Dirleise Colle (UFSC – Membro Titular)

**Profa. Dra. Regina Pessoa Pureur (UFRGS – Membro
Titular)**

**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Membro
Titular)**

**Profa. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza (UFSC –
Orientadora)**

**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 31 de julho de 2017.

Dedico esta tese aos meus queridos pais, Anilso e Diles, e ao meu irmão, Rudi, pela importância que eles tem e sempre terão em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família, pelo amor imensurável que tenho por eles e por tudo que representam em minha vida. Meus amados pais, Anilso Cattani e Diles Cattani, obrigada por todo amor, carinho e apoio incondicionais e por todas as oportunidades a mim proporcionadas. Meu querido irmão, Dr. Rudivan L. Cattani, obrigada por ser meu exemplo e por sempre me apoiar e incentivar em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a execução e conclusão desta tese, e por todo suporte, confiança, aprendizado, atenção e tempo dedicado a mim.

“To my supervisor during my Sandwich PhD period at Uppsala Univeristy, Dr Eva Brittebo, for all your great advises, your support and commitment to our project. To Dr Birger Scholz and Dr Malin Andersson for important contributions to my work. To all my friends and colleagues of Drug Safety and Toxicology’s group at the Department of Pharmaceutical Biosciences: Lena, Raili, Lisa, Emelie, Linnea, Elena and Oskar, thank you for all the fun in the lab and outside work. *Tack så mycket!*”

Aos pesquisadores, Prof. Dr. Rui D. S. Prediger, Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho, Profa. Dra Fátima R. Barreto Silva, Prof. Dr. Guilherme Razzera Maciel e ao Dr. Eduardo Benedetti Parisotto, pela colaboração no desenvolvimento desta tese.

As colegas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular (LaBioSignal), Juliana T. Domingues, Natália F. Napolini, Carla E. H. Rieg, Vitória C. Hayduck, Patrícia A. Cesconetto e Mauren Kruger, pelos momentos de trabalho e descontração e pela amizade.

Aos colegas do laboratório de Hormônios e Transdução de Sinais, principalmente à Renata Gonçalves e Ana Paula Zanatta. Rê e Ana, a amizade e suporte que vocês me deram durante esses quatro anos fizeram toda a diferença durante meu doutorado. Sentirei muita saudades dos nossos almoços no RU e dos cafês diários.

Aos meus amigos Brasileiros em Uppsala, André T. Lobato e Bruna Torres, obrigada por tudo, sem vocês minha experiência na Suécia não teria sido especial como foi.

Aos colegas do laboratório de Neuropsicofarmacologia, Dr. Paulo Alexandre de Oliveira e Me. Sandro Wopereis, pela ajuda nos experimentos comportamentais.

Aos meus queridos amigos, Daiane M. Perondi, Kaethe L. Hesse, Jessica G. Edinger, Náthaly Matté dos Santos e Thiago M. V. Oliveira, que durante esses quatro anos foram fundamentais pelo imenso incentivo e apoio constante e também por estarem sempre presentes nos momentos mais importantes.

À todos os funcionários desta universidade que de uma forma ou outra contribuíram para que esta tese fosse realizada.

À Universidade de Uppsala pelo auxílio financeiro que permitiu a execução dos experimentos durante o período de doutorado sanduíche.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR) por ter oportunizado a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPESC e PPSUS pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todos aqui não mencionados e que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

“Omnia mirari etiam tritissima”

(Carolus Linnaeus)

RESUMO

As formulações à base de glifosato são os herbicidas mais utilizados em todo o mundo. Neste trabalho investigamos os efeitos *in vitro* e *in vivo* da exposição à esse herbicida em hipocampo de ratos imaturos e adultos e em células C17.2. Esta tese foi dividida em 3 partes: Estudos I, II e III. No Estudo I foram avaliadas as diferenças entre o efeito *in vitro* de um herbicida à base de glifosato (HBG), do glifosato puro e de seu principal metabólito o ácido aminometilfosfônico (AMPA) em hipocampo de ratos imaturos (15 dias de idade). Para tanto, fatias hipocámpicas foram expostas a estas substâncias por 30 min e foram investigados diferentes parâmetros bioquímicos envolvendo o sistema glutamatérgico e o estresse oxidativo. Todos os compostos alteraram de maneira diferente os parâmetros avaliados, indicando um potencial neurotóxico dos mesmos. A formulação comercial demonstrou ser mais tóxica que o glifosato e o AMPA na maioria dos parâmetros. No Estudo II foram investigados os efeitos da exposição subcrônica ao HBG na água de beber (1%) desde o período gestacional até os animais completarem 15 e 60 dias de idade. Foram investigados parâmetros comportamentais, neuroquímicos e de estresse oxidativo no hipocampo dos ratos imaturos e adultos. Os resultados demonstraram que a neurotoxicidade induzida por HBG após exposição subcrônica envolveu o sistema glutamatérgico (diminuição da captação de glutamato e interação do glifosato com receptores de NMDA levando ao aumento no influxo de Ca^{2+}) e estresse oxidativo. No estudo comportamental foi verificado um maior tempo de imobilidade no teste do nado forçado sugerindo um comportamento tipo depressivo nos animais. As alterações neuroquímicas observadas desde o período imaturo podem estar de alguma forma, envolvidas no comportamento tipo depressivo observado na idade adulta. No Estudo III foi investigado o efeito do HBG e do glifosato durante a diferenciação neuronal. Células C17.2 induzidas à diferenciação foram expostas à diferentes concentrações de HBG ou de glifosato em períodos de tempo diferente. Ambos os compostos provocaram distúrbios na atividade mitocondrial e na geração de espécies reativas de oxigênio além de induzir a expressão de genes envolvidos com o sistema glutamatérgico e com a diferenciação celular. Os resultados dos diferentes estudos demonstraram o potencial neurotóxico do glifosato.

Palavras-chave: Glifosato 1. Ácido aminometilfosfônico 2. Estresse oxidativo 3. Sistema glutamatérgico 4. Modelagem Molecular 5. Comportamento tipo depressivo 6.

ABSTRACT

Glyphosate-based formulations are the most widely used herbicides worldwide. In this study, we investigated the *in vitro* and *in vivo* effects of the exposure to this herbicide in the hippocampus of immature and adult rats and C17.2 cells. This thesis was divided into 3 parts: Studies I, II and III. The Study I evaluated the differences among the effect of *in vitro* exposure to the commercial formulation GBH (glyphosate-based herbicide), the active principle glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) in hippocampus of immature rats. For this purpose, hippocampal slices were exposed to these substances for 30 min and biochemical parameters involving the glutamatergic system and oxidative stress were investigated. All the compounds were neurotoxic to the hippocampal cells. However, the commercial formulation was more toxic than glyphosate and AMPA in most of the parameters evaluated. The Study II investigated the neurotoxic effects of subchronic exposure to GBH in drinking water (1%) from the gestational period until postnatal day 15 and 60. Behavioral, neurochemical and oxidative stress parameters were investigated in the hippocampus of immature and adult rats. The results demonstrated that subchronic exposure to GBH induced glutamatergic excitotoxicity (decreased glutamate uptake and interaction of glyphosate with NMDA receptors leading to increased Ca^{2+} influx) and oxidative stress. The effects of GBH exposure were associated with oxidative stress and depressive-like behavior in adult offspring, as demonstrated by the prolonged immobility time observed in the forced swimming test. The neurochemical changes observed during the immature period may contribute to the depressive-like behavior observed in adulthood. The Study III investigated the effect of GBH and glyphosate during neuronal differentiation. During differentiation the cells were exposed to different doses of GBH or glyphosate during different time periods. Both compounds provoked disturbances in mitochondrial activity and increased reactive oxygen species besides of inducing the expression of genes involved with the glutamatergic system and cell differentiation. Taken together, our results demonstrated the neurotoxic potential of glyphosate.

Keywords: Glyphosate 1. Aminomethylphosphonic acid 2. Oxidative stress 3. Glutamatergic excitotoxicity 4. Molecular Modeling 5. Depressive-like behavior 6.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos municípios com resultado analítico fora do padrão de potabilidade da água para consumo humano para os parâmetros de agrotóxicos, Brasil, 2013.....	35
Figura 2 - Comercialização de agrotóxicos e afins por área plantada (kg/ha) e incidência de intoxicações por agrotóxicos – Brasil, 2007 a 2013.....	37
Figura 3 - Fórmula estrutural do herbicida glifosato (A) e fórmula estrutural do seu sal de isopropilamina (B).....	38
Figura 4 - Vias de degradação do glifosato.....	40
Figura 5 - Fórmula estrutural do ácido aminometilfosfônico (AMPA).....	41
Figura 6 - Representação esquemática do metabolismo do glutamato.....	50
Figura 7 - Representação esquemática das circunstâncias em que ocorreram as intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola no país no período de 1999 – 2009.....	56
Figura 8 - Desenho experimental do tratamento <i>in vivo</i> com 1% HBG (0,36% glifosato).....	68
Figura 9 - Ratos submetidos ao teste do nado forçado (TNF).....	78
Figura 10 - Desenho experimental da diferenciação neuronal das células C17.2 no período de 9 dias (DIV1 a DIV10) expostas ao HBG ou glifosato P.A. em tempos diferentes.....	82
Figura 11 – Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao glifosato P.A. e ao AMPA sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	88
Figura 12 - Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao glifosato P.A. e ao AMPA sobre a captação específica de ^{14}C -glutamato no hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	89

Figura 13 - Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao glifosato P.A. e ao AMPA sobre a atividade da enzima glutamina sintetase (GS) no hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	89
Figura 14 - Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a atividade da enzima colinesterase em hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	90
Figura 15 - Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a captação de ¹⁴ C-2-Desoxi-D-Glicose no hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	91
Figura 16 – Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com glifosato P.A. (A) e AMPA (B) sobre a atividade das aminotransferases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), no hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	92
Figura 17 – Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com glifosato P.A. e AMPA nos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	93
Figura 18 - Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com HBG, glifosato P.A. e AMPA nos níveis de carbonilação de proteínas no hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	94
Figura 19 – Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com HBG, glifosato P.A. e AMPA na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) no hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	94
Figura 20 - Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a atividade das enzimas, superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (CAT) (B), no hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	95
Figura 21 - Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a atividade das enzimas, glutaciona peroxidase (GPx) (A); glutaciona redutase (GR) (B) e glutaciona S-transferase (GST), no hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	96

Figura 22 - Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com glifosato P.A. e AMPA sobre os níveis de GSH (A) e a atividade das enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) (B) e gama-glutamil transferase (GGT) (C) no hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	97
Figura 23 - Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com HBG na ativação da via p65 NF-kB em hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	98
Figura 24 - Diagrama de Venn representativo dos parâmetros bioquímicos alterados pela exposição ao HBG, ao glifosato P.A. ou ao AMPA.....	111
Figura 25 - Efeito da exposição subcrônica ao HBG no ganho de peso corporal dos filhotes machos (PND1 ao PND60).....	114
Figura 26 - Efeito da exposição subcrônica ao HBG sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (A) e a captação de [^{14}C]-glutamato (B) em hipocampo de ratos PND60.....	115
Figura 27 - Ligação do glifosato ao receptor NMDA (PDB ID: 4NF8) na cavidade de ligação do glutamato (A) e na cavidade de ligação da glicina (B).	116
Figura 28 - Resíduos de ligação ao glifosato no receptor NMDA na cavidade de ligação do glutamato (A) e na cavidade de ligação da glicina (B), mapeados a partir da análise de Ligplot após simulações de dinâmica molecular de 12 ns.....	117
Figura 29 - Análise da energia de ligação do glifosato no receptor NMDA na cavidade de ligação do glutamato (A) e na cavidade de ligação da glicina (B) durante simulações de dinâmica molecular de 12 ns.....	118
Figura 30 - Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao HBG na captação de ^{14}C -2-desoxi-D-glicose no hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	118
Figura 31 - Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao HBG na atividade da enzima colinesterase em soro e hipocampo de ratos PND15 (A) e PND60 (B).	119

Figura 32 - Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao HBG na ativação da via p65 NF- κ B em hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	120
Figura 33 - Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao HBG nos níveis séricos da proteína astrocítica S100B em ratos PND15 (A) e PND60 (B)..	121
Figura 34 - Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao HBG nos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de ratos PND15 (A) e PND60 (B).....	122
Figura 35 - Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao HBG nos níveis de carbonilação de proteínas e na formação de EROs em hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	123
Figura 36 - Efeito da exposição subcrônica ao HBG no sistema enzimático de defesa antioxidante no hipocampo de ratos imaturos, PND15.....	124
Figura 37 - Efeito da exposição subcrônica ao HBG nos sistemas enzimático e não enzimático de defesa antioxidante no hipocampo de ratos adultos, PND60.....	125
Figura 38 - Efeito da exposição subcrônica ao HBG sobre a atividade locomotora (teste do Campo Aberto (A)) e o desempenho motor (teste do Rotarod (B)) de ratos adultos, PND60.....	126
Figura 39 - Efeitos da exposição subcrônica ao HBG no teste do nado forçado em ratos adultos, PND60.....	127
Figura 40 - Efeito da exposição subcrônica ao HBG sobre o consumo de sacarose 0,8% em ratos adultos, PND60.....	128
Figura 41 - Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do HBG sobre células neurais.....	139
Figura 42 - Representação por meio de imagens da coloração fluorescente celular e/ou da imunocitoquímica das células C17.2 indiferenciadas e diferenciadas em neurônios glutamatérgicos.....	142

Figura 43 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. no número de células viáveis durante a diferenciação neuronal das células C17.2 após diferentes tempos de exposição: 24 h (A), 3 dias (B) e 9 dias (C).....	144
Figura 44 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. no número de células viáveis em função do início da exposição durante a diferenciação neuronal das células C17.2.....	145
Figura 45 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. na atividade mitocondrial em função do início da exposição durante a diferenciação neuronal das células C17.2.....	146
Figura 46 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. na formação de EROs em função do início da exposição durante a diferenciação neuronal das células C17.2.....	147
Figura 47 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. na expressão de VGluT-1 em função do início da exposição durante a diferenciação neuronal das células C17.2.....	149
Figura 48 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. na expressão de β -Tubulina III em função do início da exposição durante a diferenciação neuronal das células C17.2.....	150
Figura 49 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. na expressão expressão gênica de VGluT-1 durante a diferenciação neuronal das células C17.2 após diferentes tempos de exposição (3 ou 9 dias).....	151
Figura 50 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. na expressão expressão gênica de NMDAR1 durante a diferenciação neuronal das células C17.2 após diferentes tempos de exposição (3 ou 9 dias).....	152
Figura 51 - Representação esquemática dos 3 estudos desenvolvidos neste trabalho bem como dos principais resultados obtidos.....	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes meios utilizados durante a proliferação e a diferenciação das células C17.2.....	81
Tabela 2 - Desenho experimental (tempo em meio de diferenciação, tempos de exposição e concentrações) utilizado de acordo com a análise realizada.....	83
Tabela 3 - Sequências dos primers utilizados na qPCR.....	86
Tabela 4 - Comparação dos efeitos após tratamento <i>in vitro</i> de fatias hipocâmpais de ratos imaturos com HBG, glifosato P.A. e seu principal metabólito AMPA sobre diversos parâmetros neuroquímicos.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Ácido aminometilfosfônico (metabólito glifosato)
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARG	Arginina
ASP	Aspartato
AST	Aspartato aminotransferase
BHE	Barreira hematoencefálica
CAT	Catalase
CCDV	Canal de cálcio dependente de voltagem
CYS	Cisteína
H ₂ DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DA	Dopamina
DIV	Dias <i>in vitro</i>
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
EFSA	“European Food Safety Authority”
EPA	“Environmental Protection Agency”
EPSPS	Enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERS	Espécie reativa de enxofre
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GCL	Glutamato cisteína ligase
GDH	Glutamato desidrogenase
GGT	Gama-glutamilttransferase
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GLY	Glicina
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
HBG	Herbicida à base de glifosato
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HNO ₂	Ácido nitroso
HOCl	Ácido hipocloroso
IARC	“International Agency for Research on Cancer”

IPA	Isopropilamina
LDH	Lactato desidrogenase
LOEL	Menor nível de dose com observação de efeito
MAPK	Proteína serina-treonina cinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO [•]	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitritos
NO ₃ ⁻	Nitratos (NO ₃ ⁻)
NOAEL	Nível de dose sem observação de efeitos adversos
NOEL	Nível de dose sem observação de efeito
NPT	Número de átomos, pressão e temperatura constantes
NVP	Número de átomos, volume e pressão contantes
N ₂ O ₃	Óxido nitroso
¹ O ₂	Oxigênio singlete
O ₂ ^{-•}	Radical ânion superóxido
•OH	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitritos
P.A.	Para análise
PC	Proteína carbonilada
PDB	“Protein Data Bank”
PHE	Fenilalanina
POEA	Polioxietilenoamina
RMSD	“Root Mean Square Deviation”
RO [•]	Radical alcóxil
ROO [•]	Radical peróxil
SER	Serina
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SPC	“Simple Point Charge”
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TDAH	Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade
TEA	Transtorno do espectro autista
THR	Treonina
TYR	Tirosina
VAL	Valina
VGLUT	Transportador de glutamato vesicular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
1.1	OBJETIVOS.....	31
1.1.1	Objetivo Geral.....	31
1.1.2	Objetivos Específicos.....	31
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	33
2.1	USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL E EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO.....	33
2.2	HERBICIDA GLIFOSATO.....	37
2.2.1	Mecanismo de ação e degradação do glifosato.....	39
2.2.2	Toxicidade do glifosato.....	41
2.2.2.1	Glifosato como neurotóxico.....	44
2.3	NEURODESENVOLVIMENTO E IMPLICAÇÕES DA EXPOSIÇÃO A NEUROTOXICANTES.....	46
2.3.1	Sistema glutamatérgico: noções gerais.....	48
2.3.2	Exposição a neurotóxicos.....	51
2.3.2.1	Exposição a agrotóxicos durante o neurodesenvolvimento....	53
2.3.3	Exposição a agrotóxicos e risco para transtornos psiquiátricos.....	54
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO.....	57
2.4.1	Sistemas de defesa Antioxidantes.....	58
2.4.2	Estresse Oxidativo X Sistema Nervoso Central.....	60
2.4.3	Envolvimento do estresse oxidativo na toxicidade do glifosato e/ou herbicidas à base de glifosato.....	61
2.5	HIPÓTESE E DIVISÃO DO ESTUDO.....	63
3	METODOLOGIA.....	65
3.1	MATERIAIS.....	65
3.1.1	Materiais utilizados nos experimentos com animais.....	65
3.1.2	Materiais utilizados nos experimentos com células.....	65
3.2	MÉTODOS.....	66
3.2.1	Animais.....	66
3.2.1.1	Protocolo experimental do tratamento <i>in vitro</i> das fatias de hipocampo com HBG, Glifosato P.A e AMPA – Estudo I....	67
3.2.1.2	Protocolo experimental do tratamento <i>in vivo</i> com Herbicida à Base de Glifosato (HBG) – Estudo II.....	67
3.2.2	Captação de ¹⁴C-glutamato.....	69
3.2.3	Influxo de ⁴⁵Ca²⁺.....	69
3.2.4	Captação de ¹⁴C-2-desoxi-D-glicose.....	70
3.2.5	Conteúdo de Glutathione reduzida (GSH).....	70
3.2.6	Determinação dos marcadores de danos oxidativos.....	70
3.2.6.1	Lipoperoxidação tecidual – TBARS.....	70
3.2.6.2	Proteína Carbonilada (PC).....	71
3.2.7	Determinação da atividade enzimática.....	72

3.2.7.1	Glutamina sintetase (GS).....	72
3.2.7.2	Gama-Glutamil transferase (GGT).....	72
3.2.7.3	Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD).....	72
3.2.7.4	Alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).....	73
3.2.7.5	Colinesterase.....	73
3.2.8	Deteção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	74
3.2.9	Determinação da atividade das enzimas antioxidantes.....	74
3.2.9.1	Glutathiona redutase (GR).....	74
3.2.9.2	Glutathiona peroxidase (GPx).....	75
3.2.9.3	Glutathiona S-Transferase (GST).....	75
3.2.9.4	Catalase (CAT).....	75
3.2.9.5	Superóxido dismutase (SOD).....	75
3.2.10	Determinação da concentração sérica da proteína S100B.....	76
3.2.11	Medida das concentrações de NF-κB Total e Fosforilado.....	76
3.2.12	Concentração de Proteínas.....	76
3.2.13	Estudos comportamentais.....	77
3.2.13.1	Campo aberto.....	77
3.2.13.2	Rotarod.....	77
3.2.13.3	Teste do Nado Forçado.....	78
3.2.13.4	Consumo de sacarose.....	79
3.2.14	Análise estatística.....	79
3.2.15	Simulações de acoplamento e dinâmica molecular.....	79
3.2.16	Protocolo de tratamento das células C17.2 com HBG ou glifosato P.A. durante período de diferenciação neuronal – Estudo III.....	80
3.2.16.1	Cultura e diferenciação celular.....	81
3.2.16.2	Contagem celular (Hoechst), Avaliação da atividade mitocondrial (MitoTracker® Orange – MTO) e Detecção de espécies reativas (CellROX® Deep Red).....	83
3.2.16.3	Imunocitoquímica.....	84
3.2.16.4	Transcrição Reversa (RT) e Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	85
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
4.1	ESTUDO I: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HBG, DO GLIFOSATO P.A. E DE SEU METABÓLITO AMPA SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM HIPOCAMPO DE RATOS IMATUROS (PND15) APÓS EXPOSIÇÃO <i>IN VITRO</i>.....	87
4.1.1	Envolvimento do cálcio no mecanismo de toxicidade induzido pelo glifosato P.A. e pelo AMPA.....	87

4.1.2	Participação do sistema glutamatérgico na toxicidade ocasionada pelo glifosato P.A. e pelo AMPA sobre células hipocampais.....	88
4.1.3	Estudo da ação do HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a atividade da enzima colinesterase em fatias hipocampais de ratos imaturos, PND15.....	90
4.1.4	Efeito da exposição <i>in vitro</i> de fatias hipocampais de ratos imaturos ao HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a captação de ¹⁴ C-2-desoxiglicose e a atividade das enzimas aminotransferases ALT e AST.....	91
4.1.5	Efeito da exposição <i>in vitro</i> ao HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo.....	93
4.1.6	Avaliação do envolvimento da via NF-κB após exposição <i>in vitro</i> ao HBG em fatias hipocampais de ratos imaturos.....	98
4.1.7	Comparação dos efeitos do HBG, glifosato P.A. e AMPA após exposição <i>in vitro</i> das fatias hipocampais de ratos imaturos.....	98
4.1.8	Discussão.....	101
4.1.9	Conclusões parciais.....	110
4.2	ESTUDO II: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HBG SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, DE ESTRESSE OXIDATIVO E COMPORTAMENTAIS EM HIPOCAMPO DE RATOS IMATUROS (PND15) E ADULTOS (PND60) APÓS EXPOSIÇÃO <i>IN VIVO</i>	113
4.2.1	Efeito da exposição ao HBG no ganho de massa corporal e no bem-estar dos filhotes.....	113
4.2.2	Envolvimento do cálcio e do glutamato no mecanismo de neurotoxicidade induzida pelo HBG em ratos adultos (PND60) após tratamento <i>in vivo</i>	114
4.2.3	Simulações de acoplamento e dinâmica molecular do glifosato no receptor NMDA.....	115
4.2.4	Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao HBG na captação de ¹⁴ C-2-desoxi-D-glicose.....	118
4.2.5	Avaliação dos efeitos da exposição <i>in vivo</i> ao HBG sobre a atividade da colinesterase em soro e hipocampo de ratos PND15 e PND60.....	119
4.2.6	Envolvimento da via NF-κB na neurotoxicidade induzida pelo HBG em hipocampo de ratos PND15 após exposição durante período gestacional e lactacional.....	120

4.2.7	Níveis séricos de S100B: potencial marcador de dano astrocitário em hipocampo de ratos após exposição subcrônica ao HBG.....	120
4.2.8	Efeito da exposição <i>in vivo</i> ao HBG sobre parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo em hipocampo de ratos PND15 e PND60.....	121
4.2.9	Efeito da exposição subcrônica ao HBG sobre o comportamento de ratos PND60.....	125
4.2.10	Discussão.....	129
4.2.11	Conclusões parciais.....	138
4.3	ESTUDO III: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HBG OU AO GLIFOSATO P.A. DURANTE A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS MURINAS, C17.2.....	141
4.3.1	Diferenciação das células C17.2.....	141
4.3.2	Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. no número de células viáveis, na atividade mitocondrial e na geração de EROs durante a diferenciação neuronal.	143
4.3.3	Avaliação da expressão de VGluT1 e β -Tubulina III após exposição ao HBG ou glifosato P.A. durante a diferenciação neuronal.....	148
4.3.4	Avaliação da expressão gênica do transportador vesicular de glutamato (VGluT1) e do receptor glutamatérgico (NMDAR1) após exposição ao HBG ou glifosato P.A. durante a diferenciação neuronal.....	150
4.3.5	Discussão.....	153
4.3.6	Conclusões parciais.....	159
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	161
6	CONCLUSÕES.....	165
7	PERSPECTIVAS.....	167
	REFERÊNCIAS.....	169
	ANEXO I.....	217
	ANEXO II.....	219

1 INTRODUÇÃO

O consumo anual de agrotóxicos no Brasil vem crescendo de forma alarmante nos últimos anos. A justificativa para o uso destas substâncias apoia-se na melhoria da produtividade agrícola, a qual coloca o país como um dos maiores produtores mundiais de alimentos mas também o faz figurar entre os maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (IBAMA, 2014).

Dentre os herbicidas utilizados na agricultura, o glifosato (N-fosfonometil glicina) é a substância ativa mais popular, representando cerca de 60% do mercado mundial de herbicidas não-seletivos e ocupando posição de destaque no “ranking” brasileiro entre os 10 ingredientes ativos mais comercializados (IBAMA, 2014). O glifosato é um herbicida não seletivo com amplo espectro de ação sendo utilizado tanto em atividades agrícolas quanto não-agrícolas (ex. controle de ervas-daninha em cidades, jardins, etc) (MONSANTO, 2015).

A frequente detecção de glifosato em alimentos, solo e rios (CONTARDO-JARA; KLINGELMANN; WIEGAND, 2009, APARICIO et al., 2013, BATTAGLIN et al., 2014), bem como em amostras de urina de pessoas que vivem tanto em áreas agrícolas quanto não-agrícolas (ACQUAVELLA et al., 2004, CONRAD et al., 2017), demonstram o quanto estamos a mercê da exposição diária a este herbicida tanto através da ingestão da água de beber quanto pelo consumo de alimentos contendo resíduos do mesmo. De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2016), a exposição humana aos agrotóxicos representa um problema de saúde pública.

Em 2016, Myers e diversos colaboradores, publicaram uma “declaração de preocupações” quanto ao uso de herbicidas à base de glifosato (HBG) e os riscos associados às exposições. Os autores citaram um número considerável de estudos publicados na última década, tanto epidemiológicos quanto envolvendo testes em animais, demonstrando o potencial tóxico dos HBG. Com base nos dados analisados, os autores concluíram que as exposições humanas ao glifosato estão aumentando e os padrões de segurança atuais tanto quanto ao uso do HBG ou quanto aos limites aceitáveis estão desatualizados e podem falhar em proteger a saúde pública e o meio ambiente.

Sendo assim, estudos envolvendo investigações quanto a toxicidade destas formulações são necessários para ajudar a compreender os mecanismos envolvidos na fisiopatologia das

disfunções celulares provocadas por estes compostos, ampliando assim nosso conhecimento quanto ao potencial tóxico dos mesmos.

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que a exposição materna ao HBG, durante os períodos pré e pós-natal, leva à sobrecarga de cálcio e excitotoxicidade glutamatérgica em hipocampo de ratos imaturos (15 dias de idade). Os mecanismos que medeiam tais efeitos envolvem a ativação das vias de sinalização da CaMKII e ERK, aumento da liberação e diminuição da captação de glutamato na fenda sináptica, aumento no influxo de cálcio com ativação de receptores de glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA) e de canais de cálcio dependentes de voltagem, diminuição do conteúdo de GSH, aumento da lipoperoxidação e acúmulo de aminoácidos neutros, caracterizando excitotoxicidade glutamatérgica e dano oxidativo em hipocampo de ratos imaturos (CATTANI, 2013; CATTANI et al., 2014).

No presente estudo, investigamos se os efeitos da exposição ao HBG durante os períodos pré e pós-natal, observados anteriormente no hipocampo de ratos imaturos (15 dias de idade – PND15) (CATTANI, 2013; CATTANI et al., 2014), persistem até a idade adulta (60 dias de idade – PND60). Também buscamos investigar as diferenças quanto a toxicidade da preparação comercial HBG, do princípio ativo glifosato e de seu principal metabólito AMPA sobre parâmetros bioquímicos em células neurais após tratamento *in vitro*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da exposição *in vivo* ao HBG em hipocampo de ratos imaturos e adultos, bem como os mecanismos de toxicidade induzida pela exposição *in vitro* ao HBG, glifosato puro e seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) em hipocampo de ratos imaturos e em linhagem de células progenitoras neurais murinas C17.2.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito da exposição *in vivo* ao HBG durante períodos pré e pós-natal no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e captação de ^{14}C -glutamato em fatias hipocâmpais de ratos adultos e avaliar as consequências desta exposição prolongada no comportamento dos animais;

- Investigar os efeitos do HBG, glifosato puro (para análise (P.A.) e do AMPA sobre parâmetros de estresse oxidativo (atividade das enzimas antioxidantes; detecção de EROs; carbonilação de proteínas; peroxidação lipídica e concentração de GSH) em hipocampo de ratos imaturos e/ou ratos adultos, tanto após exposição *in vivo* quanto *in vitro*;

- Estudar o efeito da exposição *in vitro* ao glifosato P.A. e ao AMPA sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, captação de ^{14}C -glutamato e atividade das enzimas glutamina sintetase (GS), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e gama-glutamil transferase (GGT) em fatias de hipocampo de ratos imaturos;

- Avaliar as concentrações séricas da proteína S100B após exposição *in vivo* ao HBG em animais imaturos e adultos;

- Investigar os efeitos do HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a atividade da colinesterase em fatias hipocâmpais e/ou soro de ratos imaturos e/ou adultos, tanto após exposição *in vivo* quanto *in vitro*;

- Analisar o efeito da exposição ao HBG na fosforilação da proteína p65 (subunidade da NF- κ B), após exposição *in vitro* e *in vivo* em hipocampo de ratos imaturos;

- Estudar os efeitos tóxicos do glifosato P.A. e do HBG durante a diferenciação neuronal de células C17.2;

- Avaliar a interação do glifosato com o receptor de glutamato NMDA através do uso de docagem molecular do glifosato em locais de ligação da glicina e do glutamato neste receptor.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL E EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO

Em 1964, o Governo Federal aprovou a Lei nº 4.595 com a implantação do Sistema Nacional de Crédito Rural, visando estimular a industrialização dos produtos agropecuários e possibilitar o fortalecimento econômico dos produtores rurais (BRASIL, 1964). Dessa forma, a produtividade agrícola aumentou por meio de pesquisas em sementes, fertilização do solo, mecanização, redução do custo de manejo e aplicação de defensivos agrícolas, os agrotóxicos (OLIVEIRA, 2013).

De acordo com a Lei nº 7.802, de 11/7/89, e o decreto nº 4.074 de 2002 que a regulamenta, os agrotóxicos e afins são definidos como

[...] os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas, e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos [...] (BRASIL, 1989, art. 2º; BRASIL, 2002, art. 1º).

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG, antigo SINDAG), em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior consumidor mundial de agrotóxicos (ANVISA, 2010). Entre 2000 e 2010, o crescimento do mercado nacional de agrotóxicos foi de 190%, superando o mundial de 93%. Entre 2007 e 2013, a quantidade de agrotóxicos comercializados teve um aumento de 90,49% enquanto que a área plantada teve uma ampliação de apenas 19,5%. Em 2014 houve um aumento de 13% das vendas de agrotóxicos, alcançando um faturamento líquido de US\$ 12,2 bilhões (ANVISA, 2010; IBAMA, 2014, BRASIL, 2016).

No Brasil, as maiores concentrações de utilização de agrotóxicos coincidem com as regiões em que predominam o chamado agronegócio (municípios da região Sul, Sudeste e Centro Oeste) e também onde

ocorre com maior intensidade o plantio de monoculturas como a soja, milho e cana (BOMBARDI, 2011).

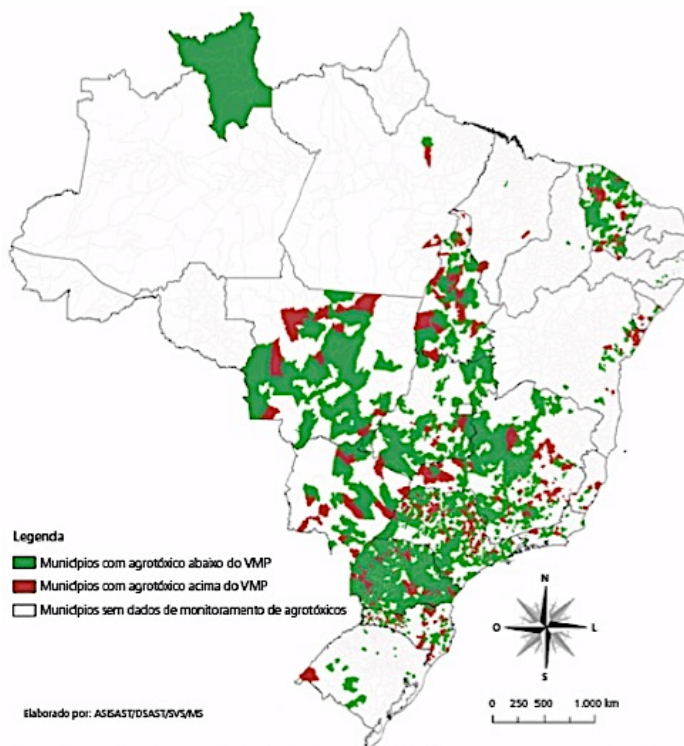
Segundo dados do relatório nacional do programa de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016), os 5 estados que mais comercializaram agrotóxicos em 2013 foram São Paulo, Mato Grosso, Paraná, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Santa Catarina aparece na 11^o posição, tendo comercializado 22.294.630 Kg de agrotóxicos em 2013. Sozinha, a Região Sul representou cerca de 23% do total de agrotóxicos comercializados no país no ano de 2013.

Devido a este uso cada vez mais abusivo e despreparado, é muito provável que uma quantidade significativa destes pesticidas e seus metabólitos, provenientes de atividades industriais, agrícolas e domésticas, atinjam e contaminem águas subterrâneas, lagos e rios, podendo ainda poluir os suprimentos de água potável, peixes e outras fontes muitas vezes vitais para o bem-estar humano (AGRA; SANTOS, 2001; EL-SHENAWY, 2009; SALBEGO et al., 2010; EL-DEMERDASH, 2011).

Segundo o Boletim Epidemiológico quanto ao Monitoramento de Agrotóxicos na Água para Consumo Humano no Brasil no ano de 2013, foi constatado que dos 1.598 municípios monitorados (28,6% do total de municípios Brasileiros) foram identificados 337 (21%) com pelo menos algum resultado analítico acima do valor máximo permitido (VMP) para agrotóxicos na água para consumo humano estabelecido pela Portaria GM/MS nº 2.914/2011 (BRASIL, 2015) (Figura 1).

Vale ressaltar que os valores de referência para quantidade máxima de tipos de agrotóxicos permitidos na água considerada potável vêm aumentando conforme as portarias que regulamentam esses parâmetros são revisadas. Na primeira norma de potabilidade da água no Brasil, a Portaria n. 56/1977, era permitida a presença de apenas 12 tipos de agrotóxicos contra os 27 permitidos na portaria mais recente, GM/MS nº 2.914/2011. Esse aumento nada mais é do que um reflexo da crescente poluição do processo agrícola, o qual utiliza toneladas de agrotóxicos anualmente (ABRASCO, 2015).

Figura 1 - Distribuição dos municípios com resultado analítico fora do padrão de potabilidade da água para consumo humano para os parâmetros de agrotóxicos, Brasil, 2013.



Fonte: Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Sisagua), abril de 2014.³

Legenda: Cor verde representa os municípios com valores de agrotóxicos abaixo dos valores máximos permitidos (VMP); Cor vermelha representa os municípios com valores de agrotóxico acima do VMP; Cor Branca (sem cor) representa os municípios sem dados de monitoramento de agrotóxicos.

FONTE: Boletim Epidemiológico quanto ao Monitoramento de Agrotóxicos na Água para Consumo Humano no Brasil no ano de 2013 (BRASIL, 2015).

Além da contaminação de águas os produtos agroquímicos também podem persistir como resíduos em alimentos tanto de origem animal quanto vegetal. O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Anvisa, no período de 2013 a 2015, relatou que 19,7% das amostras de alimentos de origem vegetal

analisadas apresentaram resultados insatisfatórios quanto ao limite permitido para resíduos de agrotóxicos (ANVISA, 2016).

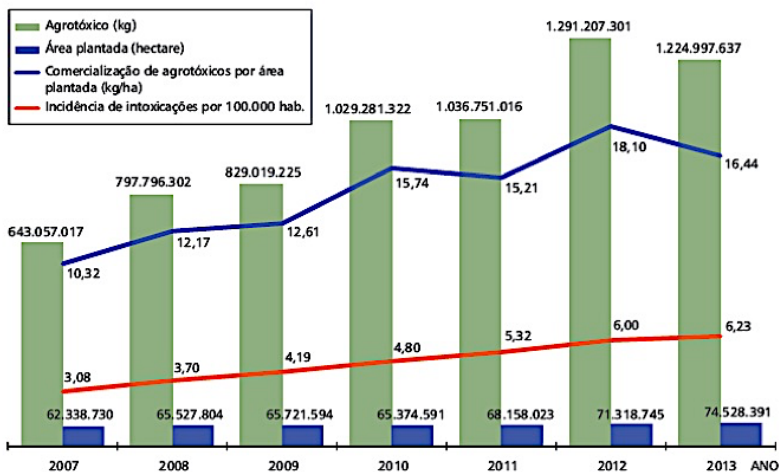
Parte dos agrotóxicos utilizados tem a capacidade de se dispersar no ambiente, e outra parte pode se acumular no organismo humano, inclusive no leite materno. Em um estudo realizado pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), com o objetivo de determinar resíduos de agrotóxicos em leite de mães residentes em Lucas do Rio Verde/MT, foi observado que todas as amostras de leite materno analisadas (n = 62 nutrízes) apresentaram contaminação com pelo menos um tipo de agrotóxico pesquisado (PALMA, 2011). Em outro estudo realizado por Nero e colaboradores (2007) também foi verificado a presença de agrotóxicos, não em leite humano mas em amostras de leite de vaca *in natura* obtidas em 4 estados brasileiros (Botucatu-SP, Londrina-PR, Viçosa-MG e Pelotas-RS). Foram encontrados resíduos de organofosforados e/ou carbamatos em 93,8% das amostras avaliadas. Estes resultados podem ser oriundos da exposição ocupacional, ambiental e alimentar do processo produtivo da agricultura.

De acordo com o relatório nacional do programa de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos (2016), do Ministério da Saúde (Figura 2),

[...] A comercialização de agrotóxicos e afins no País tem aumentando ao longo dos anos, sem aumento proporcional da área plantada. Ao se analisar a série histórica de 2007 a 2013, observa-se que, apesar do quantitativo de agrotóxicos comercializados ter sofrido pequenas oscilações nos anos de 2011 e 2013, a taxa de incidência de intoxicações no País vem apresentando um crescimento gradativo [...] (BRASIL, 2016).

O aumento no uso de agrotóxicos no país, acompanhado pelo aumento no número de casos de intoxicações, faz ressaltar a importância de pesquisas com o objetivo de avaliar a toxicidade destas formulações. Nesse contexto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou em 2015 o início da reavaliação toxicológica de cinco ingredientes ativos de agrotóxicos utilizados no Brasil, dentre eles encontra-se o herbicida glifosato (ANVISA, 2015).

Figura 2 - Comercialização de agrotóxicos e afins por área plantada (kg/ha) e incidência de intoxicações por agrotóxicos no Brasil entre 2007 a 2013.



Fonte: Sinan⁴, IBGE e Agrofit.

⁴A comercialização de agrotóxicos é estimada por meio da contabilização das variáveis cliente, venda direta, indústria e revenda.

Legenda: Barra Verde: agrotóxicos (kg); Barra azul: Área plantada (hectare); Linha azul: Comercialização de agrotóxicos por área plantada (kg/ha); Linha laranja: Incidência de intoxicações por 100.000 hab.

FONTE: Relatório Nacional do Programa de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016).

2.2 HERBICIDA GLIFOSATO

A molécula do glifosato foi primeiramente sintetizada (1950) por Henri Martin da Cilag (pequena companhia farmacêutica Suíça), mas somente foi testada como herbicida em 1970 por John E. Franz da empresa Monsanto Corp. (St. Louis, MO, USA) (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997). Em 1974, o glifosato foi formulado comercialmente em Roundup® pela Monsanto e introduzido na agricultura mundial (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; DUKE; POWLES, 2008; ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014).

O glifosato é amplamente utilizado tanto em áreas agrícolas quanto urbanas em todo o mundo. Este herbicida pertence a classe química dos organofosforados e ao grupo químico das glicinas substituídas, recebendo o nome químico de N-(fosfonometil) glicina (CAS n. 1071-83-6). Apresenta fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (MW =

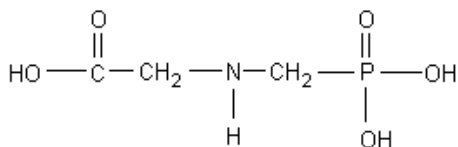
169,1 g/mol) e sua fórmula estrutural é demonstrada na figura 3A (ANDRIGHETTI, 2011; MONSANTO, 2015).

Nas formulações comerciais o glifosato é geralmente formulado como um sal com diferentes cátions (ex. com sódio ou sais de isopropilamina (IPA)), tornando-o mais solúvel em água. Sua fórmula molecular como sal de isopropilamina é $C_6H_{17}N_2O_5P$ (MW = 228.20 g/mol) (CAS n. 38641-94-0) e sua fórmula estrutural pode ser visualizada na figura 3B (CASTRO, 2005; DUKE; POWLES, 2008; MONSANTO, 2015).

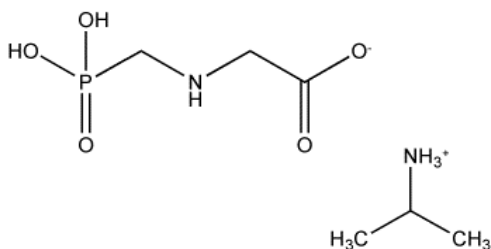
O glifosato é um herbicida pós-emergente, sistêmico, não seletivo, hidrossolúvel e de amplo espectro de ação. É registrado para uso em 26 culturas, como por exemplo café, cana-de-açúcar, arroz, soja, milho, trigo, feijão, fumo, banana, maçã, uva, mamão, pinus e eucalipto (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997; ARAÚJO, 2002; ANVISA, 2017; MONSANTO, 2015).

Figura 3 - Fórmula estrutural do herbicida glifosato (A) e fórmula estrutural do seu sal de isopropilamina (B).

(A)



(B)



FONTE: Monsanto, 2015.

A primeira formulação comercial de glifosato e também uma das mais comercializadas no cenário atual, Roundup® (CAS n. 1071-83-6), é comumente formulada em meio aquoso na concentração de 2,13 M, um agente tensoativo (360 g de ácido/L livre ou 480 g/L de sal IPA) e outras substâncias consideradas inertes, utilizadas para favorecer a

estabilidade e a penetração do ingrediente ativo na célula (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; EL-SHENAWY, 2009; MONSANTO, 2015).

O surfactante predominante utilizado nos produtos Roundup® em todo o mundo é o polioxietilenoamina (POEA). Este agente tensoativo não iônico favorece a penetração do glifosato na cutícula da planta, melhorando assim a sua efetividade. Alguns autores sugerem que os produtos formulados com este surfactante, como o Roundup®, podem ser ainda mais tóxico que o herbicida isolado (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013; SRIBANDITMONGKOL et al., 2012).

O Roundup® é considerado de baixo risco para a saúde humana pois seu mecanismo de ação tem como alvo a inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS) presente apenas em plantas e em alguns microrganismos, não sendo encontrada no reino animal. Além disso, por ser um composto anfótero e apresentar rápida e alta taxa de adsorção a partículas do solo, também foi considerado ambientalmente seguro (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; BENACHOUR et al., 2007; DUKE; POWLES, 2008).

2.2.1 Mecanismo de ação e degradação do glifosato

O modo de ação do glifosato pode ser atribuído a habilidade deste herbicida em inibir a síntese de aminoácidos aromáticos através da inibição competitiva da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS) da via do chiquimato. Esta enzima é responsável pela produção do intermediário corismato, necessário para biossíntese de aminoácidos essenciais como fenilalanina, tirosina e triptofano em plantas (STEINRUCKEN; AMRHEIN, 1980; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; DUKE; POWLES, 2008; ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014).

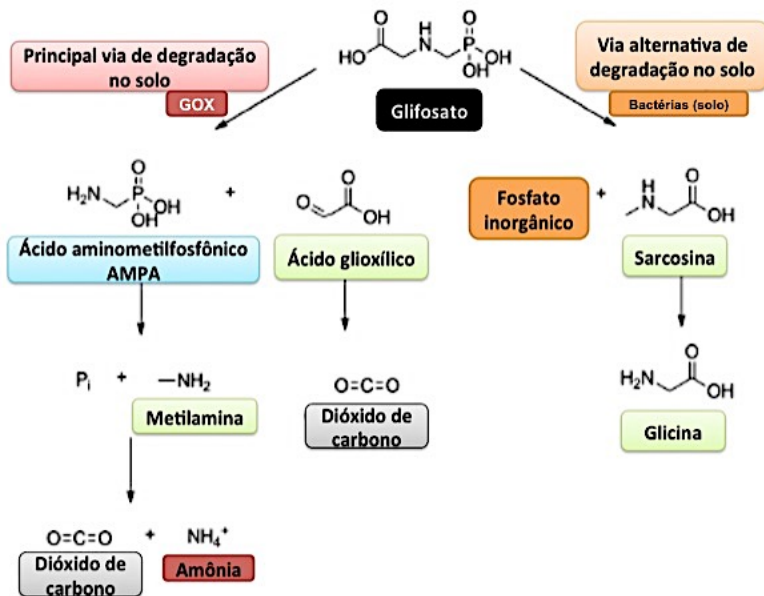
A principal vantagem e desvantagem do glifosato é justamente a sua ação não seletiva e de amplo espectro pois ao mesmo tempo que age em praticamente todos os tipos de ervas daninhas, também acaba prejudicando as plantações. Entretanto, com a introdução das plantas transgênicas em meados dos anos 90, essa desvantagem acabou sendo solucionada (CASIDA; DURKIN, 2017).

As plantas transgênicas tolerantes ao glifosato possuem uma inserção do gene CP4, uma forma mutante da enzima EPSPS proveniente da bactéria *Agrobacterium sp*, no genoma de plantas normais. O glifosato irá se ligar a enzima CP4 EPSPS expressa nas células de plantas transgênicas de uma forma condensada e não na

conformação inibitória como o que ocorre com plantas usuais. Deste modo, plantas transgênicas que expressam a enzima CP4 EPSPS são tolerantes ao glifosato e permitem a síntese de aminoácidos aromáticos mesmo após a aplicação do herbicida (BRAKE; EVERSON, 2004; BØHN et al., 2014).

A principal rota de degradação do glifosato no meio ambiente é efetuada por microrganismos presentes no solo e na água (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000). Existem duas vias principais de degradação do glifosato no solo (Figura 4). A primeira e principal via de degradação resulta da clivagem oxidativa da ligação Carbono-Nitrogênio (C-N), no lado carboxil, catalisada pela glifosato oxidorredutase (GOX), resultando na formação do ácido aminometilfosfônico (AMPA), o principal metabólito do glifosato, e glioxilato. Posteriores degradações destes dois metabólitos irão formar água, dióxido de carbono, amônia e fosfato inorgânico (DICK; QUINN, 1995; TERNAN et al., 1998; APARICIO et al.; 2013).

Figura 4 - Vias de degradação do glifosato.



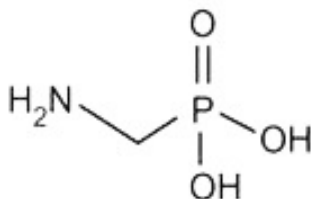
Via principal (catalisada pela enzima glifosato oxidorredutase (GOX)) e via alternativa de degradação do glifosato por bactérias presentes no solo.

FONTE: Adaptado de Annett; Habibi; Hontela, 2014.

A segunda via alternativa de degradação é menos comum e ocorre somente em espécies de bactérias presentes no solo especializadas em metabolizar glifosato em fosfato inorgânico e N-metilglicina (sarcosina) via clivagem direta da ligação Carbono-Fósforo (C-P) pela enzima liase C-P. Posteriormente a sarcosina pode ser degradada à glicina e, então a carbono, que é incorporado em alguns aminoácidos como metionina, serina, histidina, cisteína e nas purinas (DICK; QUINN, 1995; TERNAN et al., 1998).

O principal metabólito do glifosato, o AMPA (ácido aminometilfosfônico, CAS n. 1066-51-9, MW: 111,04 g/mol), apresenta fórmula molecular $\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$. Sua fórmula estrutural pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 - Fórmula estrutural do ácido aminometilfosfônico (AMPA).



FONTE: Annett; Habibi; Hontela, 2014.

A meia-vida do glifosato e seu principal metabólito, AMPA varia entre 0,8–151 e 10-98 dias, respectivamente. Este intervalo relativamente grande quanto ao tempo de meia-vida destes compostos no solo é resultado das diferentes condições ambientais e propriedades de cada solo (BAI; OGBOURNE, 2016).

2.2.2 Toxicidade do glifosato

De acordo com a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos elaborada em 2010 e revisado em 2015 pela Monsanto Brasil, o produto Roundup Original® é classificado como medianamente tóxico (classificação toxicológica III) e como produto perigoso ao meio ambiente (Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental II) (MONSANTO, 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2009), estabelece uma LD_{50} oral do glifosato puro (sólido) em ratos de 4230 mg/kg e o classifica como medianamente tóxico (classe III).

Na última revisão de registro do glifosato feita em 1993 pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, sigla do inglês “The United States Environmental Protection Agency”), os resultados da avaliação toxicológica demonstraram uma toxicidade aguda oral do glifosato em ratos > 4320 mg/kg, bem como NOEL (nível de dose sem observação de efeito) e LOEL (menor nível de dose com observação de efeito) para toxicidade materna em ratos de 1000 mg/kg/dia e 3500 mg/kg/dia, respectivamente, classificando o glifosato como pouco tóxico (Categoria IV) (EPA, 1993).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica tanto o princípio ativo glifosato quanto o seu sal de isopropilamina como pouco tóxico (classe IV). Atualmente está em andamento em nosso país uma reavaliação quanto ao registro do glifosato, determinada pela RDC 10/2008 (ANVISA, 2017).

Apesar da controvérsia quanto aos efeitos tóxicos do glifosato, uma gama cada vez maior de estudos envolvendo exposição deste herbicida em diferentes organismos como: ratos (ADAM et al., 1997; ROMANO et al., 2010; VARAYOUD et al., 2017), camundongos (WALSH et al., 2000; GEORGE et al., 2010); peixes (GLUSCZAK et al., 2006; SAMANTA et al., 2014; DE BRITO RODRIGUES et al., 2016), sapos (HEDBERG; WALLIN, 2010; PAGANELLI et al., 2010) e até mesmo humanos (após exposição aguda, acidental ou em casos de suicídio) (STELLA; RYAN, 2004; AMERIO et al., 2004; MALHOTRA et al., 2010; THAKUR et al., 2014), vem enfatizando o potencial tóxico deste herbicida.

Estudos em peixes demonstraram que o glifosato e/ou herbicidas à base de glifosato foram capazes de promover anormalidades morfológicas e malformações corporais (ROY; CARNEIRO; OCHS, 2016; SULUKAN et al., 2017); estresse oxidativo (SAMANTA et al., 2014); distúrbios metabólicos (SALBEGO et al., 2010); genotoxicidade (GUILHERME et al., 2010); neurotoxicidade (MODESTO; MARTINEZ, 2010); imunotoxicidade (MOUSTAFA et al., 2016); hepatotoxicidade (DOS SANTOS et al., 2017), entre outros.

Em pesquisas quanto à toxicidade em ratos, foram relatados efeitos respiratórios (ADAM et al., 1997), teratogênicos (DALLEGRAVE et al., 2003), no sistema reprodutor de ratos machos (DALLEGRAVE et al., 2007; CLAIR et al., 2012; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013; OWAGBORIAYE et al., 2017; NARDI et al., 2017); toxicidade hepática e renal (MESNAGE et al., 2015b; MESNAGE et al., 2017); neurotoxicidade (ANADON et al., 2009; CATTANI et al., 2014; GALLEGOS et al., 2016); ação como disruptor

endócrino (ROMANO et al., 2010; VARAYOUD et al., 2017; SOUZA et al., 2017).

Em humanos, nos casos de intoxicações agudas acidentais ou em caso de suicídio, os achados clínicos após ingestão de herbicidas à base de glifosato dependem muito das formulações mas incluem toxicidade em múltiplos órgãos, como: nefrotoxicidade (MENKES; TEMPLE; EDWARDS, 1991; WUNNAPUK et al., 2014; SATO et al., 2011), problemas no sistema cardíaco (GRESS et al., 2015), perda de memória (NISHIYORI et al., 2014), complicações neurológicas (MALHOTRA et al., 2010; CHEN et al., 2013), edema pulmonar (STELLA; RYAN, 2004; SRIBANDITMONGKOL et al., 2012; THAKUR et al., 2014). Lesões cutâneas como queimaduras químicas decorrentes do contato acidental com uma formulação à base de glifosato também já foram relatadas (BARBOSA et al., 2001; AMERIO et al., 2004).

O glifosato também é citado como fator de risco para o câncer de Linfoma Não-Hodgkin (ERIKSSON et al., 2008; SCHINASI; LEON, 2014). Em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, sigla do inglês “International Agency for Research on Cancer”) da OMS classificou o glifosato como provável carcinógeno em humanos (grupo 2A), baseando-se em estudos envolvendo tanto o princípio ativo quanto as formulações à base de glifosato.

No entanto, revisões quanto ao potencial carcinogênico do glifosato feitas pela EPA (2016) e pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, do inglês “European Food Safety Authority”) (2015) contrariaram as conclusões da IARC. Segundo a EPA, o glifosato não é susceptível de ser cancerígeno para Humanos em doses relevantes para a avaliação do risco para a saúde humana. Já a EFSA concluiu que é improvável que o glifosato represente um risco cancerígeno para os humanos, mas observa que tirou suas conclusões tendo como base apenas estudos envolvendo o glifosato, não incluindo estudos com as formulações comerciais à base deste herbicida (IARC 2015; EFSA 2015; EPA 2016).

Nesse contexto, cabe ressaltar que diferenças importantes na toxicidade das preparações comerciais em relação ao glifosato de grau analítico vem sendo descritas e atribuídas a um possível sinergismo entre os componentes das formulações comerciais. Dentre estes componentes destaca-se o surfactante POEA, comumente utilizado para facilitar a penetração do glifosato na superfície da planta (CONTARDO; KLINGELMANN; WIEGAND, 2009; ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014; KWIATKOWSKA; HURAS; BUKOWSKA, 2014; WEBSTER; SANTOS, 2015).

Em 2013, os pesquisadores Mesnage, Bernay e Séralini, ao estudarem o potencial tóxico do glifosato P.A. e de 9 formulações à base de glifosato em três tipos de linhagens celulares humanas (hepáticas HepG2, embrionárias HEK293 e placentárias JEG3), comprovaram que todas as formulações comerciais foram mais tóxicas que o glifosato sozinho. Esses resultados desafiam a relevância dos valores aceitáveis de ingestão diárias do glifosato já que estudos utilizados como parâmetros para o cálculo destas quantidades são realizados apenas com o glifosato de grau analítico. De acordo com Mesnage e colaboradores (2014), exposições crônicas com agrotóxicos não refletem as exposições ambientais se apenas o ingrediente ativo for testado.

Em 2009*, a EPA publicou um “Plano de Trabalho Final do Glifosato” referente a reavaliação do registro deste herbicida. Neste plano, a agência exigiu dados adicionais quanto aos efeitos do glifosato nos parâmetros neurológicos e imunes, pois os mesmos foram tidos como limitados para serem utilizados na revisão (EPA, 2009).

2.2.2.1 Glifosato como neurotóxico

Relatos quanto ao desenvolvimento de síndrome parkinsoniana após exposição a herbicidas à base de glifosato (BARBOSA et al., 2001), bem como desenvolvimento de encefalopatia como consequência da exposição aguda ao mesmo (MALHOTRA et al. 2010), chamam atenção quanto ao potencial neurotóxico do glifosato.

Hernández-Plata e colaboradores (2015) estudaram os efeitos do glifosato no sistema nervoso de ratos Sprague-Dawley machos após tratamento por 2 semanas com seis injeções intraperitoneais de 50, 100 ou 150 mg de glifosato/Kg (2 injeções/semana). Os resultados demonstraram que a exposição repetida ao glifosato resultou em hipoatividade locomotora acompanhada de diminuição da ligação específica aos receptores D1 de dopamina (DA) no núcleo accumbens e também que a exposição aguda ao glifosato apresentou efeitos evidentes de diminuição nos níveis de DA estriatal. Outro estudo demonstrou que a exposição materna (gravidez e lactação) ao HBG em ratos foi capaz de afetar o sistema nervoso central da prole provavelmente devido a alterações provocadas nos mecanismos ou sistemas neurotransmissores

* Decisão final quanto a reavaliação de risco para saúde humana está para ser publicada até o final do ano de 2017.

que regulam a atividade locomotora e a ansiedade (GALLEGOS et al., 2016).

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que alguns dos mecanismos envolvidos na neurotoxicidade induzida por Roundup® em hipocampus de ratos imaturos, após exposição *in vitro* e *in vivo* (exposição materna), envolvem: a ativação das vias de sinalização da CaMKII e ERK, aumento da liberação de glutamato na fenda sináptica e diminuição da captação deste aminoácido, aumento no influxo de cálcio, diminuição do conteúdo de glutathione reduzida (GSH), aumento da lipoperoxidação e acúmulo de aminoácidos neutros. Esses efeitos caracterizam excitotoxicidade glutamatérgica e dano oxidativo em hipocampo de ratos imaturos (CATTANI et al., 2014).

Paganelli e colaboradores (2010) demonstraram que o tratamento de embriões de sapos sul africanos, *Xenopus laevis* (modelo para estudos embriológicos em vertebrados), com uma diluição (1/5000) de uma formulação comercial do glifosato foram suficientes para induzir malformações embrionárias, como alterações marcantes no desenvolvimento da crista neural e cefálica. Neste mesmo contexto, Roy, Carneiro e Ochs (2016), estudaram os efeitos iniciais da exposição ao glifosato e ao HBG em cérebros de peixe-zebra (modelo utilizado em estudos toxicológicos e de desenvolvimento). Resultados revelaram anormalidades morfológicas no cérebro em desenvolvimento bem como uma diminuição nos genes expressados em diferentes regiões do cérebro. Em outro estudo, envolvendo esse mesmo modelo com peixe-zebra, os autores relataram um desenvolvimento neuronal prejudicado causado pela exposição ao glifosato durante o período de desenvolvimento embrionário desses peixes. A exposição levou a uma inibição da atividade da enzima anidrase carbônica com produção de espécies reativas de oxigênio especialmente em regiões branquiais, o que desencadeou apoptose e acabou resultando em severos tipos de malformações (SULUKAN et al., 2017).

Os efeitos do glifosato sobre o neurodesenvolvimento em embriões de vertebrados juntamente aos achados clínicos e neurocomportamentais em proles de ratos nascidos de ratas expostas ao glifosato geram uma preocupação crescente quanto ao uso extensivo deste agrotóxico e suas consequências na saúde humana. De fato, defeitos neurais e malformações craniofaciais em humanos em regiões onde há um extensivo uso de herbicidas à base de glifosato já foram relatados (CARRASCO, 2012).

2.3 NEURODESENVOLVIMENTO E IMPLICAÇÕES DA EXPOSIÇÃO A NEUROTOXICANTES

O típico desenvolvimento do sistema nervoso é uma consequência global de interações entre genética, epigenética e fatores ambientais (ex. estímulos externos, maternos, nutricionais e fatores médicos) (ALBERTS et al., 2010; DUBOIS et al., 2014). Começa durante a fase gestacional (primeiro mês em humanos e 9,5^o dia em ratos) continuando até a adolescência. Os processos que constituem a base do desenvolvimento do sistema nervoso - proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, apoptose e mielinização - ocorrem de maneira sequencial coordenada e dependem da região, tipo de célula e sinais neurotróficos (MOSER et al., 2013). Alterações nestes processos podem resultar em anormalidades congênitas graves no sistema nervoso dos seres humanos (RICE; BARONE, 2000).

Durante o desenvolvimento animal, o embrião irá se dividir e diferenciar para gerar todas as células e tecidos do organismo maduro. As divisões iniciais do embrião irão gerar a blástula, a qual passará pelo processo de gastrulação dando origem as três camadas germinais primárias do embrião em desenvolvimento (endoderma, mesoderma e ectoderma). O sistema nervoso irá se desenvolver a partir da camada ectodérmica (RICE; BARONE, 2000; DE VELLIS; CARPENTER, 2006).

O mesoderma irá se condensar e formar a notocorda, a qual irá induzir o ectoderma a formar a placa neural. Uma vez formada, a placa neural é induzida a se diferenciar em tubo neural, o qual dará origem ao sistema nervoso (DE VELLIS; CARPENTER, 2006). Esse primeiro estágio do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), quando as células precursoras do cérebro e da medula espinal começam a se desenvolver, é chamado de neurulação (MOSER et al., 2013).

A formação do tubo neural é completada aproximadamente no 10^o – 11^o dia de gestação em ratos e no 26^o a 28^o dias de gestação em humanos. Interrupções no fechamento do tubo neural podem resultar em severas anormalidades no cérebro e na medula espinal (RODIER, 1995; RICE; BARONE, 2000; BONDY; CAMPBELL, 2005; DUBOIS et al., 2014). Após este desenvolvimento embrionário inicial, com a proliferação de precursores neuronais e gliais, o processo do neurodesenvolvimento continua com posterior proliferação e migração celular, seguida por diferenciação (expressão de fenótipo), sinaptogênese (formação de conexões sinápticas funcionais), apoptose,

gliogênese e mielinização (MOSER et al., 2013; RICE; BARONE, 2000).

Aceleração substancial da síntese de RNA, DNA e proteínas, bem como migração neuronal, crescimento das células gliais e mielinização dos axônios continuam ocorrendo no período pós natal, tanto em ratos quanto em humanos. Esse período de rápido crescimento cerebral, também conhecido como “surto do crescimento cerebral” que engloba tanto as fases pré e pós-natal é conhecido por ser vulnerável a insultos promovidos por agentes neurotóxicos (RODIER, 1995; RICE; BARONE, 2000; WINNEKE, 2011).

A maturação do cérebro humano é um processo prolongado e todas estas etapas mencionadas anteriormente tem de ocorrer dentro de um prazo rigidamente controlado e na sequência correta. Se algum destes passos for interrompido ou inibido, as possibilidades de reparação tardias são escassas e as consequências podem ser permanentes (GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2006; BJÖRLING-POULSEN; ANDERSEN; GRANDJEAN, 2008).

No geral, exposições a neurotóxicos no início da gestação promovem impactos quanto ao desenvolvimento de grandes regiões cerebrais podendo levar à ocorrência de anormalidades anatômicas graves. Por outro lado, as exposições tardias alteram características bioquímicas, morfológicas ou funcionais do sistema neural, podendo levar a déficits comportamentais (BONDY; CAMPBELL, 2005; MOSER et al., 2013). Diversos estudos vem demonstrando que a exposição pré e pós-natal a diferentes tipos de agrotóxicos pode estar associada ao desenvolvimento de efeitos neurológicos e neuropsiquiátricos (BALDI et al., 2003; LONDON et al., 2012; FREIRE; KOIFMAN, 2013; ZAGANAS et al., 2013; BALTAZAR et al., 2014).

A formação hipocampal é um dos sistemas neuronais mais estudados no cérebro e alterações nesta região vêm sendo associadas a um número cada vez maior de doenças que acometem o sistema nervoso central como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia do lobo temporal, amnésia, esquizofrenia e transtornos depressivos e de ansiedade (AMARAL; WITTER, 1989; KIM; FANSELOW, 1992; BIRD; BURGESS, 2008; SMALL et al., 2011).

O hipocampo desenvolve-se rapidamente durante o período tardio da vida fetal e início da vida neonatal em roedores e em seres humanos. A região hipocampal está localizada na porção medial do lobo temporal e é uma das estruturas que compõem o sistema límbico. Aproximadamente 80 a 90% das sinapses do hipocampo são

glutamatérgicas (DANBOLT, 2001; LOZOFF; GEORGIEFF, 2006; BRADY et al., 2012).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, os neurônios geralmente expressam e liberam transmissores antes mesmo que seus axônios estabeleçam contatos com suas células alvo. Há evidências crescentes de que os neurotransmissores no sistema nervoso imaturo podem atuar como fatores tróficos que influenciam diferentes eventos do desenvolvimento, como proliferação e diferenciação celular (RUEDIGER, BOLZ, 2007). Assim, qualquer toxicante que possa interferir com a neurotransmissão durante o desenvolvimento pode causar defeitos permanentes no SNC (GIORDANO; COSTA, 2012)

O aminoácido excitatório glutamato além de ser o principal neurotransmissor excitatório no SNC maduro também desempenha um importante papel durante o neurodesenvolvimento, principalmente por facilitar a entrada de Ca^{2+} . O receptor de glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA), é essencial para a diferenciação neuronal e o estabelecimento ou eliminação de sinapses no cérebro em desenvolvimento (HACK; BALÁZS, 1994; YANO; TOKUMITSU; SODERLING, 1998; KOMURO; RAKIC, 1993; MATUS, 2000). Acredita-se que o cérebro imaturo seja mais sensível a alterações na função do receptor NMDA do que o cérebro adulto (FOX et al., 2012).

2.3.1 Sistema glutamatérgico: noções gerais

O L-glutamato, um aminoácido não-essencial, é o principal neurotransmissor excitatório no SNC em cérebro de mamíferos, excitando praticamente todos os neurônios. Aproximadamente 80-90% das sinapses são glutamatérgicas e até 90% dos neurônios do cérebro usam o glutamato como neurotransmissor (GASIC; HOLLMANN, 1992; DANBOLT, 2001; SANACORA et al., 2008; BRADY et al., 2012). A ampla distribuição desse neurotransmissor excitatório no SNC faz com que o mesmo participe de diversas reações no cérebro, atuando como o principal mediador de informações sensoriais, coordenação motora, emoções e cognição, incluindo a formação e recuperação da memória (BRADY et al., 2012).

Os efeitos do glutamato são mediados por diferentes subtipos de receptores, chamados de receptores de aminoácidos excitatórios (EAARs), os quais são divididos em dois principais subtipos, os ionotrópicos (ligados diretamente a canais iônicos, ex. N-metil-d-Aspartato (NMDA) e os metabotrópicos (acoplados à proteína G) (DANBOLT, 2001; MOSER et al., 2013).

A maior parte do glutamato existente no cérebro é sintetizado a partir da glicose plasmática, a qual é degradada na via glicolítica em duas moléculas de piruvato. Esse processo ocorre no citosol tanto de astrócitos quanto de neurônios. A oxidação do piruvato nos astrócitos e neurônios a acetilcoenzima A (Acetil-CoA) via complexo piruvato desidrogenase levará a formação de citrato no ciclo de Krebs. O piruvato também pode ser convertido a oxaloacetato nos astrócitos pela ação da enzima piruvato carboxilase (PC) (EID et al., 2013) (Figura 6).

O intermediário do ciclo de Krebs, α -cetoglutarato, dará origem ao glutamato por transaminação via aspartato aminotransferase (AST) ou por outras transaminases (por exemplo, alanina aminotransferase - ALT) ou, pela reação catalisada pela glutamato desidrogenase (GDH) (McKENNA et al., 2016; HERTZ; ROTHMAN, 2017).

O glutamato liberado a partir de terminais pré-sinápticos nas fendas sinápticas é transportado para os astrócitos via transportadores de glutamato, onde irá reagir com a amônia para formar glutamina. Esta reação é mediada pela atividade da glutamina sintetase, uma enzima citosólica dependente de ATP que é expressa por astrócitos e oligodendrócitos mas não por neurônios (McKENNA, 2007; GLIDDON et al., 2009; ALBRECHT et al., 2011).

O astrócito em seguida exporta a glutamina para o fluido extracelular por meio dos transportadores de aminoácidos neutros dependentes de Na^+ (Sistema A, ASC e N), de onde esta é captada pelos neurônios via sistema A e N e convertida em glutamato pela ação da enzima glutaminase (GLIDDON et al., 2009; FERNANDES et al., 2010; JIANG; YAN; WENG, 2012; ALBRECHT et al., 2011). O tráfego do glutamato e glutamina entre neurônios e astrócitos é chamado de ciclo glutamato-glutamina (Figura 6) (LEHMANN; BETTE; ENGELE, 2009; KOGA et al., 2011).

No neurônio, o glutamato será transportado e acumulado dentro de vesículas sinápticas. Este transporte é mediado por proteínas especializadas presentes nas membranas dessas vesículas, os transportadores de glutamato vesicular (VGLUTs) (YUDKOFF et al., 2005; COULTER; EID, 2012).

A concentração de glutamato dentro das vesículas sinápticas é estimada em torno de 60-250 mmol/L, enquanto que sua concentração no citosol é de apenas alguns mmol/L. Durante a neurotransmissão, a concentração de glutamato na fenda sináptica aumenta drasticamente. E, para um controle da ação excitatória mediada por esse neurotransmissor faz-se necessário que ocorra uma remoção eficaz do mesmo da fenda

sináptica (HASSEL; DINGLEDINE, 2012; DANBOLT; FURNESS; ZHOU, 2016).

Figura 6 - Representação esquemática do metabolismo do glutamato.

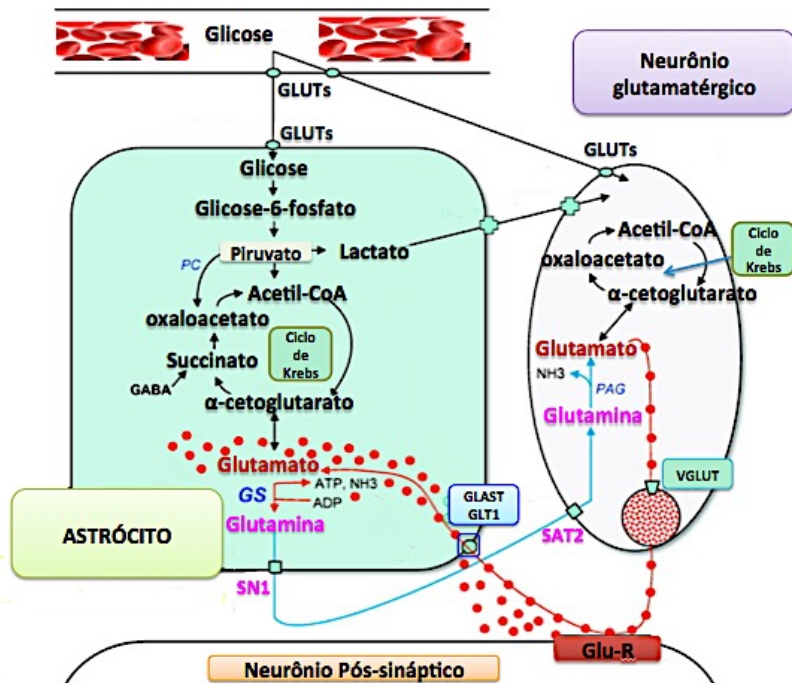


Diagrama simplificado do metabolismo do glutamato no cérebro. Abreviações: GLUTs, transportadores de glicose; PAG, Glutaminase ativada por fosfato; PC, piruvato carboxilase; SAT2, sistema A de transporte de aminoácidos neutros; SN1, sistema N de transporte de aminoácidos neutros; VGLUT, transportador vesicular de glutamato; GS, glutamina sintetase. GLAST (EAAT1)/GLT-1 (EAAT2), transportadores de aminoácidos excitatório dependentes de sódio. FONTE: Adaptado de Eid et al., 2013.

A presença de transportadores de glutamato de alta afinidade GLAST e GLT1 (também chamados de EAAT1 e EAAT2, respectivamente) em astrócitos que envolvem as sinapses facilitam a rápida remoção do glutamato da fenda sináptica (DANBOLT, 2001; McKENNA, 2007). A falha destes transportadores em remover esse excesso de glutamato do espaço extracelular pode resultar em danos

excitotóxicos no neurônio, podendo levar à morte neuronal (TZINGOUNIS; WADICHE, 2007; SANACORA et al., 2008).

A excitotoxicidade neuronal geralmente se refere à lesão e à morte de neurônios decorrentes da exposição prolongada ao glutamato com consequente aumento no influxo de íons nos neurônios pós-sinápticos (DONG; WANG; QIN, 2009). Aumentos nas concentrações de glutamato na fenda sináptica promovem uma superativação de seus receptores, NMDA e AMPA, levando à perda do potencial de membrana o qual resultará em um excessivo influxo de Ca^{2+} intracelular (NEDERGAARD; TAKANO; HANSEN, 2002).

Apesar de possuir grande importância para função neuronal, como na formação da plasticidade sináptica, uma sobrecarga de Ca^{2+} é particularmente neurotóxica pois pode levar à ativação de enzimas que degradam proteínas, membranas e ácidos nucleicos (WEBER, 2012).

Alterações nos níveis de Ca^{2+} citosólico levam à ativação de calpains, endonucleases e fosfolipase A2, as quais têm sido implicadas na morte neuronal por necrose. Altas concentrações deste íon também interferem com a função mitocondrial, provocando um aumento na geração de EROs (BOELSTERLI, 2009; DONG; WANG; QIN, 2009).

Aumentos exacerbados nos níveis intracelulares de cálcio e excitotoxicidade glutamatérgica são fenômenos muitas vezes associados à indução de estresse oxidativo e comumente correlacionados com condições divergentes tais como hipóxia, epilepsia, doenças neurodegenerativas e psiquiátricas (MOSER et al., 2013).

2.3.2 Exposição a neurotóxicos

O desenvolvimento do sistema nervoso desde a concepção até a idade adulta é extremamente complexo. Se algumas das etapas do neurodesenvolvimento forem perturbadas, os efeitos provavelmente serão duradouros e possivelmente permanentes, podendo se manifestar como déficits subclínicos em habilidades mentais ou distúrbios comportamentais mais severos (JULVEZ; GRANDJEAN, 2009; GIORDANO; COSTA, 2012; PARIKSHAK; GANDAL; GESCHWIND, 2015).

A vulnerabilidade do SNC em desenvolvimento a agentes nocivos em comparação com o adulto é relacionada à presença de diferenças fisiológicas e cinéticas incluindo a lenta formação da barreira hematoencefálica (BHE) bem como a falta de enzimas metabólicas essenciais para proteger o cérebro e eliminar esses agentes neurotóxicos (COSTA et al., 2008; MOSER et al., 2013). O desenvolvimento da BHE

é um processo gradual que começa no útero e se completa em torno do 6º mês pós-natal em humanos (GIORDANO; COSTA, 2012). Além disso, a placenta não é capaz de bloquear a passagem de muitos neurotóxicos da circulação materna à fetal (ex. álcool). Exposições no período pós-natal também podem ocorrer pelo aleitamento materno (ADINOLFI, 1985; GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2006; GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2014).

Estudos experimentais e epidemiológicos sugerem que uma série de distúrbios neurológicos decorrentes de perturbações ocorridas durante o neurodesenvolvimento são, pelo menos em parte, atribuídas a exposições a agentes neurotóxicos durante os períodos fetal e infantil (GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2006; MOSER et al., 2013; TRAN; MIYAKE, 2017).

Manifestações decorrentes de perturbações no desenvolvimento do sistema neurológico, como transtorno do espectro autista (TEA), transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH), dislexia e outras deficiências cognitivas, afetam milhares de crianças no mundo todo (BANERJEE; MIDDLETON; FARAONE, 2007; LANDRIGAN, 2010; GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2014; MODGIL et al., 2014).

Exposições a neurotóxicos durante o desenvolvimento também causa danos silenciosos e seus efeitos deletérios podem se tornar clinicamente evidentes apenas após alguns meses ou até mesmo vários anos após a exposição. Com isso, exposições pré e pós-natal a fatores ambientais também são correlacionadas com o aparecimento de doenças neurodegenerativas na vida adulta (FRANCO et al., 2010; GIORDANO; COSTA, 2012; CHIN-CHAN; NAVARRO-YEPES; QUINTANILLA-VEGA, 2015; ANTONELLI et al., 2017).

Esse período silencioso pode ser explicado pela “hipótese Barker” ou “base fetal das doenças adultas (FeBAD)” de que as doenças que afetam adultos podem ter uma origem fetal, ou seja, essas doenças são consequências de condições adversas do feto durante a gestação (BARKER; OSMOND, 1986; GODFREY; BARKER, 2001).

Um número crescente de tóxicos ambientais são implicados como causadores de distúrbios no desenvolvimento neurológico. Alguns dos produtos químicos identificados como neurotóxicos do desenvolvimento humano incluem: chumbo (HU et al., 2006); metilmercúrio (GRANDJEAN et al., 1997; DEBES et al., 2006); bifenilos policlorados (PCB) (TILSON, 1998); etanol (JONES; SMITH, 1975) e agrotóxicos organofosforados.

2.3.2.1 Exposição a agrotóxicos durante o neurodesenvolvimento

Os agrotóxicos são um dos principais poluentes ou toxinas aos quais os organismos vivos estão expostos atualmente. Exposições a pesticidas, como os organofosforados, resultam em perda neuronal, comprometimento cognitivo e disfunção motora. Essas alterações no comportamento neurológico podem estar associadas a doenças neurodegenerativas (ROHLMAN; ANGER; LEIN, 2011; MODGIL et al., 2014; SÁNCHEZ-SANTED; COLOMINA; HERRERO-HERNÁNDEZ, 2016).

Após analisar diversos estudos envolvendo exposição a organofosforados, Muñoz-Quezada e colaboradores (2013), concluíram que os mesmos forneceram evidências de que a exposição a estes agrotóxicos durante o neurodesenvolvimento é um fator de risco, principalmente quando as exposições ocorreram durante período pré-natal.

Shelton et al. (2014) avaliaram se a proximidade residencial a áreas agrícolas na Califórnia (EUA) durante a gravidez está associada a transtorno do espectro autista (TEA) ou atraso no desenvolvimento (AD) em um estudo de caso-controle com base populacional denominado como Riscos de Autismo Infantil devido à Genética e ao Meio Ambiente (CHARGE). Proximidade residencial das grávidas as áreas agrícolas com aplicação de agrotóxicos organofosforados, organoclorados, piretróides e carbamatos foram avaliadas. A proximidade aos organofosforados em algum ponto durante a gestação foi associada a um risco aumentado de 60% para TEA, sendo maior para exposições no terceiro trimestre gestacional. Os filhos de mães que residiam perto de aplicações de inseticidas piretróides logo antes da concepção ou durante o terceiro trimestre apresentaram maior risco para TEA e AD. O risco de AD foi aumentado nas aplicações próximas aos carbamatos, mas nenhum período vulnerável específico foi identificado. Os autores concluíram que o estudo fortaleceu as evidências que ligam os distúrbios do desenvolvimento neurológico com exposição a pesticidas durante a gestação, particularmente aos organofosforados, e forneceu novos resultados de associações entre TEA e AD a piretróides e carbamatos, respectivamente.

Em outro estudo, Hicks e colaboradores (2017) avaliaram a taxa de diagnósticos de TEA/AD em áreas onde se emprega aplicações aéreas anuais de pesticidas piretróides para combater encefalite transmitida por mosquito. O estudo identificou uma taxa maior no diagnóstico de TEA/AD na área com aplicação de pesticidas aéreos.

Thiruchelvam e colegas (2002) relataram que exposições ao herbicida Paraquat e ao fungicida Maneb durante períodos críticos do desenvolvimento resultaram em lesões permanentes e progressivas do sistema dopaminérgico nigroestriatal, sugerindo que exposição a esses neurotóxicos durante período de desenvolvimento pode estar envolvida na indução de distúrbios neurodegenerativos e/ou alterando o processo normal de envelhecimento.

Os estudos que relatam uma ligação entre exposição a pesticidas durante períodos críticos do desenvolvimento do SNC e distúrbios neurológicos demonstram claramente o potencial neurotóxico desses compostos químicos.

2.3.3 Exposição a agrotóxicos e risco para transtornos psiquiátricos

A exposição crônica a agrotóxicos também tem sido associada a alterações psiquiátricas, incluindo transtornos afetivos como depressão, ansiedade e comportamento agressivo. Além disso, diversos estudos relatam que agricultores expostos a agrotóxicos têm taxas de suicídio mais elevadas do que outros grupos ocupacionais e alguns sugerem que isso pode ser parcialmente explicado pelos efeitos neurotóxicos desses agrotóxicos (SALVI et al., 2003; FRANCO et al., 2010; WESSELING et al., 2010; PARRÓN et al., 2011; FREIRE; KOIFMAN, 2013).

Faria e colaboradores (1999; 2014) demonstraram evidências da associação entre intoxicações por pesticidas e transtornos mentais em áreas agrícolas do Brasil. Em 1999, eles avaliaram através de um estudo transversal as associações entre as características do trabalho rural e a ocorrência de transtornos psiquiátricos menores (TPM, ex: ansiedade) em 1282 trabalhadores agrícolas de 446 fazendas. TPM foi encontrado em 37,5% dos trabalhadores agrícolas, sendo que o risco foi maior em fazendas com uma extensão de terra de 26 a 50 hectares, e menor, onde havia um maior nível de tecnologia do trabalho e escolaridade. A prevalência de TPM foi maior entre os produtores de feijão e menor entre os produtores de maçã. Os autores afirmam que apesar de ser impossível definir a direção da ligação causal, a intoxicação por pesticidas esta fortemente associada aos TPM (FARIA et al., 1999).

Já em 2014, Faria, Fassa e Meucci investigaram a associação entre a exposição de pesticidas e taxas de suicídio. Foram examinadas as taxas de suicídio por um período de tempo de 15 anos (1996-2010), seguido de um estudo ecológico utilizando taxas de suicídio padronizadas pela idade para o período de 2006-2010. A unidade de análise foi de 558 microrregiões brasileiras. A série de tempos mostrou

que houve maiores taxas de suicídio em pessoas entre 35 e 64 anos e entre homens de 15 a 34 anos. As microrregiões com maior uso de pesticidas e com uma alta proporção de intoxicação por pesticidas apresentaram taxas de suicídio mais altas para os três grupos analisados: ambos os gêneros, homens e mulheres. Este estudo reforça a hipótese de que o uso de pesticidas e a intoxicação por pesticidas aumentam as taxas de suicídio.

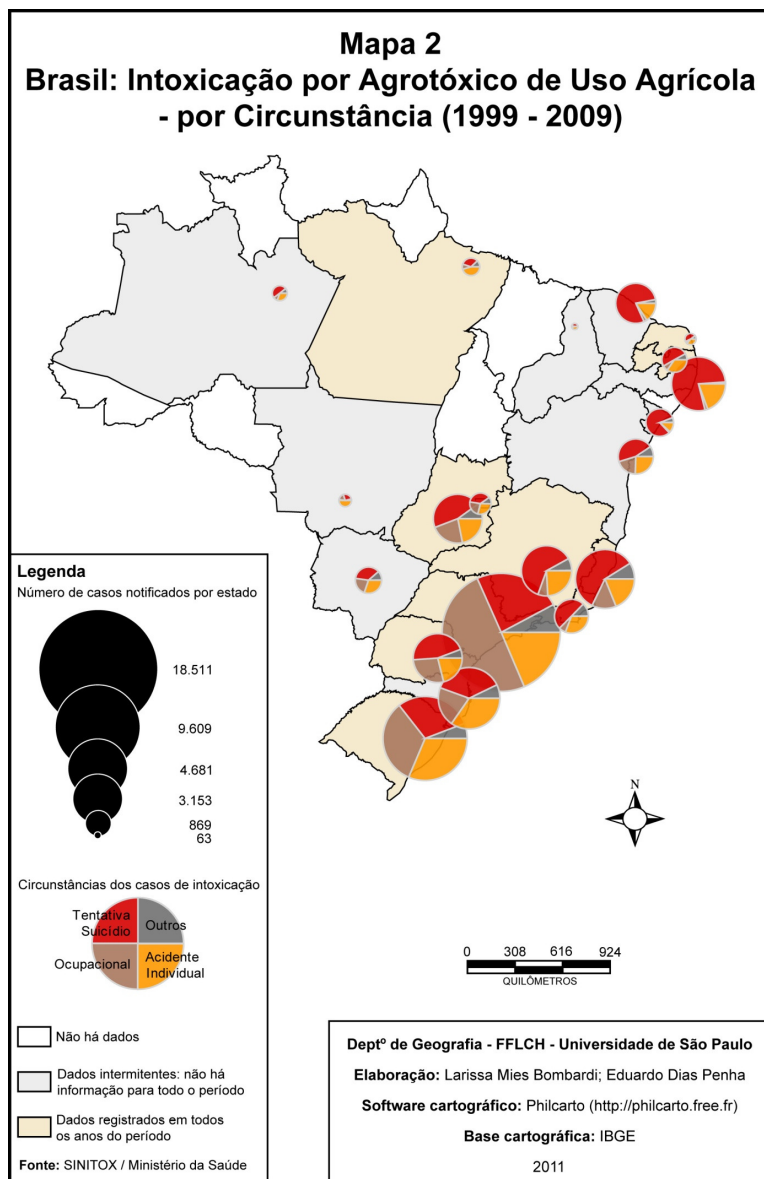
Jamal; Haque e Singh (2016) avaliaram os efeitos tóxicos da exposição a organofosforados em 187 pulverizadores de pesticidas em plantações de manga na Índia quanto ao comprometimento neurocognitivo e ao estado de saúde mental. Resultados demonstraram que as taxas de ansiedade/insônia e depressão grave foram significativamente maiores nos pulverizadores de pesticidas quando comparados com grupo controle (trabalhadores rurais não expostos a pesticidas).

Bombardi (2011) demonstrou que dentre as circunstâncias de intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola no Brasil, no período de 1999 a 2009, a tentativa de suicídio teve lugar bastante significativo. A autora relata que na região Nordeste a tentativa de suicídio foi o principal fator de intoxicação notificado sendo que em alguns estados como Pernambuco e Ceará, a taxa de suicídio atingiu 75% dos casos de intoxicações. Nos estados da região Sudeste e Sul a taxa de suicídio foi de pelo menos 25% dos casos notificados, atingindo valores superiores a 70% nos Estados do Espírito Santo e Minas Gerais. A autora descreve que uma das hipóteses para justificar esse número de suicídios relacionados à intoxicação por agrotóxicos pode ser devido a transtornos psiquiátricos causados pela própria exposição aos agrotóxicos.

Segundo Bombardi, no mapa elaborado pela mesma e representado na Figura 7,

(...) no período representado no Mapa 2 (1999 a 2009) foram notificadas 25.350 tentativas de suicídio através do uso de agrotóxicos, isto significa uma média de 2.300 tentativas de suicídio por ano, ou seja, uma média de seis tentativas de suicídio por dia, com a utilização de agrotóxicos (...) (BOMBARDI, 2011).

Figura 7 - Representação esquemática das circunstâncias em que ocorreram as intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola no país no período de 1999 – 2009.



Os resultados apresentados na Figura 7 chamam a atenção para a dimensão do problema e para a importância em se adotar novas políticas para a proteção da saúde mental dos trabalhadores agrícolas e das populações expostas.

Considerando-se que o dano oxidativo causado pelos radicais livres no cérebro pode estar envolvido na patologia das doenças que afetam o SNC, tanto como causa primária quanto como consequência para a progressão dessas doenças (GILGUN-SHERKI; MELAMED, OFFEN, 2001; VAN VELZEN et al., 2017), e que a exposição ao glifosato ou ao HBG leva ao estresse oxidativo em vários tecidos, incluindo o cérebro (EL-SHENAWY, 2009; LARSEN et al., 2012; MODESTO E MARTINEZ, 2010), estudos investigando o papel do estresse oxidativo na toxicidade do glifosato durante o período do neurodesenvolvimento faz-se necessário.

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O conceito de estresse oxidativo foi publicado pela primeira vez em 1985 por Helmut Sies, sendo definido como "Um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante-antioxidante em favor do primeiro". Em 2007, o mesmo autor atualizou o conceito para "um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização redox e de controles e/ou a danos moleculares" (SIES, 1985; SIES; JONES, 2007; SIES, 2015).

Nos sistemas biológicos a maioria dos elementos pró-oxidantes provem do oxigênio, sendo denominados genericamente de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em 1952, Conger e Fairchild demonstraram pela primeira vez que o dano oxidativo mediado pelas EROs ocorria nos organismos vivos. A partir desta descoberta, as EROs e seu potencial deletério vêm sendo relacionados com diversas doenças, como câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, psiquiátricas, cardiovasculares, e até mesmo com o processo de envelhecimento (STUFFINS; WEATHERALL, 1945; GERSCHMAN et al., 1954; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SÁNCHEZ, 2012).

As EROs são divididas em dois grupos, os radiculares e os não-radicalares. Dentre os radiculares, encontram-se o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), radical peroxil (ROO^{\cdot}) e radical alcoxil (RO^{\cdot}); e no grupo dos não-radicalares, encontram-se oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso ($HOCl$) (SÁNCHEZ, 2012). As EROs não-radicalares mesmo não possuindo elétrons desemparelhados, possuem reatividade

devido à sua instabilidade. O radical hidroxila $\cdot\text{OH}$ é considerado o mais reativo e particularmente tóxico pois tem a capacidade de reagir com quase todas as moléculas biológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Também são descritas espécies reativas de nitrogênio (ERNs), dentre elas, o óxido nítrico (NO^\cdot), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (SÁNCHEZ, 2012; CAROCHO; FERREIRA, 2013), e espécies reativas de enxofre (ERSs). As ERNs juntamente com EROs representam a classe mais importante de tais espécies geradas em organismos.

As ERO são geradas principalmente através de produtos intermediários do metabolismo celular oxidativo, pela redução incompleta do oxigênio à água na cadeia transportadora de elétrons. Cerca de 2% a 5% do O_2 metabolizado nas mitocôndrias sofre redução incompleta gerando $\text{O}_2^{\cdot-}$ (ZWART et al., 1999; INOUE et al., 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Tanto o $\text{O}_2^{\cdot-}$ quanto o H_2O_2 podem interagir com íons de metais de transição, como o ferro e o cobre por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. Na reação de Fenton, ocorre a geração de $\cdot\text{OH}$ por meio da reação do H_2O_2 com estes íons. Por outro lado, na reação de Haber-Weiss estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot-}$, a fim de gerar o $\cdot\text{OH}$ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; BARBOSA et al., 2010; SÁNCHEZ, 2012).

As EROs também podem ser produzidas em processos inflamatórios (NADPH oxidase em macrófagos ativados) (BABIOR, 1997; SÁNCHEZ, 2012); através de reações bioquímicas de oxidação e redução dependentes de O_2 (mediado pelas enzimas monoamino oxidase, xantina oxidase, lipooxigenases, óxido nítrico sintase, entre outras) (SUGAMURA; KEANEY, 2011; SÁNCHEZ, 2012); pelos mecanismos de detoxificação de fármacos e outros xenobióticos (através da atividade enzimática do citocromo P-450) (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003; FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SÁNCHEZ, 2012).

2.4.1 Sistemas de defesa antioxidantes

Para detoxificar as EROs, todos os organismos aeróbicos desenvolveram um complexo sistema de defesa antioxidante. De acordo com Halliwell (2007), os antioxidantes são definidos como "qualquer substância que atrasa, previne ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo".

Os efeitos nocivos das EROs são equilibrados pela ação de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (VALKO et al., 2006). O sistema antioxidante enzimático mais eficiente envolve a glutatona peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). A SOD dismuta o $O_2^{\cdot-}$ gerando H_2O_2 enquanto que a CAT e a GPx convertem H_2O_2 em H_2O e O_2 (KAUR; LING, 2008). A ação das enzimas antioxidantes serve como uma tentativa das células em manter baixas as quantidades do radical ânion superóxido e de peróxidos de hidrogênio, evitando assim a formação do radical hidroxila, que é altamente reativo e deletério às células (BOVERIS et al., 1997). O sistema enzimático também inclui as enzimas envolvidas na produção e manutenção da glutatona reduzida (GSH), tais como a glutatona redutase (GR) e a glutamato-cisteína ligase (GCL) (DI GIULIO; NEWMAN, 2013).

Os sistemas de defesas antioxidantes não enzimáticos são capazes de prevenir o dano oxidativo por interações diretas e indiretas com as EROs (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Uma grande variedade de substâncias constitui o grupo desses antioxidantes, os quais podem ter origem biológica ou dietética (antioxidantes naturais ou nutricionais). Entre os principais antioxidantes não enzimáticos endógenos estão os antioxidantes tióis (GSH, tioredoxina, ácido lipóico), o ácido úrico e o estradiol, entre outros, e como antioxidantes exógenos existem as vitaminas E, C e A, os carotenóides, os polifenóis, substâncias sintéticas (N-acetilcisteína), entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; BARBOSA et al., 2010).

A GSH, juntamente com seu sistema enzimático acoplado, é uma das defesas antioxidantes mais importantes nos organismos, tendo um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na detoxificação celular de EROs nas células gliais (BOELSTERLI, 2009). Trata-se de um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina (Gly-Cys-Glu) e pode ser encontrado tanto na forma reduzida (GSH) quanto na oxidada (GSSG). É o tiol não proteico mais abundante nas células (DRINGEN, 2000; DICKINSON; FORMAN, 2002).

GSH participa nas reações de detoxificação de compostos eletrofílicos ao atuar como substrato para ação da enzima glutatona-S-transferase (GST). Também atua como doador de elétrons na redução do peróxido de hidrogênio catalisada pela GPx. Essa doação de elétrons para detoxificação de peróxidos leva a formação de GSSG, a qual é reduzida novamente a GSH pela ação da enzima GR em uma reação dependente de NADPH. O NADPH é proveniente do ciclo das pentoses

pela atividade da enzima glicose-6-fostato desidrogenase (G6PD) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; DAMMEYER; ARNÉR, 2011). Depleção de GSH através de conjugação ou perda pela excreção de GSSG demandam reposição pela via síntese *de novo* de GSH (DICKINSON; FORMAN, 2002).

A ligação peptídica que liga o glutamato e cisteína na GSH é feita através do grupo γ -carboxil do glutamato em vez do convencional grupo α -carboxil. A única enzima que pode hidrolisar essa ligação incomum é a γ -glutamil transferase (GGT), a qual está presente somente no exterior de superfícies de determinados tipos de células. Como consequência, a GSH é resistente à degradação intracelular e somente é metabolizada extracelularmente por células que expressam GGT. Isso permite a liberação de GSH para o meio extracelular onde será quebrada em seus aminoácidos constituintes, os quais serão novamente absorvidos pelas células e podem participar da síntese *de novo* de GSH (LU, 2013).

2.4.2 Estresse Oxidativo X Sistema Nervoso Central

O cérebro, ao ser comparado com outros órgãos, é especialmente vulnerável ao estresse oxidativo por diversas razões, tais como: alta taxa metabólica oxidativa; quantidade abundante de lipídios com ácidos graxos insaturados que são alvos da peroxidação lipídica; presença de metais de transição no cérebro (ferro e cobre); elevada taxa de geração de radicais livres derivados do metabolismo de neurotransmissores; e em contrapartida, contém uma baixa atividade de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GPx. Além disso, a concentração de GSH no cérebro é menor que em outros órgãos, como fígado, rim, baço e intestino delgado (LEBEL; BONDY, 1991; BONDY; LEE, 1993; AOYAMA; WATABE; NAKAKI, 2008; KAUR; LING, 2008; MAES et al., 2011; ASTIZ; ALANIZ; MARRA, 2012; MAZZETI et al., 2015).

O cérebro consome mais oxigênio sob condições fisiológicas que qualquer outro órgão do corpo humano. O consumo de oxigênio requerido pelo cérebro humano corresponde a 20% do total de oxigênio no corpo, apesar deste representar apenas 2% do peso corporal (AOYAMA; WATABE; NAKAKI, 2008). Os neurônios estão entre as células mais ativas do metabolismo oxidativo, exigindo um delicado equilíbrio entre oferta e consumo de oxigênio e glicose (MAZZETI et al., 2015). Esses processos levam a uma geração elevada de EROs no cérebro.

O hipocampo é uma das estruturas cerebrais mais sensíveis ao estresse oxidativo. Vários estudos relatam que o estresse oxidativo no

hipocampo causa uma diminuição da neurogênese e um aumento da morte neuronal (WANG; MICHAELIS, 2010; VAN VELZEN et al., 2017).

Embora diversos fatores possam precipitar o surgimento de EROs no cérebro, um dos principais é a excitotoxicidade glutamatérgica. O aumento de glutamato na fenda sináptica com superativação de seus receptores e aumento no influxo de cálcio intracelular, levam à degeneração neuronal. Essa toxicidade desencadeada pelo glutamato provoca um aumento na produção de radicais livres tais como superóxido e hidroxila, os quais prejudicam o sistema de transporte iônico da membrana resultando em diminuição nos níveis de GSH (GILGUN-SHERKI; MELAMED, OFFEN, 2001; EMERIT; EDEAS; BRICAIRE, 2004; KAUR; LING, 2008; SAYRE; PERRY; SMITH, 2008)

Já é bem conhecido que o estresse oxidativo atua como um dos principais fatores nas doenças neurodegenerativas (EMERIT; EDEAS; BRICAIRE, 2004; AOYAMA; WATABE; NAKAKI, 2008). Desequilíbrio entre oxidantes e moléculas antioxidantes podem afetar o aparecimento ou o curso de um número comum de doenças neurológicas, incluído doença de Parkinson e de Alzheimer (MAES et al., 2011; ROSSIGNOL; FRYE, 2014; MAZZETI et al., 2015)

2.4.3 Envolvimento do estresse oxidativo na toxicidade do glifosato e/ou de herbicidas à base de glifosato

Diversos estudos tem demonstrado que os efeitos tóxicos do glifosato e/ou de herbicidas à base de glifosato parecem envolver a indução de estresse oxidativo. Em 2012, Larsen e colaboradores trataram ratos adultos durante 30 ou 90 dias com diferentes concentrações de glifosato (0,7 mg/L e 7 mg/L) na água de beber. Este estudo demonstrou que os ratos expostos ao glifosato apresentaram aumento nos níveis de GSH (fígado) e da atividade da GPx (fígado, rim e intestino delgado), as quais podem estar atuando como mecanismos contra os efeitos deletérios do herbicida.

Nosso grupo de pesquisa também já demonstrou que a exposição aguda a baixas doses de Roundup® induziu estresse oxidativo e ativou múltiplas vias responsáveis pelo estresse, levando à morte de células de Sertoli em testículos de ratos pré-púbere. Estes eventos foram prevenidos pelo uso de antioxidantes como Trolox e ácido ascórbico (DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013).

Um estudo realizado em peixes investigou os efeitos agudos do glifosato sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes. Os peixes foram expostos a diferentes concentrações do herbicida durante 96 h. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína carbonilada e respostas antioxidantes foram verificadas. A concentração mais alta do herbicida resultou na morte de 50% dos peixes após o período de exposição. Níveis de TBARS estavam elevados no fígado e músculo desses animais enquanto que o conteúdo de proteína carbonilada estava aumentado no fígado e cérebro. A atividade antioxidante diminuiu no fígado e cérebro (SINHORIN et al., 2014a).

Martini e colaboradores (2016) ao estudarem o efeito do glifosato sobre os genes que são regulados positivamente durante a adipogênese verificaram que o glifosato foi capaz de inibir a indução de PPAR gama, principal gene na adipogênese, mas não de C/EBP beta, gene que precede a ativação da PPAR gama. Nas células 3T3-L1 o glifosato aumentou a peroxidação lipídica e a atividade da enzima antioxidante, superóxido dismutase. Também foi verificado que a proliferação dessas células foi inibida nas menores concentrações de glifosato quando o tempo de exposição foi prolongado. Assim, os autores concluíram que o glifosato foi capaz de inibir a proliferação e diferenciação de pré-adipócitos e induzir o estresse oxidativo, indicativos da sua capacidade em alterar a fisiologia celular.

2.5 HIPÓTESE E DIVISÃO DO ESTUDO

A exposição *in vitro* ou subcrônica à formulação comercial HBG, herbicida descrito como seguro pelo fabricante e pelas agências que o regulamentam, tem potencial neurotóxico afetando diferentes rotas metabólicas e oxidativas no hipocampo de ratos expostos durante períodos críticos do desenvolvimento neural. Esses eventos acarretam no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos que podem estar envolvidos com a alta incidência de suicídios na população rural. A toxicidade da formulação comercial está associada ao princípio ativo glifosato, ao seu metabólito AMPA, bem como aos demais adjuvantes da formulação.

Para comprovar essa hipótese, o presente estudo propôs-se a investigar alguns mecanismos envolvidos na neurotoxicidade induzida pelo HBG, pelo glifosato de grau analítico (P.A., para análise) e pelo seu principal metabólito AMPA, em células hipocâmpais de ratos. Além disso, investigou-se se a exposição ao HBG durante períodos críticos do neurodesenvolvimento leva a alterações bioquímicas importantes no cérebro de ratos resultando em alterações neurocomportamentais.

Para isso, o presente trabalho foi dividido em 3 estudos:

- Estudo I: Avaliação da toxicidade do HBG, do glifosato P.A. e de seu metabólito AMPA sobre parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo em hipocampo de ratos imaturos (PND15) após exposição *in vitro*;

- Estudo II: Avaliação da toxicidade do herbicida à base de glifosato sobre parâmetros bioquímicos, de estresse oxidativo e comportamentais em hipocampo de ratos imaturos (PND15) e adultos (PND60) após exposição *in vivo*;

- Estudo III: Efeitos da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. durante a diferenciação neuronal *in vitro* de células progenitoras neurais murinas, C17.2

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Materiais utilizados nos experimentos com animais

As substâncias radioativas [$^{45}\text{Ca}^{2+}$]- CaCl_2 (sp. act. 321 KBq/mg Ca^{2+}) e 2- ^{14}C -deoxi-D-glicose (^{14}C -DG) (sp act 10,434 GBq/mmol), bem como o líquido de cintilação biodegradável Optiphase Hisafe III foram obtidos da Perkin Elmer (Waltham, MA, EUA) enquanto o L- ^{14}C -glutamato (sp. act. 9,62 GBq/mmol) foi obtido da Amersham (Oakville, Ontario, Canadá). A formulação comercial utilizada foi Roundup Original® (sal de isopropilamina de Glifosato 480 g/L – 360 g/L equivalente glifosato) (Monsanto, St Louis, MO, EUA), registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob o número 898793. O glifosato de grau analítico (P.A., para análise), o ácido aminometilfosfônico (AMPA) e os reagentes referentes as análises de biomarcadores de estresse oxidativo foram adquiridos da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os kits ELISA NF- κ B p65 (Total) InstantOne ELISA e InstantOnePhospho-NF- κ B p65 (Ser536) foram adquiridos da eBioscience® (San Diego, CA, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A.). Para leitura da ABS na medição das atividades enzimáticas foi utilizado o leitor de placas Tecan Infinito® 200 PRO.

3.1.2 Materiais utilizados nos experimentos com células

Foram utilizadas células C17.2, linhagem de células-tronco neurais derivadas do cerebelo de camundongo, C17.2 (Nº de Cat. 07062902, ECACC, Salisbury, Inglaterra). Produtos químicos e reagentes utilizados no cultivo celular: leite em pó desnatado e liofilizado (Bio-Rad, Berkeley, Califórnia, EUA), Paraformaldeído (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA), Fenol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), Triton-TX-100 (Acros, Geel, Bélgica) e Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Meios de cultura utilizados: DMEM alta concentração de glicose (do inglês “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”, D6546, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e meio Ham’s F-12K (“Kaighn’s Modification of Ham’s F-12 with L-Glutamine”, ATCC® 30-2004, Manassas, Virgínia, EUA). Componentes utilizados nos meios: soro fetal bovino (SFB) (ref. 04-

007-1A, BI, Cromwell, Connecticut, EUA), L-Glutamina (ref. 25030-024, Gibco, Carlsbad, Califórnia, EUA), suplemento N2 (ref. 17502-048, Gibco, Carlsbad, Califórnia, EUA) e Penicilina-Estreptomicina (PEST) (ref. 15140-122, Gibco, Carlsbad, Califórnia, EUA). Corantes fluorescentes utilizados nas células foram, Hoechst 33342 (#62249, ThermoFischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), MitoTracker® Orange CM-H2TMRos e CellROX® Deep Red Reagent (ThermoFischer Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA). Os anticorpos primários utilizados foram: Ac policlonal de coelho Anti- β -Tubulina III (T2200, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA); Ac policlonal de cabra anti-VGluT-1 (ab104899, Abcam, Cambridge, Inglaterra), Ac monoclonal de camundongo α -internexina (MAB5224, Chemicon, Rolling Meadows, Illinois, EUA), Ac policlonal de coelho NMDA-R1 (ab131452, Abcam, Cambridge, Inglaterra). Os anticorpos secundários utilizados foram: donkey anti-cabra AlexaFluor 555 (ab15013, Abcam, Cambridge, Inglaterra), donkey anti-camundongo AlexaFluor 647 (ab150107, Abcam, Cambridge, Inglaterra) e donkey anti-coelho AlexaFluor 488 (R37118, Molecular Probes, Carlsbad, Califórnia, EUA). As células foram semeadas e tratadas em placas de 96 poços utilizando o equipamento “braço mecânico” Biomek® 4000 (Beckman Coulter, Brea, California, EUA). Para análise quantitativa automatizada e imparcial das imagens obtidas foi utilizado o microscópio de fluorescência de análise de alto conteúdo (HCA, sigla do inglês “High Content Analysis” - ImageXpress XLS, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA). Para técnica da qPCR foi utilizado: RNeasy Micro Kit (QIAGEN), cDNA iScript™ (BIORAD, Hercules, Califórnia, EUA), iTaq Universal SYBR Green Supermix (BIORAD, Hercules, Califórnia, EUA). Para análise da qPCR foi utilizado sistema CFX Connect™ em tempo real (BIORAD).

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Animais

Foram utilizados ratos machos (linhagem Wistar) com 15 dias de idade ou ratas fêmeas gestantes (linhagem Wistar) provenientes do Biotério Central da UFSC, bem como a prole proveniente dessas fêmeas (15 e 60 dias de idade). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com controle do ciclo claro/escuro 12/12 h em sala climatizada com temperatura controlada em 21 °C (+/- 1 °C), com ração (Nuvital,

Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os animais foram monitorados quanto aos sinais clínicos de toxicidade relacionado ao tratamento químico. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC, Protocolos n° PP00471/PP00820) e em concordância com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2.1.1 Protocolo experimental do tratamento *in vitro* das fatias de hipocampo com HBG, Glifosato P.A. e AMPA – Estudo I

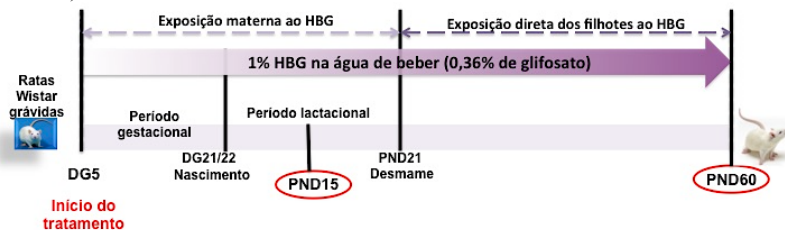
Animais com 15 dias de idade (PND15) foram eutanaziados por decapitação e o hipocampo removido e fatiado (fatias com 300 µm de espessura). Para todos os experimentos *in vitro*, as fatias de hipocampo foram previamente pré-incubadas por 15 min em tampão Solução Salina Balanceada de Hanks (NaCl 136,9 mM; KCl 5,36 mM; CaCl₂ 1,29 mM; MgSO₄ 0,65 mM; KH₂PO₄ 0,441 mM; NaHCO₃ 0,417 mM; Na₂HPO₄ 0,27 mM; D-glicose 6,1 mM) a 37 °C, pH 7,4, em banho metabólico Dubnoff sob agitação, para estabilização dos tecidos, seguido por uma incubação de 30 min na presença ou ausência de HBG 0,01% (equivalente a 36 ppm de glifosato), ou 36 ppm de glifosato P.A. ou 36 ppm de AMPA.

3.2.1.2 Protocolo experimental do tratamento *in vivo* com Herbicida à Base de Glifosato (HBG) – Estudo II

Ratas Wistar fêmeas gestantes (5° dia gestacional, DG5) foram alojadas individualmente e divididas em 2 grupos (4 gestantes em cada grupo): grupo controle, o qual recebeu água da torneira durante o período de tratamento; e grupo tratado, que foi exposto a 1% de HBG (correspondente a 0,36% de glifosato) na água de beber. O tratamento foi iniciado no DG5 e continuou até os filhotes completarem 15 (PND15) ou 60 dias pós-natal (PND60). 1-2 dias após o nascimento, o tamanho das ninhadas foi padronizado de forma que cada rata foi mantida com 8 filhotes/gaiola (4 machos e 4 fêmeas, sempre que possível) durante todo o período de tratamento e manutenção dos animais. Ninhadas menores que 8 filhotes não foram incluídas. A exposição materna ao HBG abrangeu os períodos gestacional (DG5 ao DG21-22) e de lactação (PND1 ao PND21). Com 21 dias de idade (PND21) os filhotes foram desmamados e os filhotes machos foram separados e alojados de acordo com seus respectivos grupos anteriores

(quatro ratos por gaiola). O tratamento com 1% HBG na água de beber (grupo tratado) ou somente com água da torneira (grupo controle) continuou até PND60 (Figura 8). Filhotes fêmeas não foram utilizados nos experimentos. A dose materna de HBG foi equivalente a 70 mg de glifosato/Kg/dia (NOAEL (nível de dose sem observação de efeito adversos) do glifosato para toxicidade materna é de 1000 mg/Kg de massa corporal/dia de dosagem segundo a EPA (1993) e Williams, Kroes e Munro (2000)). O número de animais utilizados em cada teste foi de pelo menos 6 por grupo experimental. As soluções contendo HBG foram preparadas diariamente. O consumo materno de água durante os períodos gestacional e lactacional das ratas controles e tratadas bem como o peso corporal dos filhotes machos foram monitorados diariamente. Os testes neuroquímicos foram realizados em PND15 e PND60, enquanto que os testes comportamentais foram realizados apenas no PND60. Para investigar os efeitos neurotóxicos da exposição ao HBG foram utilizados hipocampo de ambas as idades, PND15 e PND60. Os animais foram eutanaziados por decapitação e os hipocampus foram removidos e fatiados (fatias com 300 μm de espessura). Cada grupo experimental continha fatias hipocampais de ratos de ninhadas diferentes (diferentes mães). As fatias foram homogeneizadas nos tampões específicos dependendo da determinação bioquímica a ser realizada.

Figura 8 - Desenho experimental do tratamento *in vivo* com 1% HBG (0,36% glifosato).



Tratamento iniciou no DG5. A exposição materna abrangeu período gestacional e lactacional (DG5 a PND21). PND21 ocorreu o desmame (filhotes foram separados das mães). Do PND21 ao PND60 o tratamento foi dado diretamente aos filhotes (machos). As idades utilizadas nos experimentos correspondem aos PND circunscritos com linha vermelha, PND15 e PND60. Animais de ambas as idades foram eutanasiados e o hipocampo removido para posteriores análises bioquímicas. Somente o PND60 foi utilizado para experimentos comportamentais. Siglas: DG, dia gestacional; HBG, Herbicida à Base de Glifosato; PND, dia pós-natal. FONTE: Próprio autor.

3.2.2 Captação de ^{14}C -glutamato

As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl_2 1,29 mM, NaCl 137 mM, KCl 5,36 mM, MgSO_4 0,65 mM, Na_2HPO_4 0,27 mM, NaHCO_3 0,417 mM, KH_2PO_4 1,1 mM, D-glicose 2 mM e HEPES 5 mM, pH 7,4). Após esse período, o meio foi trocado por HBSS fresco e o tecido foi incubado durante 30 minutos na presença ou ausência de glifosato P.A. ou AMPA. A captação teve início com a adição de 0,33 $\mu\text{Ci/mL}$ [^{14}C]- L-glutamato nos 10 min finais da incubação. A incubação foi interrompida com a retirada do meio de captação seguida por lavagem (duas vezes) com HBSS gelado. Solução de NaOH 0,5 M foi adicionada para solubilização das fatias. Após a completa solubilização foi determinado o conteúdo intracelular de glutamato por cintilação líquida, medido em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). A absorção independente de sódio foi determinada usando N-metil-D-glucamina em vez de cloreto de sódio. A absorção de glutamato dependente de sódio foi obtida subtraindo a absorção não específica da absorção específica. Os resultados foram expressos como nmol [^{14}C]-Glutamato/ μg proteína/min.

3.2.3 Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Fatias hipocampais foram pré-incubadas em tampão HBSS por 15 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7,4. Após esse período, o meio foi trocado por HBSS fresco com 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e o tecido foi incubado durante 30 minutos na presença ou ausência de glifosato P.A. ou AMPA. O $^{45}\text{Ca}^{2+}$ extracelular foi totalmente lavado com solução de lantânio (NaCl 127,5 mM, KCl 4,6 mM, MgSO_4 1,2 mM, HEPES 10 mM, glicose 11 mM, LaCl_3 10 mM) pH 7,2 a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. A presença de La^{3+} durante o estágio de lavagem foi utilizada para evitar a liberação do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ intracelular (BATRA; SJÖGREN, 1983; ZAMONER et al., 2007). Após 10 min a solução de cloreto de lantânio foi removida e o tecido foi homogeneizado em solução de NaOH 0,5 M. A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada. Aliquotas de 100 μL do homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida. Os resultados foram expressos como pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ / μg proteína (ZAMONER et al., 2007).

3.2.4 Captação de ^{14}C -2-desoxi-D-glicose

Para determinação da captação de ^{14}C -DG, fatias de hipocampo foram primeiramente pré-incubadas em tampão HBSS pH 7,4 a 36 °C por 15 min para estabilização do tecido. Em seguida o tecido foi incubado por 30 min em HBSS fresco contendo D-glicose 2 mM e ^{14}C -desoxiglicose 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ na presença ou ausência de HBG, glifosato P.A. ou AMPA. Após a incubação, o tecido foi lavado com HBSS gelado e homogeneizado em solução de NaOH 0,5 M. Alíquotas da amostra foram colocadas em líquido de cintilação e a radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). Os resultados foram expressos em mg de glicose/mL/ μg de proteína.

3.2.5 Conteúdo de glutatona reduzida (GSH)

O conteúdo de GSH foi avaliado através da determinação dos tióis não proteicos, uma vez que a mesma representa 95% do total destes tióis. A avaliação foi realizada segundo o método descrito por Beutler, Duron e Kelly (1963). Os níveis de glutatona foram medidos em homogeneizados de hipocampo, preparados em ácido tricloroacético 12% (1:10, P:V), seguido por centrifugação a 5000 x g durante 5 minutos. Uma alíquota de 10 μL deste sobrenadante foi acrescentada em 190 μL de Tampão Fosfato 0,2 M pH 8,0. Posteriormente, 20 μL de ácido 5,5'-Ditio-bis(2-nitrobenzóico) 2,525 mM (DTNB; Reagente Ellman) diluído em Citrato de Sódio 1% foram adicionados. A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 412 nm. GSH reage com DTNB e por redução de GSSG, a GSH total (GSH + GSSG) pode ser medida. DTNB reage com GSH para produzir um ânion conjugado, ânion tiolato (TNB), de cor amarela, que pode ser detectado por fluorescência ou absorbância e é proporcional à quantidade inicial de GSH (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009). Os resultados foram expressos em gráficos como conteúdo de GSH em mmol/ μg proteína.

3.2.6 Determinação dos marcadores de danos oxidativos

3.2.6.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS

O malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, irá reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), reação essa que produz uma base de

Shiff de coloração rosa (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979; BIRD; DRAPER, 1984). Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidos nas fatias hipocâmpais. As fatias foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 20 mM, 0,1% Triton e NaCl 150 mM, pH 7,4 (1:20, p:v). O homogeneizado foi centrifugado a 5.000 x g por 5 min. À uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi acrescentado 1 mL de TCA 12% (para precipitação das proteínas) e agitado em vórtex. Posteriormente, foi adicionado 900 µL de tampão Tris-HCl 0,06 M pH 7,4 e 1 mL TBA 0,73%, agitado em vórtex e levado para aquecimento por 1 h a 100 °C. Após este período as amostras foram resfriadas em banho de gelo e centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos. A reação colorimétrica das amostras foi medida em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos como nmol de MDA/g de proteína.

3.2.6.2 Proteína Carbonilada (PC)

Para determinar o dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi utilizado o método descrito por Levine e colaboradores (1990). As fatias hipocâmpais foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 20 mM, 0,1% Triton e NaCl 150 mM, pH 7,4 (1:20, p:v). Inicialmente, foram adicionados 200 µL da amostra em 600 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM preparado em solução de HCl 2 N, seguido de uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação contínua. Após este período foi adicionado 600 µL de TCA 20%, seguido de agitação em vórtex e incubação em banho de gelo durante 10 min. Em seguida foi realizada uma centrifugação (5 min a 10.000 x g), e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado por três vezes consecutivas (centrifugação por 5 min a 10.000 x g) com 800 µL de etanol-acetato de etila (1:1 v/v). Finalmente, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete e foram adicionados 1 mL de guanidina 6,0 M preparada em solução de KH₂PO₄ 20 mM, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C com agitação contínua por 60 min e centrifugação por 5 min a 10.000 x g, para posteriormente proceder a leitura a 360 nm do sobrenadante. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em µmol/mg de proteína.

3.2.7 Determinação da atividade enzimática

3.2.7.1 Glutamina Sintetase (GS)

A atividade da GS foi realizada de acordo com o método descrito por Petito et al. (1992) e modificado por Santos et al. (2006). Fatias de hipocampo foram homogeneizadas em KCl 150 mM (tampão de lise). À uma alíquota de 100 μ L do homogeneizado foi adicionado 100 μ L de meio de reação contendo Imidazol-HCl 100 mM (pH 7,4), Glutamato 50 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, Hidroxilamina 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM e ATP 10 mM e incubados por 30 min a 37 °C. A reação foi interrompida por adição de 400 μ L de uma mistura contendo $FeCl_3$ 370 mM, HCl 670 mM, TCA 200 mM, seguido por centrifugação a 10.000 x g por 10 min e leitura da absorbância do sobrenadante. O produto da reação, γ -glutamilhidroxamato, foi medido a 540 nm utilizando um leitor de ELISA e convertido para a quantidade de produto formado por comparação com uma curva padrão de γ -glutamilhidroxamato. A atividade enzimática foi expressa como μ M hidroxamato/mg proteína (SHAPIRO; STADTMAN, 1970; SANTOS et al., 2006).

3.2.7.2 Gama-glutamil transferase (GGT)

Fatias hipocampais foram homogeneizadas em Tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,5. A atividade enzimática da GGT foi determinada através da técnica modificada descrita por Orłowsky e Meister (1963), utilizando o L- γ -Glutamil-p-Nitroanilida como substrato e a glicilglicina como molécula aceptora, com liberação de p-nitroanilina, a qual é diazotada, gerando um composto final de cor rósea. Alíquotas do homogeneizado foram incubadas com o substrato enzimático por 90 min a 37 °C e a reação enzimática foi bloqueada pela adição de ácido acético. Foi realizada a leitura da absorbância a 530 nm. Resultados foram expressos como U/L/ μ g proteína.

3.2.7.3 Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

Fatias hipocampais foram homogeneizadas em Tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4. A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) foi determinada através da reação com G6PD na presença do $NADP^+$, que catalisa a oxidação da G6P a 6-fosfogliconato. A reação foi monitorada de modo cinético a 570 nm durante 10 minutos. Os resultados foram calculados pela avaliação do aumento da densidade óptica por minuto

(declínio) da amostra contra o “declínio” da atividade enzimática do padrão da G6PD. O kit de ensaio para G6PD foi gentilmente fornecido pela Intercientífica (São José dos Campos, SP, Brasil). Resultados foram expressos como U/ μ g de proteína.

3.2.7.4 Alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)

Fatias hipocâmpais foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e a atividade enzimática foi medida colorimetricamente. Na reação, a alanina aminotransferase (ALT) catalisa especificamente a transferência do grupo amina do substrato L-alanina para o α -cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. A aspartato aminotransferase (AST) catalisa especificamente a transferência do grupo amina do substrato L-aspartico para o α -cetoglutarato com formação de glutamato e oxaloacetato. Tanto o piruvato quanto o oxaloacetato formado reagem com a 2-4-dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra e é medida espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 505 nm. A atividade enzimática da ALT e AST foi determinada através da utilização de Kits colorimétricos (Gold Analisa[®]). Os resultados foram expressos como U/L/ μ g de proteína.

3.2.7.5 Colinesterase

A atividade da colinesterase foi determinada em fatias de hipocampo ou soro através da reação de hidrólise do substrato Propioniltiocolina mediada pela colinesterase, com a liberação de grupo sulfídrico livre ao nível de Tiocolina. O grupo SH livre reage com DTNB (reagente de cor) levando à formação de um composto amarelo, de absorção máxima em torno de 410 nm. As fatias hipocâmpais foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4. O substrato e o reagente de cor foram incubados em banho-maria a 37 °C por 3 min, em seguida foi adicionado uma alíquota de amostra e realizada uma nova incubação em banho-maria a 37 °C e após exatos 160 s foi acrescentado uma solução inibidora. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em um comprimento de onda de 410 nm. Resultados foram expressos como U/mL/ μ g proteína.

3.2.8 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A formação de EROs foi medida utilizando a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA), a qual as células são permeáveis. Esterases celulares hidrolisam a sonda para o não fluorescente 2',7' diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), que é retido nas células. Na presença de EROs e peroxidases celulares, H₂DCF é transformado no 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), substância altamente fluorescente (VINCENT et al., 2004). Fatias de hipocampo foram homogeneizadas em solução contendo fosfato de sódio 20 mM e KCl 140 mM, pH 7,4, com posterior centrifugação (960 x g por 10 min a 4 °C). Em placa preta de 96 poços, 10 µL de H₂DCFDA 1 mM (preparado em DMSO e protegido da luz) foram adicionados em 90 µL de sobrenadante, seguido de uma incubação no escuro a 37 °C por 30 min. O produto foi detectado em comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias, sendo os valores corrigidos pela concentração de proteína de cada amostra.

3.2.9 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

As fatias hipocampais foram homogeneizadas em uma solução contendo fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4; Triton 0,1% e NaCl 150 mM (1:20 p/v). As determinações foram realizadas utilizando o sobrenadante após centrifugação do homogeneizado (5.000 x g durante 5 min).

3.2.9.1 Glutathione redutase (GR)

A GR foi determinada pela medida da taxa de oxidação do NADPH a 340 nm devido à formação de GSH, a partir da GSSG, por ação da GR presente na amostra (CALBERG; MANNERVICK, 1985). Um meio de reação contendo tampão fosfato de Potássio 0,1 M pH 7,0, NADPH, água destilada, glutathione oxidada (GSSG) e DPTA 5 mM foi adicionado a amostra dando início a reação que foi monitorada durante 3 min, gerando uma curva decrescente. Os valores da atividade desta enzima foram expressos em µmol/g/min.

3.2.9.2 Glutathione peroxidase (GPx)

Para a análise enzimática de GPx, a reação utilizada foi baseada na redução de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH a

GSSG, catalisada pela GPx, e subsequente regeneração de GSH pela enzima GR com oxidação de NADPH em 340 nm. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade da GPx na amostra (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984). Para a realização da técnica, 200 µL de um meio de reação contendo tampão fosfato de Potássio 0,1 M (pH 7,0), NADPH, ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 5 mM, água destilada, GSH e GR foi adicionado a amostra, seguido pela adição de 5 µL de t-BuOOH. A reação foi monitorada durante 3 min. Os valores foram expressos em µmol/g/min.

3.2.9.3 Glutationa S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Habig, Pabst e Jakoby (1976). Neste protocolo foi utilizado 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0,1 M como substrato para GST. A GST irá promover a conjugação GSH-CDNB. À amostra foi adicionado um meio de reação contendo (substrato), GSH 0,1 M e tampão fosfato de Potássio 0,1 M pH 7,0. A reação foi monitorada espectrofotometricamente por 60s a 340 nm. A atividade enzimática foi expressa em µmol/g/min.

3.2.9.4 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada baseando-se na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio (AEBI, 1984). À uma alíquota da amostra foi adicionado 200 µL de uma solução de de H_2O_2 30% (10 mM) preparada em tampão fosfato de Potássio 50 mM pH 7,0, seguida de leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 30s. Os valores foram expressos em mmol/g/min.

3.2.9.5 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida baseada na oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que produz o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), e um cromóforo rosa, o adrenocromo, o qual é mensurado em 480 nm (MISRA; FRIDOVICH, 1972; BOVERIS et al., 1983). À uma alíquota da amostra, geralmente em torno de 5 a 40 µL dependendo da concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota, foi acrescentado q.s.p. para 200 µL tampão glicina 50 mM pH 10,2, seguido pela realização de uma leitura pontual. Após, foi adicionado uma solução com adrenalina 60 mM pH 2,0, seguido por

monitoramento da reação durante 10 min. A adição de adrenalina retarda a oxidação e consequentemente a produção de adrenocromo através da enzima SOD. Curvas de 3 ou 4 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe a velocidade de oxidação da adrenalina em 50%. Os resultados foram expressos como USOD/mL.

3.2.10 Determinação da concentração sérica da proteína S100B

O imunoconteúdo de S100B foi determinado de acordo com protocolo de Leite et al. (2008) para detecção pelo método de ELISA em soro de ratos controles e expostos ao HBG.

3.2.11 Medida das concentrações de NF- κ B total e fosforilado

Para analisar o efeito da exposição ao HBG na fosforilação da proteína p65 (subunidade de NF- κ B), foram medidos os níveis total e fosforilado de p65 (p65 e p-p65, respectivamente). Fatias hipocâmpais foram homogeneizadas em tampão de lise e a concentração de proteína foi determinada (LOWRY et al., 1951). O teor total de proteína foi ajustado, sendo utilizado 60 μ g/amostra. A análise foi realizada utilizando um kit comercialmente disponível com anticorpos monoclonais específicos contra a proteína total p65 e especificamente contra a proteína p65 fosforilada. O experimento foi realizado utilizando os kits ELISA NF- κ B p65 (Total) InstantOne ELISA e InstantOnephospho-NF- κ B p65 (Ser536) (adquiridos da eBioscience®, San Diego, CA, EUA) de acordo com os protocolos do fabricante. Os resultados foram expressos como % do controle.

3.2.12 Concentração de Proteínas

A concentração de proteína das amostras foi avaliada pelo método de Lowry et al. (1951). Uma curva padrão utilizando a albumina de soro bovino (Sigma®) foi utilizada para calcular os níveis de proteína nas amostras.

3.2.13 Estudos comportamentais

Foram realizados estudos comportamentais nos animais expostos subcronicamente ao HBG. Estes experimentos foram realizados em parceria com o Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger (Departamento de Farmacologia/UFSC). Animais no PND60 expostos ao HBG, conforme descrito no tratamento *in vivo*, foram submetidos a diversos protocolos experimentais com intuito de verificar possíveis alterações sobre a função neural, motora e comportamental dos mesmos. Todos os animais foram testados no PND60. Os animais foram ambientados na sala de testes por 1 h antes do início dos experimentos. Os procedimentos foram realizados durante a fase leve do ciclo (10:00 - 17:00 h).

3.2.13.1 Campo Aberto

Para avaliar possíveis alterações locomotoras após exposição ao HBG foi utilizado o modelo proposto por Hall e Ballachey em 1932. O teste consiste na verificação (medição) de algumas variáveis comportamentais após a inserção do animal em um novo espaço aberto do qual a fuga é impedida por paredes (WALSH; CUMMINS, 1976). O aparato consiste em uma arena quadrada feita de madeira cuja área total é de 1 m² (100 cm x 100 cm), cercada por paredes (40 cm de altura) e com assoalho dividido por linhas pretas formando 25 quadrados (20 x 20 cm). O início do teste deu-se quando o rato foi colocado no centro do campo aberto e explorou livremente o aparato durante 15 min. Os experimentos foram filmados e a distância total percorrida e o tempo de permanência na região central foram analisados através do software de análise etológica AnyMaze® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA). Entre cada animal o aparato era limpo com etanol 10%. A distância total percorrida foi utilizada como índice para a atividade motora.

3.2.13.2 Rotarod

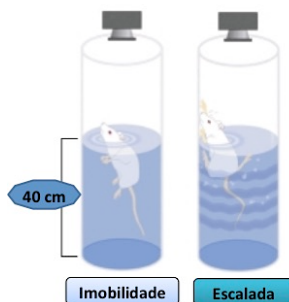
O sistema do rotarod (Rotamex-V-EE/85), controlado por sistema computacional (Columbus Instruments Computer-Counter Interface; Ohio, EUA) foi utilizado para a avaliação da coordenação motora e do equilíbrio dos animais. O aparelho consiste de uma barra rotacional, que pode girar com velocidade constante ou com aceleração regulável de 1 rpm/s. Utilizou-se a versão em aceleração do rotarod no qual os animais foram colocados sobre um cilindro em rotação, com velocidade inicial

de 5 rotações por minuto (RPM) e aceleração de 0,1 revolução/segundo, pelo período máximo de 5 min, sendo a latência para queda (em s) registrada numa única sessão de teste (SHIOTSUKI et al., 2010).

3.2.13.3 Teste do Nado forçado

O teste do nado forçado é o mais utilizado e reconhecido como modelo farmacológico para a avaliação de comportamentos relacionados à depressão (PORSOLT et al., 1978). Os ratos machos com 60 dias de idade foram forçados a nadar, individualmente, em um recipiente cilíndrico aberto de PVC (60 cm de altura, 30 cm de diâmetro) preenchido com água ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) até altura de 40 cm. No dia anterior ao teste, os animais foram colocados para nadar neste cilindro durante 15 minutos (sessão de treino) e após 24 horas eles foram reexpostos ao cilindro com água durante 5 minutos (sessão de teste). A duração total dos tempos de imobilidade e de escalada durante o teste (5 min) foram avaliadas e utilizadas como um parâmetro tipo depressivo. Uma câmera de vídeo digital montada sobre o tanque registrou o comportamento dos ratos durante o teste. As seguintes medidas foram avaliadas: (i) tempo de imobilidade: o animal estava completamente imóvel, sem movimentos de membro, cauda ou cabeça; (ii) tempo de escalada: movimentos da pata dianteira contra a parede do tanque trazendo parte do corpo para fora da água (Figura 9). Imediatamente após o teste, cada animal foi removido da água, secado com toalha e retornado à sua gaiola doméstica. A água do tanque foi trocada e o cilindro foi enxaguado com água limpa após cada rato.

Figura 9 - Ratos submetidos ao teste do nado forçado (TNF).



Durante o TNF, os ratos podem se envolver em pelo menos duas formas diferentes de comportamento: imobilidade e escalada.

FONTE: Figura adaptada de Cryan, Markou e Lucki, 2002.

3.2.13.4 Consumo de sacarose

O teste de consumo de sacarose consiste de protocolo de livre escolha entre duas soluções, água e sacarose 0,8%, e tem sido extensivamente utilizado para avaliar os efeitos da anedonia induzida por estresse (WILLNER et al., 1987; WILLNER, 2005). O procedimento foi realizado em gaiolas individuais com livre acesso para comida. Cada rato foi provido com 2 garrafas de água (200 mL), uma em cada lado da gaiola, durante 24 horas para a fase de treinamento (1^o dia), onde o rato é adaptado a beber das duas garrafas. Após o treino, uma das garrafa foi trocada por outra contendo solução de sacarose 0,8% e 24 h depois as garrafas foram invertidas (2^o dia), para evitar o viés da preferência do animal por um lado específico, e mantidas por mais 24 h (3^o dia). As garrafas foram pesadas diariamente e completadas com água ou solução de sacarose 0,8%. O consumo de líquidos foi medido diariamente.

3.2.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações feitas em duplicatas em 3 a 4 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste *t* de Student, teste *t* com correção de Welch, ANOVA de uma via seguida de pós-teste com comparações múltiplas (Bonferroni) ou ANOVA de duas vias usando GraphPad InStat versão 3.01 e GraphPad Prism versão 5.0, GraphPad software Inc, (La Jolla, Califórnia, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$.

3.2.15 Simulações de acoplamento e dinâmica molecular

O estudo do acoplamento e dinâmica molecular foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Guilherme Razzera Maciel (Departamento de Bioquímica/UFSC). O software Autodock vina (TROTT; OLSON, 2010) foi utilizado para o acoplamento molecular. O receptor NMDA foi preparado para o encaixe usando Chimera 10.1 (PETTERSEN et al., 2004) em parâmetros padrão e campo de força AMBER (WANG et al., 2004). Os ligantes do glifosato e do ácido glutâmico foram selecionados a partir do banco de dados Zinc (IRWIN; SHOICHET, 2005). O glifosato usado foi modelado com carga líquida -2 em pH 7. Resíduos flexíveis, 3Å do centro ligado ao ligante (bolsas de ácido glutâmico ou glicina), foram utilizados para correr a análise de acoplamento. A postura ΔG inferior com RMSD (valor de desvio da raiz quadrada

média, sigla do inglês, “Root Mean Square Deviation”) inferior ao ligando cristalográfico foi selecionada para simulações de dinâmica molecular (DM). A ligação do glifosato selecionada a partir da análise de acoplamento usando a estrutura de 4NF8 PDB (sigla do inglês “Protein Data Bank”) foi submetida a 12 ns de simulações de Dinâmica Molecular (glifosato no local de ligação da glicina e glifosato no local de ligação do glutamato). 4NF8, é uma estrutura cristalina do domínio de ligação do ligando GluN1/GluN2A em complexo com glicina e glutamato em solução PEG2000MME (Poli(etileno glicol) metil éter 2000). As simulações foram realizadas utilizando GROMACS 5.1.4 (VAN DER SPOEL et al., 2005). Foi utilizado o campo de força GROMOS96 43a1 e a topologia do ligando foi preparada pelo PRODGR 2.5 (SCHUTTELKOPF; VAN AALTEN, 2004). O tempo para todas as simulações foi de 2 fs. Primeiro, o complexo foi solvatado em uma caixa cúbica usando o modelo de água do tipo SPC (sigla do inglês “Simple Point Charge”) e o sistema foi neutralizado pela adição de contra-íons. Após a minimização de energia, duas DM de equilíbrio de 500 ps foram realizadas em condições NVP (com número de átomos (N), volume (V) e pressão (P) contantes) e NPT (isotérmico-isobárico ou com número de átomos (N), pressão (P) e temperatura (T) constantes). Para as corridas de equilíbrio, as restrições de posição foram aplicadas à proteína e aos backbones do ligando. Finalmente, a DM de produção de 15 ns foi realizada em condições NPT (T = 300K, P = 1 bar). As coordenadas Atom foram salvas a cada 10 ps. As energias de ligação em kJ/mol (eletrostática, solvatação polar, Van der Waals e SASA) foram calculadas usando a ferramenta MM-PBSA (KUMARI; KUMAR; LYNN, 2014) em cada 500 ps da dinâmica. Parâmetros padrões foram usados em todas as instâncias. A análise de ligação do ligando após a dinâmica de 12 ns foi analisada por LigPlot software (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995). PyMol (www.pymol.org) foi utilizado para criar as imagens.

3.2.16 Protocolo de tratamento das células C17.2 com HBG ou glifosato P.A. durante período de diferenciação neuronal – Estudo III

Todos os experimentos envolvendo cultura celular foram realizados durante o estágio sanduíche na Universidade de Uppsala/Suécia sob supervisão da Profª. Dra. Eva Brittebo e com colaboração do pesquisador Dr. Birger Scholz

3.2.16.1 Cultura e diferenciação celular

Para os experimentos foram utilizadas células C17.2, linhagem celular de células-tronco neurais derivadas de cerebelo de camundongo (Cat. 07062902, ECACC, Inglaterra, Salisbury). As células C17.2 foram semeadas em placas de 96 poços, previamente revestidas com poli-L-lisina 10 µg/mL, a uma concentração de 4000 células/poço. Nas primeiras 24 horas (DIV0 a DIV1, onde DIV: Dias *In Vitro*) as células foram mantidas em meio de cultura para proliferação (descrição do meio encontra-se na Tabela 1) e incubadas em uma atmosfera umidificada com 5% CO₂ e 95% de O₂ a 37 °C. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e submetidas à diferenciação neuronal pela adição do meio de diferenciação (Tabela 1) com ou sem HBG ou glifosato P.A. e novamente incubadas em uma atmosfera umidificada com 5% CO₂ e 95% de O₂ a 37 °C por diferentes períodos de tempo de diferenciação (24h, 3 dias ou 9 dias).

Tabela 1 - Diferentes meios utilizados durante a proliferação e a diferenciação das células C17.2.

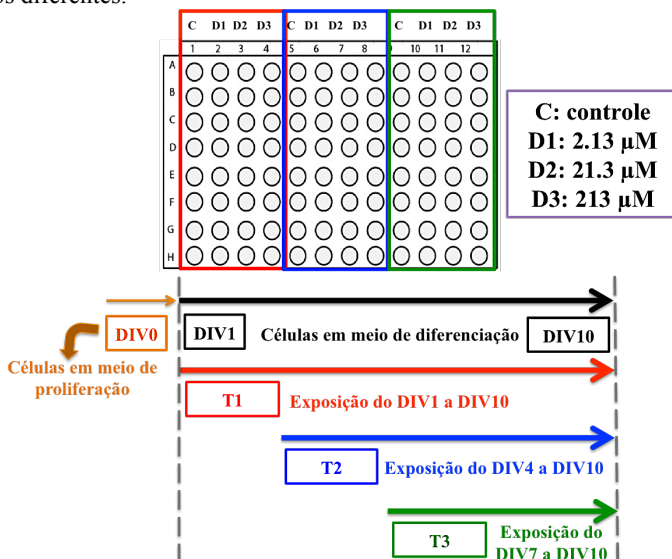
Meio de cultura (tempo)	Principais componentes	L-Gln	SFB	PE/ST	Suplemento
Proliferação (DIV0 a DIV1)	DMEM alta glicose	2 mM	10%	1%	-
Diferenciação neuronal (DIV1 em diante)	45% DMEM alta glicose sem glutamina + 45% Ham's F-12K com glutamina	3 mM	0,5%	1%	1% de N2

Abreviações: L-Gln, L-Glutamina; SFB, soro fetal bovino; PE/ST, penicilina/estreptomicina; DMEM, sigla do inglês "Dulbecco's Modified Eagle's médium".

Para os experimentos de diferenciação foram utilizadas células entre as passagens 4-6. As diferentes concentrações de HBG e glifosato P.A. utilizadas, bem como os diferentes tempos de exposição, variaram conforme desenho experimental (Tabela 2). As concentrações de HBG e o glifosato P.A. foram preparadas utilizando o meio de diferenciação. O grupo controle foi tratado apenas com o meio de diferenciação. A escolha das concentrações de HBG e glifosato P.A. foi baseada na dose utilizada no Estudo I, exposição *in vitro* de fatias hipocâmpais ao HBG, 213 µM. Para os estudos de curto prazo (24h e 3 dias) tanto de

exposição quanto de diferenciação, as células foram expostas a 5 concentrações diferentes de HBG ou glifosato P.A. (D1: 0,213 μM ; D2: 2,13 μM ; D3: 21,3 μM ; D4: 213 μM ; D5: 2130 μM) a partir do DIV1. Os tratamentos e tempos utilizados foram realizados individualmente por placa, por exemplo, 1 placa de 96 poços para glifosato P.A. 24h, 1 placa para HBG 24h, e assim por diante. Nos estudos de longo prazo (9 dias em meio de diferenciação – DIV1 a DIV10) as células foram divididas em 3 grupos com diferentes tempos de exposição (Tempo 1 (T1): DIV1 a DIV10; T2: DIV4 a DIV10; T3: DIV7 a DIV10) e com 3 concentrações de HBG e glifosato (D1: 2,13 μM ; D2: 21,3 μM ; D3: 213 μM) em cada grupo, conforme figura abaixo (tabela 2; Figura 10). A cada novo grupo exposto o meio de cultura dos demais também era substituído. Os tratamentos foram realizados individualmente por placa, por exemplo, 1 placa de 96 poços para o glifosato P.A. e 1 placa para o HBG. As exposições foram iniciadas no DIV1 ou DIV4 ou DIV7 e finalizadas no DIV10.

Figura 10 - Desenho experimental da diferenciação neuronal das células C17.2 no período de 9 dias (DIV1 a DIV10) expostas ao HBG ou glifosato P.A. em tempos diferentes.



Células C17.2 em meio de diferenciação (DIV1 ao DIV10) expostas ao HBG ou glifosato P.A. em períodos diferentes, dependendo de cada tempo (T1: DIV1; T2: DIV4, T3: DIV7). As 3 concentrações escolhidas (2,13 μM ; 21,3 μM e 213 μM) foram mantidas em todos os tempos.

Tabela 2 - Desenho experimental (tempo em meio de diferenciação, tempos de exposição e concentrações) utilizado de acordo com a análise realizada.

Período de tempo em meio de diferenciação	Tempo de exposição	[]s de HBG ou Glifosato P.A. (μM)	Experimentos
24 horas	DIV1 a DIV2 (24h de exposição)	D1: 0,213 D2: 2,13 D3: 21,3 D4: 213 D5: 2130	-Contagem nuclear (Hoechst); -MitoTracker® Orange (atividade mitocondrial);
3 dias	DIV1 a DIV4 (3 dias de exposição)	D1: 0,213 D2: 2,13 D3: 21,3 D4: 213 D5: 2130	- Contagem nuclear (Hoechst); -Imunocitoquímica (VGluT1 e β -Tubulina III);
9 dias*	T1: DIV1 a DIV10 (9 dias de exposição); T2: DIV4 a DIV10 (6 dias de exposição) T3: DIV7 a DIV10 (3 dias de exposição)	D1: 2,13 D2: 21,3 D3: 213	- Contagem nuclear (Hoechst); -MitoTracker® Orange (atividade mitocondrial); - CellROX®; -Imunocitoquímica (VGluT1; β -Tubulina III; NMDAR1 e α -internexina);
3 dias**	DIV1 a DIV4	213 μM	RT-qPCR - VGluT1; - NMDAR1
9 dias**	DIV1 a DIV10	213 μM	RT-qPCR - VGluT1; - NMDAR1

DIV, Dias *In Vitro*; D1, concentração 1; T1, tempo 1; []s, concentrações; VGluT1, transportador vesicular de glutamato 1; NMDAR1, receptor ionotrópico de glutamato N-metil-d-Aspartato (NMDA); RT-qPCR, Transcrição Reversa (RT) e Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). *Em todos os tempos de exposição (T1, T2 e T3) todas as células foram diferenciadas durante 9 dias, o que mudou entre cada tempo foi apenas o dia de início da exposição com HBG ou glifosato P.A.. **Usados apenas para análise RT-qPCR.

3.2.16.2 Contagem celular (Hoechst), Avaliação da atividade mitocondrial (MitoTracker® Orange - MTO) e Detecção de espécies reativas (CellROX® Deep Red)

A contagem celular e a atividade mitocondrial foram avaliadas após tempo de diferenciação de 24 horas (DIV1 a DIV2, 24 horas de

exposição) e 9 dias (DIV1 a DIV10; T1, T2 e T3 de exposição). Após 9 dias em meio de diferenciação (DIV1 a DIV10; T1, T2 e T3 de exposição) também foi avaliada a detecção de espécies reativas. No DIV2 (24 h) e no DIV10 (9 dias), as células foram incubadas por 30 min a 37 °C com Hoechst 500 nM (coloração de contraste para ácido nucléico) e MTO 200 nM (marcador de atividade mitocondrial). No DIV10 as células também foram incubadas com CellROX® Deep Red 4 μM (marcador de estresse oxidativo). Em seguida, as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 3% e submetidas à análise utilizando o equipamento HCA (ImageXpress XLS, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA).

3.2.16.3 Imunocitoquímica

Análise imunocitoquímica foi realizada após exposição de 24 h (DIV1 a DIV2), 3 dias (DIV1 a DIV4) e 9 dias (DIV1 a DIV10; T1, T2 e T3 de exposição). No DIV2 ou DIV4 ou DIV10, as células C17.2 foram lavadas em PBS e fixadas durante 20 min em paraformaldeído 3%. Após fixação, as células foram permeabilizadas com Triton TX-100 0,3% durante 10 min, seguida de incubação durante 60 min com solução bloqueadora (5% de leite em pó desnatado em PBS (p/v)). Logo após, as células foram lavadas com PBS e incubadas com solução contendo os anticorpos primários (1% de leite em pó desnatado em PBS – p/v) “overnight” a 4 °C. No dia seguinte, as células foram novamente lavadas com PBS e incubadas com solução contendo os anticorpos secundários conjugados com fluoróforo (1% de leite em pó desnatado em PBS – p/v) durante 60 min em temperatura ambiente e protegido da luz. Para coloração de contraste dos ácidos nucléicos, as células foram incubadas com Hoechst (500 nM) por 30 min a temperatura ambiente e protegidas da luz. Os anticorpos primários utilizados foram: Ac policlonal de cabra anti-VGluT-1 (1:200), Ac policlonal de coelho Anti-β-III-Tubulina (1:300), Ac policlonal de coelho NMDAR1 (1:200) e Ac monoclonal de camundongo α-internexina (1:200). Os anticorpos secundários utilizados foram: donkey anti-cabra Alexa Fluor 555 (1:500), donkey anti-camundongo AlexaFluor 647 (1:500) e donkey anti-coelho Alexa Fluor 488 (1:500). Os anticorpos primários NMDAR1 e α-internexina foram utilizados apenas para estabelecer a diferenciação neuronal. Os dados foram analisados com auxílio do equipamento HCA (High Analysis Content - ImageXpress XLS).

3.2.16.4 Transcrição Reversa (RT) e Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Como complemento aos estudos de imunocitoquímica também foi investigada alteração da expressão do mRNA de VGluT-1 e NMDAR1 através da técnica de RT-qPCR após exposição ao HBG e glifosato P.A. durante diferenciação neuronal por 3 ou 9 dias. Todas as células (exceto as do grupo controle) foram expostas a mesma concentração de HBG ou glifosato P.A. (213 μ M) a partir do DIV1. A extração do RNA foi realizada no DIV4 ou DIV10. O RNA foi isolado com Trizol e para cada amostra foi coletado o conteúdo de 4 poços, totalizando 6 tratados e 6 controles para cada um dos tratamentos. A extração do RNA com Trizol foi seguida pela purificação do mesmo utilizando RNeasy Micro Kit (QIAGEN). Os procedimentos para purificação seguiram as recomendações do fabricante do kit comercial e os pellets foram ressuspensos em água livre de nuclease. RNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e 1 μ g foi utilizado para síntese de DNA complementar (cDNA). A síntese de cDNA foi realizada em placas de 96 poços utilizando o kit comercial iScriptTM cDNA synthesis kit (BIORAD), seguindo as recomendações do fabricante. A qPCR foi posteriormente conduzida usando amostras com iTaq Universal SYBR Green Supermix (BIORAD) no sistema em tempo real CFX ConnectTM (BioRad). Na corrida de qPCR, 1 μ L do cDNA sintetizado foi transferido para um nova placa já contendo 19 μ L de uma mistura de primers e nucleotídeos. A concentração final dos primers foi de 300 nM. A quantidade dos genes utilizados como controle interno (Tbp e β -actina) e como genes de interesse (VGluT-1 e NMDAR1) foi avaliada individualmente para cada uma das amostras. A RT-qPCR foi realizada em duas etapas: RT (síntese de cDNA): 1 ciclo de 95 °C por 2 min; qPCR: 40 ciclos de 95 °C durante 7 s seguidos por ciclo de 59 °C durante 26 s seguido por ciclo de 72 °C durante 12 s. A qualidade dos primers foi controlada com subsequente análise da curva de fusão. Tanto a síntese de cDNA quanto a preparação das amostras com SYBR Green foram conduzidas automaticamente com auxílio de braço mecânico BIOMEK4000 para redução de variações na técnica. As seqüências nucleotídicas para os genes de interesse foram coletadas no banco de dados UCSC genome. Os primers Forward e Reverse para Tbp, β -actina, VGluT-1 e NMDAR1 (Tabela 3) foram desenhados nas regiões conservadas do exon usando ferramenta online para desenho de primers, Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). A análise dos

dados da corrida de qPCR foi realizada utilizando o método 2ddCT com Tbp e β -actina como genes de controle interno. Significância estatística foi calculada utilizando programa computacional “R” comparando o grupo controle e grupo tratado com HBG ou glifosato P.A. em cada ponto de tempo (DIV4 e DIV10) com o teste *t* com correção de Welch.

Tabela 3 - Sequências dos primers utilizados na qPCR.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
Tbp	GGGGAGCTGTGATGT	CCAGGAAATAATTCT
β - Actina	GTGCTCTGACAACCACAGG	CCTCTATGCCAACACAGTGC
VGluT-1	GGGACTTGCTATGATGTTTGC	TGTGCTAACCTTGTGCTTGG
NMDAR1	CGTTCTTGCCGTTGATTAGC	CTGAACATGACTGGCTCTGG

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram realizados três estudos usando diferentes protocolos experimentais com intuito de avaliar a toxicidade do herbicida glifosato durante o neurodesenvolvimento e também as diferenças quanto toxicidade da formulação comercial, o princípio ativo glifosato e seu principal metabólito AMPA em hipocampo de ratos.

Cada estudo (I, II e III) contém descrição dos resultados, bem como discussão e conclusões parciais.

4.1 ESTUDO I: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HBG, DO GLIFOSATO P.A. E DE SEU METABÓLITO AMPA SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM HIPOCAMPO DE RATOS IMATUROS (PND15) APÓS EXPOSIÇÃO *IN VITRO*.

Neste estudo avaliamos os efeitos neurotóxicos da exposição aguda de fatias de hipocampo de ratos imaturos ao HBG, glifosato P.A. e AMPA. Com intuito de avaliar os efeitos no sistema nervoso em desenvolvimento foram utilizados ratos com 15 dias de idade. Em ratos, o período entre o 11^o e o 20^o dia pós-natal está associado com o pico da sinaptogênese (SUTOR; LUHMANN, 1995).

O fracasso na proliferação celular ou na migração celular devido à exposição a tóxicos tem efeitos deletérios profundos no cérebro em desenvolvimento. Embora os neurônios mantenham a capacidade de realizar novas sinapses ao longo da vida, o período de desenvolvimento cerebral, quando ocorre a sinaptogênese, é fundamental para a formação dos circuitos básicos do sistema nervoso (GIORDANO; COSTA, 2012).

4.1.1 Envolvimento do cálcio no mecanismo de toxicidade induzido pelo glifosato P.A. e pelo AMPA.

Para investigar o efeito do glifosato P.A. e do AMPA sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, fatias hipocampais foram incubadas com $0,1 \mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ durante 30 minutos com 36 ppm de glifosato P.A. ou de AMPA. Conforme demonstrado na Figura 11, os resultados mostraram que a exposição ao AMPA levou ao aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, sugerindo que este metabólito é capaz de induzir uma excitotoxicidade através do acúmulo intracelular de Ca^{2+} . Nenhuma alteração foi observada no influxo deste íon após tratamento com o glifosato P.A.

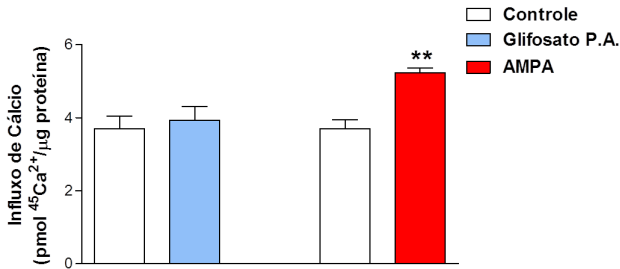


Figura 11 - Efeito da exposição *in vitro* ao glifosato P.A. e ao AMPA sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampo de ratos imaturos, PND15. As fatias hipocâmpais foram incubadas na presença ou ausência de 36 ppm de glifosato ou 36 ppm de AMPA durante 30 min. Os experimentos foram realizados individualmente e cada tratamento foi comparado com o respectivo controle. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. ** $p < 0,01$, quando comparado com o grupo controle.

4.1.2 Participação do sistema glutamatérgico na toxicidade ocasionada pelo glifosato P.A. e pelo AMPA sobre células hipocâmpais

O efeito da exposição aguda das fatias hipocâmpais de ratos imaturos ao glifosato P.A. e ao AMPA foi avaliado sobre a captação específica de ^{14}C -glutamato dependente de Na^+ (Figura 12), a qual representa a principal forma de retirada do glutamato da fenda sináptica. Esta captação é feita principalmente por transportadores específicos presentes na membrana plasmática dos astrócitos.

Quanto aos resultados *in vitro* não foram observadas alterações significativas na captação de ^{14}C -glutamato dependente de Na^+ (Figura 12) tanto após tratamento com o glifosato P.A. quanto com o AMPA. Na captação independente de Na^+ (dados não mostrados) também não houve diferenças entre os grupos controle e tratado de ambos os compostos.

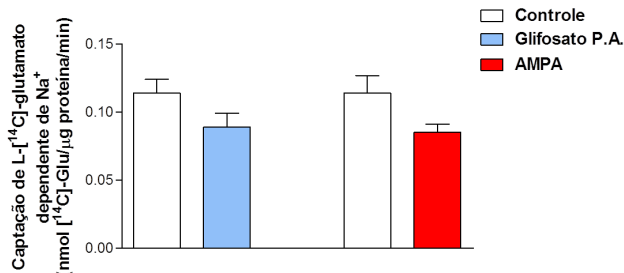


Figura 12 - Efeito da exposição *in vitro* ao glifosato P.A. e ao AMPA sobre a captação específica de ¹⁴C-glutamato no hipocampo de ratos imaturos, PND15. As fatias hipocampais foram incubadas na presença ou ausência de 36 ppm de glifosato P.A. ou 36 ppm de AMPA durante 30 min. Os experimentos foram realizados individualmente e cada tratamento foi comparado com o respectivo controle. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student.

O glutamato extracelular captado pelos astrócitos através de transportadores presentes na membrana das células gliais irá reagir com a amônia para formar glutamina em uma reação mediada pela enzima GS. Esta enzima faz parte do ciclo glutamato-glutamina e está envolvida no metabolismo do glutamato. Os experimentos *in vitro* tanto após exposição ao glifosato P.A. quanto ao AMPA (Figura 13) demonstraram uma diminuição na atividade da GS.

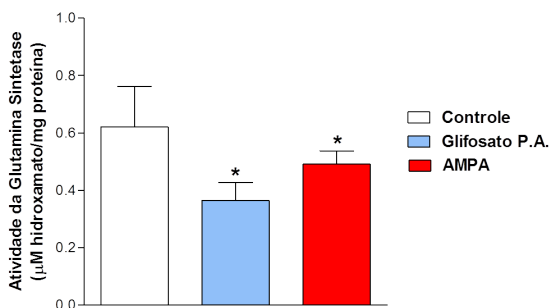


Figura 13 - Efeito da exposição *in vitro* ao glifosato P.A. e ao AMPA sobre a atividade da enzima glutamina sintetase (GS) no hipocampo de ratos imaturos, PND15. As fatias hipocampais foram incubadas na presença ou ausência de 36 ppm de glifosato P.A. ou 36 ppm de AMPA durante 30 min. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. **p*<0,05, quando comparado ao grupo controle.

4.1.3 Estudo da ação do HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a atividade da enzima colinesterase em fatias hipocampais de ratos imaturos, PND15

De acordo com a sua estrutura química, o glifosato é classificado como um herbicida pertencente a classe dos organofosforados. Esta classe de pesticidas é conhecida por inibir a enzima acetilcolinesterase na junção neuromuscular (DI GIULIO; NEWMAN, 2013). Apesar deste efeito ser comum entre os inseticidas e não entre os herbicidas organofosforados, diversos estudos envolvendo espécies não mamíferas demonstraram uma inibição da acetilcolinesterase pelo glifosato (CATTANEO et al., 2011; MENENDEZ-HELMAN et al., 2012). Portanto, neste estudo foi avaliada a atividade desta enzima em fatias hipocampais de ratos PND15 expostas ao HBG, glifosato P.A. ou AMPA (Figura 14).

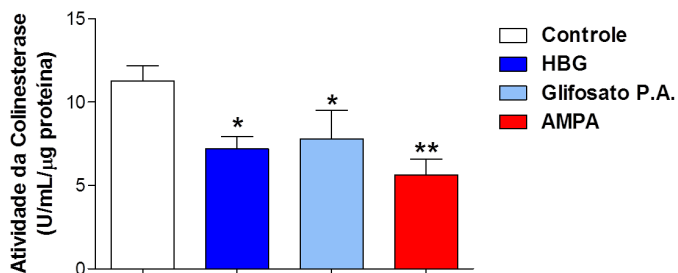


Figura 14 - Efeito da exposição *in vitro* ao HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a atividade da enzima colinesterase no hipocampo de ratos imaturos, PND15. As fatias hipocampais foram incubadas na presença ou ausência de 0,01% HBG (36 ppm de glifosato), 36 ppm de glifosato P.A. ou 36 ppm de AMPA durante 30 min. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle.

Podemos verificar que tanto o HBG, quanto o glifosato P.A. e o AMPA foram capazes de diminuir a atividade da colinesterase no hipocampo dos animais após exposição *in vitro* a estes toxicantes.

4.1.4 Efeito da exposição *in vitro* de fatias hipocampais de ratos imaturos ao HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a captação de ^{14}C -2-desoxi-D-glicose e a atividade das enzimas aminotransferases (ALT e AST)

A barreira hematoencefálica impede a entrada do glutamato proveniente da circulação sanguínea, portanto, grande parte do glutamato sintetizado no cérebro é dependente da glicose plasmática. Neste contexto, foram investigadas possíveis alterações causadas pela exposição ao HBG, glifosato P.A. e AMPA na captação da ^{14}C -2-desoxi-D-glicose. A figura 15 demonstra que tanto a formulação comercial HBG quanto o metabólito AMPA promoveram um aumento da captação de glicose. No entanto, o mesmo não foi observado após exposição ao glifosato P.A., o qual provocou uma diminuição da captação da ^{14}C -2-desoxiglicose.

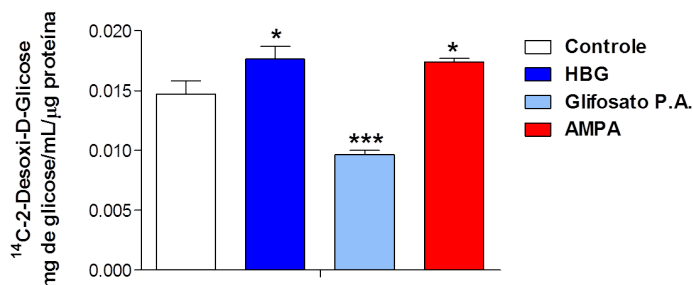


Figura 15 - Efeito do tratamento *in vitro* com HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a captação de ^{14}C -2-Desoxi-D-Glicose no hipocampo de ratos imaturos, PND15. As fatias hipocampais foram incubadas na presença ou ausência de 0,01% HBG (36 ppm de glifosato), 36 ppm de glifosato P.A. ou 36 ppm de AMPA durante 30 min. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle.

Uma vez dentro dos astrócitos a glicose pode seguir várias rotas metabólicas, inclusive entrar no ciclo de Krebs como acetil-CoA via piruvato desidrogenase. O intermediário do ciclo de Krebs, o α -cetoglutarato, pode dar origem ao glutamato por ação da glutamato desidrogenase, ou através de reações de transaminação catalisadas pela aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (BRADY et al., 2012). Por este motivo, também foi investigado o efeito

da exposição *in vitro* ao glifosato P.A. e ao AMPA sobre a atividade dessas aminotransferases. A figura 16 (A) mostra que após a exposição *in vitro* das fatias hipocâmpais de ratos imaturos ao glifosato P.A. foi verificada uma diminuição na atividade da ALT sem alterar a atividade da AST; quanto à exposição ao AMPA (Figura 16B), não foram observadas alterações quanto à atividade dessas enzimas.

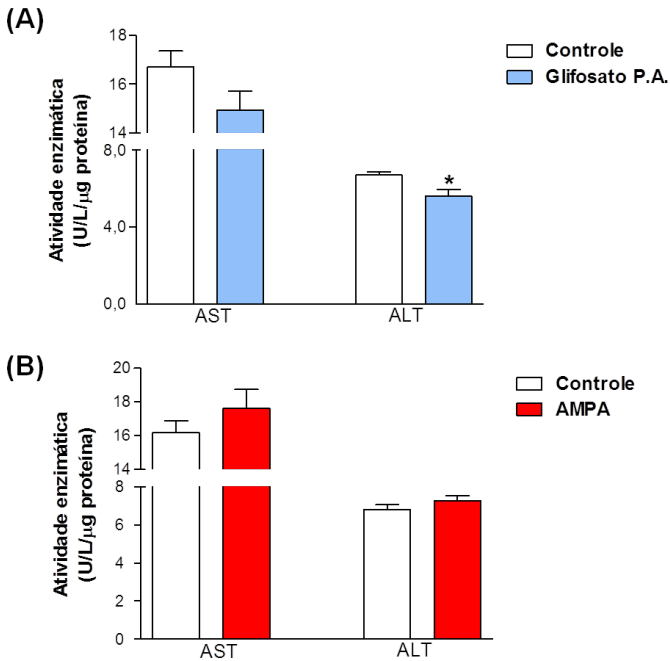


Figura 16 - Efeito do tratamento *in vitro* com glifosato P.A. (A) e AMPA (B) sobre a atividade das aminotransferases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no hipocampo de ratos imaturos, PND15. As fatias hipocâmpais foram incubadas na presença ou ausência de 36 ppm de glifosato P.A. ou 36 ppm de AMPA durante 30 min. Os experimentos foram realizados individualmente e cada tratamento foi comparado com o respectivo controle. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste *t* de Student. * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

4.1.5 Efeito da exposição *in vitro* ao HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo

Para avaliar uma possível indução de estresse oxidativo em fatias hipocâmpais de ratos imaturos expostas ao HBG, glifosato P.A. e AMPA, parâmetros como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram estudados.

Também foram avaliados a atividade das enzimas antioxidantes e os níveis de GSH. Nenhum aumento significativo nos níveis de TBARS foram encontrados tanto no grupo tratado com o glifosato P.A. quanto no tratado com o AMPA (Figura 17).

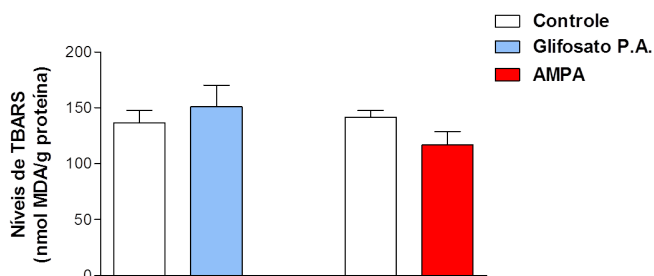


Figura 17 - Efeito do tratamento *in vitro* com glifosato P.A. e AMPA nos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de ratos imaturos, PND15. Resultados foram expressos como níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) decorrentes da lipoperoxidação. As fatias hipocâmpais foram incubadas na presença ou ausência de 36 ppm de glifosato P.A. ou 36 ppm de AMPA durante 30 min. Os experimentos foram realizados individualmente e cada tratamento foi comparado com o respectivo controle. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: Teste *t* de Student.

Para avaliar a oxidação de proteínas, os níveis de proteína carbonilada foram mensurados após exposição *in vitro* de fatias hipocâmpais de ratos imaturos ao HBG, glifosato P.A. e AMPA. Conforme pode ser observado na figura 18, somente após tratamento com a formulação comercial HBG foi observado um aumento significativo nos níveis de proteína carbonilada.

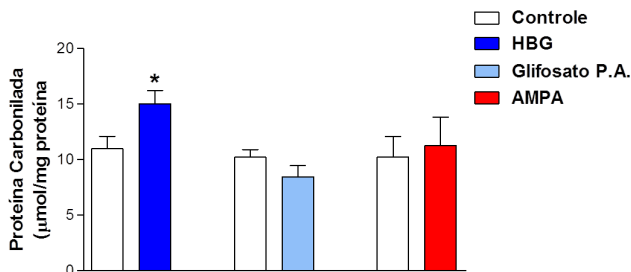


Figura 18 - Efeito do tratamento *in vitro* com HBG, glifosato P.A. e AMPA nos níveis de carbonilação de proteínas no hipocampo de ratos imaturos, PND15. As fatias hipocâmpais foram incubadas na presença ou ausência de 0,01% HBG (36 ppm de glifosato), 36 ppm de glifosato P.A. ou 36 ppm de AMPA durante 30 min. Os experimentos foram realizados individualmente e cada tratamento foi comparado com o respectivo controle. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student.* $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

A formação de EROs (figura 19) também foi investigada neste estudo. O aumento da fluorescência observado após tratamento *in vitro* com o glifosato P.A. indicou a presença de EROs nas fatias hipocâmpais tratadas com o princípio ativo. Entretanto, nenhuma diferença quanto ao grupo controle foi observada após tratamento com o HBG ou com o AMPA.

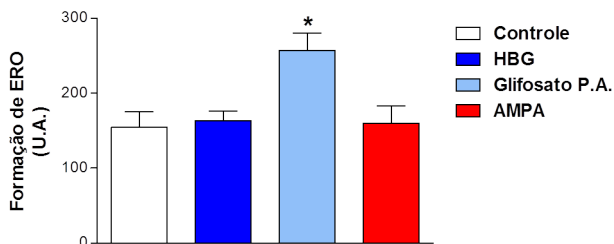


Figura 19 - Efeito do tratamento *in vitro* com HBG, glifosato P.A. e AMPA na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) no hipocampo de ratos imaturos, PND15. A formação de EROs foi avaliada utilizando a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA). As fatias hipocâmpais foram incubadas na presença ou ausência de 0,01% HBG (36 ppm de glifosato), 36 ppm de glifosato P.A. ou 36 ppm de AMPA durante 30 min. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni.* $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle.

Ainda investigando o papel do estresse oxidativo no mecanismo de toxicidade destes compostos, foram avaliadas as defesas antioxidantes enzimáticas (SOD, CAT, GPx, GR, GST, G6PD, GGT) e não enzimáticas (GSH).

Os resultados demonstraram que a formulação comercial HBG não alterou a atividade da SOD, entretanto, tanto o glifosato P.A. quanto o AMPA aumentaram a atividade desta enzima (Figura 20A). Quanto à atividade da CAT (Figura 20B), após tratamento com o glifosato P.A. foi verificada uma diminuição da atividade enquanto que após exposição ao HBG e ao AMPA foi observado um aumento da atividade.

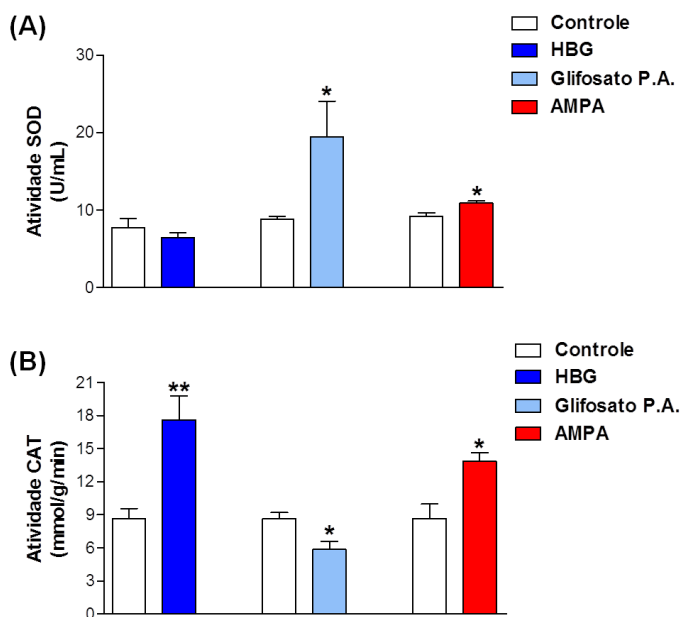


Figura 20 - Efeito do tratamento *in vitro* com HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (CAT) (B) no hipocampo de ratos imaturos, PND15. As fatias hipocâmpais foram incubadas na presença ou ausência de 0,01% HBG (36 ppm de glifosato), 36 ppm de glifosato P.A. ou 36 ppm de AMPA durante 30 min. Os experimentos foram realizados individualmente e cada tratamento foi comparado com o respectivo controle. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle.

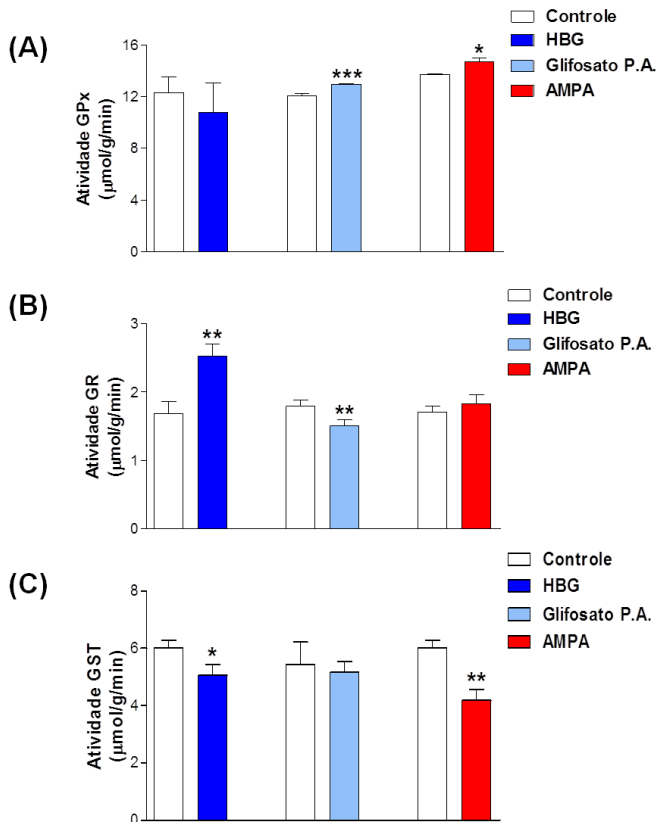


Figura 21 - Efeito do tratamento *in vitro* com HBG, glifosato P.A. e AMPA sobre a atividade das enzimas glutaciona peroxidase (GPx) (A), glutaciona redutase (GR) (B) e glutaciona S-transferase (GST) (C) no hipocampo de ratos imaturos, PND15. As fatias hipocampais foram incubadas na presença ou ausência de 0,01% HBG (36 ppm de glifosato), 36 ppm de glifosato P.A. ou 36 ppm de AMPA durante 30 min. Os experimentos foram realizados individualmente e cada tratamento foi comparado com o respectivo controle. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle.

Quanto a atividade da GPx, tanto após exposição ao glifosato P.A. quanto ao AMPA ocorreu um aumento na atividade desta enzima (Figura 21A). A enzima GR teve sua atividade aumentada após exposição ao HBG e diminuída após tratamento com o glifosato P.A.

(Figura 21B). Somente o tratamento *in vitro* das fatias hipocâmpais com o HBG ou com o AMPA demonstrou provocar uma diminuição na atividade da GST (Figura 21C).

Foram estudados os efeitos da exposição ao glifosato P.A. e ao AMPA nos níveis de GSH, bem como na atividade das enzimas G6PD e GGT, responsáveis pela disponibilidade de NADPH para a redução da glutatona e pela síntese *de novo* da GSH, respectivamente.

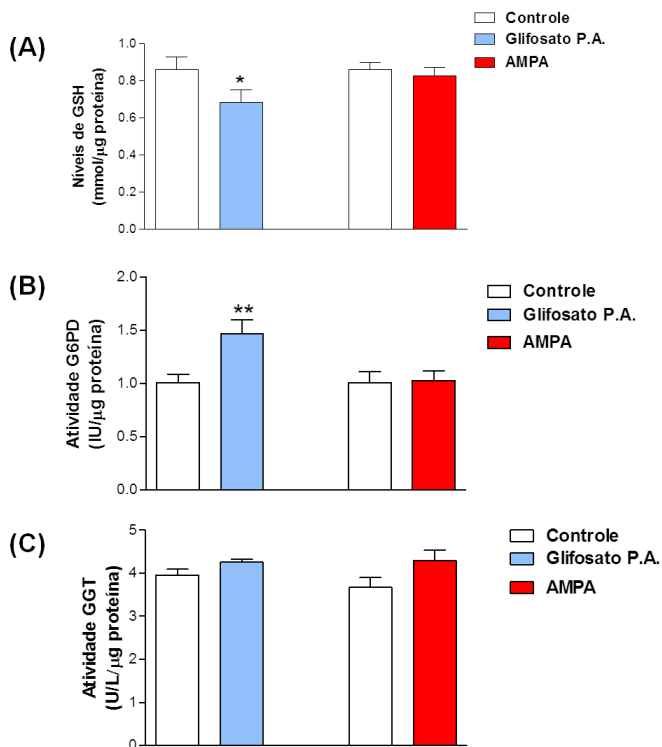


Figura 22 - Efeito do tratamento *in vitro* com glifosato P.A. e AMPA sobre os níveis de GSH (A) e a atividade das enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) (B) e gama-glutamil transferase (GGT) (C) no hipocampo de ratos imaturos, PND15. As fatias hipocâmpais foram incubadas na presença ou ausência de 36 ppm de glifosato P.A. ou 36 ppm de AMPA durante 30 min. Os experimentos foram realizados individualmente e cada tratamento foi comparado com o respectivo controle. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle.

Conforme demonstrado na figura 22, os níveis de GSH (Figura 22A) foram diminuídos apenas após exposição ao glifosato P.A., o qual também aumentou a atividade da G6PD (Figura 22B). Ambos, glifosato P.A. e AMPA não alteraram a atividade da GGT (Figura 22C).

4.1.6 Avaliação do envolvimento da via NF- κ B após exposição *in vitro* ao HBG em fatias hipocâmpais de ratos imaturos

Considerando que eventos neurotóxicos são frequentemente associados com neuroinflamação foi investigado o envolvimento da via NF- κ B após tratamento *in vitro* das fatias hipocâmpais de ratos PND15 com o HBG. Figura 23 demonstra que o tratamento *in vitro* das fatias com o HBG diminuiu a fosforilação da p65 da NF- κ B.

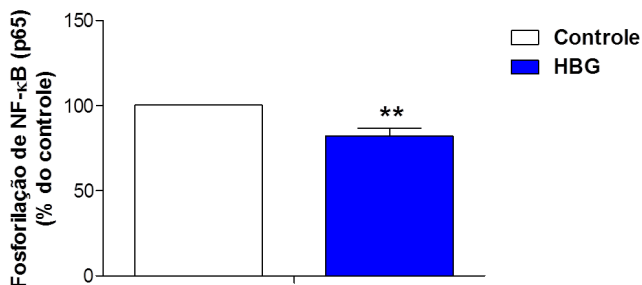


Figura 23 - Efeito do tratamento *in vitro* com HBG na ativação da via p65 NF- κ B em hipocampo de ratos imaturos, PND15. Os níveis total e fosforilado da p65 NF- κ B foram determinados por ELISA. As fatias hipocâmpais foram incubadas na presença ou ausência de 0,01% HBG (36 ppm de glifosato) durante 30 min. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais por grupo e expressos como % do controle. Análise estatística: teste *t* de Student. ** $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

4.1.7 Comparação dos efeitos do HBG, glifosato P.A. e AMPA após exposição *in vitro* das fatias hipocâmpais de ratos imaturos

Os resultados obtidos até o presente momento após exposição *in vitro* de fatias hipocâmpais de ratos imaturos (PND15) com HBG, glifosato P.A. ou AMPA durante 30 min foram compilados e resumidos na tabela 4. Resultados já publicados (marcados com *) estão disponíveis no artigo científico intitulado “Mechanisms underlying the

neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity”, publicado no periódico “Toxicology” no ano de 2014 e aqui citado como CATTANI et al., 2014 (ANEXO 1).

Tabela 4 - Comparação dos efeitos após tratamento *in vitro* de fatias hipocâmpais de ratos imaturos com HBG, glifosato P.A. e seu principal metabólito AMPA sobre diversos parâmetros neuroquímicos.

	HBG	Glifosato P.A.	AMPA
Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	↑ *	=	↑
Captação de [^{14}C]- Glu dep. de Na^+	↓ *	=	=
Captação de ^{14}C-2- Desoxi-D-Glicose	↑	↓	↑
Atividade da Colinesterase	↓	↓	↓
Atividade da GS	↓ *	↓	↓
Atividade da AST	↓ *	=	=
Atividade da ALT	↓ *	↓	=
Níveis de GSH	↓ *	↓	=
Atividade da G6PD	↓ *	↑	=
Atividade da GGT	↓ *	=	=
Atividade da GR	↑	↓	=
Atividade da GPx	=	↑	↑
Atividade da GST	↓	=	↓
Atividade da SOD	=	↑	↑
Atividade da CAT	↑	↓	↑
Níveis de TBARS	↑ *	=	=
Níveis de PC	↑	=	=
Formação de EROs	=	↑	=
NF-κB	↓	-	-

Legenda: Glu dep. de Na^+ , captação de glutamato dependente de sódio; GS, Glutamina sintetase; AST, Aspartato aminotransferase; ALT, Alanina aminotransferase; GSH, glutationa reduzida; G6PD, Glicose 6-fosfato desidrogenase; GGT, gamma-glutamilttransferase; GR, glutationa redutase; GPx, Glutationa peroxidase; GST, Glutationa S-transferase; SOD, Superóxido dismutase; CAT, catalase; TBARS, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; PC, proteína carbonilada; EROs, espécies reativos de oxigênio; (↑) aumento; (↓) diminuição; (=) parâmetro inalterado; (*) dados já publicados em CATTANI et al. (2014).

4.1.8 Discussão

Glifosato, como já foi descrito anteriormente, é atualmente o herbicida mais popular em uso na agricultura, sendo utilizado mundialmente em larga escala. Considerando-se que o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, esta liderança pode acarretar em consequências desastrosas, gerando impactos tanto ambientais quanto à saúde humana.

Nas preparações comerciais à base de glifosato, o princípio ativo é misturado com diferentes adjuvantes com o intuito de facilitar a penetração do agrotóxico nas membranas celulares das plantas, aumentando assim a lipossolubilidade da molécula (GRESS et al., 2015). Alguns autores sugerem que o produto formulado com estes surfactantes pode ser ainda mais tóxico que o herbicida isolado (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; MESNAGE; BERNAY; SÈRALINI, 2013; SRIBANDITMONGKOL et al., 2012; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V. et al., 2013), provavelmente em decorrência de um sinergismo entre os componentes presentes na formulação comercial.

A análise dos efeitos deletérios dos metabólitos dos agrotóxicos também mostra-se ser de grande importância para avaliar os riscos toxicológicos exercidos por esses. Há diversas evidências de que metabólitos e impurezas revelaram-se toxicologicamente mais potentes que seus compostos de origem (KWIATKOWSKA; HURAS; BUKOWSKA, 2014). O principal metabólito do glifosato, o AMPA, vem sendo apontado como um potente agente tóxico com efeito crônico. Em amostras de sangue humano após intoxicação aguda por glifosato já foi detectada a presença de AMPA (ZOUAOUI et al., 2013), sugerindo uma possível degradação do glifosato por microrganismos presentes no intestino humano. Guilherme e colaboradores (2014) avaliaram o potencial genotóxico representado pelo AMPA em peixes após exposições de curta duração (1 a 3 dias) em concentrações encontradas no ambiente (11,8 e 23,6 mg/L). Os autores utilizaram o ensaio cometa e a avaliação das alterações nucleares eritrocitárias para demonstrar danos no DNA e nos cromossomos, respectivamente. Os resultados apontaram para um potencial genotóxico do AMPA em peixes e enfatizaram a importância de incluí-lo em futuros estudos sobre a avaliação de risco de herbicidas à base de glifosato.

Considerando as evidências descritas acima, este estudo investigou as possíveis alterações ocasionadas pela exposição a um herbicida à base de glifosato (formulação comercial), ao glifosato P.A. e ao seu principal metabólito AMPA em modelos animais *in vitro*.

Através da exposição de fatias hipocampais de ratos imaturos foi possível avaliar e comparar o potencial neurotóxico do HBG, do glifosato P.A. e do AMPA.

Devido a grande importância que o Ca^{2+} possui para a função neuronal normal, também pelo fato que os níveis intracelulares deste íon são mantidos sob estrito controle pelas células (CLAPHAM, 1995; WEBER, 2012), e que altas concentrações do mesmo podem contribuir para a morte neuronal - o que está relacionado com desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (BIRD; PUTNEY, 2006; GLEICHMANN; MATTSON, 2009) - avaliou-se o efeito do glifosato P.A. e do AMPA no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampo de ratos imaturos. Os resultados apontam para um aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fatias hipocampais tratadas com o AMPA, o que não foi visto após tratamento com o glifosato P.A.. Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que o HBG causa um aumento na captação de cálcio em hipocampo de animais imaturos (CATTANI et al., 2014) e em células testiculares e de Sertoli de ratos de 30 dias idade (DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013), ambos após exposição *in vitro*. De Liz Oliveira Cavalli et al. (2013) também demonstraram um aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ após exposição ao glifosato P.A. em células testiculares. Em contrapartida aos nossos achados, George e Shukla (2013) demonstraram que o glifosato induziu um decréscimo na concentração intracelular de Ca^{2+} em células de queratinócitos humanos HaCaT.

Um excessivo influxo de Ca^{2+} através do estímulo ao receptor glutamatérgico NMDA é considerado uma importante causa de morte neuronal seguida da exposição a pesticidas (MCDONOUGH; SHIH, 1997; CATTANI et al., 2014). Esta morte é decorrente do conhecido fenômeno chamado de excitotoxicidade glutamatérgica, o qual está ligado a várias doenças neurodegenerativas. O processo de excitotoxicidade em neurônios glutamatérgicos baseia-se no aumento do glutamato na fenda sináptica o que leva a uma superativação de seus receptores, principalmente os ionotrópicos, como o NMDA, promovendo um aumento no influxo de cálcio para o meio intracelular (DANBOLT, 2001; PESSOA-PUREUR; WAJNER, 2007). Com isso, também investigamos a captação de ^{14}C -glutamato em fatias hipocampais de animais imaturos expostas ao AMPA e ao glifosato P.A., bem como a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo deste importante aminoácido excitatório, como a GS e as aminotransferases ALT e AST.

Não foram encontradas alterações na captação de ^{14}C -glutamato dependente de sódio tanto após exposição ao AMPA quanto ao glifosato P.A.. Estes resultados foram diferentes quando a avaliação foi feita após exposição ao HBG, uma vez que foi observada uma diminuição significativa na captação de L- ^3H]glutamato específica (dependente de Na^+) no hipocampo de animais com 15 dias de idade após exposição *in vivo* e *in vitro* (CATTANI et al., 2014).

Embora o glifosato P.A. e o AMPA não tenham alterado a captação de ^{14}C -glutamato, ambos os compostos promoveram uma diminuição na atividade da GS. Este efeito estaria indicando uma diminuição na conversão de glutamato em glutamina, com consequente aumento nos níveis de glutamato nos astrócitos, o qual pode ser novamente direcionado à fenda sináptica através de transportadores presentes na membrana astrocitária. Diminuição na atividade da GS também foi observado após exposição ao HBG (CATTANI et al., 2014) em hipocampus de ratos imaturos e após exposições ao manganês em cultura de astrócitos (DENG et al., 2012) e no SNC (SIDORYK-WEGRZYNOWICZ; ASCHNER, 2013). A conversão de glutamato em glutamina pela GS, realizada nos astrócitos, representa um mecanismo chave na regulação da neurotransmissão excitatória e diminuição de sua atividade vem sendo relacionado à epilepsia (SWAMY et al., 2011).

Com relação à atividade das enzimas aminotransferases ALT e AST, nenhuma alteração foi observada após exposição ao AMPA. O glifosato P.A. provocou uma diminuição apenas na atividade da ALT. Já em nosso trabalho anterior, envolvendo o HBG (CATTANI et al., 2014), foi demonstrado que a exposição *in vitro* de fatias hipocampais de ratos imaturos à formulação comercial leva a uma diminuição na atividade de ambas as enzimas. Em um estudo *in vitro* realizado por El-Demerdash, Yousef e Elagamy em 2001 foi demonstrado que tanto o glifosato quanto o paraquat são capazes de inibir as enzimas séricas AST e ALT após exposição *in vitro*. Por outro lado, Sinhorin e colaboradores (2014b) demonstraram que após exposição aguda ao HBG (Roundup® Original) ocorreu um aumento na atividade da ALT sérica em peixes. As enzimas aminotransferases ALT e AST são responsáveis pela conversão de aminoácidos como a alanina e o aspartato aos seus α -cetoácidos correspondentes (piruvato e oxaloacetato, respectivamente). A ALT está envolvida na síntese do neurotransmissor glutamato em neurônios glutamatérgicos (DESAI; DESAI, 2008). Portanto, a modulação na atividade da ALT observada após exposição ao glifosato P.A. pode afetar a disponibilidade de glutamato nas células neurais. Com base nos resultados anteriores do

grupo quanto à atividade dessas enzimas, pode-se verificar novamente uma maior toxicidade do HBG quando comparado ao glifosato P.A. e ao AMPA. Provavelmente devido ao sinergismo entre o princípio ativo e algum componente da formulação comercial, o que potencializaria o efeito tóxico deste herbicida.

O metabolismo energético nos neurônios requer a absorção de glicose e o consumo de oxigênio. A glicose é o combustível energético obrigatório no sistema nervoso central e é o único substrato capaz de sustentar completamente todas as atividades neurais. Os astrócitos requerem ATP para manter o processo de captação de glutamato e a despolarização neuronal. Estima-se que cerca de 90% da demanda de glicose do cérebro é utilizada para manter os gradientes necessários para a realização dessas ações. A glicose também é responsável por fornecer ao cérebro precursores de ribose-5-fosfato para a síntese de nucleotídeos e NADPH, o qual é requerido, além de outras funções, como doador de elétrons na reação para a redução da glutathione oxidada (MCKENNA et al., 2012). A maioria das doenças cerebrais está associada com mudanças regionais no metabolismo basal (SMALL et al., 2011). Portanto, investigamos a captação da ^{14}C -2-desoxi-D-glicose em fatias hipocâmpais de animais imaturos expostas ao HBG, ao glifosato P.A. ou ao AMPA.

Os resultados demonstraram um aumento na captação de ^{14}C -2-desoxi-D-glicose induzida pelo HBG e pelo AMPA, o que pode indicar uma maior demanda de ATP pelo astrócito para tentar manter o processo de captação de glutamato e evitar um aumento deste na fenda sináptica. Como demonstramos previamente (CATTANI et al., 2014), o HBG diminuiu a captação de ^{14}C -glutamato após exposição *in vitro*. Logo, o aumento na captação de glicose pode ser uma tentativa de suprir as alterações metabólicas causadas pela diminuição na captação de glutamato. Por outro lado, o glifosato P.A. provocou uma diminuição na captação de ^{14}C -2-desoxi-D-glicose. Inibição da captação de glicose decorrente da exposição ao glifosato P.A. pode estar indicando um déficit no metabolismo basal das células neuronais hipocâmpais. Outros agrotóxicos, como o malation e o paraquat, também já demonstraram provocar uma diminuição na captação de glicose. Em 1980, Chowdhury e colegas verificaram que uma única dose do agrotóxico malation reduziu consideravelmente a absorção de glicose no epitélio intestinal de ratos. Shibata e colaboradores (2010) demonstraram que o paraquat induziu diminuição na captação de glicose em células 3T3-L1.

Os agrotóxicos organofosforados são conhecidos por inibir a atividade da enzima colinesterase, o que resulta em um acúmulo de

acetilcolina na fenda sináptica. Este acúmulo provoca uma profunda excitação e disfunção dos neurônios colinérgicos no cérebro devido a super ativação de seus receptores (FULTON; KEY; 2001; BOELSTERLI, 2009). Esta super ativação dos receptores colinérgicos também pode resultar em desequilíbrio na atividade GABAérgica e glutamatérgica causando lesões neuronais. A perda da integridade da via colinérgica resulta em uma variedade de efeitos negativos que subsequentemente causam morte neuronal (CHEN, 2012; ZAGANAS et al., 2013; GÜNGÖRDÜ, 2013). O glifosato, mesmo sendo estruturalmente relacionado aos organofosforados, é considerado seguro quanto ao efeito sobre a atividade da colinesterase devido a falta de um grupo químico específico em sua molécula que indique neurotoxicidade (MESNAGE et al., 2015a). Entretanto, diversos estudos vem relatando uma inibição da colinesterase em estruturas cerebrais após exposição ao glifosato (GLUSCZAK et al., 2006; MODESTO; MARTINEZ, 2010; SALBEGO et al., 2010; CATTANEO et al., 2011). Mediante o exposto, procuramos avaliar a atividade da enzima colinesterase em fatias hipocampais de ratos imaturos após tratamento com HBG, glifosato P.A. e AMPA.

Os resultados demonstraram uma diminuição na atividade da colinesterase provocada por todos os toxicantes após exposição *in vitro* das fatias hipocampais. Salbego e colaboradores (2010) mostraram que exposições de longo prazo ao HBG afetam a atividade da acetilcolinesterase cerebral em peixes. Outro estudo envolvendo peixes também demonstrou que o HBG foi capaz de inibir a acetilcolinesterase em músculos e no cérebro dos animais (MODESTO; MARTINEZ, 2010). Em contrapartida, no trabalho de Kwiatkowsk, Nowacka-Krukowska e Bukowska (2014) não foram encontradas diferenças significativas que indicassem uma inibição da acetilcolinesterase após exposição ao HBG e respectivos metabólitos em eritrócitos humanos, os quais possuem uma acetilcolinesterase considerada bioquimicamente similar à presente nas sinapses neurais.

Geração excessiva e desregulada de EROs e ERNs, bem como um desequilíbrio no sistema enzimático antioxidante com consequente dano tecidual têm sido frequentemente demonstrados após exposição a diferentes pesticidas (BANERJEE et al., 1999; INBARAJ; CHIGNELL, 2004; GEHIN; GUYON; NICOD, 2006; FRANCO et al., 2009; LARSEN et al., 2012). As características anatômicas e fisiológicas do cérebro fazem com que este órgão seja especialmente vulnerável aos insultos decorrentes do excesso da produção de radicais livres, o qual é um fenômeno comum na neurotoxicidade (LEBEL; BONDY, 1991; BONDY; LEE, 1993).

Apesar dos mecanismos de toxicidade do glifosato não estarem bem evidenciados, crescentes achados quanto à geração de estresse oxidativo decorrentes da exposição a este agrotóxico implicam no fato de que este processo pode ser um dos potenciais mecanismo de ação do herbicida (ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014). Em 2005, Peixoto relatou que o Roundup® afeta a cadeia transportadora de elétrons ao nível dos complexos I e III, podendo aumentar então a produção do $O_2^{\cdot-}$, desencadeando assim um estado de estresse oxidativo e respostas antioxidantes. Diversos estudos envolvendo peixes também vem relacionando uma interferência no sistema antioxidante destes animais após exposição ao glifosato ou ao HBG (LUSHCHAK et al., 2009; CATTANEO et al., 2011; NWANI et al., 2013; SINHORIN et al., 2014b; WEBSTER; SANTOS, 2015), o qual também já foi demonstrado em espécies de anfíbios (GÜNGÖRDÜ, 2013). No entanto, o efeito da exposição ao glifosato ou ao HBG na atividade de enzimas antioxidantes, incluindo SOD, GST e CAT, variam consideravelmente de acordo com o protocolo experimental e as espécies utilizadas (ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014).

Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que após exposição *in vitro* ao HBG ocorreu diminuição nos níveis de GSH acompanhada da diminuição na atividade das enzimas G6PD e GGT (CATTANI et al., 2014). No presente estudo foi demonstrado diminuição na atividade da GST e aumento na atividade da GR e da CAT após exposição ao HBG. Nenhuma alteração foi encontrada quanto a atividade da GPx e da SOD. A enzima GR é responsável pela redução da glutathiona oxidada (GSSG) à glutathiona reduzida (GSH) às custas de NADPH (HUBER; ALMEIDA, 2008); portanto, o aumento da atividade desta enzima pode ser uma resposta compensatória para tentar reverter os baixos níveis de GSH induzidos pela exposição ao HBG. A exposição ao HBG também foi capaz de promover lipoperoxidação (CATTANI et al., 2014) e carbonilação de proteínas, sugerindo a indução de estresse oxidativo pela exposição à formulação comercial.

Depleção nos níveis de GSH e aumento da lipoperoxidação após tratamento com o HBG em fatias de hipocampo de ratos imaturos também já foram demonstrados por El-shenawy (2009) em tecido hepático de ratos adultos. Larsen e colaboradores (2014), no entanto, demonstraram um aumento nos níveis totais de GSH em frações subcelulares de fígado de ratos Wistar após exposição a uma formulação comercial de glifosato.

Quanto aos resultados encontrados após exposição ao glifosato P.A., foi visto que o mesmo promoveu uma redução nos níveis

de GSH, bem como uma diminuição da atividade da GR e da CAT e um aumento da atividade das enzimas G6PD, GPx e SOD. Nenhuma alteração foi observada quanto à atividade das enzimas GGT e GST. Estes resultados indicam que o aumento da atividade da SOD pode ser em resposta à formação do $O_2^{\cdot-}$. A enzima SOD promove a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , o qual pode ser convertido a água pela ação da GPx ou da CAT. Redução do H_2O_2 mediado pela GPx depende da doação de elétrons pela GSH, a qual apresenta-se com níveis diminuídos. Portanto, o aumento da atividade da G6PD, enzima das vias das pentoses responsável por gerar o agente redutor NADPH, pode ser decorrente da tentativa de manter os níveis de GSH para que a GPx possa atuar. A exposição ao glifosato P.A., apesar de não promover lipoperoxidação e carbonilação de proteínas na dose utilizada neste trabalho, demonstrou aumentar as concentrações de EROs em fatias hipocâmpais de ratos imaturos após exposição *in vitro*.

O metabólito AMPA promoveu um aumento na atividade das enzimas GPx, SOD e CAT e uma diminuição na atividade da GST. Nenhuma alteração foi observada quanto à atividade da GR, GGT e G6PD e aos níveis de GSH. Com base nesses resultados, podemos concluir que o AMPA pode estar levando à formação do $O_2^{\cdot-}$, o qual está sendo reduzido à água pela atuação da SOD, CAT e GPx, enzimas consideradas como as primeiras na linha de defesa contra as EROs.

A primeira linha de defesa contra as EROs é realizada pela SOD, uma metalo-enzima que catalisa a dismutação de dois radicais $O_2^{\cdot-}$ gerando H_2O_2 e água. O aumento da atividade pode ser observado tanto após exposição ao glifosato P.A. quanto ao AMPA. Ambos também promoveram um aumento na atividade da GPx, enzima considerada como a segunda na linha de defesa contra EROs, responsável pela redução do H_2O_2 à H_2O . A terceira enzima da linha de defesa é a CAT, que também realiza a conversão de H_2O_2 à H_2O (TUNÇMEN; TUZMEN, 2007). A CAT teve sua atividade diminuída após exposição ao glifosato P.A., em contrapartida, o metabólito AMPA e o HBG promoveram um aumento na atividade da enzima.

A importância da GSH para a função das células neurais deve-se ao fato deste tripeptídeo ser o componente mais importante nos processos de defesa contra a toxicidade de xenobióticos e componentes oxidantes a qual as células são expostas diariamente. Nossos resultados demonstraram diminuição nos níveis de GSH após tratamento *in vitro* das fatias hipocâmpais tanto com a formulação comercial HBG quanto com o glifosato P.A.. Esta diminuição pode ser decorrente do consumo de GSH por diversas reações (DICKINSON; FORMAN, 2002), como

por exemplo, via conjugação catalisada pela GST. Neste trabalho verificamos uma diminuição da atividade da GST em fâcias hipocâmpais de ratos imaturos após exposição ao HBG e ao AMPA. Moustafa e colaboradores (2016) também relataram uma diminuição nos níveis de GSH e na atividade da GST em soro de peixes expostos ao Roundup®.

A GST é uma importante enzima da biotransformação de fase II, protegendo a célula contra substâncias xenobióticas (BOELSTERLI, 2009). Portanto, diminuição da atividade desta enzima pode ser causada pelo fracasso do processo de desintoxicação e pelo desenvolvimento do estresse oxidativo (CATTANEO et al., 2011). Outros estudos envolvendo exposição a diferentes HBGs também relataram diminuição da atividade da GST (MENEZES et al., 2011; SAMANTA et al., 2014; GÜNGÖRDÜ; UÇKUN; YOĞLU, 2016).

No presente trabalho também avaliamos o envolvimento da via NF- κ B após exposição *in vitro* de fâcias hipocâmpais de ratos imaturos ao HBG. A fosforilação e a ativação da NF- κ B foram diminuídas pelo tratamento com o HBG, indicando um efeito deste herbicida sobre esta importante via. O fator nuclear NF- κ B é uma família de fatores de transcrição que regulam a expressão de mais de 150 genes envolvidos em uma ampla gama de processos, incluindo inflamação, imunidade, proliferação celular, diferenciação e sobrevivência. A ativação crônica ou a desregulação da sinalização da via NF- κ B é a principal causa na patogênese de muitas doenças. A desregulação desta via é associada com uma variedade de doenças infecciosas e não infecciosas, incluindo artrite reumatóide, asma, sepse, distúrbios neurodegenerativos e vários tipos de câncer (MOHAMED; MCFADDEN, 2009; PANDAY et al., 2016; GHOSH; DASS, 2016).

Pesticidas são utilizados no mundo inteiro como misturas chamadas de formulações, mas ainda hoje somente seu princípio ativo é estudado e testado em mamíferos. Adjuvantes presentes nas formulações, os quais são adicionados justamente com o intuito de melhorar a absorção do princípio ativo, são excluídos dos estudos de toxicidade (MESNAGE et al., 2014). Os resíduos de pesticidas quando encontrados na água, em alimentos e no meio ambiente provêm da formulação como um todo e não somente dos ingredientes ativos, os quais nunca são utilizados sozinhos. Portanto, com os resultados obtidos neste trabalho foi possível verificar a alteração de diferentes parâmetros bioquímicos após exposição *in vitro* de fâcias hipocâmpais à formulação comercial, ao princípio ativo e ao principal metabólito. Os resultados

indicaram diferenças quanto a atuação e o potencial de toxicidade do HBG, do glifosato P.A. e do AMPA.

Com relação aos resultados obtidos após exposição ao HBG, a redução da função da GS, concomitante com a redução da capacidade antioxidante, está provavelmente associada com a excitotoxicidade mediada pelo glutamato, o qual, ao menos em parte, é responsável pela sobrecarga de Ca^{2+} intracelular (CATTANI et al., 2014). O estresse oxidativo e a excitotoxicidade são eventos frequentes em diversas doenças que acometem o SNC. Uma importante correlação entre exposição ocupacional a pesticidas e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como as doenças de Parkinson (WANG et al., 2006) e de Alzheimer (HAYDEN et al., 2010) são descritas.

Resultados obtidos após exposição ao glifosato P.A. demonstraram que o mesmo não promoveu alterações no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e na captação de ^{14}C -glutamato apesar de diminuir a atividade da GS. Sendo assim, o fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica observado após o tratamento com o HBG não foi verificado com o glifosato P.A.. Entretanto, o glifosato P.A. promoveu alterações na atividade de algumas enzimas antioxidantes, indicando uma possível promoção de estresse oxidativo por parte deste herbicida.

O metabólito AMPA, apesar de não alterar a captação de ^{14}C -glutamato, alterou os níveis de Ca^{2+} intracelular e diminuiu a atividade da GS. Estes resultados podem estar indicando um aumento dos níveis de glutamato na fenda sináptica, o que leva a um aumento no influxo de Ca^{2+} com consequente geração de EROs, como o $\text{O}_2^{\cdot-}$. De fato, podemos observar que o AMPA promoveu um aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT, mesmo não alterando os níveis do principal antioxidante não enzimático, GSH. O AMPA é geralmente considerado menos tóxico que o glifosato, entretanto, alguns estudos tem demonstrado seu potencial genotóxico em diferentes tecidos (MAÑAS et al., 2009; BATTAGLIN et al., 2014; GUILHERME et al., 2014). Esses resultados chamam a atenção para a importância em incluí-lo em estudos futuros acerca dos riscos à saúde humana provocados pelas formulações comerciais que contêm glifosato.

Quando comparamos a toxicidade do HBG, do glifosato P.A. e do AMPA sobre fatias hipocámpais de ratos imaturos expostas de forma aguda (Tabela 4, figura 24), observamos que a formulação comercial demonstrou ser mais tóxica que seu ingrediente ativo e seu principal metabólito na maioria dos parâmetros bioquímicos avaliados. Diversos dados da literatura demonstram que a formulação comercial apresenta maior toxicidade em relação ao seu princípio ativo, glifosato (ADAM et

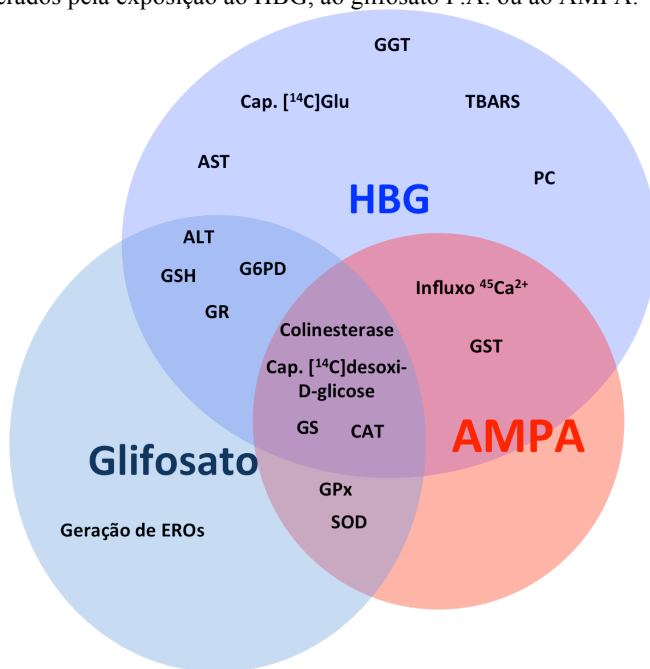
al., 1997; WALSH et al., 2000; MARC et al., 2002; RICHARD et al., 2005; PEIXOTO, 2005; BENACHOUR, et al., 2007; BENACHOUR; SÉRALINI, 2009; GASNIER et al., 2009; EL-SHENAWY, 2009; KOLLER et al., 2012; MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013; CHAUFAN; COALOVA; RÍOS DE MOLINA, 2014; DEFARGE et al., 2016). A maioria dos estudos propõem que a presença de adjuvantes como o tensoativo POEA, o qual serve para melhorar a estabilidade do agrotóxico e sua penetração nas células, pode potencializar os efeitos tóxicos do herbicida através de um sinergismo entre os componentes da formulação (SAWADA et al., 1988; BRADBERRY; PROUDFOOT; VALE, 2004).

Em resumo, os resultados presentes neste trabalho indicam que a exposição das fatias hipocâmpais ao HBG, ao seu princípio ativo glifosato ou ao seu metabólito AMPA, mesmo por curto período de tempo, podem induzir danos ao hipocampo. Estes danos provavelmente são decorrentes da promoção de estresse oxidativo. Diferenças entre a formulação comercial e seu princípio ativo devem ser estudadas com o intuito de estabelecer o risco real que os agrotóxicos oferecem à saúde humana.

4.1.9 Conclusões parciais

- A formulação comercial foi mais tóxica que o glifosato P.A. e o AMPA na maioria dos parâmetros estudados;
- Dentre todos os 18 parâmetros avaliados somente em dois (na atividade da colinesterase e da GS) todos os compostos apresentaram o mesmo efeito, demonstrando assim individualidades quanto aos mecanismos de toxicidade dos mesmos (Figura 24);
- Todos os compostos, de maneira diferente, mostraram ser capazes de alterar a atividade dos sistemas de defesa antioxidante aqui estudados;
- Apesar de apenas o glifosato P.A. aumentar o conteúdo de EROs, a lipoperoxidação e a carbonilação de proteínas foram aumentadas significativamente somente após exposição ao HBG;
- Em resumo, as alterações neuroquímicas observados nas fatias de hipocampo de ratos imaturos expostas ao HBG, ao glifosato P.A. ou ao AMPA são um indicativo do potencial neurotóxico destas substâncias.

Figura 24 - Diagrama de Venn representativo dos parâmetros bioquímicos alterados pela exposição ao HBG, ao glifosato P.A. ou ao AMPA.



Cada círculo representa um composto e os parâmetros bioquímicos alterados por ele. Os conjuntos representam parâmetros alterados por: HBG e glifosato P.A.; glifosato P.A. e AMPA; AMPA e HBG; e o conjunto central representa alterações induzidas por todos. Os conjuntos não representam os efeitos iguais mas sim as alterações.

4.2 ESTUDO II: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HBG SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, DE ESTRESSE OXIDATIVO E COMPORTAMENTAIS EM HIPOCAMPO DE RATOS IMATUROS (PND15) E ADULTOS (PND60) APÓS TRATAMENTO *IN VIVO*

Em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, envolvendo a exposição materna ao glifosato, demonstramos que o tratamento *in vivo* com o HBG durante os períodos pré e pós-natal provocou estresse oxidativo no hipocampo de ratos imaturos (PND15). Este resultado foi provavelmente em consequência ao aumento no influxo de cálcio via receptor glutamatérgico NMDA observado no hipocampo dos animais (CATTANI et al., 2014). Portanto, o presente estudo foi realizado com o intuito de avaliar se esses efeitos da exposição materna ao HBG durante os períodos gestacional e lactacional irão persistir após exposição prolongada até a fase adulta (PND60).

4.2.1 Efeito da exposição ao HBG no ganho de massa corporal e no bem-estar dos filhotes

O protocolo experimental utilizado no presente estudo foi delineado para evitar ou minimizar a dor e o estresse intencional nos animais. Todos os animais foram monitorados diariamente durante o tratamento e não foram observados sinais de dor e/ou angústia, como ataxia, canibalismo ou abandono da prole, “licking” e arranhões excessivos, perda de apetite, bem como piloereção. Além disso, não foram observadas malformações corporais tanto no grupo tratado quanto no grupo controle. A exposição ao HBG também não provocou mortalidade entre os filhotes. No entanto, a análise estatística mostrou que o ganho de massa corporal dos filhotes do grupo tratado com HBG foi menor em relação ao ganho de peso dos filhotes do grupo controle (Figura 25).

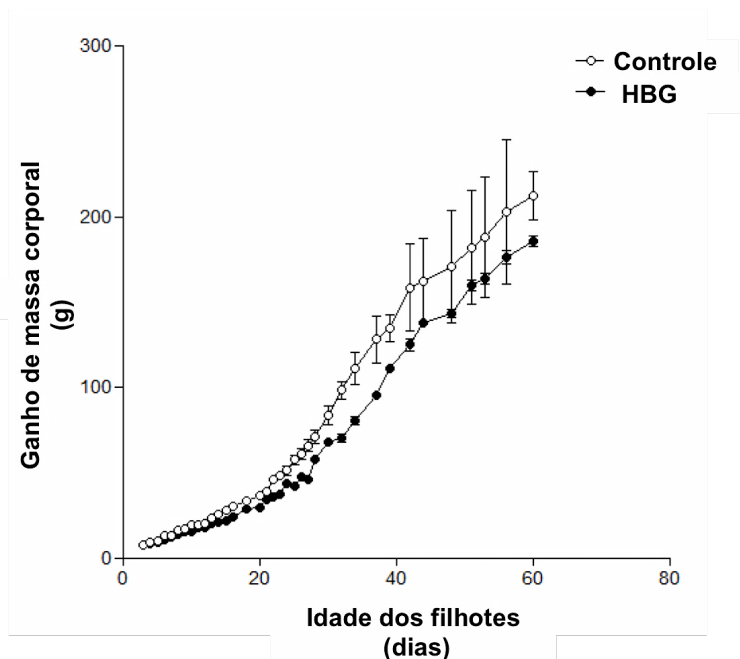


Figura 25 - Efeito da exposição subcrônica ao HBG no ganho de peso corporal dos filhotes machos (PND1 ao PND60). O peso corporal dos filhotes machos tanto do grupo controle quanto do grupo tratado foi monitorado diariamente entre o PND1 e o PND60. Dados foram expressos como média \pm S.D. de 15 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias onde, $p < 0,0001$ e $F = 187,1$ para tratamento.

4.2.2 Envolvimento do cálcio e do glutamato no mecanismo de neurotoxicidade induzida pelo HBG em ratos adultos (PND60) após tratamento *in vivo*

No estudo anterior demonstramos que a exposição materna ao HBG diminuiu a captação de glutamato e aumentou o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células hipocâmpais de ratos PND15 (CATTANI et al., 2014). No presente estudo, os resultados mostraram que a exposição subcrônica ao HBG também provocou diminuição da absorção glial de ^{14}C -glutamato dependente de Na^+ (Figura 26B) no hipocampo de ratos adulto (PND60). Esta diminuição pode levar a um acúmulo do neurotransmissor na fenda sináptica e a uma contínua excitação de seus receptores como o NMDA, responsável por promover influxo de cálcio para o meio intracelular. A Figura 26A mostrou o aumento no influxo

de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzido pela exposição subcrônica ao HBG. Juntos esses dados sugerem a indução de excitotoxicidade glutamatérgica em decorrência da exposição ao HBG.

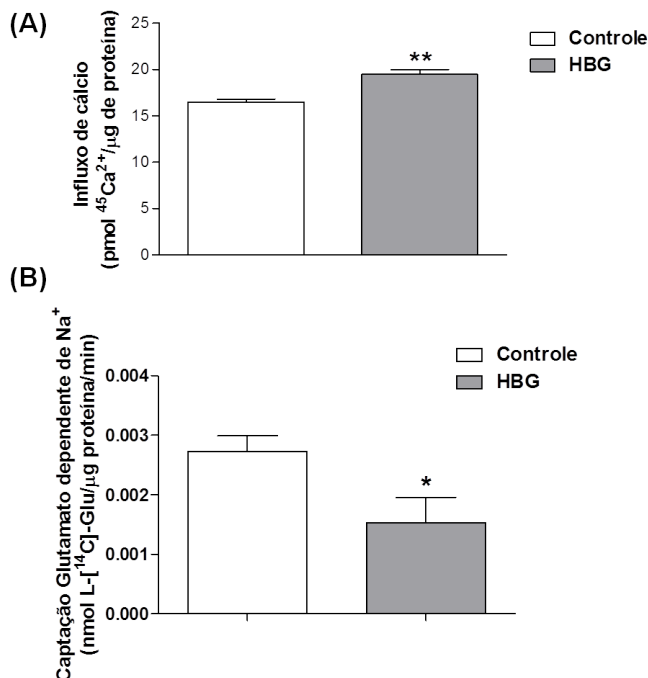


Figura 26 - Efeito da exposição subcrônica ao HBG sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (A) e a captação de [^{14}C]-glutamato (B) em hipocampo de ratos PND60. Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber desde o período gestacional até a fase adulta, PND60. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

4.2.3 Simulações de acoplamento e dinâmica molecular do glifosato no receptor NMDA

Os receptores NMDA desempenham um importante papel na plasticidade sináptica, memória e aprendizagem. Por meio do uso de ferramentas farmacológicas nós já demonstramos que o mecanismo de influxo de cálcio induzido pelo glifosato no hipocampo de ratos ocorre devido ao excesso de estimulação dos receptores NMDA (CATTANI et

al., 2014). Estes receptores são ativados quando o glutamato e a glicina se ligam a ele, permitindo que os íons carregados positivamente fluam para as células (KUMAR, 2015). Para testar a hipótese de ligação competitiva do glifosato ao receptor NMDA, foram analisadas as cavidades de ligação da glicina e do ácido glutâmico no receptor NMDA (PDB ID: 4NF8).

As cavidades de ligação à glicina e ao glutamato do receptor NMDA foram selecionadas como pontos de partida para simulações de dinâmica molecular e as energias de ligação foram estimadas durante trajetórias de dinâmica molecular de 12 ns (Figura 27).

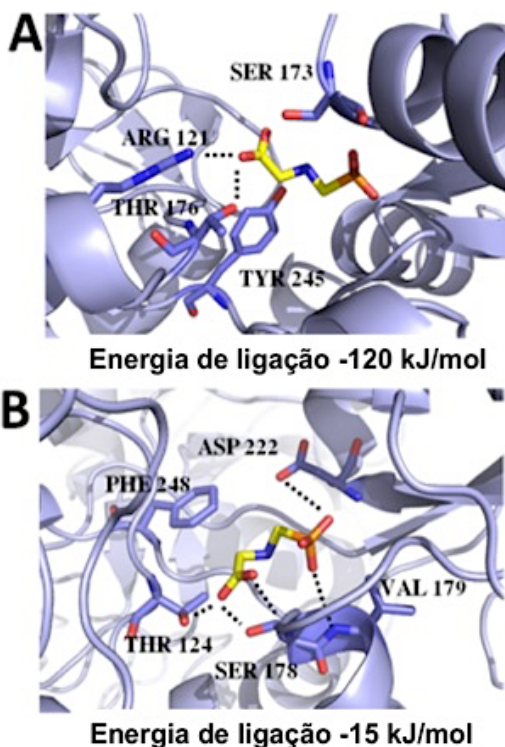


Figura 27 - Ligação do glifosato ao receptor NMDA (PDB ID: 4NF8) na cavidade de ligação do glutamato (A) e na cavidade de ligação da glicina (B). Em (A), o glifosato na cavidade de ligação do glutamato mostrando menor energia de ligação ($-120,3 \text{ kJ.mol}^{-1}$) em comparação com a cavidade de ligação da glicina em (B) ($-15,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Os resíduos mapeados envolvidos na ligação do glifosato estão mostrados como bastões. O glifosato está representado pela cor amarela. Linhas tracejadas representam contatos polares.

A Figura 27A mostra a estrutura do glifosato ligado às cavidades de ligação do glutamato no receptor NMDA em simulações de dinâmica molecular de 12 ns. Os principais aminoácidos envolvidos na ligação do glifosato na cavidade de ligação do glutamato (Figura 27A) foram SER¹⁷³ e TYR²⁴⁵ (interações hidrofóbicas) e, ARG¹²¹ e THR¹¹⁶ (contatos polares com grupo carboxílico).

Na cavidade de ligação à glicina do receptor NMDA (Figura 27B), o glifosato interage com PHE²⁴⁸ (interação hidrofóbica), THR¹²⁴ e SER¹⁷⁸ (contato polar com grupo carboxílico) e, VAL¹⁷⁹ e ASP²²² estabelecendo contatos polares com grupo fosfato (Figura 28).

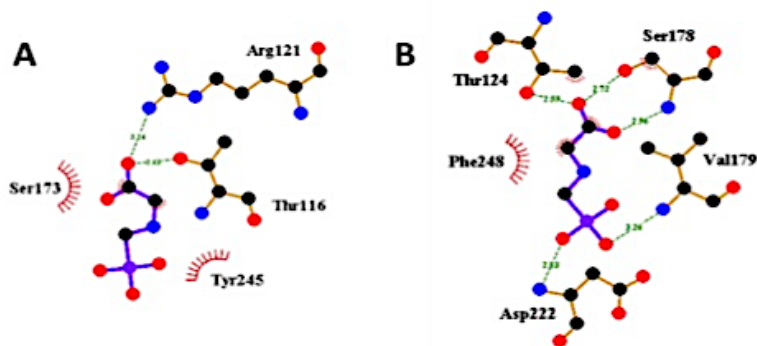


Figura 28 - Resíduos de ligação ao glifosato no receptor NMDA na cavidade de ligação do glutamato (A) e na cavidade de ligação da glicina (B), mapeados a partir da análise de Ligplot após simulações de dinâmica molecular de 12 ns. Em A, o glifosato na cavidade de ligação do glutamato; e em B, o glifosato no local de ligação da glicina, no receptor NMDA (PDB ID: 4NF8). As ligações de hidrogênio estão indicadas por linhas tracejadas verdes e os contatos hidrofóbicos por arcos vermelhos.

A energia de ligação do glifosato nas cavidades de ligação ao glutamato e à glicina foi de -120 kJ/mol e -15 kJ/mol, respectivamente. Na cavidade para a glicina, a energia de ligação oscilou entre valores de ligação positivos a negativos durante a simulação dinâmica, sugerindo uma menor estabilidade de ligação nessa cavidade em comparação com a do glutamato (Figura 29).

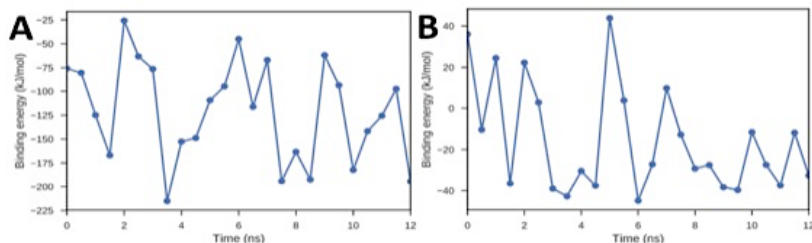


Figura 29 - Análise da energia de ligação do glicosato no receptor NMDA na cavidade de ligação do glutamato (A) e na cavidade de ligação da glicina (B) durante simulações de dinâmica molecular de 12 ns. Em A, o glicosato na cavidade de ligação do glutamato; e em B, o glicosato na cavidade de ligação da glicina mostrando oscilações entre valores de energias de ligação positivos e negativos.

4.2.4 Efeito da exposição *in vivo* ao HBG na captação de ^{14}C -desoxi-D-glicose

A exposição pré e pós-natal ao HBG promoveu um aumento da captação de ^{14}C -desoxi-D-glicose no hipocampo de ratos PND15 (Figura 30).

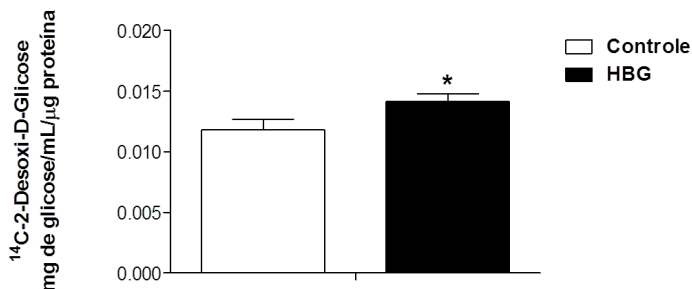


Figura 30 - Efeito da exposição *in vivo* ao HBG na captação de ^{14}C -desoxi-D-glicose no hipocampo de ratos imaturos, PND15. Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber desde o período gestacional até fase imatura, PND15. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

4.2.5 Avaliação dos efeitos da exposição *in vivo* ao HBG sobre a atividade da colinesterase em soro e hipocampo de ratos PND15 e PND60

Os resultados demonstraram que a exposição ao HBG não inibiu a atividade da colinesterase no soro dos animais, tanto no PND15 quanto no PND60. Entretanto, o HBG foi capaz de inibir a atividade da colinesterase no hipocampo dos ratos imaturos e nos ratos adultos após exposição *in vivo* (Figura 31A e 31B, respectivamente).

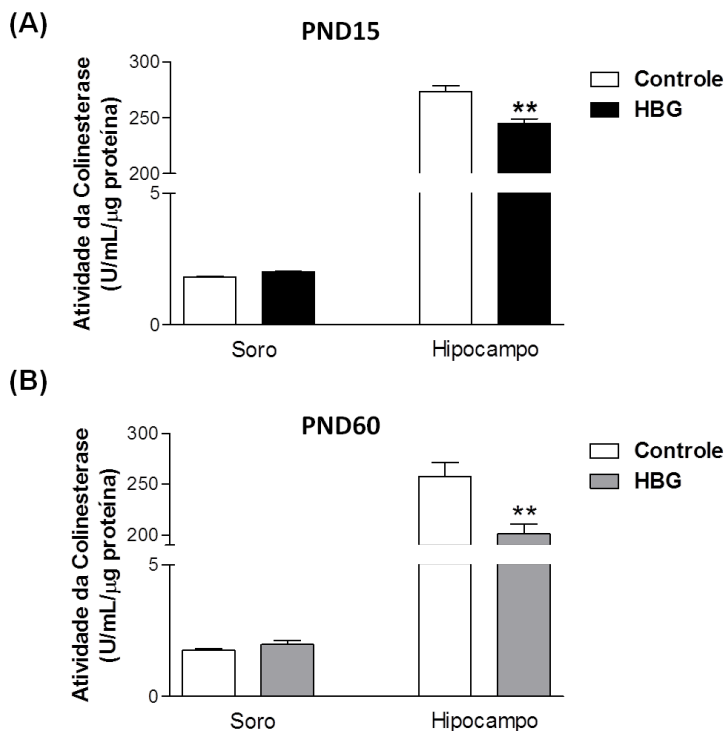


Figura 31 - Efeito da exposição *in vivo* ao HBG na atividade da enzima colinesterase em soro e hipocampo de ratos PND15 (A) e PND60 (B). Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber desde o período gestacional até a fase imatura (PND15) ou até a fase adulta (PND60). Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. ** $p < 0,01$, quando comparado ao respectivo grupo controle.

4.2.6 Envolvimento da via NF- κ B na neurotoxicidade induzida pelo HBG em hipocampo de ratos PND15 após exposição durante período gestacional e lactacional

Como pode ser observado na figura 32, o tratamento subcrônico com o HBG levou a uma diminuição da fosforilação da p65 da via NF- κ B no hipocampus dos animais PND15.

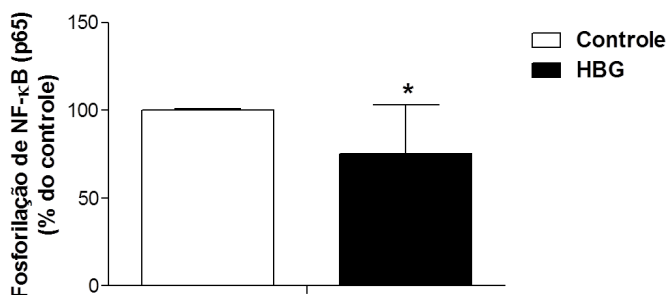


Figura 32 - Efeito da exposição *in vivo* ao HBG na ativação da via p65 NF κ B em hipocampo de ratos imaturos, PND15. Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber desde o período gestacional até a fase imatura, PND15. Os níveis total e fosforilado da p65 NF- κ B foram determinados por ELISA. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais por grupo e expressos como % do controle. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

4.2.7 Níveis séricos de S100B: potencial marcador de dano astrocitário em hipocampo de ratos após exposição subcrônica ao HBG

Na tentativa para entender melhor os mecanismos envolvidos no dano neurotóxico induzido pelo tratamento com o HBG durante o desenvolvimento, os níveis da proteína astrocítica S100B foram avaliados no sangue dos animais expostos ao HBG desde a fase gestacional até completarem 15 ou 60 dias de idade. Os resultados mostraram que a exposição ao HBG diminuiu os níveis séricos de S100B no PND15 (Figura 33A) e aumentou no PND60 (Figura 33B), sugerindo que uma disfunção astrocitária pode estar envolvida nos efeitos neurotóxicos deste herbicida.

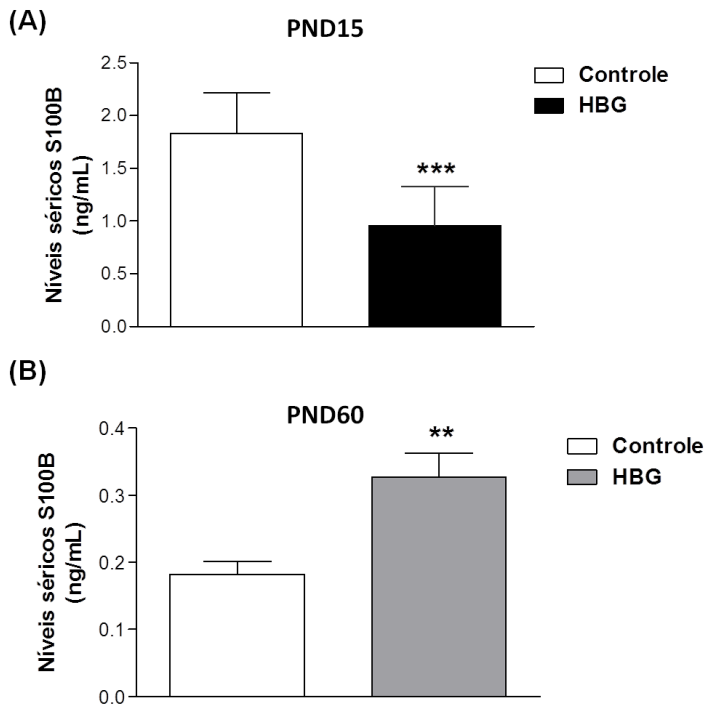


Figura 33 - Efeito da exposição *in vivo* ao HBG nos níveis séricos da proteína astrocítica S100B em ratos PND15 (A) e PND60 (B). Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber desde o período gestacional até a fase imatura (PND15) ou até a fase adulta (PND60). O imunocntéudo de S100B foi determinado por ELISA no soro dos animais. Os resultados foram expressos como a média \pm S.D. de pelo menos 12 animais por grupo. Análise estatística: teste *t* de Student não pareado ou teste *t* não pareado com correção de Welch. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$, quando comparado ao respectivo grupo controle.

4.2.8 Efeito da exposição *in vivo* ao HBG sobre parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo em hipocampo de ratos PND15 e PND60

Com o intuito de investigar a indução de estresse oxidativo em hipocampo de ratos imaturos e adultos expostos por longos períodos de tempo ao HBG foi avaliada a peroxidação lipídica. Não foram

observadas alterações no conteúdo de TBARS em nenhuma das idades estudadas, PND15 (Figura 34A) e PND60 (Figura 34B).

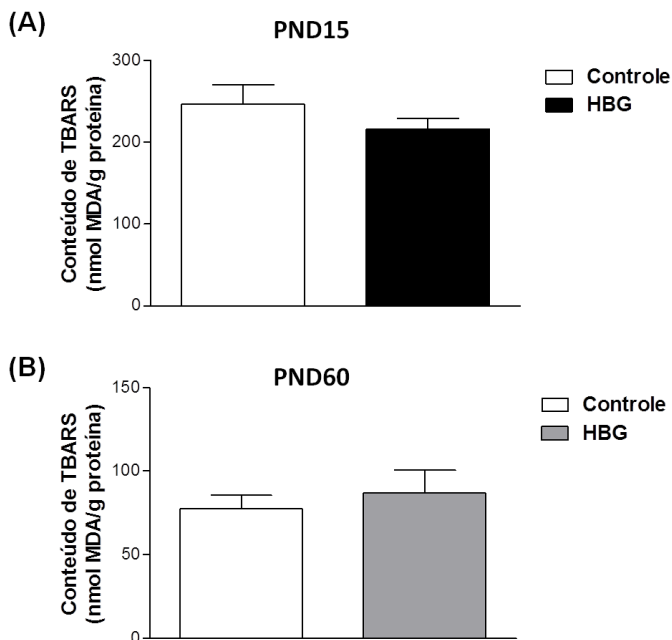


Figura 34 - Efeito da exposição *in vivo* ao HBG nos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de ratos PND15 (A) e PND60 (B). Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber desde o período gestacional até a fase imatura (PND15) ou até a fase adulta (PND60). Os resultados foram expressos como níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) decorrentes da lipoperoxidação e como a média \pm E.P.M. de 08 animais por grupo. Análise estatística: teste *t* de Student.

Para avaliar a oxidação de proteínas, os níveis de proteína carbonilada foram mensurados após exposição subcrônica ao HBG. Conforme pode ser observado na figura 35A, ocorreu um aumento significativo nos níveis de proteína carbonilada no hipocampo dos ratos PND15. A presença de EROs (Figura 35B) também foi investigada nesta mesma idade. Foi observado um aumento na detecção de EROs no hipocampo dos animais expostos ao HBG.

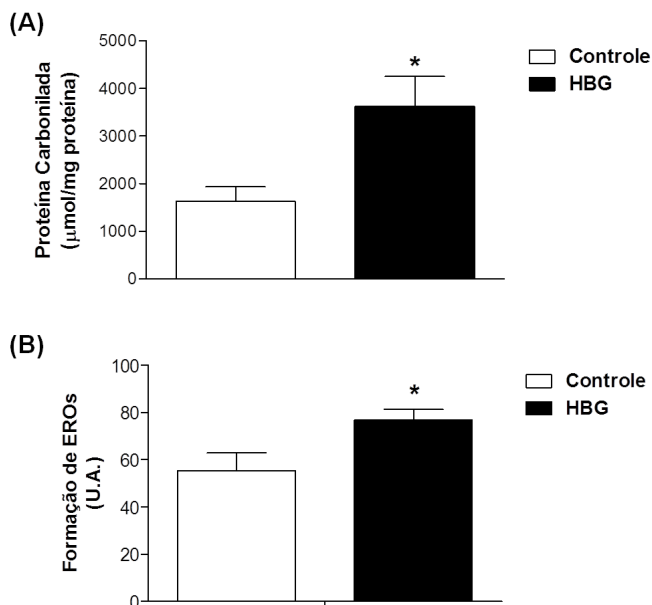


Figura 35 - Efeito da exposição *in vivo* ao HBG nos níveis de carbonilação de proteínas e na formação de EROS em hipocampo de ratos imaturos, PND15. Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber desde a fase gestacional até a fase imatura, PND15. A formação de espécies reativas foi avaliada utilizando a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA). Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M de 08 animais por grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

No presente estudo também foram avaliadas as conseqüências da exposição subcrônica ao HBG no sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático no hipocampo de ratos PND15 e PND60. Quanto aos animais com 15 dias de idade, os resultados mostraram que a exposição ao HBG durante a fase gestacional e lactacional diminuiu a atividade das enzimas SOD e GST (Figura 36A e 36D, respectivamente) mas não alterou a atividade das enzimas CAT, GPx e GR (Figura 36B, 36C e 36E, respectivamente) no hipocampus dos animais.

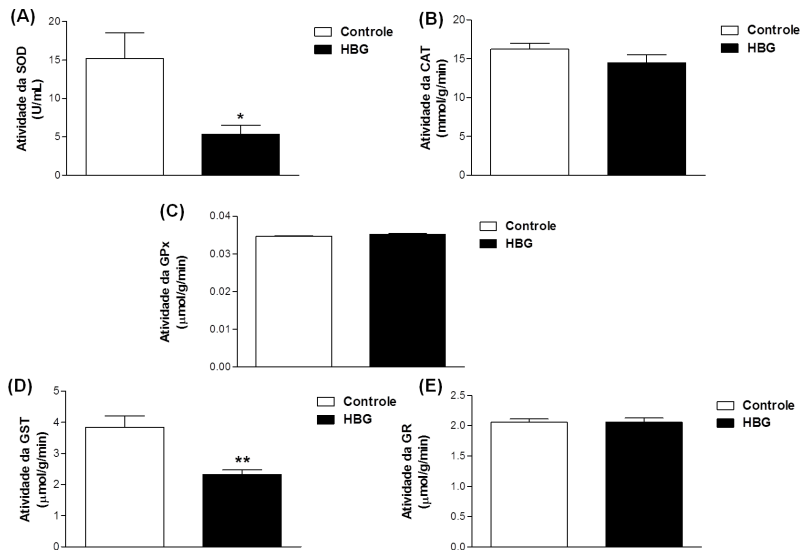


Figura 36 - Efeito da exposição subcrônica ao HBG no sistema enzimático de defesa antioxidante no hipocampo de ratos imaturos, PND15. Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber desde a fase gestacional até a fase imatura, PND15. A atividade enzimática da SOD (A), CAT (B), GPx (C), GST (D) e GR (E) foi avaliada no hipocampo dos ratos PND15. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de 10 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, quando comparado ao respectivo grupo controle.

A figura 37 mostra os efeitos da exposição subcrônica ao HBG nos parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo de ratos PND60. Os resultados mostraram que a exposição ao HBG aumentou a atividade das enzimas SOD, CAT e GST no hipocampo dos ratos adultos (Figura 37A, 37B e 37F, respectivamente). Nenhuma alteração foi observada quanto a atividade enzimática da GR e da GPx (Figura 37C e 37D, respectivamente) e quanto aos níveis de GSH (Figura 37E).

Em conjunto, nossos resultados demonstraram que a exposição ao HBG durante o desenvolvimento pode estar causando danos oxidativos nas células hipocâmpais.

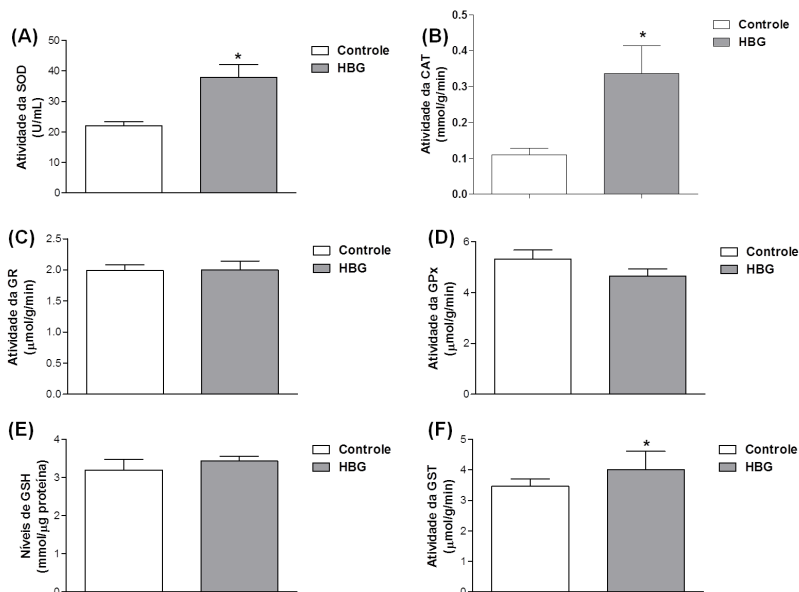


Figura 37 - Efeito da exposição subcrônica ao HBG nos sistemas enzimático e não enzimático de defesa antioxidante no hipocampo de ratos adultos, PND60. Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber desde o período gestacional até a fase adulta (PND60). A atividade enzimática da SOD (A), CAT (B), GR (C), GPx (D) e GST (F) bem como os níveis de GSH (E) foram avaliados no hipocampo dos ratos PND60. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student: * $p < 0,05$, quando comparado ao respectivo grupo controle.

4.2.9 Efeito da exposição subcrônica ao HBG sobre o comportamento de ratos PND60

Neste estudo também foi investigada a associação entre a exposição pré e pós-natal ao HBG e efeitos neurocomportamentais. Para isso, foram avaliados os efeitos da exposição sobre funções locomotoras (campo aberto e rotarod) e emocionais (nado forçado e consumo de sacarose 0,8%) em ratos adultos com 60 dias de idade.

Na figura 38 podem ser observados os resultados obtidos quanto à função locomotora dos animais. Tanto os resultados do teste do campo aberto (Figura 38A) quanto do rotarod (Figura 38B) mostram a inexistência de alterações na atividade locomotora dos animais após exposição subcrônica ao HBG.

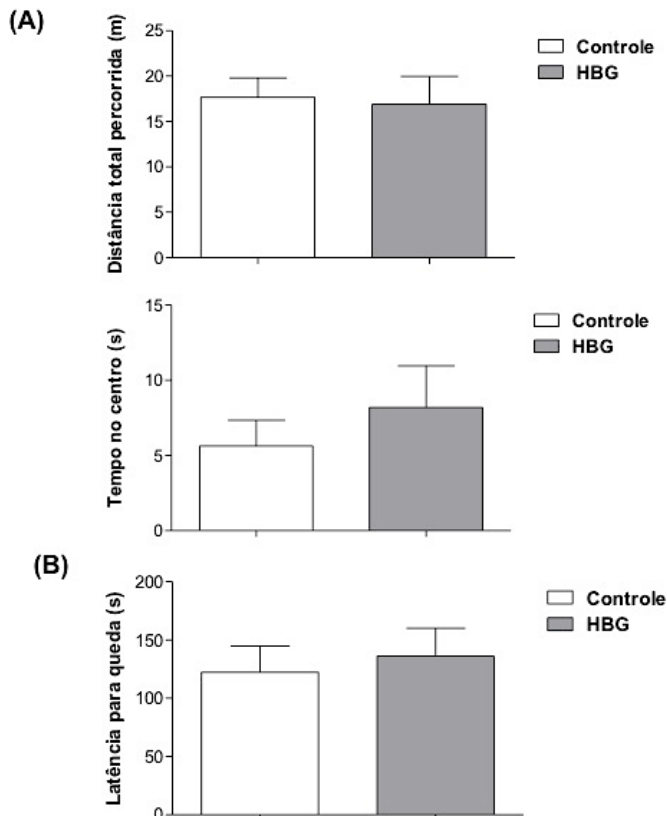


Figura 38 - Efeito da exposição subcrônica ao HBG sobre a atividade locomotora (teste do Campo Aberto (A)) e o desempenho motor (teste do Rotarod (B)) de ratos adultos, PND60. Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber desde o período gestacional até a fase adulta (PND60). (A) Teste do campo aberto: Distância total percorrida (m) e Tempo de permanência na região central (s); (B) Teste do Rotarod: Latência para queda (s). Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M de 10 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student.

O teste do nado forçado tem sido validado no mundo inteiro como modelo animal de depressão, onde a imobilidade do animal na água pode ser considerada como análogo a um comportamento tipo depressivo (LAHMAME; ARMARIO, 1996). Resultados demonstraram que a exposição ao HBG durante o desenvolvimento aumentou o tempo

de imobilidade no teste do nado forçado (Figura 39), o qual pode ser associado com o tempo de escalada diminuído, sugerindo assim uma indução do comportamento tipo depressivo nos ratos adultos.

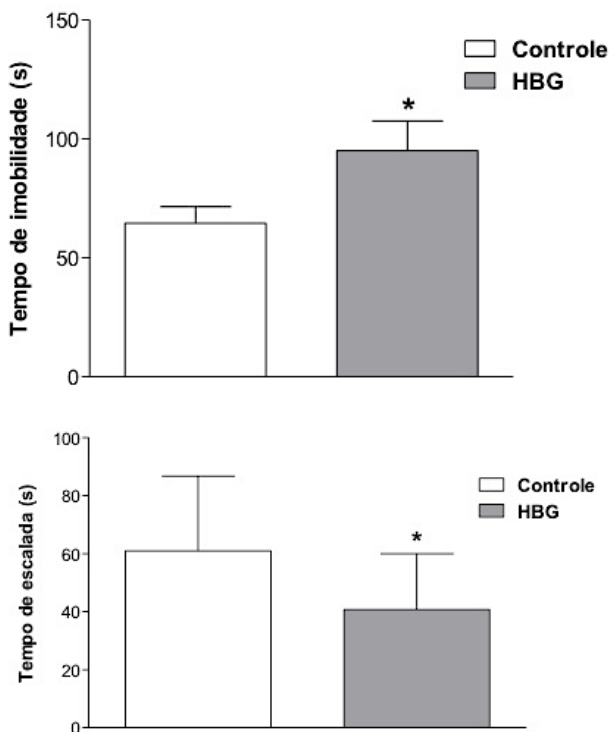


Figura 39 - Efeitos da exposição subcrônica ao HBG no teste do nado forçado em ratos adultos, PND60. Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber desde o período gestacional até a fase adulta (PND60). Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$, quando comparado ao respectivo grupo controle.

Após a demonstração de comportamento tipo depressivo no teste do nado forçado foi realizado o teste de preferência por sacarose. Este teste consiste de um protocolo de livre escolha entre duas soluções, água

e sacarose a 0,8%. Os resultados demonstraram que a exposição ao HBG não alterou a preferência dos animais por sacarose (Figura 40).

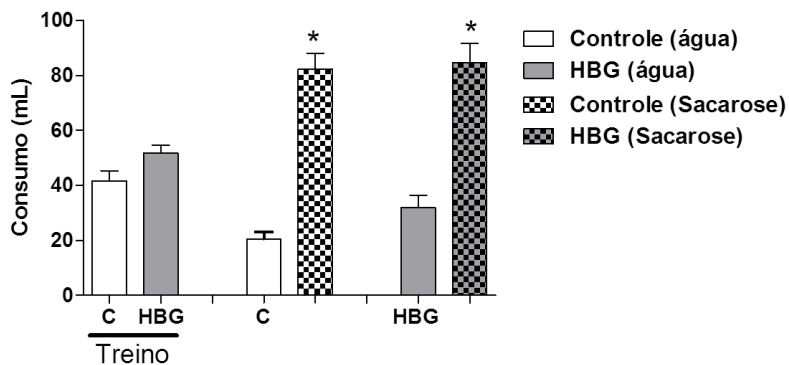


Figura 40 - Efeito da exposição subcrônica ao HBG sobre o consumo de sacarose 0,8% em ratos adultos, PND60. Os animais foram tratados com 1% HBG na água de beber desde o período gestacional até a fase adulta (PND60). Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$, quando comparado o grupo Controle (água) com o grupo Controle (sacarose); e quando comparado o grupo HBG (água) com o grupo HBG (sacarose).

4.2.10 Discussão

A exposição ao glifosato atinge tanto os indivíduos que trabalham diretamente com ele quanto a população em geral que vive longe dessas plantações e que pode entrar em contato ao consumir alimentos e água que contenham resíduos deste agrotóxico. A exposição ocupacional e os diversos casos de suicídio com o glifosato fazem deste herbicida uma preocupação em nível mundial (GRESS et al., 2015).

Meza-Joya, Ramírez-Pinilla e Fuentes-Lorenzo (2013) avaliaram os efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de uma formulação comercial do glifosato (Roundup®SL-Cosmoflux®411F) em sapos da espécie *Eleutherodactylus johnstonei*. Os autores aplicaram o agrotóxico de maneira similar ao que ocorre na pulverização aérea em plantações ilegais de coca (*Erythroxylum coca*) na Colômbia. Os dados de toxicidade indicaram que a taxa de aplicação [37,4 mg a.e./cm²] equivalente ao utilizado na pulverização aérea (3,74 kg a.e./ha) não é letal em rãs adultas machos e fêmeas; entretanto, os sapos recém-nascidos demonstraram ser altamente sensíveis à exposição.

Diversos estudos experimentais com animais indicam que o cérebro em desenvolvimento é mais susceptível aos efeitos neurotóxicos de agrotóxicos que o cérebro adulto. Além disso, a exposição a pesticidas pode causar déficits neurocomportamentais significativos, como já demonstrado em modelos animais e em humanos (BJÖRLING-POULSEN; ANDERSEN; GRANDJEAN, 2008; LONDON et al., 2012; MODGIL et al., 2014). Déficits no desenvolvimento neural, pré e pós-natal, incluem um grande espectro de distúrbios e disfunções, como autismo, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), dificuldades no aprendizado, atrasos no desenvolvimento, problemas comportamentais e emocionais, déficits em habilidades motoras, risco de doenças neurodegenerativas (MIGLIOREA; COPPED, 2009; LONDON, 2012; BURNS et al., 2013; MODGIL et al., 2014), entre outros. Modgil e colegas (2014) sugeriram que a exposição ambiental durante a vida pré- e pós-natal pode induzir a algumas alterações epigenéticas, o que pode levar a condições neurodegenerativas. Neste contexto, é necessário considerar que algumas consequências dos danos neurotóxicos precoces podem surgir apenas em idades avançadas (WEISS, 2000).

Os efeitos das exposições agudas aos agrotóxicos são bem conhecidos e estudados na grande maioria, o que não ocorre com os efeitos decorrentes das exposições crônicas ou em longo prazo. As exposições crônicas vem sendo associadas a uma grande variedade de

doenças neurológicas. Uma das conexões mais conhecida é o exemplo da possível ligação entre a exposição a pesticidas e a doença de Parkinson (PARRÓN et al., 2011; MODGIL et al., 2014). Além disso, há evidências do aumento da prevalência de disfunções cognitivas, neurocomportamentais e psicomotoras em indivíduos expostos cronicamente a agrotóxicos (ZAGANAS et al., 2013).

Sendo assim, neste estudo foram investigados os possíveis efeitos ocasionados pela exposição subcrônica ao HBG em diferentes idades, preconizando a fase imatura (PND15) e a fase adulta (PND60). A exposição dos animais ao herbicida ocorreu desde a fase gestacional perdurando durante a fase lactacional até a fase adulta, PND60. Filhotes machos de diferentes idades pós-natal, PND15 e PND60, foram utilizados para avaliar os efeitos iniciais e tardios da exposição ao glifosato. Foram utilizados animais com 15 dias de idade pois o cérebro pós-natal de ratos entre o 7^o e 28^o dia representa um modelo estabelecido para estudos de desenvolvimento do cérebro humano (TKÁC et al., 2003).

Os resultados mostraram que a exposição ao HBG não alterou a média do tamanho da ninhada, bem como o número de machos e fêmeas mas levou à diminuição do ganho de massa corporal dos filhotes durante o desenvolvimento pós-natal. É importante destacar que após o parto, o tamanho das ninhadas foi padronizado para oito filhotes por rata (AGNISH; KELLERT, 1997) em ambos os grupos de tratamento (controle e tratado). Deste modo, a variabilidade observada no ganho de massa corporal dos filhotes foi independente do tamanho da ninhada. Gallegos et al. (2016) também demonstraram que a exposição materna ao HBG em ratos durante os períodos gestacional e lactacional não afetaram o tamanho da ninhada. No entanto, diferente dos nossos achados, os autores não mostraram diferença no ganho de massa corporal dos filhotes.

Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, demonstramos que a exposição materna ao HBG diminuiu a captação específica (dependente de Na^+) de $\text{L-}^3\text{H}$ -glutamato e aumentou a liberação deste neurotransmissor em hipocampo de ratos PND15. O excesso de glutamato na fenda sináptica promoveu uma superativação dos receptores NMDA, o que provocou um aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no hipocampo dos animais, evidenciando claramente o fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica induzido por HBG (CATTANI et al., 2014). Neste contexto, no presente estudo os mesmos parâmetros foram avaliados em ratos PND60 com o propósito de investigar se os efeitos observados nos ratos imaturos irão persistir até a idade adulta.

Os resultados atuais corroboram nossos achados anteriores mostrando que a diminuição da captação de [^{14}C]-glutamato e o aumento do influxo $^{45}\text{Ca}^{2+}$ observados anteriormente persistiram até a idade adulta.

O mecanismo para o efeito tóxico do glifosato na homeostase do Ca^{2+} está relacionado ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial aos íons hidrogênio e ao Ca^{2+} (OLORUNSOGO, 1991). Neste contexto, já demonstramos que o influxo de Ca^{2+} induzido por HBG ocorreu pela da ativação do receptor NMDA e pela abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (CCDV-L) (CATTANI et al., 2014).

Os resultados sobre o sistema glutamatérgico, tanto do estudo atual quanto do anterior (CATTANI et al., 2014), indicam que um dos mecanismos para a toxicidade induzida por HBG no hipocampo de ratos pode envolver o fenômeno da excitotoxicidade glutamatérgica. Este fenômeno é um dos mecanismos de morte celular mais conhecidos em doenças neurológicas. Consiste em um aumento nas concentrações intracelulares de cálcio devido à superativação do receptor de glutamato, NMDA. O aumento do nível intracelular de Ca^{2+} provoca um estímulo incontrolável de enzimas proteolíticas, lipoperoxidação e geração de EROS pela mitocôndria, culminando na morte celular (BACON et al., 1985; ARUNDINE, TYMIANSKI, 2003; FAN; RAYMOND, 2007; MOLZ et al., 2008; WANG; MICHAELIS, 2010; ALEKSEENKO et al., 2012).

Os receptores NMDA são canais de cátions não seletivos heteroméricos que requerem a ligação de glicina e glutamato para o mecanismo de gating (abertura e fechamento de canais sensíveis à voltagem). Considerando a semelhança estrutural do glifosato com o glutamato e a glicina, propomos que a excitotoxicidade do glutamato induzida pelo glifosato também possa ser explicada pela sua interação/ligação aos receptores de glutamato, NMDA. Para comprovar essa hipótese, os resultados da simulação de dinâmica molecular demonstraram que o glifosato pode ligar-se às cavidades de glutamato e glicina nos receptores NMDA. A energia de ligação do glifosato nas cavidades de ligação do glutamato e da glicina, estimadas durante as trajetórias da dinâmica molecular de 12 ns, foram -120 kJ/mol e -15 kJ/mol, respectivamente. Os resultados também sugeriram uma menor estabilidade da ligação do glifosato na cavidade de ligação da glicina em comparação com a do glutamato. Levando em consideração que a superativação do receptor NMDA causa um acúmulo excessivo de cálcio intracelular, os resultados da dinâmica molecular aqui observados corroboram nosso estudo anterior no qual demonstramos que a exposição *in vitro* ao HBG por 30 min provocou sobrecarga de cálcio

em células hipocâmpais. O acúmulo de cálcio intracelular induzido por HBG foi prevenido pelo uso de antagonistas de NMDA (AP5 e MK801). Portanto, concluímos que o glifosato pode interagir com o receptor NMDA e que este evento provoca um aumento no influxo de Ca^{2+} intracelular, provocando disfunção mitocondrial e dano oxidativo.

Neste estudo também investigamos a captação da ^{14}C -2-desoxi-D-glicose no hipocampo dos animais imaturos. Os resultados demonstraram um aumento na captação de ^{14}C -2-desoxi-D-glicose induzida pela exposição *in vivo* ao HBG. Este aumento pode ser em resposta à diminuição da captação de glutamato. Aumento na captação de glicose também foi demonstrado em fatias hipocâmpais de ratos imaturos após exposição *in vitro* ao HBG, conforme demonstrado no Estudo I.

Na tentativa de investigar o efeito do HBG na neurotransmissão colinérgica, determinamos a atividade da enzima colinesterase no hipocampo e no soro dos ratos PND15 e PND60. Nenhuma alteração na atividade desta enzima foi verificada no soro dos animais. No entanto, a exposição ao HBG provocou uma diminuição da atividade da colinesterase no hipocampo dos ratos PND15 e PND60. Devido ao significativo efeito inibitório do glifosato sobre a atividade da colinesterase observado em peixes por Menéndez-Helman e colegas (2012), os mesmos propuseram a colinesterase como um biomarcador de neurotoxicidade induzida por glifosato em peixes.

A acetilcolinesterase é responsável por promover a degradação da acetilcolina em junções neuromusculares, processo crítico para as funções normais tanto do músculo quanto do cérebro. A inibição desta enzima pelo HBG pode gerar um acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica o que causaria uma excitação prolongada de neurônios pós-sinápticos com decorrente dano excitotóxico e degeneração colinérgica (ZAGANAS et al., 2013). Neste sentido, a geração de EROs resultante da excitotoxicidade glutamatérgica e/ou da superativação do sistema colinérgico pode estar ocorrendo nos animais expostos ao HBG, promovendo consequentes oxidações e possíveis danos em diversos compostos celulares incluindo DNA, RNA, lipídios de membranas e proteínas.

O estresse oxidativo tem sido implicado em mecanismos associados ao envelhecimento (LEE; WEI, 2007) e a algumas doenças, como por exemplo, as cardiovasculares (KIM; BYZOVA, 2014; FARIAS et al., 2017), o diabetes mellitus (NEWSHOLME et al., 2007; TIWARI et al., 2013), alguns tipos de câncer (AVNI; COHEN; NEEMAN, 2011; BATTISTI et al., 2011) e as doenças

neurodegenerativas (ASLAN; OZBEN et al., 2004; GANGULY et al., 2017). Além disso, evidências sugerem que o estresse oxidativo pode estar associado a transtornos psiquiátricos, incluindo a depressão (BLACK et al., 2015). Estas evidências não são consideradas surpresas uma vez que o cérebro é altamente susceptível ao estresse oxidativo e ao desequilíbrio redox devido a seu elevado consumo de oxigênio e também por ser rico em lipídios (SHOHAMI et al., 1997; SALIM, 2014).

Após a exposição subcrônica ao HBG foi detectado um aumento na formação de EROs nos ratos PND15 tratados com o herbicida. Nesta mesma idade também foi demonstrado um aumento na carbonilação de proteínas no hipocampo dos animais. Menezes et al. (2011) descreveram que o HBG pode induzir o estresse oxidativo, levando à geração de radicais livres que causam lipoperoxidação e carbonilação de proteínas, sugerindo que a toxicidade desse pesticida pode envolver estes mecanismos. Entretanto, no presente estudo não foram observados indícios de peroxidação lipídica nos animais de ambas as idades estudadas. Larsen e colaboradores (2012) ao expor ratos Wistar durante 30 e 90 dias a altas doses de glifosato na água de beber também não encontraram alterações significativas nos níveis de TBARS.

Como uma forma de defesa primária contra as EROs, tanto procariontes como eucariontes têm desenvolvido sistemas de defesa antioxidante para proteger as células contra os danos oxidativos. Para investigar os efeitos causados pela exposição subcrônica ao HBG os sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático foram avaliados no hipocampo dos ratos imaturos e adultos. Nosso grupo de pesquisa já demonstrou uma diminuição nos níveis do antioxidante não enzimático, GSH, em ratos Wistar PND15 após exposição *in vivo* ao HBG (CATTANI, 2013). No entanto, alterações significativas quanto aos níveis de GSH no hipocampo dos ratos PND60 após exposição subcrônica não foram encontradas. Considerando que uma depleção sistêmica de GSH, que é um marcador muito sensível de estresse oxidativo, ocorre após exposições agudas a diferentes contaminantes enquanto que geralmente é recuperada após alguns dias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Sugerimos que os diferentes perfis observados nos níveis de GSH no hipocampo de ratos PND15 e PND60 indicam que ocorreu uma modificação adaptativa no perfil antioxidante do PND15 para o PND60. Esta modificação decorreu para tentar manter os níveis desse importante antioxidante não enzimático em concentrações basais, a fim de atenuar, pelo menos em parte, as consequências tóxicas do HBG no cérebro.

Com relação à atividade da GST, foram observadas alterações em ambas as idades estudadas, entretanto, de maneira oposta. Na fase imatura ocorreu uma diminuição enquanto que na fase adulta foi observado um aumento. A atividade da GST faz parte de uma importante estratégia de defesa das células contra os xenobióticos, incluindo a propriedade de detoxificação de peróxidos derivados de processos de lipoperoxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HUBER; ALMEIDA, 2008). Portanto, a diminuição da atividade da GST pode resultar em uma detoxificação insuficiente do pesticida no hipocampo dos animais imaturos. Por outro lado, o aumento da atividade desta enzima na idade adulta pode ser decorrente do tratamento prolongado com o HBG. Provavelmente a expressão da GST foi aumentada em resposta à exposição de longo prazo ao HBG, a fim de proteger as células dos efeitos deletérios do pesticida. Uma diminuição da atividade da GST também foi observada em girinos após exposição aguda a uma formulação comercial de glifosato (LAJMANOVICH et al., 2011).

Com relação a enzima SOD, uma diminuição da sua atividade foi observada nos animais PND15 enquanto que nos ratos PND60 ocorreu um aumento da atividade. Nenhuma alteração foi observada na atividade da CAT no hipocampo de ratos imaturos, apesar da tendência desta enzima em exibir valores mais baixos. Por outro lado, no cérebro dos animais adultos a atividade da CAT estava aumentada. Este aumento na fase adulta pode ser explicado pelo fato de que a CAT apresenta atividade mais elevada apenas após PND45 em cérebro de rato (SHIVAKUMAR; ANANDATHEERTHAVARADA; RAVINDRANATH; 1991). A atividade das enzimas SOD e CAT tem sido reportada como um indicador da capacidade dos tecidos em lidar com o estresse oxidativo (NWANI et al., 2015).

O desequilíbrio na atividade das enzimas antioxidantes e nos níveis de GSH no hipocampo de PND15 pode ser indicativo de uma proteção insuficiente contra EROs ou outros estressores fisiológicos no cérebro em desenvolvimento. Estudos têm demonstrado que a capacidade antioxidante dos indivíduos aumenta gradativamente durante o desenvolvimento da fase jovem para a adulta (LI et al., 2013), o que poderia explicar ainda mais as diferenças entre os sistemas antioxidantes encontrados em ambas as idades.

A ativação da via de sinalização NF- κ B é comumente associada ao processo inflamatório e a diversas doenças. No entanto, a ativação desta via também está envolvida em eventos fisiológicos no cérebro,

como neurogênese (KOO et al., 2010), neuritogênese (ROLLS et al., 2007) e plasticidade sináptica (AHN et al., 2008). Assim, a diminuição da fosforilação e da ativação da NF- κ B observadas em hipocampo de ratos imaturos exposto ao HBG durante o período gestacional e lactacional podem estar afetando a neurogênese e conseqüentemente o desenvolvimento do sistema nervoso central. Carloni e colaboradores (2013) avaliaram o impacto que a administração do inseticida permetrina durante a fase imatura de ratos Wistar teria na fase adulta. Os animais foram tratados por 15 dias, do 6^o ao 21^o dia pós-natal (PND6 ao PND21) com uma dose de permetrina próxima ao NOAEL. As análises foram realizadas quando os ratos completaram 500 dias de idade. Os autores verificaram que a expressão do gene NF- κ B p65 estava diminuída no hipocampo dos animais, concluindo que o tratamento neonatal com permetrina pode estar influenciando os genes envolvidos com o início dos processos de envelhecimento cerebral.

Alterações das funções cerebrais também são confirmadas por mudanças nos níveis séricos da proteína S100B, a qual reflete a função astrogliar. Nossos resultados mostraram que durante o desenvolvimento, os níveis dessa proteína foram diminuídos pela exposição ao HBG. No entanto, níveis aumentados de S100B foram observados nos animais PND60. Considerando que a proteína de ligação ao cálcio S100B é considerada um marcador astrocitário, uma vez que estas células são o principal compartimento contendo S100B no sistema nervoso central (DONATO et al., 2013), nossos resultados sugerem que esta proteína pode ser utilizada como um biomarcador periférico de disfunção astrocitária após exposição ao HBG. Um estudo piloto recente também demonstrou que a S100B pode servir como marcador para prever complicações neurológicas em pacientes com envenenamento com glifosato ou glufosinato (LEE et al., 2017).

Visto o aumento da relação entre a exposição a pesticidas e o surgimento de distúrbios neurológicos também foram avaliados neste trabalho possíveis prejuízos comportamentais decorrentes da exposição subcrônica ao HBG nos ratos adultos, PND60. Os resultados demonstraram um aumento no tempo de imobilidade associado a uma diminuição no tempo de escalada no teste do nado forçado, sugerindo um comportamento tipo depressivo. Resultados semelhantes foram observados em ratos expostos ao agrotóxico Malation quando submetidos ao teste do nado forçado (ASSINI et al.; 2005; BROCARDI et al., 2007). Exposição crônica ao Ometoato (pesticida organofosforado) também aumentou o tempo de imobilidade no teste do

nado forçado, além de induzir dano neuronal, resultando em comportamento tipo depressivo (QIAO et al., 2017).

Embora o teste do nado forçado seja mais conhecido no uso para validação de fármacos com potencial antidepressivo (PORSOLT et al., 1978), também pode ser utilizado para avaliar o potencial depressivo de compostos (PAUL et al., 1990). Neste modelo, os ratos são forçados a nadar em um compartimento cilíndrico preenchido com água, considerando como comportamento tipo depressivo quando ocorre um aumento no tempo de imobilidade, indicativo de que o animal desistiu de tentar escapar/sobreviver. Com base neste protocolo, sugerimos que a exposição subcrônica ao HBG provocou um comportamento tipo depressivo nos ratos PND60.

Visto que o HBG induziu um comportamento tipo depressivo nos animais, a avaliação da presença de anedonia também foi realizada. A presença de anedonia é uma característica frequentemente relatada em indivíduos depressivos. O teste de preferência por sacarose foi utilizado para medir a anedonia nos roedores expostos subcronicamente ao HBG. Resultados obtidos com este teste demonstraram que tanto o grupo controle quanto o grupo tratado apresentaram uma maior preferência pelo consumo de sacarose, descartando-se assim a presença de características anedônicas nos animais tratados com o agrotóxico. A anedonia geralmente é considerada uma característica da depressão (LEMKE et al., 2005); entretanto, alguns estudos vem dissociando esta relação entre anedonia e o estado depressivo (FUJIWARA et al., 2011).

Para avaliar o estado locomotor dos animais foram utilizados os testes do campo aberto e rota rod. Ambos demonstraram não haver indícios de déficits locomotores nos animais. Os resultados obtidos viabilizam o achado no teste do nado forçado, já que diminuição da atividade locomotora poderiam estar gerando um resultado falso positivo no nado forçado quanto ao comportamento tipo depressivo. Por outro lado, Hernández-Plata e colegas (2015) descreveram efeitos da exposição ao glifosato na atividade locomotora. Os autores relataram que a exposição intraperitoneal repetida ao glifosato causou hipoatividade imediatamente após cada injeção, sendo também evidente 2 dias após a última injeção nos ratos expostos à dose mais alta de glifosato, mas não após 16 dias. Sugerindo que essas alterações podem ter ocorrido apenas enquanto uma concentração crítica de glifosato estava presente no sistema fisiológico dos animais.

Nossos resultados demonstraram que a exposição subcrônica ao HBG pode resultar em efeitos que variam do dano oxidativo ao comprometimento da função cerebral, o que pode explicar o

comportamento tipo depressivo observado na fase adulta. Considerando que o HBG é um dos herbicida mais utilizados no Brasil e no mundo, sugerimos que o comportamento tipo depressivo induzido pela exposição precoce a este herbicida, como observado no presente estudo, pode estar envolvido, pelo menos em parte, no risco elevado de suicídio observado entre agricultores (BOSSARD et al., 2016, PARRÓN et al., 2011, FREIRE; KOIFMAN, 2013; TIESMAN et al., 2015).

O hipocampo é uma das estruturas límbicas que tem sido amplamente estudada em indivíduos com depressão. Estudos envolvendo ressonância magnética têm demonstrado consistentemente uma atrofia do hipocampo em pacientes com depressão, sendo que este efeito é bloqueado ou revertido por tratamentos com antidepressivos (SAHAY; HEN, 2007; SCHMIDT; DUMAN, 2007; QIAO et al., 2017).

O sistema glutamatérgico também é apontado na fisiopatologia da depressão. Acredita-se que o fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica seja uma das causas do transtorno depressivo sendo até considerado como um potencial alvo farmacológico para o tratamento da depressão. A administração de antagonistas do sistema glutamatérgico, incluindo o zinco e a cetamina, mostrou possuir efeito antidepressivo em estudos pré-clínicos e clínicos (ALMEIDA et al., 2010; MLYNIEC, 2015; SAHAY; HEN, 2007; MILADINOVIC; NASHED; SINGH, 2015; HUANG; LANE; LIN, 2017).

Com relação à exposição materna dos filhotes, um estudo recente demonstrou a presença de glifosato no soro materno e no cordão umbilical de mulheres grávidas que deram à luz em três províncias da Tailândia (KONGTIP et al., 2017). Os autores mostraram que as mulheres grávidas que trabalhavam na agricultura ou viviam em famílias agricultoras apresentaram maiores exposições ao herbicida glifosato quando comparadas às mulheres grávidas que não eram agricultoras por ocupação. Neste contexto, estudos envolvendo a cinética de transporte do glifosato através da monocamada de células BeWo (usado como modelo de trofoblasto humano) e através da barreira placentária no sistema de perfusão ex vivo mostraram que o transporte de glifosato através da placenta é possível, embora seja considerado baixo. Após 2,5 h de perfusão, a percentagem de composto transferido para o compartimento fetal foi de cerca de 15% para o glifosato (MOSE et al., 2008) e após 24 h no experimento com as células BeWo, a percentagem de glifosato transportado foi de cerca de 24% (POULSEN et al., 2009). Portanto, em nosso modelo experimental, supomos que os filhotes foram expostos ao pesticida via barreira

placentária durante o período gestacional e/ou via aleitamento materno durante o período lactacional.

A exposição das mães (GD5 a PND21) e dos filhotes (PND22 a PND60) ao pesticida foi através da ingestão de água de beber contendo HBG. Embora a biodisponibilidade oral do glifosato seja considerada baixa, este herbicida é lentamente eliminado do plasma e, portanto, pode ser difundido para outros tecidos alvo e exercer efeitos sistêmicos (ANADON et al., 2009). Uma vez que o glifosato tem uma estrutura semelhante a um aminoácido, a afinidade da molécula com os transportadores de aminoácidos sugere que podem ser exibidas toxicidades adicionais nos órgãos que expressam uma elevada atividade desses transportadores (XU et al., 2016), tais como o cérebro. De fato, a detecção de glifosato no cérebro (MENKES; TEMPLE; EDWARDS, 1991) e líquido cefalorraquidiano (SATO et al., 2011) após a exposição humana ao HBG já foram relatadas, indicando assim que este herbicida é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.

Neste estudo foi demonstrado que a exposição pré e pós-natal ao HBG leva ao fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica com aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ tanto em animais imaturos quanto em adultos. Este aumento exacerbado nas concentrações de cálcio intracelular pode estar provocando uma elevada produção de EROs, promovendo assim um desequilíbrio na atividade do sistema antioxidante. O sistema de defesa antioxidante, por sua vez, é dependente do tempo de exposição (figura 41).

Os resultados apresentados no estudo (II) foram publicados no periódico “Toxicology” em junho de 2017 com o título “Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress” (ANEXO II) (CATTANI et al., 2017).

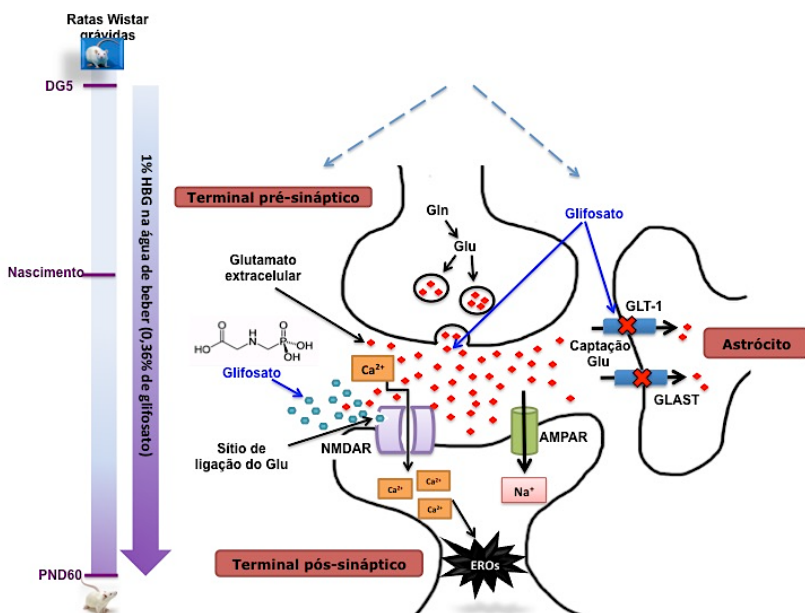
4.2.11 Conclusões parciais

- A neurotoxicidade induzida por HBG após exposição subcrônica (GD5 ao PND60) envolve o fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica devido a diminuição da captação de glutamato e interação do glifosato com receptores NMDA levando assim ao influxo de Ca^{2+} em células hipocâmpais;

- Alguns dos mecanismos subjacentes à neurotoxicidade induzida por HBG envolveram a ativação do receptor NMDA, a liberação da proteína S100B e a diminuição da ativação da via NF- κ B;

- Inibição da atividade da enzima colinesterase também pode indicar um envolvimento do sistema colinérgico na toxicidade gerada pelo HBG, necessitando assim de mais estudos com relação a este sistema;
- Nossos resultados mostram que os danos oxidativos podem estar ocorrendo com maior intensidade durante o período do neurodesenvolvimento.

Figura 41 - Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do HBG sobre células neurais.



Envolvimento do fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica devido ao aumento da liberação de glutamato na fenda sináptica, diminuição da captação de glutamato e interação do glifosato com receptores de glutamato do tipo NMDA provocando um aumento no influxo de Ca^{2+} em células do hipocampo. Gln, glutamina; Glu, glutamato; DG, dia gestacional; NMDAR e AMPAR, receptores glutamatérgicos; GLT1 e GLAST, transportadores de glutamato; PND, dia pós-natal.

FONTE: Adaptado de Cattani et al., 2017.

4.3 ESTUDO III: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HBG OU AO GLIFOSATO P.A. DURANTE A DIFERENCIAÇÃO NEURONAL *IN VITRO* DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAS MURINAS, C17.2

Com o intuito de avaliar os efeitos tóxicos do HBG e do glifosato P.A. sobre o SNC em desenvolvimento, um sistema de ensaio baseado no uso de células-tronco foi utilizado. As células escolhidas foram C17.2, uma linhagem celular progenitora neural multipotente proveniente de camundongo com 5 dias de idade (pós-natal) e imortalizadas via transfecção do oncogene relacionado ao vírus aviário mielocitomatose (v-myc) (SNYDER et al., 1992; LUNDQVIST et al., 2013).

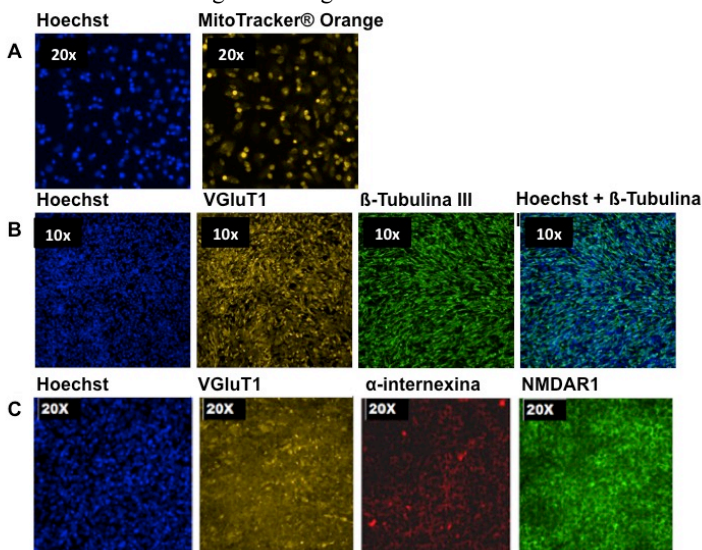
Primeiramente, foi desenvolvido e padronizado um protocolo para a diferenciação neuronal das células C17.2 em neurônios glutamatérgicos. Em seguida, durante os diferentes estágios da diferenciação as células foram expostas a diferentes concentrações de HBG ou de glifosato P.A.. Efeitos sobre a viabilidade celular bem como sobre o sistema glutamatérgico foram avaliados utilizando uma abordagem metodológica de análise quantitativa automatizada e imparcial de imagens por meio do equipamento de análise de alto conteúdo (HCA – sigla do inglês: “high content analysis”). Avaliamos também a expressão gênica de marcador glutamatérgico nos diferentes estágios da exposição às concentrações de HBG ou de glifosato P.A. por meio de Transcrição Reversa (RT) e Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

Este estudo foi desenvolvido durante o período de estágio sanduíche na Universidade de Uppsala/Suécia sob a supervisão da Profa. Dra. Eva Brittebo e com a colaboração do pesquisador Dr. Birger Scholz.

4.3.1 Diferenciação das células C17.2

A diferenciação das células C17.2 em neurônios glutamatérgicos foi comprovada com o uso de dois marcadores neuronais glutamatérgicos, VGluT-1 (Transportador vesicular de glutamato) e NMDAR1 (Receptor glutamatérgico) (Figura 42C). A expressão destes marcadores neuronais são fortes indicadores de que as células estão se diferenciando para uma linhagem neuronal glutamatérgica.

Figura 42 - Representação por meio de imagens da coloração fluorescente celular e/ou da imunocitoquímica das células C17.2 indiferenciadas e diferenciadas em neurônios glutamatérgicos.



As imagens contidas em (A) e em (C) foram obtidas com uma ampliação de 20x e as em (B) foram obtidas com uma ampliação de 10x. Todas as imagens continham 4000 células/poço. (A) Células em meio de diferenciação por 24 h (DIV1 a DIV2) submetidas à coloração fluorescente com Hoechst (azul) (corante nuclear) e MitoTracker® Orange (amarelo) (atividade mitocondrial). (B) Células em meio de diferenciação por 4 dias (DIV1 a DIV4) após coloração com Hoechst (azul) e anticorpos contra VGluT-1 (Transportador de glutamato vesicular em neurônios glutamatérgicos) e β -Tubulina III (proteínas de neurofilamentos, marcador de neurônios). (C) Células em meio de diferenciação por 10 dias (DIV1 a DIV10) após coloração com Hoechst (azul) e anticorpos contra VGluT-1, α -internexina (filamento intermediário neuronal expresso na maioria dos neurônios) e NMDAR1 (Receptor glutamatérgico, sendo também utilizado como marcador neuronal glutamatérgico).

O protocolo para a diferenciação das células C17.2 foi otimizado para uma diferenciação neuronal por 9 dias conforme descrito na metodologia. As células C17.2 foram cultivadas com base na densidade celular de 4000 células por poço (Figura 42A, coloração nuclear com corante Hoechst) e condições do meio de cultura celular (meio de proliferação por 24 h - DIV0 a DIV1 - seguido por meio de diferenciação neuronal - DIV1 a DIV10) otimizados para os estudos de toxicidade aguda durante a diferenciação neuronal (Figura 42). No

DIV2, as células não expostas apresentaram atividade mitocondrial baixa a moderada (Figura 42A, coloração com a sonda MitoTracker® Orange). No DIV4, as células expressaram níveis claros de VGluT1 e β -Tubulina III (Figura 42B). O estado de diferenciação neuronal foi determinado com dois marcadores neuronais glutamatérgicos (VGluT1 e NMDAR1) e um marcador intermediário de diferenciação neuronal (α -internexina) (Figura 42C). A expressão moderada de α -internexina, um filamento neuronal intermediário expresso na maioria dos neurônios (LIU et al., 2013), e a forte expressão dos marcadores glutamatérgicos neuronais demonstraram que as células progrediram para uma linhagem neuronal glutamatérgica.

Os efeitos do HBG e do glifosato P.A. nas células C17.2 foram estudados em experimentos de citotoxicidade aguda de curto prazo (exposições por 24 h com observação no DIV2 e por 3 dias com observação no DIV4), experimentos de diferenciação de longo prazo (exposição máxima de 9 dias com observação em DIV10) e na expressão de genes do sistema glutamatérgico (extração de RNA no DIV4 e DIV10).

A escolha das concentrações de HBG e glifosato P.A. utilizadas neste estudo foi baseada na dose utilizada no Estudo I durante a exposição *in vitro* de fatias hipocampais ao HBG (213 μ M). Para os experimentos de 24 h e 3 dias foram utilizados 5 concentrações diferentes (D1: 0,213 μ M; D2: 2,13 μ M; D3: 21,3 μ M; D4: 213 μ M; D5: 2130 μ M). Dentre essas, apenas 3 foram escolhidas para os testes a longo prazo, 9 dias (2,13 μ M; 21,3 μ M e 213 μ M).

4.3.2 Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. no número de células viáveis, na atividade mitocondrial e na geração de EROs durante a diferenciação neuronal

Para contagem das células viáveis foi realizada a coloração com corante nuclear Hoechst. Conforme pode ser observado na Figura 43 as células ainda indiferenciadas (43A, 24 h – DIV1 ao DIV2) mostraram-se mais sensíveis a exposição ao glifosato P.A. e ao HBG, indicando um efeito precoce da exposição sobre as populações de células. A citotoxicidade foi dose-dependente (D5>D4>D3>D2>D1), ou seja, o efeito tóxico decorrente da exposição foi maior quanto maior a concentração de HBG ou de glifosato P.A. utilizada. As células também mostraram-se mais sensíveis à exposição ao HBG quando comparado com o glifosato P.A..

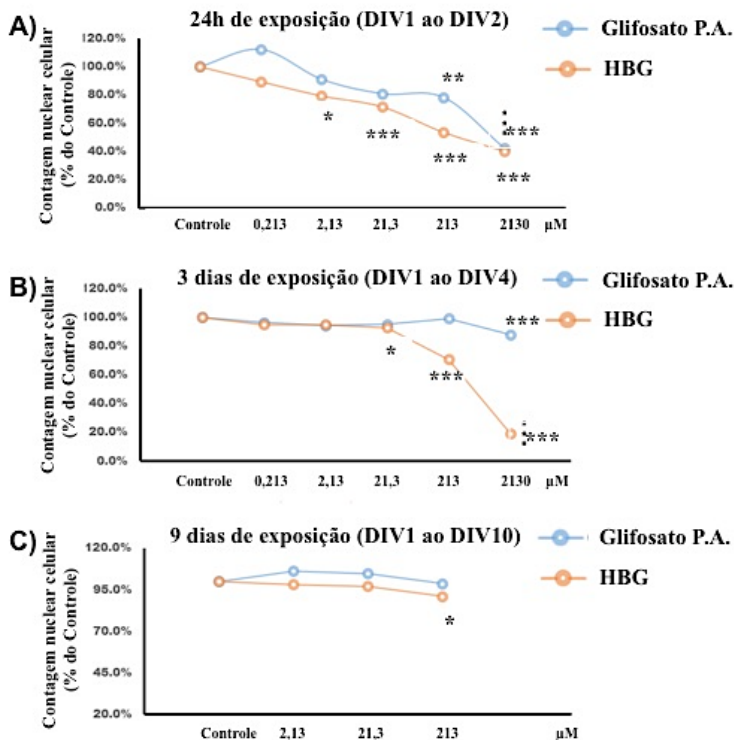


Figura 43 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. no número de células viáveis durante a diferenciação neuronal das células C17.2 após diferentes tempos de exposição: 24 h (A), 3 dias (B) e 9 dias (C). Todos os grupos foram expostos ao HBG ou ao glifosato P.A. a partir do DV1 até o dia da realização da análise: DIV2 (A), DIV4 (B) e DIV10 (C). Para a contagem celular foi utilizada a coloração de contraste com o corante nuclear Hoechst. Os dados foram analisados com o auxílio do equipamento HCA (High Analysis Content - ImageXpress XLS) e os resultados obtidos foram expressos como a porcentagem do controle (100%). Análise estatística: teste post-hoc Dunnetts. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, quando comparado ao respectivo grupo controle.

Com o intuito de verificar uma sensibilidade precoce à exposição ao HBG ou ao glifosato P.A., conforme demonstrado na figura 43, as células foram diferenciadas por 9 dias e o início da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. ocorreu em dias diferentes: a partir do DIV1 (figura 44A); a partir do DIV4 (Figura 44B) ou a partir do DIV7 (Figura 44C).

Em todos os grupos, a coloração nuclear com Hoechst foi realizada no DIV10. Conforme pode ser observado na figura 44, o efeito citotóxico do tratamento foi demonstrado apenas nas células tratadas desde o DIV1 com a maior concentração de HBG, 213 μM (figura 44A).

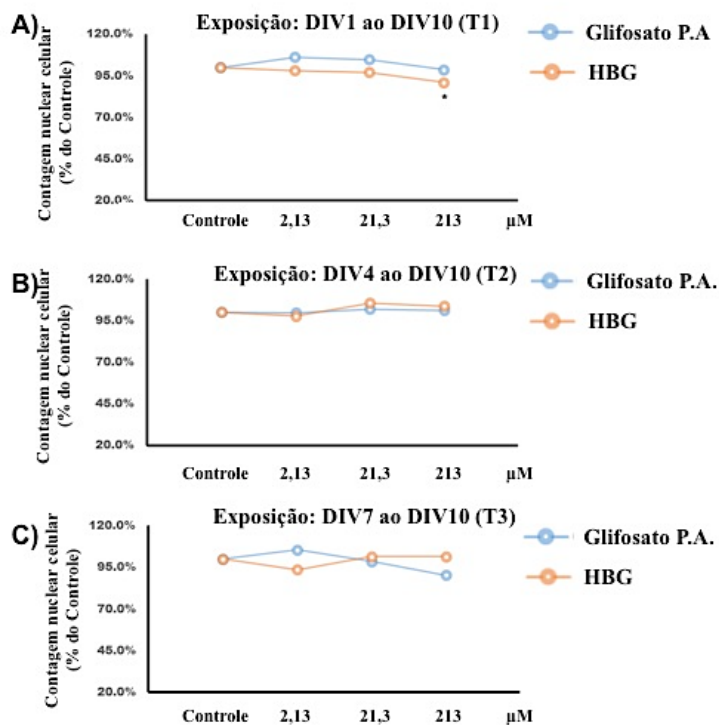


Figura 44 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. no número de células viáveis em função do início da exposição durante a diferenciação neuronal das células C17.2. As células foram mantidas em meio de diferenciação por um período total de 9 dias e a exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. foi iniciado em dias diferentes: (A) as células foram expostas a partir do DIV1 (T1: DIV1 a DIV10); (B) as células foram expostas a partir do DIV4 (T2: DIV4 a DIV10); (c) as células foram expostas a partir do DIV7 (T3: DIV7 a DIV10). Em todos os grupos, as células foram coradas no DIV10 com o corante nuclear Hoechst para a contagem celular. Os dados foram analisados com auxílio do equipamento HCA (High Analysis Content - ImageXpress XLS) e os resultados obtidos foram expressos como a porcentagem do controle (100%). Análise estatística: teste post-hoc Dunnetts. * $p < 0,05$, quando comparado ao respectivo grupo controle.

Este mesmo modelo de tratamento com o início da exposição ao HBG ou glifosato P.A. em dias diferentes da diferenciação também foi utilizado para avaliar a atividade mitocondrial (Figura 45).

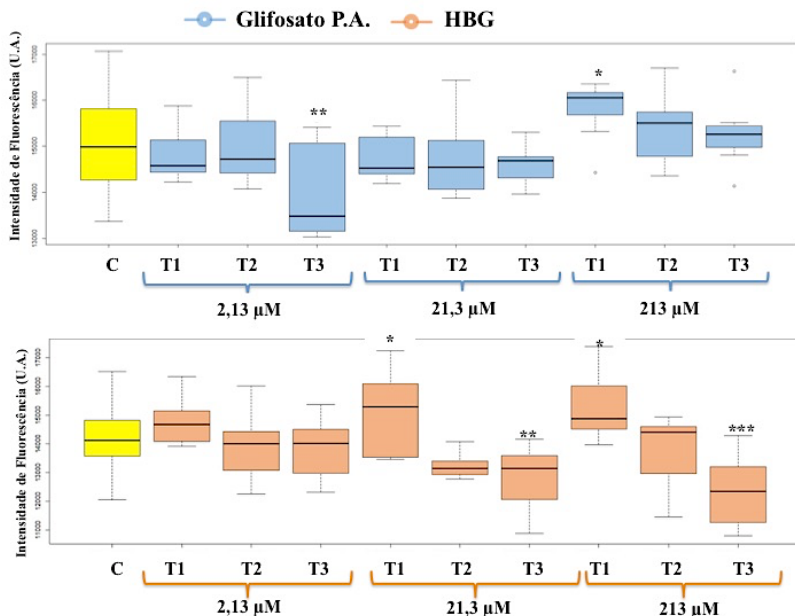


Figura 45 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. na atividade mitocondrial em função do início da exposição durante a diferenciação neuronal das células C17.2. As células foram mantidas em meio de diferenciação por um período total de 9 dias e a exposição às concentrações de HBG ou de glifosato P.A. (D1: 2,13 μM; D2: 21,3 μM, D3: 213 μM) foi iniciada em dias diferentes: no T1 as células foram expostas a partir do DIV1 (T1: DIV1 a DIV10); no T2 as células foram expostas a partir do DIV4 (DIV4 a DIV10); no T3 as células foram expostas a partir do DIV7 (T3: DIV7 a DIV10). Em todos os grupos, no DIV10 as células foram incubadas com a sonda MitoTracker® Orange para a avaliação da atividade mitocondrial. Os dados foram analisados com o auxílio do equipamento HCA (High Analysis Content - ImageXpress XLS) e os resultados obtidos foram expressos como a mediada ± E.P.M. de um total de 6 poços por concentração/grupo. Análise estatística: teste post-hoc Dunnetts. ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05, quando comparado com o respectivo grupo controle.

Foi observado um aumento na atividade mitocondrial após exposição ao HBG nas concentrações 21,3 e 213 μM no T1 (DIV1 a DIV10) e uma diminuição da atividade nas mesmas concentrações no

T3 (DIV7 a DIV10). Quanto ao glifosato P.A., a concentração de 213 μM no T1 (DIV1 a DIV10) aumentou a atividade mitocondrial enquanto que a concentração de 2,13 μM promoveu uma diminuição da atividade no T3 (DIV7 a DIV10). Tanto o glifosato P.A. quanto o HBG aumentaram a atividade mitocondrial após exposição por longo período (T1) e diminuíram a atividade após início tardio de exposição (T3) (Figura 45), demonstrando diferentes respostas quanto ao período de início da exposição.

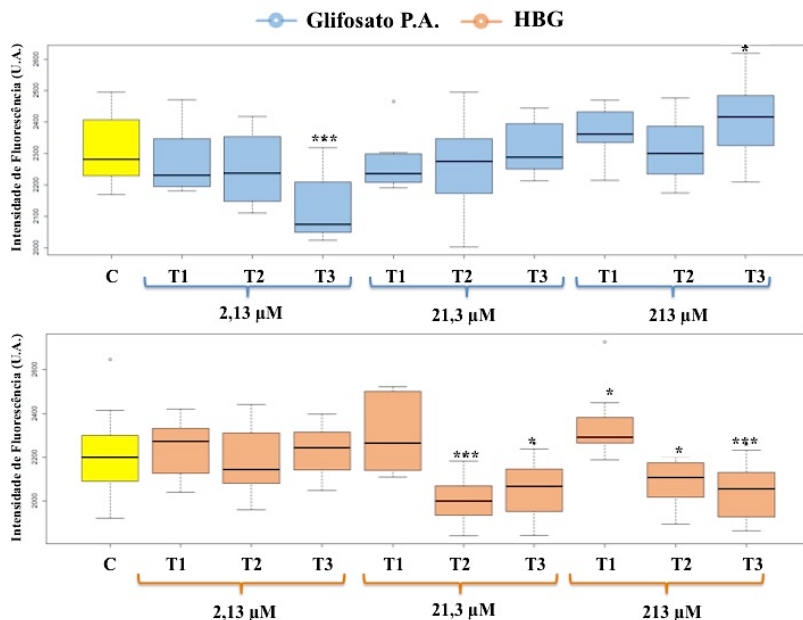


Figura 46 – Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. na formação de EROs em função do início da exposição durante a diferenciação neuronal das células C17.2. As células foram mantidas em meio de diferenciação por um período total de 9 dias e a exposição às concentrações de HBG ou de glifosato P.A. (D1: 2,13 μM ; D2: 21,3 μM , D3: 213 μM) foi iniciada em dias diferentes: no T1 as células foram expostas a partir do DIV1 (T1: DIV1 a DIV10); no T2 as células foram expostas a partir do DIV4 (DIV4 a DIV10); no T3 as células foram expostas a partir do DIV7 (T3: DIV7 a DIV10). Em todos os grupos, no DIV10 as células foram incubadas com a sonda CellROX® Deep Red para a detecção da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os dados foram analisados com o auxílio do equipamento HCA (High Analysis Content - ImageXpress XLS) e os resultados obtidos foram expressos como mediada \pm E.P.M. de um total de 6 poços por concentração/grupo. Análise estatística: teste post-hoc Dunnetts. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, quando comparados com o respectivo grupo controle.

Por meio do uso do mesmo modelo de exposição, verificamos a formação de EROs após exposição à concentração mais alta de glifosato P.A. e de HBG (213 μM), no entanto, em períodos diferentes do início da exposição com o glifosato P.A. e com o HBG. Detecção de EROs após exposição ao glifosato P.A. ocorreu no T3 enquanto que ao HBG no T1 (Figura 46).

4.3.3 Avaliação da expressão de VGluT1 e β -Tubulina III após exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. durante a diferenciação neuronal

A expressão de VGluT-1 e β -III-Tubulina também foi verificada nos diferentes grupos de tratamento durante a diferenciação por 9 dias (DIV1 a DIV10) (Figura 47 e 48, respectivamente).

Quanto ao glifosato P.A. foi verificado que o mesmo aumentou significativamente a expressão de VGluT-1 (Figura 47) em todos os tempos (T1, T2 e T3) na concentração 2,13 μM e no T2 e T3 na concentração de 21,3 μM . Quanto ao HBG, a concentração 21,3 μM no T2 e 213 μM no T1 e T2 demonstraram provocar um aumento na expressão do transportador vesicular de glutamato.

O aumento da expressão de β -Tubulina III (Figura 48) foi verificado em todos os tempos após a exposição às concentrações 2,13 μM e 21,3 μM de glifosato P.A.. Para a concentração de 213 μM apenas o T2 demonstrou provocar um aumento na expressão. Quanto a exposição ao HBG, em todas as concentrações no T2 foi verificado um aumento na expressão de β -tubulina III bem como após a exposição à concentração de 213 μM no T1.

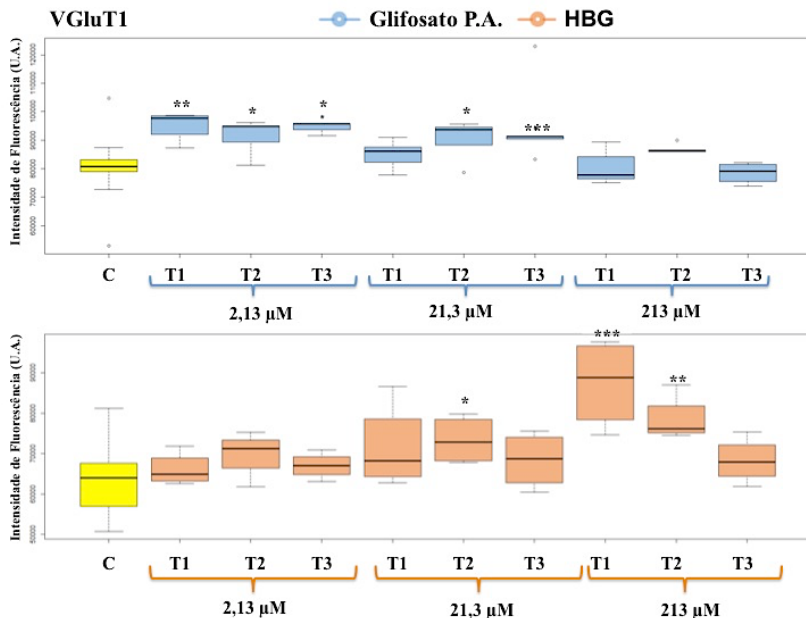


Figura 47 – Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. na expressão de VGluT-1 em função do início da exposição durante a diferenciação neuronal das células C17.2. As células foram mantidas em meio de diferenciação por um período total de 9 dias e a exposição às concentrações de HBG ou de glifosato P.A. (D1: 2,13 μM; D2: 21,3 μM, D3: 213 μM) foi iniciada em dias diferentes: no T1 as células foram expostas a partir do DIV1 (T1: DIV1 a DIV10); no T2 as células foram expostas a partir do DIV4 (DIV4 a DIV10); no T3 as células foram expostas a partir do DIV7 (T3: DIV7 a DIV10). Em todos os grupos, no DIV10 as células foram submetidas à análise imunocitoquímica. Os dados foram analisados com auxílio do equipamento HCA (High Analysis Content - ImageXpress XLS) e os resultados obtidos foram expressos como mediana ± E.P.M de um total de 6 poços por concentração/grupo. Análise estatística: teste post-hoc Dunnetts. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, quando comparados com o respectivo grupo controle.

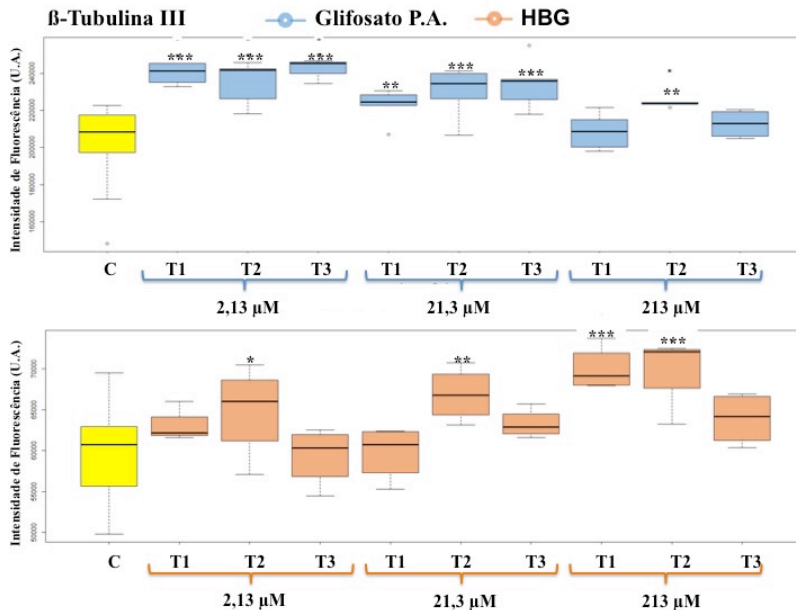


Figura 48 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. na expressão de β -Tubulina III em função do início da exposição durante a diferenciação neuronal das células C17.2. As células foram mantidas em meio de diferenciação por um período total de 9 dias e a exposição às concentrações de HBG ou de glifosato P.A. (D1: 2,13 μ M; D2: 21,3 μ M, D3: 213 μ M) foi iniciada em dias diferentes: no T1 as células foram expostas a partir do DIV1 (T1: DIV1 a DIV10); no T2 as células foram expostas a partir do DIV4 (DIV4 a DIV10); no T3 as células foram expostas a partir do DIV7 (T3: DIV7 a DIV10). Em todos os grupos, no DIV10 as células foram submetidas à análise imunocitoquímica. Os dados foram analisados com auxílio do equipamento HCA (High Analysis Content - ImageXpress XLS) e os resultados obtidos foram expressos como mediana \pm E.P.M de um total de 6 poços por concentração/grupo. Análise estatística: teste post-hoc Dunnetts. *** p <0,001, ** p <0,01, * p <0,05, quando comparados com o respectivo grupo controle.

4.3.4 Avaliação da expressão gênica do transportador vesicular de glutamato (VGLuT1) e do receptor glutamatérgico (NMDAR1) após exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. durante a diferenciação neuronal

Como complemento aos estudos de imunocitoquímica também foi investigada a alteração da expressão de mRNA de VGLuT-1 e NMDAR1 por meio da técnica de RT-qPCR após exposição de 3 ou 9

dias ao HBG ou ao glifosato P.A. durante a diferenciação neuronal das células C17.2.

Conforme pode ser observado na figura 49 após o período de 3 dias de exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. não foram observadas alterações significativas quanto a expressão de VGluT-1. Após 9 dias de exposição e diferenciação, tanto o glifosato P.A. quanto o HBG demonstraram provocar um aumento na expressão desse transportador quando comparados com grupo controle, no entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa quando consideramos como significância um $p < 0,05$ (p obtido: $p < 0,07$ para o glifosato P.A. e $p < 0,1$ para o HBG). Entretanto, quando apenas os grupos tratados com o HBG foram comparados foi observado um aumento significativo na expressão de VGluT-1 após 9 dias de exposição em relação ao período de 3 dias.

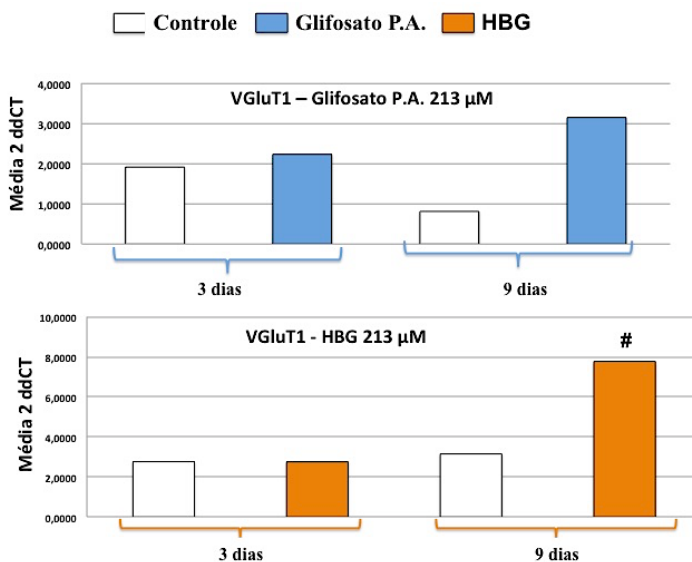


Figura 49 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. na expressão expressão gênica de VGluT-1 durante a diferenciação neuronal das células C17.2 após diferentes tempos de exposição (3 ou 9 dias). A expressão do mRNA de VGluT1 em células C17.2 foi analisada por qPCR após tratamento com o HBG ou com o glifosato P.A. na concentração de 213 µM. As células foram expostas no DIV1 e o RNA foi extraído após 3 dias (DIV4) ou 9 dias (DIV10) de exposição em meio de diferenciação. Os grupos controle e tratado continham um n de 6 amostras (pool de 4 poços por amostra). Análise estatística: teste *t* com correção de Welch. $\# < 0,05$, quando o grupo tratado (3 dias) foi comparado com o grupo tratado (9 dias).

Quanto à expressão do receptor de glutamato, NMDAR1 (Figura 50), não foram observadas diferenças após a exposição ao glifosato P.A. ou ao HBG em nenhum dos tempos avaliados.

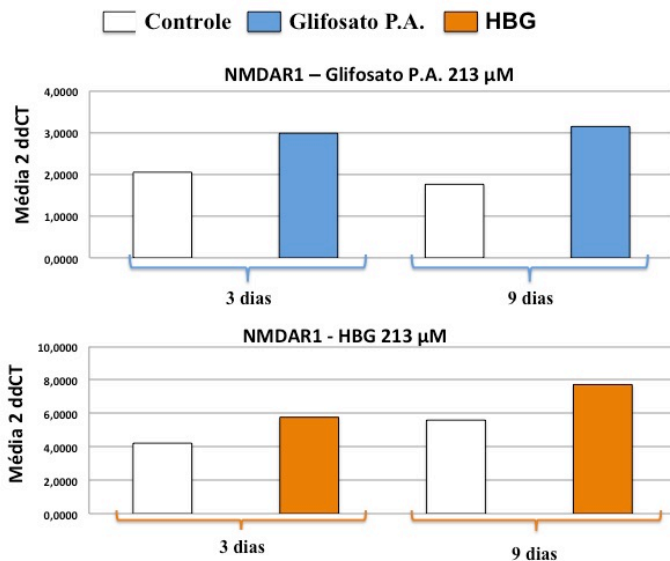


Figura 50 - Efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. na expressão gênica de NMDAR1 durante a diferenciação neuronal das células C17.2 após diferentes tempos de exposição (3 ou 9 dias). A expressão do mRNA de NMDAR1 em células C17.2 foi analisada por qPCR após tratamento com o HBG ou com o glifosato P.A. na concentração 213 µM. As células foram expostas no DIV1 e o RNA foi extraído após 3 dias (DIV4) ou 9 dias (DIV10) de exposição em meio de diferenciação. Os grupos controle e tratado continham um n de 6 amostras (pool de 4 poços por amostra). Análise estatística: teste *t* com correção de Welch.

4.3.5 Discussão

Devido à natureza complexa dos processos de neurotoxicidade durante o desenvolvimento, há relativamente pouco conhecimento sobre como a maioria das substâncias influencia o desenvolvimento do SNC. Estima-se que atualmente entre 10.000 a 30.000 produtos químicos comercialmente disponíveis possuem dados insuficientes sobre os respectivos perfis toxicológicos, incluindo o potencial neurotóxico durante o desenvolvimento (KNUDSEN et al., 2011; BELLINGER, 2012; TSUJI; CROFTON, 2012).

Em 2006, Rull, Ritz e Shaw (2006) sugeriram que a exposição ambiental com um número crescente de pesticidas agrícolas, dentre eles os organofosforados, pode aumentar o risco de neonatos com malformações decorrentes de defeitos no fechamento do tubo neural. Os autores relataram que a proximidade residencial dos locais de aplicações de pesticidas agrícolas pode consistir em uma importante fonte de exposição a agentes classificados como toxinas do desenvolvimento.

Greenlee, Ellis e Berg (2004) avaliaram exposições ambientalmente relevantes e de baixa dose a diversos agrotóxicos utilizados em atividades não-agrícolas, como a jardinagem. Para isso, os autores realizaram estudos durante o desenvolvimento de embriões de camundongo em período correspondente aos primeiros 5-7 dias após a concepção em humanos. Os agentes testados foram os agrotóxicos comumente usados no meio-oeste dos Estados Unidos, incluindo herbicidas (ex. atrazina), inseticidas (ex. permetrina), fungicidas, dessecante (diquat) e fertilizante (nitrato de amônio). Os autores demonstraram que as lesões induzidas pelos pesticidas avaliados podem ocorrer muito precocemente durante o desenvolvimento, e em concentrações consideradas seguras ou sem conseqüências adversas para a saúde dos seres humanos.

O aumento dos relatos de incidência de desordens do desenvolvimento neurológico, como o autismo, e dados empíricos sugerindo que este aumento poderia estar relacionado com o elevado uso do glifosato aumentaram o interesse de pesquisas envolvendo a avaliação do potencial neurotóxico deste herbicida. Em 2009, a EPA publicou que iria começar uma revisão do registro do glifosato e para isso exigiu estudos de neurotoxicidade após exposições agudas e subcrônicas ao mesmo.

Neste contexto, estudos *in vivo* com animais, subcrônicos e crônicos, vêm relatando as conseqüências neuronais da exposição pré e pós-natal ao glifosato ou a suas preparações comerciais (DARUICH;

ZIRULNIK; GIMENEZ, 2001; CATTANI et al., 2014; GALLEGOS et al., 2016). No entanto, avaliar a extensão da toxicidade de um composto em um embrião depende de vários fatores. Os efeitos sobre o desenvolvimento neurológico não dependem apenas do tipo de exposição, incluindo a dose e a duração, mas também do estágio de desenvolvimento no momento específico da exposição (FINNELL, 1999; BAL-PRICE et al., 2012). Sendo assim, o uso de metodologias *in vitro*, como cultura de células progenitoras induzidas a diferenciação neuronal, pode ajudar a compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na neurotoxicidade do desenvolvimento (DE GROOT; WESTERINK; DINGEMANS, 2013).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. em células C17.2 durante período de diferenciação neuronal. Sendo assim, foram realizadas análises com o intuito de avaliar o efeito citotóxico e a expressão de genes após exposição por tempos diferentes (24 h, 3 e 9 dias) durante a diferenciação neuronal. Para este fim, no presente estudo foi utilizada uma metodologia semi-automatizada de análise de alto conteúdo (HCA). Os instrumentos HCA são microscópios de fluorescência automatizados desenvolvidos para realizar varreduras rápidas de múltiplos canais em várias amostras de células vivas ou fixadas em placas de 96 poços (ou maiores), bem como para realizar a avaliação das imagens dessas varreduras. A análise realizada por HCA foi complementada com a verificação da expressão gênica realizada com o uso da técnica de qPCR.

Conforme descrito na metodologia, as células escolhidas foram as C17.2, uma linhagem celular progenitora neuronal multipotente proveniente de camundongo com 5 dias de idade (pós-natal) (SNYDER et al., 1992; LUNDQVIST et al., 2013). A otimização inicial das condições de cultura celular resultou em um meio que diferenciou as células C17.2 em células neuronais glutamatérgicas, comprovado pela expressão de alfa-internexina, VGluT1 e NMDAR1.

As células viáveis, após exposição em diferentes tempos ao HBG ou ao glifosato P.A., foram contadas utilizando uma coloração com o corante nuclear Hoechst. O número de células diminuiu de forma dose- e tempo-dependente após exposição ao HBG e ao glifosato P.A.. Esta diminuição foi mais visível após exposição por 24 h ou 3 dias. Por outro lado, no tratamento de longo prazo (9 dias) a porcentagem de células viáveis com relação ao controle teve uma diminuição apenas após exposição ao HBG e na concentração mais alta (213 μ M). O número de células viáveis após 9 dias foi maior do que quando comparado com os

tempos de 24 h e 3 dias, o que poderia indicar uma recuperação do dano inicial. Com isso, os resultados apontam para um efeito precoce do HBG e do glifosato P.A. durante a diferenciação neuronal uma vez que as células ainda indiferenciadas mostraram-se mais sensíveis à exposição.

Para comprovar o efeito precoce do tratamento, foram realizados experimentos de longo prazo em meio de diferenciação (9 dias) e com início de exposição em dias diferentes. As células foram separadas em 3 grupos, com início de tratamento no DIV1 ou DIV4 ou DIV7. O número de células viáveis foi menor apenas no grupo tratado desde o início da diferenciação com o HBG. Os demais grupos, assim como o glifosato P.A. em todos os grupos, não apresentaram diferenças significativas quando comparados com o respectivo grupo controle. Estes resultados, juntamente com os observados após a exposição por tempos diferentes, apontam para uma toxicidade precoce do HBG durante a diferenciação neuronal.

Neste contexto, Coullery, Ferrari e Rosso (2016) avaliaram o efeito da exposição ao glifosato na morfologia e no desenvolvimento de culturas de neurônios hipocâmpais. Os autores relataram que os neurônios piramidais indiferenciados expostos ao glifosato apresentaram atraso no desenvolvimento caracterizado por uma diminuição da diferenciação axonal e alongamento do neurito, além de apresentarem mudanças na morfologia dos cones de crescimento. Como mecanismo de ação foi demonstrado que o glifosato levou a uma diminuição no nível de Wnt5a, um fator chave para o desenvolvimento e a maturação inicial dos neuritos, além de induzir uma redução da atividade da CaMKII. Os autores sugeriram que as alterações observadas podem refletir uma subsequente disfunção neuronal.

No presente trabalho também avaliamos a atividade mitocondrial nas células em meio de diferenciação por longo período de tempo (9 dias) e com o início de exposição ao glifosato P.A. ou ao HBG em dias diferentes, T1 (DIV1 a DIV10), T2 (DIV4 a DIV10) e T3 (DIV7 a DIV10). Para isto, foi utilizada a sonda fluorescente MitoTracker® Orange CM-H2 TMRo, ferramenta muito útil para a determinação da atividade oxidativa das mitocôndrias. A sonda MitoTracker® Orange, forma reduzida não fluorescente de tetrametilossamina, é oxidada pelo oxigênio molecular em células respirando ativamente gerando a forma oxidada e fluorescente. Esta sonda depende do potencial de membrana para se acumular nas mitocôndrias (AGNELLO; MORICI; RINALDI, 2008).

Os resultados demonstraram um aumento na atividade mitocondrial após exposição ao HBG nas concentrações 21,3 e 213 μM e ao glifosato P.A. na concentração de 213 μM quando as células foram expostas desde o primeiro dia de diferenciação (T1: DIV1 a DIV10). No entanto, células expostas ao HBG (21,3 μM e 213 μM) e ao glifosato P.A. (2,13 μM) tiveram a atividade mitocondrial diminuída quando o tratamento foi iniciado no T3 (DIV7 ao DIV10). Com isso, podemos concluir que tanto o glifosato P.A. quanto o HBG aumentaram a atividade mitocondrial após exposição por longo período (T1) e diminuíram a atividade após início tardio de exposição (T3), demonstrando promover diferentes respostas na atividade mitocondrial de acordo com o estágio de diferenciação no qual as células foram expostas.

Sabendo que alterações no potencial de membrana mitocondrial podem levar à geração de EROs, no presente estudo também foi verificado os níveis de formação de EROs em experimentos realizado seguindo as mesmas condições de exposição descritas para a atividade mitocondrial. A produção intracelular de EROs foi detectada pela incubação com a sonda CellROX® Deep Red. Esta sonda não é fluorescente no estado reduzido, exibindo fluorescência após a oxidação por EROs.

Os resultados demonstraram que a formação de EROs aumentou após o tratamento com 213 μM de glifosato P.A. no T3, e não no T1 como foi demonstrado na avaliação da atividade mitocondrial. Quanto ao HBG, 213 μM , um aumento na formação de EROs ocorreu no T1, onde também foi verificado um aumento da atividade mitocondrial. Estes dados indicam que a exposição ao HBG desde o início da diferenciação e por longo período leva a um aumento na atividade oxidativa mitocondrial e dos níveis de EROs.

Heu et al (2012) demonstrou que distúrbios no potencial da membrana mitocondrial induzidos pelo glifosato poderiam ser uma das causas de apoptose em culturas de queratinócitos após exposição a este herbicida. Os autores concluíram que o papel das mitocôndrias na via citotóxica foi decorrente da superprodução de EROs resultando em estresse oxidativo, apoptose e, em condições particulares, em necrose.

Com o intuito de avaliar o sistema glutamatérgico e a diferenciação neuronal, a expressão dos genes de VGluT-1 e β -Tubulina III também foi verificada nos diferentes grupos de tratamento durante a diferenciação por 9 dias (DIV1 a DIV10).

O transportador de glutamato vesicular (VGluT) está envolvido no carregamento ativo do glutamato em vesículas sinápticas antes da

liberação exocitótica, desempenhando um papel crucial na sinalização do glutamato. Das três isoformas de VGluT, VGluT1 e VGluT2 estão localizadas em diferentes populações de neurônios glutamatérgicos, enquanto que VGluT3 é encontrado em neurônios GABAérgicos, colinérgicos e monoaminérgicos (DANBOLT, 2001; BRADY et al., 2012). Várias linhas de evidência sugerem que a expressão de VGluT1 pode ser importante para o desenvolvimento do terminal pré-sináptico. Além disso, os níveis de VGluT1 influenciam diretamente a quantidade de carga e liberação de glutamato vesicular (BERRY et al., 2012).

Em relação ao VGluT1, os resultados demonstraram que o glifosato P.A. aumentou significativamente a expressão do transportador em todos os tempos (T1, T2 e T3) na concentração de 2,13 μM e, no T2 e T3 na concentração de 21,3 μM . Quanto ao HBG, a concentração de 21,3 μM no T2 e de 213 μM no T1 e T2 apresentaram aumento na expressão de VGluT-1. Nenhuma diminuição na expressão deste transportador foi verificada tanto após exposição ao glifosato P.A. quanto ao HBG.

A liberação vesicular do glutamato é a principal via de neurotransmissão excitatória no cérebro de mamíferos. A expressão dos VGluTs pode definir fenótipos glutamatérgicos nos neurônios, uma vez que a expressão forçada de VGluT1 e VGluT2 em neurônios inibitórios induz a liberação de glutamato (WOJCIK et al., 2004). O aumento da expressão deste transportador vesicular ocasionado pelo HBG e pelo glifosato P.A. pode estar provocando um excesso de liberação de glutamato durante a diferenciação neuronal, podendo levar à morte neuronal devido ao fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica. De fato, em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa demonstramos um aumento na liberação de glutamato em hipocampo de animais de 15 dias de idade após exposição *in vivo* ao HBG durante o período pré e pós-natal (CATTANI et al., 2014). Níveis elevados de VGluTs em vertebrados foram associados à excitotoxicidade em modelos animais de epilepsia e de lesão cerebral traumática (VERMA et al., 2015).

Como complemento aos estudos de imunocitoquímica também foi investigada alteração na expressão de mRNA de VGluT-1 por meio da técnica de RT-qPCR após exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. durante período de diferenciação neuronal de 3 ou 9 dias. Nenhuma alteração foi observada após 3 dias de exposição, entretanto, após 9 dias tanto o glifosato P.A. quanto o HBG demonstraram provocar um aumento na expressão do transportador quando comparados com grupo controle, porém, não foram estatisticamente significativos. Neste trabalho também foi avaliada a expressão do receptor de glutamato,

NMDAR1, no entanto, nenhuma alteração em sua expressão foi observada.

Quanto a expressão de β -Tubulina III foi verificado um aumento após a exposição ao glifosato P.A. em todos os tempos nas concentrações de 2,13 μ M e 21,3 μ M e, no T2 para a concentração de 213 μ M. Quanto à exposição ao HBG, em todas as concentrações no T2 foi verificado um aumento na expressão de β -Tubulina III bem como após a exposição à concentração de 213 μ M no T1. Nenhuma diminuição quanto a expressão β -Tubulina III foi verificada após exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. nas concentrações e tempos avaliados.

A tubulina, proteína de subunidade dos microtúbulos, é um heterodímero α/β . Nos mamíferos, existem sete isotipos de β -tubulina estabelecidos, referidos como β I, β II, β III, β IVa, β IVb, β V e β VI. A β -Tubulina III é encontrada quase que exclusivamente em neurônios, sendo considerada como um bom marcador neuronal. Sabe-se que os microtúbulos estão envolvidos em muitas funções celulares, incluindo mitose, transporte intracelular, determinação da morfologia celular e diferenciação (GUO; WALSS-BASS; LUDUEÑA, 2010).

Aumentos da expressão de β -Tubulina III em células imaturas está relacionada com a promoção da diferenciação neuronal após exposição ao H_2O_2 (ESTRADA et al., 2014), cetamina (HUANG et al., 2015), e também devido ao estresse do retículo endoplasmático (KAWADA et al., 2014). Sendo assim, os resultados indicaram que o tratamento com o HBG ou com o glifosato P.A. tiveram o potencial de influenciar a expressão da β -Tubulina III afetando assim a diferenciação neuronal das células C17.2.

Devido a importância da diferenciação durante a neurogênese, é possível que a exposição pré e pós-natal ao HBG ou ao glifosato P.A. pode interferir com a neurogênese no cérebro em desenvolvimento. Este aumento da diferenciação durante o neurodesenvolvimento pode resultar em anormalidades quanto ao número e proporção de neurônios e astrócitos, resultando em distúrbios quanto a estrutura e formação de circuitos neuronais.

4.3.6 Conclusões parciais

A exposição ao HBG ou ao glifosato P.A. das células C17.2 em diferenciação, demonstrou provocar:

- Citotoxicidade precoce (células indiferenciadas foram mais sensíveis ao HBG e ao glifosato P.A.);
- Distúrbio na atividade mitocondrial;
- Aumento na geração de EROs;
- Indução da expressão de genes envolvidos com o sistema glutamatérgico e com a diferenciação neuronal, VGluT1 e β -Tubulina III.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio do uso de estudos envolvendo abordagens *in vivo* (Estudo II), *in vitro* (Estudo I e III) e *in silico* (ESTUDO II) utilizando modelos animais, bem como de cultura celular e simulação computacional, demonstramos claramente a neurotoxicidade induzida pelo glifosato em tecido hipocampal e em células progenitoras neurais. Os mecanismos envolvidos no processo de neurotoxicidade estão associados ao estresse oxidativo, excitotoxicidade glutamatérgica, alterações do metabolismo energético, além de alterações na expressão de proteínas importantes para a função neural (Figura 51). Dentre esses, o envolvimento do sistema glutamatérgico e o estresse oxidativo, efeitos observados nos três estudos, são evidências da neurotoxicidade do glifosato. Tanto o estresse oxidativo (CHEN; LIU, 2017) quanto a excitotoxicidade glutamatérgica (DOBLE, 1995; PLATT, 2007; MILADINOVIC; NASHED; SINGH, 2015) ocorrem em diversas patologias que acometem o SNC, incluindo doenças psiquiátricas e neurodegenerativas.

Os resultados demonstrados nos estudos desta tese corroboram entre si e apontam para um potencial neurotóxico do glifosato focando no período do neurodesenvolvimento. O presente trabalho abrangeu diferentes idades e tempos de exposição. Tanto as exposições por curto período de tempo quanto por períodos mais longos, seja em modelo de cultura celular, exposição do tecido ao herbicida ou exposição subcrônica *in vivo*, demonstraram alterações neuroquímicas em períodos críticos do neurodesenvolvimento, o que pode estar contribuindo para o comportamento tipo depressivo observado na fase adulta.

A influência da exposição a pesticidas em transtornos mentais, suicídio e saúde em geral é um problema de saúde pública muito importante. Diversos estudos têm avaliado o impacto que a exposição prolongada a grandes quantidades de pesticidas pode ter sobre a saúde mental dos agricultores, levando-os à depressão e ao suicídio (STALLONES; BESELER, 2002; STALLONES, 2006; MEYER et al., 2010; BEARD et al., 2014; FARIA; FASSA; MEUCCI, 2014; FARIA et al., 2014). O uso de pesticidas também é associado com outras condições neurológicas, incluindo a doença de Parkinson (RITZ; PAUL; BRONSTEIN, 2016) e a doença de Alzheimer (JONES, 2010; HAYDEN et al., 2010), ambas tendo a depressão como um de seus efeitos.

Segundo a organização mundial de saúde (OMS), mais de 300 milhões de pessoas de todas as idades sofrem de depressão atualmente

no mundo, e esse número representou um aumento de mais de 18% entre 2005 e 2015. A preocupação com o aumento no número de casos é tanta que no ano de 2017 a OMS liderou uma campanha mundial sobre a depressão, a qual é uma das condições prioritárias abrangidas pelo Programa de Ação de Interesse Mental da OMS (mhGAP) (OMS, 2017).

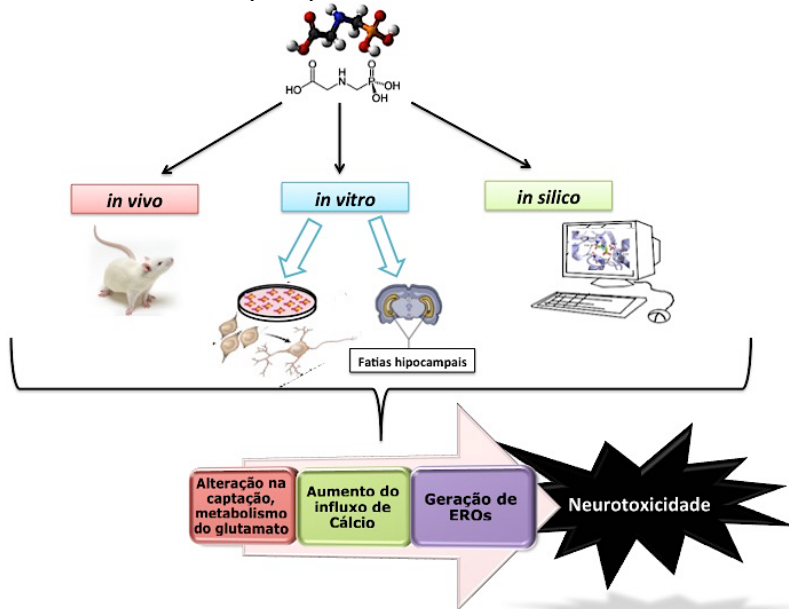
No pior dos casos, a depressão pode levar ao suicídio e, atualmente, cerca de 800.000 pessoas morrem por suicídio a cada ano, sendo considerado como a segunda principal causa de morte entre jovens de 15 a 29 anos. Estima-se que cerca de 30% dos suicídios globais sejam devido à autointoxicação por pesticidas, a maioria dos quais ocorre em áreas agrícolas rurais em países de baixa e média renda (OMS, 2017).

A depressão é uma doença complexa e pode ter vários fatores desencadeantes. Apesar de que a correlação positiva entre o aumento no uso de agrotóxicos com o aumento de casos de depressão parece ser bem evidente, ainda há uma escassez de dados científicos que comprovem tal relação. A maioria dos estudos focam apenas em agrotóxicos já conhecidos por seu potencial neurotóxico, como os organofosforados, deixando de lado pesticidas como o glifosato, os quais são largamente utilizados na agricultura e não tiveram uma avaliação quanto ao seu potencial neurotóxico já que foram inicialmente considerados seguros.

Assim, o presente estudo demonstrou que as alterações bioquímicas decorrentes da exposição ao glifosato P.A. e/ou ao HBG resultaram em alterações fisiológicas levando a um comportamento tipo depressivo após exposição por longo período de tempo. Cabe ressaltar que novos experimentos, tanto comportamentais quanto bioquímicos, ainda são necessários para comprovar o potencial neurotóxico do glifosato durante o neurodesenvolvimento.

Levando em consideração a miríade de compostos químicos a qual estamos expostos atualmente e que menos de 20% destes compostos foram testados quanto a sua toxicidade durante o neurodesenvolvimento, ressaltamos a importância de estudos que visam sanar esta lacuna, fornecendo cada vez mais dados quanto ao efeito desses compostos, ajudando assim a melhorar a qualidade de vida da população.

Figura 51 – Representação esquemática dos 3 estudos desenvolvidos neste trabalho bem como dos principais resultados obtidos.



Os estudos desenvolvidos neste trabalho utilizaram de uma abordagem *in vivo* (Estudo II), *in vitro* (Estudo I e III) e *in silico* (ESTUDO II), bem como de modelos animais, cultura celular e simulação computacional, para demonstrar o potencial neurotóxico do herbicida glifosato. Os principais mecanismos envolvidos no processo de neurotoxicidade do glifosato englobaram o estresse oxidativo e a excitotoxicidade glutamatérgica.

6 CONCLUSÕES

- O estudo I demonstrou diferenças significativas entre a toxicidade da formulação comercial de um herbicida à base de glifosato (HBG), do princípio ativo glifosato e de seu principal metabólito, o AMPA. O conjunto dos resultados obtidos com os parâmetros bioquímicos avaliados levaram à conclusão que a exposição *in vitro* das fatias hipocâmpais de ratos imaturos ao HBG provocou uma maior toxicidade do que a exposição ao glifosato P.A. ou ao AMPA.

- Exposições pré e pós-natal ao HBG (Estudo II) levam a um aumento na produção de estresse oxidativo promovendo um desequilíbrio na atividade das enzimas relacionadas ao sistema antioxidante de forma diferente quanto ao tempo de exposição, demonstrando que no período relacionado ao neurodesenvolvimento foram encontradas alterações mais significativas nestes parâmetros;

- Alguns dos mecanismos subjacentes à neurotoxicidade induzida pelo HBG em modelos *in vivo* e *in vitro* com animais envolveram a ativação do receptor NMDA, a liberação da proteína astrocítica S100B, e a diminuição da ativação da via NF- κ B de p65.

- A inibição da enzima colinesterase em fatias de hipocampo tratadas *in vitro* com HBG, glifosato P.A. ou AMPA, ou, no hipocampo de animais expostos de forma subcrônica (*in vivo*) ao HBG sugere o envolvimento do sistema colinérgico, além do glutamatérgico.

- A persistência do fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica desde a fase imatura até a fase adulta no hipocampo de ratos pode estar relacionada, ao menos em parte, com o comportamento tipo depressivo observado nos animais adultos após a exposição subcrônica ao HBG.

- O HBG e o glifosato P.A. afetaram de forma diferente, em termos de citotoxicidade e metabolismo, as células C17.2 durante período de diferenciação neuronal.

- A exposição ao HBG e ao glifosato P.A. durante a diferenciação neuronal das células C17.2 induziu um aumento da expressão de VGluT e β -Tubulina III alterando a liberação de glutamato e a diferenciação neuronal.

Tendo em vista os resultados expostos nesta tese, destacamos o potencial neurotóxico dos herbicidas à base de glifosato, ressaltando a necessidade de um controle mais rigoroso quanto ao uso bem como quanto a avaliação toxicológica deste agrotóxico. Assim, enfatizamos a importância em utilizar tanto as formulações comerciais quanto os

ingredientes ativos e seus metabólitos para uma avaliação mais coerente do perfil toxicológico dos agrotóxicos.

7 PERSPECTIVAS

Apoiados nos resultados obtidos até o presente momento evidenciando a neurotoxicidade induzida pela formulação comercial contendo glifosato, bem como pelo glifosato P.A. e seu metabólito AMPA, para dar continuidade a esses estudos pretende-se:

- Avaliar o mecanismo de morte neuronal, assim como realizar a análise morfométrica em hipocampo dos animais expostos subcrônicamente ao HBG;
- Proceder novos experimentos investigando outros estudos comportamentais que possam estar associados aos transtornos psiquiátricos, como esquizofrenia;
- Realizar os mesmo experimentos com animais fêmeas para avaliar as diferenças entre os gêneros;
- Verificar a modulação de vias de sinalização neuronal envolvidas com o estresse oxidativo;
- Verificar a participação do sistema GABAérgico no mecanismo de toxicidade do HBG, glifosato P.A. e AMPA;
- Verificar a expressão de algumas das enzimas do sistema antioxidante, como a SOD, a CAT e a tiorredoxina redutase, tanto na fase imatura (PND15) quanto na fase adulta (PND60) de ratos expostos subcrônicamente ao HBG bem como a expressão do receptor glutamatérgico NMDA e dos transportadores astrocitários de glutamato;
- Avaliar a exposição lactacional ao HBG utilizando ¹⁴C-glifosato;
- Avaliar se a interrupção da exposição ao HBG, por diferentes períodos, é capaz de reverter os efeitos causados pelo herbicida no sistema nervoso de ratos.

REFERÊNCIAS

- ABRASCO. Associação Brasileira de Saúde Coletiva. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Organização: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 624p, 2015.
- ACQUAVELLA, J. F.; ALEXANDER, B. H.; MANDEL, J. S.; GUSTIN, C.; BAKER, B.; CHAPMAN, P.; BLEEKE, M. Glyphosate Biomonitoring for Farmers and Their Families: Results from the Farm Family Exposure Study. **Environmental Health Perspectives**, V. 12, 2004.
- ADAM, A.; MARZUKI, A.; ABDUL RAHMAN, H.; ABDUL AZIZ, M. The oral and intratracheal toxicities of ROUNDUP and its components to rats. **Veterinary and human toxicology**, v. 39, p. 147-51, 1997.
- ADINOLFI, M. The development of the human blood-CSF-brain barrier. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 27, n. 4, p. 532-7, 1985.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymology**, v. 204, p. 234–254, 1984.
- AGNELLO, M.; MORICI, G.; RINALDI, A. M. A method for measuring mitochondrial mass and activity. **Cytotechnology**, v. 56, p. 145-149, 2008.
- AGNISH, N. D.; KELLERT, K. A. The Rationale for Culling of Rodent Litters. **Fundamental And Applied Toxicology**, v. 38, p. 2 – 6, 1997.
- AGRA, N. G.; SANTOS, R. F. **Agricultura brasileira: situação atual e perspectivas de desenvolvimento**. Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural. Recife, 2001.
- AHN, H. J., HERNANDEZ, C. M., LEVENSON, J. M., LUBIN, F. D., LIOU, H. C. AND SWEATT, J. D. c-Rel, an NF-kappaB family transcription factor, is required for hippocampal long-term synaptic

plasticity and memory formation. **Learning & Memory**, v. 15, n. 7, p. 539-49, 2008.

ALEKSEENKO, A. V., LEMESHCHENKO, V. V., PEKUN, T. G., WASEEM, T. V.; FEDOROVICH, S. V. Glutamate-induced free radical formation in rat brain synaptosomes is not dependent on intrasynaptosomal mitochondria membrane potential. **Neuroscience Letters**, v. 513, p. 238-242, 2012.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Tradução: Ana Letícia de Souza Vanz et al. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALBRECHT, J.; SIDORYK-WĘGRZYNOWICZ; ZIENLIŃSKA, M.; ASCHNER, M. Roles of glutamine in neurotransmission. **Neuron Glia Biology**, v. 6, p. 263-276, 2011.

ALMEIDA, R. F.; THOMAZI, A. P.; GODINHO, G. F.; SAUTE, J. A.; WOFCHUK, S. T.; SOUZA, D. O.; GANZELLA, M. Effects of depressive-like behavior of rats on brain glutamate uptake. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 8, p. 1164-71, 2010.

AMARAL, D.G.; WITTER, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31, p. 571-91, 1989

AMERIO, P.; MOTTA, A.; TOTO, P.; POUR, S. M.; PAJAND, R.; FELICIANI, C.; TULLI, A. Skin toxicity from glyphosate-surfactant formulation. **Journal of Toxicology. Clinical Toxicology**, v. 42, n. 3, p. 317-9, 2004.

ANADON, A.; MARTINEZ-LARRANAGA, M. R.; MARTINEZ, M. A.; CASTELLANO, V. J.; MARTINEZ, M.; MARTIN, M. T.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology Letters**, v. 190, n. 1, p. 91-5, 2009.

ANDRIGHETTI, M.S. **Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos cultivados com macieira com diferentes históricos de aplicação deste herbicida**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Programa de Pós-Graduação em

Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, p. 458-79, 2014.

ANTONELLI, M. C.; PALLARÉS, M. E.; CECCATELLI, S.; SPULBER, S. LONG-term consequences of prenatal stress and neurotoxicants exposure on neurodevelopment. **Progress in Neurobioly**, v. 155, p. 21-35, 2017.

ANVISA (2010). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Universidade Federal do Paraná. **Monitormaneto do Mercado de Agrotóxicos: Observatório da Indústria de Agrotóxicos**. Brasília, 11 de março de 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>> . Acesso em: abril de 2014.

ANVISA (2015). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portal de notícias**. Anvisa irá reavaliar glifosato e outros quatro agrotóxicos utilizados no país. Data da notícia: 20 de agosto de 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/noticias/>> . Acesso em: janeiro 2016.

ANVISA (2016). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): Relatório das Análises de Amostras Monitoradas no Período de 2013 a 2015**. Gerência-Geral de Toxicologia. Brasília, 25 de novembro de 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8> . Acesso em: março de 2017.

ANVISA (2017). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regularização de produtos: Agrotóxicos. Monografias Autorizadas. Glifosato**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>. Acesso em: maio de 2017.

AOYAMA, K.; WATABE, M.; NAKAKI, T. Regulation of Neuronal Glutathione Synthesis. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 108, p. 227-238, 2008.

APARICIO, V. C.; DE GERÓNIMO, E.; MARINO, D.; PRIMOST, J.; CARRIQUIRIBORDE, P.; COSTA, J. L. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, v. 93, p. 1866-1873, 2013.

ARAÚJO, A.S.F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. Dissertação (mestrado em agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2002.

ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**, v. 34, n. 4-5, p. 325-37, 2003.

ASLAN, M.; OZBEN, T. Reactive oxygen and nitrogen species in Alzheimer’s disease. **Current Alzheimer Research**, v. 1, p. 111-9, 2004.

ASSINI, F. L.; ZANETTE, K. D.; BROCARDO, P. S.; PANDOLFO, P.; RODRIGUES, A. L.; TAKAHASHI, R. N. Behavioral effects and ChE measures after acute and repeated administration of malathion in rats. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 20, p. 443-9, 2005.

ASTIZ, M.; ALANIZ, M. J. T.; MARRA, C. A. The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain. **Neurochemistry International**, v. 61, p. 1231-1241, 2012.

AVNI, R.; COHEN, B.; NEEMAN, M. Hypoxic stress and cancer: imaging the axis of evil in tumor metastasis. **NMR in Biomedicine**, v. 24, p. 569-81, 2011.

BABIOR, B.M. Superoxide: a two-edged. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 141-155, 1997.

BACON, B. R.; PARK, C. H.; BRITTENHAM, G. M.; O’NEILL, R.; TAVILL, A. S. Hepatic mitochondrial oxidative metabolism in rats with chronic dietary iron overload. **Hepatology**, v. 5, n. 5, p. 789-97, 1985.

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food

contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 18988-19001, 2016.

BALDI, I.; LEBAILLY, P.; MOHAMMED-BRAHIM, B.; LETENNEUR, L.; DARTIGUES, J. F.; BROCHARD, P. Neurodegenerative Diseases and Exposure to Pesticides in the Elderly. **American Journal of Epidemiology**, v. 157, n. 5, 2003.

BAL-PRICE, A. K.; COECKE, S.; COSTA, L.; CROFTON, K. M.; FRITSCHÉ, E.; GOLDBERG, A.; KREYSA, J. Advancing the science of developmental neurotoxicity (DNT): testing for better safety evaluation. **ALTEX**, v. 29, n. 2, p. 202–15, 2012.

BALTAZAR, M. T.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; BASTOSA, M. L.; TSATSAKISE, A. M.; DUARTE, J. A.; CARVALHO, F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases - A mechanistic approach. **Toxicology Letters**, v. 230, p. 85-103, 2014.

BANERJEE, B. D.; SETH, V.; BHATTACHARYA, A.; PASHA, S.T.; CHAKRABORTY, A.K. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. **Toxicology Letters**, v. 107, p. 33-47, 1999.

BANERJEE, T. D.; MIDDLETON, F.; FARAONE, S. V. Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. **Acta Paediatrica**, v. 96, n. 9, p. 1269-74, 2007.

BARBOSA, E. R.; LEIROS DA COSTA, M. D.; BACHESCHI, L. A.; SCAFF, M.; LEITE, C. C. Parkinsonism after glycine-derivate exposure. **Movement Disorders**, v. 16, p. 565-568, 2001.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R. BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23(4), p. 629-643, 2010.

BARKER, D. J. P.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition and ischemic heart disease in England and Wales. **The Lancet**, v. 327, n. 8489, p. 1077-81, 1986.

BATRA, S.; SJÖGREN, C. Effect of estrogen treatment on calciumuptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Sciences**, 32, p. 315-319, 1983.

BATTAGLIN, W. A.; MEYER, M. T.; KUIVILA, K. M.; DIETZE, J. E. Glyphosate and its degradation product ampa occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. **Journal of the American water resources association**, v. 50, 2014.

BATTISTI, V.; MADERS, L. D.; BAGATINI, M. D.; REETZ, L. G.; CHIESA, J.; BATTISTI, I. E.; GONÇALVES, J. F.; DUARTE, M. M.; SCHETINGER, M. R.; MORSCH, V. M. Oxidative stress and antioxidante status in prostate cancer patients: relation to Gleason score, treatment and boné metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, p. 516-24, 2011.

BEARD, J. D.; UMBACH, D. M.; HOPPIN, J. A.; RICHARDS, M.; ALAVANJA, M. C.; BLAIR, A.; SANDLER, D. P.; KAMEL, F. Pesticide exposure and depression among male private pesticide applicators in the agriculturalhealth study. **Environmental Health Perspectives**, v. 122, n. 9, p. 984-91, 2014.

BELLINGER, D. C. Comparing the population neurodevelopmental burdens associated with children's exposures to environmental chemicals and other risk factors. **Neurotoxicology**, v. 33, p. 641-643, 2012.

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

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

BERRY, C. T.; SCENIAK, M. P.; ZHOU, L.; SABO, S. L. Developmental Up-Regulation of Vesicular Glutamate Transporter-1

Promotes Neocortical Presynaptic Terminal Development. **Células**, v. 7, 2012.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-90, 1963.

BIRD, C. M.; BURGESS, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nature Reviews**, 2008

BIRD, G.S.; PUTNEY, J.W. JR. Calcium. In: **Basic Neurochemistry – Molecular, Cellular, and Medical Aspects**. 7^o ed. Editor: SIEGEL, G.J., EUA: Elsevier, 2006.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymology**, v. 90, p. 105-110, 1984.

BLACK CN; BOT M; SCHEFFER PG, CUIJPERS P; PENNINX BW. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164-75, 2015.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, V.; Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179-94, 2003.

BONDY, S. C.; CAMPBELL, A. Developmental neurotoxicology. **Journal of Neuroscience Research**, v. 81, n. 5, p. 605-12, 2005.

BONDY, S. C.; LEE, D. K. Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. **Brain Research**, v. 610, p. 229-233, 1993.

BOSSARD, C.; SANTIN, G.; GUSEVA CANU, I. Suicide Among Farmers in France: Occupational Factors and Recent Trends. **Journal of Agromedicine**, v. 21, n. 4, p. 310-5, 2016.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. CLERCK, L.; MASSARO, D Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: **Oxygen, gene expression and cellular**, v. 105, p. 1-25, 1997.

BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.I.; KOCH, O.R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 227, n. 2, p. 534–541, 1983.

BOMBARDI, L. M. Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado. **Boletim DATALUTA**, 2011. Disponível em: <http://www2.fct.unesp.br/nera/artigodomes/9artigodomes_2011.pdf>. Acesso em: mar. 2013.

BJÖRLING-POULSEN, M.; ANDERSEN, H. R.; GRANDJEAN, P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. **Environmental Health**, v. 22, 2008.

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

BRADY, S. T.; SIEGEL, G. J.; ALBERS, R. W.; PRICE, D. L. **Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology**. 8^o ed. EUA: Academic Press, 2012.

BRAKE, D.G.; EVENSON, D.P. A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development, **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 29–36, 2004.

BRASIL (2002). Decreto Nº 4074/2002 - "Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências" - Data da legislação: 04/01/2002 - Publicação DOU, de 08/01/2002. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=515> Acesso em: dezembro 2014.

BRASIL (1964). LEI Nº 4.595, DE 31 DE DEZEMBRO DE 1964. Dispõe sobre a Política e as Instituições Monetárias, Bancárias e Creditícias, Cria o Conselho Monetário Nacional e dá outras providências. Data da legislação: 31/12/1964. Disponível em:

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L4595.htm> . Acesso em: janeiro 2017.

BRASIL (1989). LEI Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Data da legislação: 11/07/1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm Acesso em: dezembro 2014.

BRASIL (2016). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 141 p. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agrotoxicos_otica_sistema_unico_saude_v1_t.1.pdf>. Acesso em: fevereiro 2017.

BRASIL (2015). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano no Brasil, 2013**. Boletim Epidemiológico, Brasília, v. 46, n. 4, 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/20/2014-028---Boletim-Agrotoxico-.pdf>>. Acesso em: janeiro 2016.

BROCARD, P. S.; ASSINI, F.; FRANCO, J. L.; PANDOLFO, P.; MÜLLER, Y. M.; TAKAHASHI, R. N.; DAFRE, A. L.; RODRIGUES, A. L. Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain. **Toxicological Sciences**, v. 97, p. 140-8, 2007.

BOELSTERLI, U. A. **Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets**. 2º Ed. EUA: Informa Healthcare, 2009.

BURNS, C. J.; McINTOSH, L. J.; MINK, P. J.; JUREK, A. M.; LI, A. A. Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: review of the

epidemiologic and animal studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part B, v. 16, p. 127–283, 2013.

BØHN, T.; CUHRA, M.; TRAAVIK, T.; SANDEN, M.; FAGAN, J.; PRIMICERIO, R. Compositional differences in soybeans on the market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. **Food Chemistry**, v. 153, p. 207-215, 2014.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484–490, 1985.

CARLONI, M., NASUTI, C., FEDELI, D., MONTANI, M., VADHANA, M. S., AMICI, A. AND GABBIANELLI, R. Early life permethrin exposure induces long-term brain changes in Nurr1, NF-kB and Nrf-2. **Brain Research**, v. 1515, p. 19-28, 2013.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, pro-oxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, 2013.

CARRASCO, A. E. **Teratogenesis by glyphosate based herbicides and other pesticides. Relationship with the retinoic acid pathway.** In: GMLS International Conference on Implications of GM Crop Cultivation at Large Spatial Scales, Jun. 14th-15th 2012. Disponível em: http://www.gmls.eu/beitraege/113_Carrasco.pdf Acesso em: fev. 2015.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Pesticide Chemical Research in Toxicology: Lessons from Nature. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 94-104, 2017.

CASTRO, A.S. **Avaliação pontual da degradação e transporte do herbicida glifosato no solo da bacia do Arroio Donato-Pejuçara (RS).** Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CATTANEO, R.; CLASEN, B.; LORO, V. L.; MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; BALDISSEROTTO, B.; SANTI, A.; AVILA, L. A. Toxicological responses of cyprinus carpio exposed to a commercial

formulation containing glyphosate. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, p. 597-602, 2011.

CATTANI, D. **Mecanismos envolvidos na excitotoxicidade glutamatérgica induzida pela exposição aguda ou crônica ao Roundup® sobre o hipocampo de ratos imaturos**. 2013. 126 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

CATTANI, D.; CESCO NETTO, P. A.; TAVARES, M. K.; PARISOTTO, E. B.; DE OLIVEIRA, P. A.; RIEG, C. E. H.; LEITE, M. C.; PREDIGER, R. D. S.; WENDT, N. C.; RAZZERA, G.; FILHO, D. W.; ZAMONER, A. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implications of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, p. 67-80, 2017.

CATTANI, D.; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V. L.; HEINZ RIEG, C. E.; DOMINGUES, J. T.; DAL-CIM, T.; TASCIA, C. I.; MENA BARRETO SILVA, F. R.; ZAMONER, A. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 5, p. 34-45, 2014.

CHAUFAN, G.; COALOVA, I.; RÍOS DE MOLINA, M. C. Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. **International Journal of Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 29-38, 2014.

CHEN, H. H.; LIN, J. L.; HUANG, W. H.; WENG, C. H.; LEE, S. Y.; HSU, C. W.; CHEN, K. H.; WANG, I. K.; LIANG, C. C.; CHANG, C. T.; YEN, T. H. Spectrum of corrosive esophageal injury after intentional paraquat or glyphosate-surfactant herbicide ingestion. **International Journal of General Medicine**, v. 6, p. 677-683, 2013.

CHEN, L.; LIU, B. Relationships between Stress Granules, Oxidative Stress, and Neurodegenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017.

CHEN, Y. Organophosphate-induced brain damage: Mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. **NeuroToxicology**, v. 33, p. 391-400, 2012.

CHIN-CHAN, M.; NAVARRO-YEPES, J.; QUINTANILLA-VEGA, B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. **Frontier in Cellular Neuroscience**, v. 9, 2015.

CHOWDHURY, J.S.; DUDEJA, P. K.; MEHTA, S. K.; MAHMOOD, A. Effect of a single oral dose of malathion on D-glucose and glycine uptake and on brush border enzymes in rat intestine. **Toxicology Letters**, v. 6, p. 411-5, 1980.

CLAIR, E.; MESNAGE, R.; TRAVERT, C.; SÉRALINI, G. E. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro and testosterone decrease at lower levels. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 269-279, 2012.

CLAPHAM, D.E. **Calcium signaling**. Cell, v. 80, p. 259-268, 1995.

CONGER, A. D.; FAIRSCHILD, L. M. Breakage of chromosomes by oxygen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 38, p. 289-99, 1952.

CONRAD, A.; SCHRÖTER-KERMANI, C.; HOPPE, H. W.; RÜTHER, M.; PIEPER, S.; KOLOSSA-GEHRING, M. Glyphosate in German adults - Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide, **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 220, n.1, p. 8-16, 2017.

CONTARDO-JARA, V.; KLINGELMANN, E.; WIEGAND, C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 57-63, 2009.

COSTA, L. G.; GIORDANO, G.; GUIZZETTI, M.; VITALONE, A. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 1240-1249, 2008.

COULLERY, R. P.; FERRARI, M. E.; ROSSO, S. B. Neuronal development and axon growth are altered by glyphosate through a WNT non-canonical signaling pathway. **Neurotoxicology**, v. 52, p. 150-61, 2016.

COULTER, D. A.; EID, T. Astrocytic Regulation of Glutamate Homeostasis in Epilepsy. **Glia**, v. 60, p. 1215-1226, 2012.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-45, 2002.

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

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; OLIVEIRA, R. T.; ANDRADE, A. J.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, v. 81, p. 665-73, 2007.

DAMMEYER, P.; ARNÉR, E. S. J. Human Protein Atlas of redox systems — What can be learnt? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 111-138, 2011.

DANBOLT, N. C.; Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 1-105, 2001.

DANBOLT, N. C.; FURNESS, D. N.; ZHOU, Y. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. **Neurochemistry International**, v. 98, p. 29-45, 2016.

DARUICH, J., ZIRULNIK, F., GIMENEZ, M.S. Effect of the Herbicide Glyphosate on Enzymatic Activity in Pregnant Rats and Their Fetuses. **Environmental Research Section A**, v. 85, p. 226-231, 2001.

DEBES, F.; BUDTZ-JØRGENSEN, E.; WEIHE, P.; WHITE, R. F.; GRANDJEAN, P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 28, n. 5, p. 536-47, 2006.

DE BRITO RODRIGUES, L.; DE OLIVEIRA, R.; ABE, F. R.; BRITO, L. B.; MOURA, D. S.; VALADARES, M. C.; GRISOLIA, C. K.; DE OLIVEIRA, D. P.; DE OLIVEIRA, G. A. Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, p. 1755-1763, 2016.

DEFARGE, N.; TAKÁCS, E.; LOZANO, V. L.; MESNAGE, R.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G. E.; SZÉKÁCS, A. Co-Formulants in Glyphosate-Based Herbicides Disrupt Aromatase Activity in Human Cells below Toxic Levels. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 3, p. 264, 2016.

DE GROOT, M. W. G. D. M.; WESTERINK, R. H. S.; DINGEMANS, M. M. L. Don't judge a neuron only by its cover: neuronal function in in vitro developmental neurotoxicity testing. **Toxicological Sciences**, v. 132, n. 1, 1-7, 2013.

DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V. L.; CATTANI, D.; HEINZ RIEG, C. E.; PIEROZAN, P.; ZANATTA, L.; PARISOTTO, E. B.; WILHELM FILHO, D.; MENA BARRETO SILVA, F. R.; PESSOA-PUREUR, R.; ZAMONER, A. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radical Biology and Medicine**, 65, p. 335-346, 2013.

DENG, Y.; XU, Z.; XU, B.; XU, D.; TIAN, Y.; FENG, W. The protective effects of riluzole on manganese-induced disruption of glutamate transporters and glutamine synthetase in the cultured astrocytes. **Biological Trace Element Research**, v. 148, p. 242-249, 2012.

DESAI, S. N.; DESAI, P. V. Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities of rat brain during crush syndrome. **Neuroscience Letters**, v. 447, p. 58-61, 2008.

DE VELLIS, J.; CARPENTER, E. Development. In: **Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects**. 7^o ed. Editor: SIEGEL, G. J. EUA: Elsevier, 2006.

DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 545-550, 1995.

DICKINSON, D.A; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 1019-1026, 2002.

DI GIULIO, R. T.; NEWMAN, M. C. Ecotoxicology In: **Cassarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. Editor: KLAASSEN, C. D. 8^o ed. EUA: McGraw-Hill Medical, 2013.

DOBLE A. Excitatory amino acid receptors and neurodegeneration. **Therapie**, v.50, n. 4, p. 319-37, 1995.

DONATO, R.; CANNON, B. R.; SORCI, G.; RIUZZI, F.; HSU, K.; WEBER, D. J.; GECZY, C. L. Functions of S100 proteins. **Current Molecular Medicine**, v. 13, n. 1, p. 24-57, 2013.

DONG, X. X.; WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacological Sinica**, v. 40, n. 4, p. 379-87, 2009.

DOS SANTOS, A. P.; ROCHA, T. L.; BORGES, C. L.; BAILÃO, A. M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M.; DE SABÓIA-MORAIS, S. M. A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**, v. 168, p. 922-943, 2017.

DRINGEN R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p. 649–671, 2000.

DUBOIS, J.; DEHAENE-LAMBERTZ, G.; KULIKOVA, S.; POUPON, C.; PPI, P. S. H.; HERTZ-PANNIER, L. The early development of brain white matter: a review of imaging studies in fetuses, newborns and infants. **Neuroscience**, v. 276, p. 48-71, 2014.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, p. 319–325, 2008.

EFSA (2015). European Food Safety Authority. News. **Glyphosate: EFSA updates toxicological profile**. 12 de Novembro de 2015. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/151112>>. Acesso em: abril 2017.

EL-DEMERDASH, F. M. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1346-1352, 2011.

EID, T.; TU, N.; LEE, T. S.; LAI, J. C. Regulation of astrocyte glutamine synthetase in epilepsy. **Neurochemistry International**, v. 63, p. 670-81, 2013.

EL-DEMERDASH, F. M.; YOUSEF, M. I.; ELAGAMY, E. I. Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (in vitro). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 36, p. 29-42, 2001.

EL-SHENAWY, N.S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 379–385, 2009.

EMERIT, J.; EDEAS, M.; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 39-46, 2004.

EPA (1993). U.S. EPA: United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticide, Programs and Toxic Substances. **Re-registration Eligibility Decision (RED) Glyphosate**. EPA-738-R-93-014. Washington, DC, U.S.A. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-417300_1-Sep-93.pdf>. Acesso em: janeiro 2017.

EPA (2009). U.S. EPA: United States Environmental Protection Agency. Glyphosate: Human Health Assessment Scoping Document in Support of Registration Review. EPA-HQ-OPP-2009-0361.

EPA (2016). United State Environmental Protection Agency. **Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential**. EPA's Office of Pesticide Programs. 12 de setembro de 2016. Disponível em:

<https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/glyphosate_issue_paper_evaluation_of_carcinogenic_potential.pdf>. Acesso em: abril 2017.

ERIKSSON, M.; HARDELL, L.; CALBERG, M.; AKERMAN, M. Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. **International Journal of Cancer**, v. 123, p. 1657–1663, 2008.

ESTRADA C. P.; COVACU, R.; SANKAVARAM, S. R.; SVENSSON, M.; BRUNDIN, L. Oxidative stress increases neurogenesis and oligodendrogenesis in adult neural progenitor cells. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 19, p. 2311-27, 2014.

FAN, M. M.; RAYMOND, L. A. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 81, n. 5-6, p. 272-93, 2007.

FARIA, N. M.; FACCHINI, L. A.; FASSA, A. G.; TOMASI, E. A cross-sectional study about mental health of farm-workers from Serra Gaucha (Brazil). [Article in Portuguese]. **Revista de Saude Publica**, v. 33, n. 4, p. 391-400, 1999.

FARIA, N. M.; FASSA, A. G.; MEUCCI, R. D. Association between pesticide exposure and suicide rates in Brazil. **Neurotoxicology**, v.45, p. 355-62, 2014.

FARIA, N. M.; FASSA, A. G.; MEUCCI, R. D.; FIORI, N. S.; MIRANDA, V. I. Occupational exposure to pesticides, nicotine and minor psychiatric disorders among tobacco farmers in southern Brazil. **Neurotoxicology**, v. 45, p. 347-54, 2014.

FARÍAS, J. G.; MOLINA, V. M.; CARRASCO, R. A.; ZEPEDA, A. B.; FIGUEROA, E.; LETELIER, P.; CASTILLO, R. L. Antioxidant therapeutic strategies for cardiovascular conditions associated with oxidative stress. **Nutrients**, v. 9, 2017.

FERNANDES, S. P.; DRINGEN, R.; LAWEN, A.; ROBINSON, S. R. Neurones express glutamine synthetase when deprived of glutamine or interaction with astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, p. 1527-1536, 2010.

FINNELL, R. H. Teratology: general considerations and principles. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103 (2 Pt 2), S337–S342, 1999.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114–121, 1984.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 1-12, 2009.

FOX, D. A.; GRANDJEAN, P.; DE GROOT, D.; PAULE, M. G. Developmental origins of adult diseases and neurotoxicity: epidemiological and experimental studies. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 4, p. 810-6, 2012.

FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. **Mutation Research**, v. 674, p. 3-22, 2009.

FRANCO, R.; LI, S.; RODRIGUEZ-ROCHA, H.; BURNS, M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Molecular mechanisms of pesticides-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 289-300, 2010.

FRANZ, J. E., MAO, M. K., SIKORSKI, J. A. Glyphosate: a Unique Global Herbicide. **American Chemical Society**, p. 65-97, 1997.

FREIRE, C.; KOIFMAN, S. Pesticides, depression and suicide: A systematic review of the epidemiological evidence. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, p. 445-460, 2013.

FRIDOVICH, I.; Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1203-9, 1998.

FUJIWARA, S.; KIMURA, F.; HOSOKAWA, T.; ISHIDA, S.; SUGINO, M.; HANAFUSA, T. Anhedonia in Japanese patients with Parkinson's disease. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 11, p. 275-281, 2011.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 37–45, 2001.

GALLEGOS, C. E.; BARTOS, M.; BRAS, C.; GUMILAR, F.; ANTONELLI, M. C.; MINETTI, A. Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring. **NeuroToxicolog**, v. 53, p. 20–28, 2016.

GANGULY, G.; CHAKRABARTI, S.; CHATTERJEE, U.; SASO, L. Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Drugs Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 797-810, 2017.

GASIC, G.P.; HOLLMANN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Annul Review of Physiology**, v.54, p.507-36, 1992.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M. C.; SÉRALINI, G. E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, p. 184-191, 2009.

GEHIN, A.; GUYON, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p. 27-34, 2006.

GERSCHMAN, R.; GILBERTO, D. L.; NYE, S. W.; DWYER, P.; FENN, W. O. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. **Science**, v. 119, p. 623-6, 1954.

GEORGE, J.; PRASAD, S.; MAHMOOD, Z.; SHUKLA, Y. Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin: a proteomic approach. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 951-64, 2010.

GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Emptying of Intracellular Calcium Pool and Oxidative Stress Imbalance Are Associated with the Glyphosate-Induced Proliferation in Human Skin Keratinocytes HaCaT Cells. **International Scholarly Research Notices: Dermatology**, v. 29, 2013.

GHOSH, S.; DASS, J. F. Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. **Gene**, v. 584, n. 1, p. 97-190, 2016.

GILGUN-SHERIKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 959-975, 2001.

GIORDANO, G.; COSTA, L. G. Developmental neurotoxicity: some old and new issues. **ISRN Toxicology**, v. 24, 2012.

GLEICHMANN, M.; MATTSON, M. P. Intracellular calcium and neuronal death. **Encyclopedia of Neuroscience**, p. 191-196, 2009.

GLIDDON, C. M.; SHAO, Z.; LEMAISTRE, J. L.; ANDERSON, C. M. Cellular distribution of the neutral amino acid transporter subtype ASCT2 in mouse brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 108, p. 372-382, 2009.

GLUSCZAK, L.; DOS SANTOS MIRON, D.; CRESTANI, M.; BRAGA DA FONSECA, M.; DE ARAÚJO PEDRON, F.; DUARTE, M. F.; VIEIRA, V. L. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 2, p. 237-41, 2006.

GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. P. Fetal programming and adult health. **Public Health Nutrition**, vol. 4, no. 2, pp. 611– 624, 2001

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. **The Lancet**, v. 16, p. 2167-78, 2006.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 3, p. 330-8, 2014.

GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R. F.; DEBES, F.; ARAKI, S.; YOKOYAMA, K.; MURATA, K.; SØRENSEN, N.; DAHL, R.; JØRGENSEN, P. J. Cognitive deficit in 7-year-old children with

prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 19, n. 6, p. 417-28, 1997.

GREENLEE A. R, ELLIS T. M, BERG R. L. Low-dose agrochemicals and lawn-care pesticides induce developmental toxicity in murine preimplantation embryos. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 6, p. 703-9, 2004.

GRESS, S.; LEMOINE, S.; SÉRALINI, G. E.; PUDDU, P. E. Glyphosate-Based Herbicides Potently Affect Cardiovascular System in Mammals: Review of the Literature. **Cardiovascular Toxicology**, v. 15, n. 2, p. 117-26, 2015.

GUILHERME, S.; GAIVÃO, I.; SANTOS, M. A.; PACHECO, M. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup glyphosate-based herbicide. **Mutagenesis**, v. 25, n. 5, p. 523-30, 2010.

GUILHERME, S.; SANTOS, M. A.; GAIVÃO, I.; PACHECO, M. DNA and chromosomal damage induced in fish (*Anguilla anguilla* L.) by aminomethylphosphonic acid (AMPA) – the major environmental breakdown product of glyphosate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 8730-8739, 2014.

GUO, J.; WALSS-BASS, C.; LUDUEÑA; R. F. The β isotypes of tubulin in neuronal differentiation. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 67, n. 7, p. 431-441, 2010.

GÜNGÖRDÜ, A. Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages of three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis*, and *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, v. 140-141, p. 220-8, 2013.

GÜNGÖRDÜ, A.; UÇKUN, M.; YOLOĞLU, E. Integrated assessment of biochemical markers in premetamorphic tadpoles of three amphibian species exposed to glyphosate- and methidathion-based pesticides in single and combination forms. **Chemosphere**, v. 144, p. 2024-35, 2016.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferase AA from rat liver. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 175, p. 710-6, 1976.

HACK, N.; BALÁZS, R. Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of granule cells in culture: effect of quisqualate and AMPA. **Neurochemistry International**, v. 25, p. 235–241, 1994

HALL C. S.; BALLACHEY E. L. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. **University of California Publications in Psychology**, v. 6, p. 1-12, 1932.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3ed. Clarendon, Oxford, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4.ed. Oxford University Press. 2007

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL; B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147-50, 2007.

HASSEL, B.; DINGLEDINE, R. Glutamate and Glutamate Receptors. In: **Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology**. 8^o ed. Editores: BRADY, S. T.; SIEGEL, G.. J.; ALBERS, R. W.; PRICE, D. L. EUA: Academic Press, 2012.

HAYDEN, K.M.; NORTON, M.C.; DARCEY, D.; OSTBYE, T.; ZANDI, P.P.; BREITNER, J.C.; WELSH-BOHMER, K.A.; CACHE COUNTY STUDY INVESTIGATORS. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. **Neurology**, v. 74, p. 1524-30, 2010.

HEDBERG, D.; WALLIN, M. Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 795-802, 2010.

HERNÁNDEZ-PLATA, I.; GIORDANO, M.; DÍAZ-MUNÓZ, M.; RODRÍGUEZ, V. M. The herbicide glyphosate causes behavioral

changes and alterations in dopaminergic markers in male Sprague-Dawley rat. **NeuroToxicology**, v. 46, p. 79-91, 2015.

HERTZ, L.; ROTHMAN, D. L. Glutamine glutamate cycle flux is similar in cultured astrocytes and brain and both glutamate production and oxidation are mainly catalyzed by aspartate aminotransferase. **Biology (Basel)**, v. 6, n. 1, 2017.

HEU, C.; ELIE-CAILLE, C.; MOUGEYC, V.; LAUNAY, S.; NICOD, L. A step further toward glyphosate-induced epidermal cell death: Involvement of mitochondrial and oxidative mechanisms. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, p. 144–153, 2012.

HICKS, S. D.; WANG, M.; FRY, K.; DORAISWAMY, V.; WOHLFORD, E. M. Neurodevelopmental Delay Diagnosis Rates Are Increased in a Region with Aerial Pesticide Application. **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, p. 116, 2017.

HU, H.; TÉLLEZ-ROJO, M. M.; BELLINGER, D.; SMITH, D.; ETTINGER, A. S.; LAMADRID-FIGUEROA, H.; SCHWARTZ, J.; SCHNAAS, L.; MERCADO-GARCÍA, A.; HERNÁNDEZ-AVILA, M. Fetal lead exposure at each stage of pregnancy as a predictor of infant mental development. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 11, p. 1730-5, 2006.

HUANG, H.; LIU, L.; LI, B.; ZHAO, P-P.; XU, C-M.; ZHU, Y-Z; ZHOU, C-H.; WU, Y-Q. Ketamine Interferes with the Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells in the Subventricular Zone of Neonatal Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 315-325, 2015.

HUANG, Y. J.; LANE, H. Y.; LIN, C. H. New Treatment Strategies of Depression: Based on Mechanisms Related to Neuroplasticity. **Neural Plasticity**, 2017.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.

IARC (2015). International Agency for Research on Cancer. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **Meeting of International Agency for Research on Cancer (IARC; Lyon, France)**. Lancet Oncol., 20 de Março de 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8)>. Acesso em: abril 2015.

IBAMA (2014). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002**. Dados Atualizados: 15/10/2014. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3> Acesso em: Dez., 2014.

INBARAJ, J.J.; CHIGNELL, C.F. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. **Chemical Research in Toxicology**, 17, 55, 2004.

INOUE, M.; SATO, E.F.; NISHIKAWA, M.; PARK, A.M.; KIRA, Y.; IMADA, I.; UTSUMI, K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2495-2505, 2003.

IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 45, n. 1, p. 177-82, 2005.

JAMAL, F.; HAQUE, Q. S.; SINGH, S. Interrelation of Glycemic Status and Neuropsychiatric Disturbances in Farmers with Organophosphorus Pesticide Toxicity. **The Open Biochemistry Journal**, v. 10, p. 27-34, 2016.

JIANG, E.; YAN, X.; WENG, H.-R. Glial glutamate transporter and glutamine synthetase regulate GABAergic synaptic strength in the spinal dorsal horn. **Journal of Neurochemistry**, v.121, p.526-536, 2012.

JONES, N. Alzheimer disease: Risk of dementia and Alzheimer disease increases with occupational pesticide exposure. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 7, p. 353, 2010.

JONES, K. L.; SMITH, D. W. THE fetal alcohol syndrome. **Teratology**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 1975.

JULVEZ, J.; GRANDJEAN, P. Neurodevelopmental toxicity risks due to occupational exposure to industrial chemicals during pregnancy. **Industrial Health**, v. 5, p. 459-68, 2009.

KAUR, C.; LING, E. A. Antioxidants and Neuroprotection in the Adult and Developing Central Nervous System. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3068-3080, 2008.

KAWADA K, IEKUMO T, SAITO R, KANEKO M, MIMORI S, NOMURA Y, OKUMA Y. Aberrant neuronal differentiation and inhibition of dendrite outgrowth resulting from endoplasmic reticulum stress. **Journal of Neuroscience Research**, v. 92, n. 9, p. 1122-33, 2014.

KIM, J.J.; FANSELOW, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, p. 675-7, 1992.

KIM, Y. W.; BYZOVA, T. V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. **Blood**, v. 123, p. 625-31, 2014.

KNUDSEN, T. B., KAVLOCK, R. J., DASTON, G. P., STEDMAN, D., HIXON, M., & KIM, J. H. Developmental toxicity testing for safety assessment: new approaches and technologies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 92, n. 5, p. 413-420, 2011.

KOGA, M.; SERRITELLA, A. V.; MESSMER, M. M.; HAYASHI-TAKAGI, A.; HESTER, L. D.; SNYDER, S. H.; SAWA, A.; SEDLAK, T. W. Glutathione is a physiologic reservoir of neuronal glutamate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 409, p. 596-602, 2011.

KOLLER, V. J.; FURHACKER, M.; NERSESYAN, A.; MIŠÍK, M.; EISENBAUER, M.; KNASMUELLER, S. Cytotoxic and DNA-

damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 805-813, 2012.

KOMURO, H.; RAKIC, P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. **Science**, v. 260, n. 5104, p. 95-7, 1993.

KONGTIP, P.; NANGKONGNAB, N.; PHUPANCHAROENSUK, R.; PALARACH, C.; SUJIRARAT, D.; SANGPRASERT, S.; SERMSUK, M.; SAWATTRAKOOL, N.; WOSKIE, S. R. Glyphosate and Paraquat in Maternal and Fetal Serums in Thai Women. **Journal of Agromedicine**, 2017.

KOO, J. W., RUSSO, S. J., FERGUSON, D., NESTLER, E. J. AND DUMAN, R. S. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 6, p. 2669-74, 2010.

KUMAR, A. NMDA Receptor Function During Senescence: Implication on Cognitive Performance. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 473, 2015.

KUMARI, R.; KUMAR, R.; LYNN, A. `g_mmpbsa`--a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 7, p. 1951-62, 2014.

KWIATKOWSKA, M.; HURAS, B.; BUKOWSKA, B. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (*in vitro*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 109, p. 34-43, 2014.

KWIATKOWSKA, M.; NOWACKA-KRUKOWSKA, H.; BUKOWSKA, B. The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 3, 1101-8, 2014.

LAHMAME, A.; ARMARIO, A. Differential responsiveness of inbred strains of rats to antidepressants in the forced swimming test: are Wistar Kyoto rats an animal model of subsensitivity to antidepressants? **Psychopharmacology**, v. 123, p. 191-8, 1996.

LAJMANOVICH, R. C., ATTADEMO, A. M., PELTZER, P. M., JUNGES, C. M.; CABAGNA, M. C. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (anura: bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 681-689, 2011.

LANDRIGAN, P. J. What causes autism? Exploring the environmental contribution. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 22, n. 2, p. 219-25, 2010.

LARSEN, K.; NAJLE, R.; LIFSCHITZ, A.; MATÉ, M. L.; LANUSSE, C.; VIRKEL, G. L. Effects of Sublethal Exposure to a Glyphosate-Based Herbicide Formulation on Metabolic Activities of Different Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rats. **International Journal of Toxicology**, v. 33, p. 307-318, 2014.

LARSEN, K.; NAJLE, R.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, p. 811-818, 2012.

LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Oxygen radicals: common mediators of neurotoxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 13, p. 341-6, 1991.

LEE, H. C.; WEI, Y. H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 592-606, 2007.

LEE, J. W., CHOI, Y. J., PARK, S., GIL, H. W., SONG, H. Y. AND HONG, S. Y. Serum S100 protein could predict altered consciousness in glyphosate or glufosinate poisoning patients. **Clinical Toxicology (Phila)**, v. 55, n. 5, p. 357-359, 2017.

LEHMANN, C.; BETTE, S.; ENGELE, J. High extracellular glutamate modulates expression of glutamate transporters and glutamine synthetase in cultured astrocytes. **Brain Research**, v. 1297, p. 1-8, 2009.

LEITE, M. C.; GALLAND, F.; BROLESE, G.; GUERRA, M. C.; BORTOLOTTI, J. W.; FREITAS, R.; ALMEIDA, L. M.; GOTTFRIED, C.; GONCALVES, C. A. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 93-9, 2008.

LEMKE, M. R.; BRECHT, H. M.; KOESTER, J.; KRAUS, P. H.; REICHMANN, H. Anhedonia, depression, and motor functioning in Parkinson's disease during treatment with pramipexole. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 17, p. 214-220, 2005.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v.186, p.464-478, 1990.

LI, M., YOU, T. Z., ZHU, W. J., QU, J. P., LIU, C., ZHAO, B., XU, S. W. AND LI, S. Antioxidant response and histopathological changes in brain tissue of pigeon exposed to avermectin. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 8, p. 1241-54, 2013.

LIU, C.-H., WANG, I.-J., WEI, F.-D.; CHIEN, C.-L. Neuronal intermediate filament & alpha;-internexin is expressed by neuronal lineages in the developing chicken retina. **Experimental Eye Research**, v. 110, p. 18-25, 2013.

LONDON, L.; BESELER, C.; BOUCHARD, M. F.; BELLINGER, D. C.; COLOSIO, C.; GRANDJEAN, P.; HARARI, R.; KOOTBODIEN, T.; KROMHOUT, H.; LITTLE, F.; MEIJSTER, T.; MORETTO, A.; ROHLMAN, D. S.; STALLONES, L. Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. **NeuroToxicology**, v. 33, p. 887-896, 2012.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-267, 1951.

LOZOFF, B.; GEORGIEFF, M. K. Iron Deficiency and Brain Development. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 13, p. 158-165, 2006.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, p. 3143-3152, 2013.

LUNDQVIST J.; EL ANDALOUSSI-LILJA J.; SVENSSON C.; GUSTAFSSON DORFH H.; FORSBY A. Optimisation of culture conditions for differentiation of C17.2 neural stem cells to be used for in vitro toxicity tests. **Toxicol In Vitro**, v. 27, n. 5, p. 1565-9, 2013.

LUSHCHAK, O. V.; KUBRAK, O. I.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v. 76, p. 923-937, 2009.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y. S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 676-692, 2011.

MALHOTRA, R. C.; GHIA, D. K.; CORDATO, D. J.; BERAN, R. G. Glyphosate-surfactant herbicide-induced reversible encephalopathy. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, p. 1472-1473, 2010.

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. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, p. 326-331, 2002.

MARTINI, C. N.; GABRIELLI, M.; BRANDANI, J. N.; VILA MDEL, C. GLYPHOSATE Inhibits PPAR Gamma Induction and Differentiation of Preadipocytes and is able to Induce Oxidative Stress. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 30, n. 8, p. 404-13, 2016.

MATUS, A. Actin-based plasticity in dendritic spines. **Science**, v. 290, n. 5492, p. 754-8, 2000.

MAZZETI, A. P.; FIORILE, M. C.; PRIMAVERA, A.; BELLO, M. L. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 82, p. 10-18, 2015.

MAÑAS, F.; PERALTA, L.; RAVIOLO, J.; GARCÍA OVANDO, H.; WEYERS, A.; UGNIA, L.; GONZALEZ CID, M.; LARRIPA, I.; GORLA, N. Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 834-7, 2009.

MCDONOUGH J. H.; SHIH, T. M. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, p. 559-79, 1997.

MCKENNA, M. C.; DIENEL, G. A.; SONNEWALD, U.; WAAGEPETERSEN, H. S.; SCHOUSBOE, A. Energy Metabolism of the Brain. In: **Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology**. Editores: BRADY, S. T.; SIEGEL, G. J.; ALBERS, R. W.; PRICE, D. L., 8^o ed., EUA: Academic Press, 2012.

MCKENNA, M. C. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 15, p. 3347-58, 2007.

MCKENNA, M. C.; STRIDH, M. H.; MCNAIR, L. F.; SONNEWALD, U.; WAAGEPETERSEN, H. S.; SCHOUSBOE, A. Glutamate oxidation in astrocytes: Roles of glutamate dehydrogenase and aminotransferases. **Journal of Neuroscience Research**, v. 94, n. 12, p. 1561-1571, 2016.

MENÉNDEZ-HELMAN, R. J.; FERREYROA, G. V.; DOS SANTOS AFONSO, M.; SALIBIÁN, A. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, n. 1, p. 6-9, 2012.

MENEZES, C.C.; FONSECA, M.B.; LORO, V.L.; SANTI, A.; CATTANEO, R.; CLASEN, B.; PRETTO, A.; MORSCH, V.M. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 665–671, 2011.

MENKES, D. B.; TEMPLE, W. A.; EDWARDS, I. R. Intentional self-poisoning with glyphosate-containing herbicides. **Human & Experimental Toxicology**, v. 10, n. 2, p. 103-7, 1991.

MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SÉRALINI, G. E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology**, v. 313, p. 122-8, 2013.

MESNAGE, R.; DEFARGE, N.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G. E. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. **BioMed Research International**, 2014.

MESNAGE, R.; RENNEY, G.; SÉRALINI, G. E.; WARD, M.; ANTONIOU, M. N. Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

aMESNAGE, R.; DEFARGE, N.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G. E. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 133-53, 2015.

bMESNAGE, R.; ARNO, M.; COSTANZO, M.; MALATESTA, M.; SÉRALINI, G. E.; ANTONIOU, M. N. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. **Environmental Health**, v. 14, p. 70, 2015.

MEYER, A.; KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MOREIRA, J. C.; DE REZENDE CHRISMAN, J.; ABREU-VILLACA, Y. Mood disorders hospitalizations, suicide attempts, and suicide mortality among agricultural workers and residents in an area with intensive use of pesticides in Brazil. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 73, n. 13-14, p. 866-77, 2010.

MEZA-JOYA, F. L.; RAMÍRES-PINILLA, M. P.; FUENTES-LORENZO, J. L. Toxic, Cytotoxic, and Genotoxic Effects of a Glyphosate Formulation (Roundup®SL-Cosmoflux®411F) in the Direct-Developing Frog *Eleutherodactylus johnstonei*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 54, p. 362-373, 2013.

MIGLIOREA, L.; COPPED, F. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. **Mutation Research**, v. 667, p. 82-97, 2009.

MILADINOVIC, T.; NASHED, M. G.; SINGH, G. Overview of Glutamatergic Dysregulation in Central Pathologies. **Biomolecules**, v. 5, n. 4, p. 3112-41, 2015.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 188-92, 1972.

MLYNIEC, K. Zinc in the Glutamatergic Theory of Depression. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 4, p. 505-13, 2015.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 294-9, 2010.

MODGIL, S.; LAHIRI, D. K.; SHARMA, V. L.; ANAND, A. Role of early life exposure and environment on neurodegeneration: implications on brain disorders. **Translational Neurodegeneration**, v. 3, 2014.

MOHAMED, M. R.; MCFADDEN, G. NF κ B inhibitors: Strategies from poxviruses. **Cell Cycle**, v. 8, p. 3125-3132, 2009.

MOLZ, S.; DAL-CIM, T.; DECKER, H.; TASCA, C. I. GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. **Brain Research**, v. 1231, p. 113-120, 2008.

MONSANTO, 2015. FISPQ - Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Roundup® Original. Disponível em: <http://www.monsantoglobal.com/global/br/produtos/Documents/fispq-roundup-original.pdf> Acesso em: Dez. 2015.

MOSE, T.; KJAERSTAD, M. B.; MATHIESEN, L.; NIELSEN, J. B.; EDELFORS, S.; KNUDSEN, L. E. Placental passage of benzoic acid, caffeine, and glyphosate in an ex vivo human perfusion system. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 71, n. 15, p. 984-91, 2008.

MOSER, V. C.; ASCHNER, M.; RICHARDSON, R. J.; PHILBERT, M. A. Toxic response of the nervous system. In: **Cassarett & Doull's**

Toxicology: The Basic Science of Poisons. Editor: KLAASSEN, C. D. 8^o ed. EUA: McGraw-Hill Medical, 2013.

MOUSTAFA, G. G.; SHAABAN, F. E.; HADEED, A. H.; ELHADY, W. M. Immunotoxicological, biochemical, and histopathological studies on Roundup and Stomp herbicides in Nile catfish (*Clarias gariepinus*). **Vet World**, v. 9, n. 6, p. 638-647, 2016.

MUÑOZ-QUEZADA, M. T.; LUCERO, B. A.; BARR, D. B.; STEENLAND, K.; LEVY, K.; RYAN, P. B.; IGLESIAS, V.; ALVARADO, S.; CONCHA, C.; ROJAS, E.; VEGA, C. Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: a systematic review. **Neurotoxicology**, v. 39, p. 158-68, 2013.

MYERS, J. P.; ANTONIOU, M. N.; BLUMBERG, B.; CARROLL, L.; COLBORN, T.; EVERETT, L. G.; HANSEN, M.; LANDRIGAN, P. J.; LANPHEAR, B. P.; MESNAGE, R.; VANDENBERG, L. N.; VOM SAAL, F. S.; WELSHONS, W. V.; BENBROOK, C. M. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. **Environmental Health**, 15, pp. 19, 2016.

NARDI, J.; MORAS, P. B.; KOEPPE, C.; DALLEGRAVE, E.; LEAL, M. B.; ROSSATO-GRANDO, L. G. Prepubertal subchronic exposure to soy milk and glyphosate leads to endocrine disruption. **Food and Chemical Toxicology**, v. 100, p. 247-252, 2017.

NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. **Nature Reviews**, v.3, 2002.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; FRANCO, B. D. G. M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: Ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 201-204, 2007.

NEWSHOLME, P.; HABER, E. P.; HIRABARA, S. M.; REBELATO, E. L.; PROCOPIO, J.; MORGAN, D.; OLIVEIRA-EMILIO, H. C.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. **The Journal of Physiology**, v. 583, p. 9-24, 2007.

NISHIYORI, Y.; NISHIDA, M.; SHIODA, K.; SUDA, S.; KATO, S. Unilateral hippocampal infarction associated with an attempted suicide: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 8, 2014.

NWANI, C.D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; LAKRA, W. S. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channapunctatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 539-47, 2013.

NWANI, C. D.; AGRAWAL, N. D.; RAGHUVANSHI, S.; JASWAL, A.; SHRIVASTAVA, S.; SINHA, N.; ONYISHI, G.; SHUKLA, S. Toxicological effects of carbosulfan in rats: Antioxidant, enzymological, biochemical, and hematological responses. **Toxicology and Industrial Health**, 2015.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-8, 1979.

OLIVEIRA, C. **Consumo de agrotóxicos cresce e afeta a saúde e meio ambiente**. Portal Fiocruz, 2013. Disponível em: <http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/consumo-de-agrotoxicos-cresce-e-afeta-saude-e-meio-ambiente> Acesso em: 20/12/2014.

OLORUNSOGO, O. O. Modification of the transport of protons and Ca^{2+} ions across mitochondrial coupling membrane by N-(phosphonomethyl)glycine. **Toxicology**, v. 61, n. 2, p. 205-9, 1991.

OMS (2009). Organização Mundial da Saúde. World Health Organization. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009**. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf>. Acesso em: março 2017.

OMS (2017). Organização Mundial da Saúde. World Health Organization. **Depression**. Updated February 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>>. Acesso em: junho 2017.

ORLOWSKI M, MEISTER A. Gamma-glutamyl-p-nitroanilide: a new convenient substrate for determination and study of l- and d-gamma-glutamyltranspeptidase activities. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 73, p. 679-81, 1963.

OWAGBORIAYE, F. O.; DEDEKE, G. A.; ADEMOLU, K. O.; OLUJIMI, O. O.; ASHIDI, J. S.; ADEYINKA, A. A. Reproductive toxicity of Roundup herbicide exposure in male albino rat. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2017.

PAGANELLI, A., GNAZZO, V., ACOSTA, H., LÓPEZ, S.L., CARRASCO, A.E. Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, p. 1586–1595, 2010.

PALMA, D. C. A. **Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde- MT**. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva)– Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

PANDAY, A.; INDA, M. E.; BAGAM, P.; SAHOO, M. K.; OSORIO, D.; BATRA, S. Transcription Factor NF- κ B: An Update on Intervention Strategies. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentallis (Warsz)**, v. 64, n. 6, p. 463-483, 2016.

PARIKSHAK, N. N.; GANDAL, M. J.; GESCHWIND, D. H. Systems biology and gene networks in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 8, p. 441-58, 2015.

PARRÓN, T.; REQUENA, M.; HERNÁNDEZ, A. F.; ALARCÓN, R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2011.

PAUL, I. A., DUNCAN, G. E., KUHN, C., MUELLER, R. A., HONG, J. S. BREESE, G. R. Neural adaptation in imipramine-treated rats processed in forced swim test: assessment of time course, handling, rat strain and amine uptake. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 252, n. 3, p. 997-1005, 1990.

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

PESSOA-PUREUR, R; WAJNER, M. Cytoskeleton as a potential target in the neuropathology of maple syrup urine disease: insight from animal studies. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 30, p. 664-72, 2007.

PETITO, C. K.; CHUNG, M. C.; VERKHOVSKY, L. M.; COOPER, A. J. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. **Brain Research**, v. 569, p. 275-80, 1992.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-12, 2004.

PLATT, S. R. The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review. **The Veterinary Journal**, v. 173, n. 2, p. 278-86, 2007.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978.

POULSEN, M. S.; RYTTING, E.; MOSE, T.; KNUDSEN, L. E. Modeling placental transport: correlation of in vitro BeWo cell permeability and ex vivo human placental perfusion. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1380–1386, 2009.

QIAO, J., RONG, L., WANG, Z. AND ZHANG, M. Involvement of Akt/GSK3beta/CREB signaling pathway on chronic omethoate induced depressive-like behavior and improvement effects of combined lithium chloride and astaxanthin treatment. **Neuroscience Letters**, v. 649, p. 55-61, 2017.

RICE, D.; BARONE, S. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, 2000.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G. E. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 716-720, 2005.

RITZ, B. R.; PAUL, K. C.; BRONSTEIN, J. M. P. Pesticides and Men: a California Story of Genes and Environment in Parkinson's Disease. **Current Environmental Health Reports**, v. 3, n. 1, p. 40-52, 2016.

RODIER, P. M. Developing Brain as a Target of Toxicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 6, p. 73-6, 1995.

ROHLMAN, D. S.; ANGER, W. K.; LEIN, P. J. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 2, p. 268-76, 2011.

ROLLS, A., SHECHTER, R., LONDON, A., ZIV, Y., RONEN, A., LEVY, R.; SCHWARTZ, M. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 9, p. 1081-8, 2007.

ROMANO, R.M.; ROMANO, M.A.; BERNARDI, M.M.; OLIVEIRA, C.A.; FURTADO, P.V. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. **Archives of Toxicology**, 84, p. 309-317, 2010.

ROSSIGNOL, D. A.; FRYE, R. E. Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism. **Frontiers in Physiology**, v. 5, 2014.

ROY, N. M.; CARNEIRO, B.; OCHS, J. Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 42, pp. 45-54, 2016.

RUEDIGER, T.; BOLZ, J. Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 621, p. 104-15, 2007.

RULL, R. P.; RITZ, B., SHAW, G. M. Neural Tube Defects and Maternal Residential Proximity to Agricultural Pesticide Applications. **American Journal of Epidemiology**, v. 163, n. 8, 2006

SAHAY, A.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 1110-5, 2007.

SALBEGO, J.; PRETTO, A.; GIODA, C. R.; DE MENEZES, C. C.; LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; BALDISSEROTTO, B.; LORO, V. L. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 740-5, 2010.

SALIM. S. Oxidative stress and psychological disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 12, p. 140-147, 2014.

SALVI, R. M.; LARA, D. R.; GHISOLFI, E. S.; PORTELA, L. V.; DIAS, R. D.; SOUZA, D. O. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. **Toxicological Sciences**, v. 72, n. 2, p. 267-71, 2003.

SAMANTA, P.; PAL, S.; MUKHERJEE, A. K.; GHOSH, A. R. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipidperoxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein contente eonteleostean fishes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p.120–125, 2014.

SANACORA, G.; ZARATE, C. A.; KRYSTAL, J. H.; MANJI, H. K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nature Reviews**, v. 7, 2008.

SÁNCHEZ, G.M. Ambiente anti-oxidante/pro-oxidante su impacto medico. 1ª ed. **Aracne**, 2012.

SÁNCHEZ-SANTED, F.; COLOMINA, M. T.; HERRERO-HERNÁNDEZ, E. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. **Cortex**, v. 74, p. 417-26, 2016.

SANTOS, A. Q.; NARDIN, P.; FUNCHAL, C.; ALMEIDA, L.M.; JACQUES-SILVA, M. C.; WOFCHUK, S. T.; GONÇALVES, C. A.; GOTTFRIED, C. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 453, p. 161-7, 2006.

SATO, C.; KAMIJO, Y.; YOSHIMURA, K.; IDE, T. Aseptic meningitis in association with glyphosate-surfactant herbicide poisoning. **Clinical Toxicology (Phila)**, v. 49, n. 2, p. 118-20, 2011.

SAWADA, Y.; NAGAI, Y.; UEYAMA, M.; YAMAMOTO, I. Probable toxicity of surface-active agent in commercial herbicide containing glyphosate. **The Lancet**, v. 1, n. 8580, p. 299, 1988.

SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative Stress and Neurotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 172-188, 2008.

SCHINASI, L.; LEON, M. E. Non-Hodgkin Lymphoma and Occupational Exposure to Agricultural Pesticide Chemical Groups and Active Ingredients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 4449-4527, 2014.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. **Behavioural Pharmacology**, v. 18, n. 5-6, p. 391-418, 2007.

SCHUTTELKOPF, A. W.; VAN AALTEN, D. M. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. **Acta Crystallographica Section D Biol Crystallography**, v. 60, p. 1355-63, 2004.

SHAPIRO, B. M.; STADTMAN, E. R.; The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 24, p. 501-524, 1970.

SHELTON, J. F.; GERAGHTY, E. M.; TANCREDI, D. J.; DELWICHE, L. D.; SCHMIDT, R. J.; RITZ, B.; HANSEN, R. L.; HERTZ-PICCIOTTO, I. Neurodevelopmental disorders and prenatal

residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. **Environmental Health Perspectives**, v. 122, n. 10, p. 1103-9, 2014.

SHIBATA, M.; HAKUNO, F.; YAMANAKA, D.; OKAJIMA, H.; FUKUSHIMA, T.; HASEGAWA, T.; OGATA, T.; TOYOSHIMA, Y.; CHIDA, K.; KIMURA, K.; SAKODA, H.; TAKENAKA, A.; ASANO, T.; TAKAHASHI, S. Paraquat-induced oxidative stress represses phosphatidylinositol 3-kinase activities leading to impaired glucoseuptake in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 20915-25, 2010.

SHIOTSUKI, H; YOSHIMI, K; SHIMO, Y; FUNAYAMA, M; TAKAMATSU, Y; IKEDA, K; TAKAHASHI, R; KITAZAWA, S; HATTORI, N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of Neuroscience Methods**, v.189, n.2, p.180-5. 2010.

SHIVAKUMAR, B. R.; ANANDATHEERTHAVARADA, H. K; RAVINDRANATH, V. Free radical scavenging systems in developing rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 181-5, 1991.

SHOHAMI, E.; BEIT-YANNAL, E.; HOROWITZ, M.; KOHEN, R. Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 17, p. 1007-19, 1997.

SIDORYK-WEGRZYNOWICZ, M.; ASCHNER, M. Manganese toxicity in the central nervous system: the glutamine/glutamate- γ -aminobutyric acid cycle. **Journal of Internal Medicine**, v. 273, n. 5, p. 466-477, 2013.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: **Oxidative Stress**. Editor: SIES, H. London: Academic Press, p. 1–8, 1985.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.

SIES, H.; JONES, D. Oxidative stress. In: **Encyclopedia of Stress**. Editor: FINK, G. 2^o ed. Vol. 3. Amsterdam: Elsevier, p. 45–48, 2007.

aSINHORIN, V. D. G.; SINHORIN, A. P.; TEIXEIRA, J. M. S.; MILÉSKI, K. M. L.; HANSEN, P. C.; MOREIRA, P. S. A.; KAWASHITA, N. H.; BAVIERA, A. M.; LORO, V. L. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidante responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 106, p. 181–187, 2014

bSINHORIN, V. D.; SINHORIN, A. P.; TEIXEIRA, J. M.; MILÉSKI, K. M.; HANSEN, P. C.; MOELLER, P. R.; MOREIRA, P. S.; BAVIERA, A. M.; LORO, V. L. Metabolic and behavior changes in surubim acutely exposed to a glyphosate-based herbicide. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, p. 659-67, 2014.

SMALL, S. A.; SCHOBEL, S. A.; BUXTON, R. B.; WITTER, M. P.; BARNES, C. A. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, 2011.

SNYDER EY, DEITCHER DL, WALSH C, ARNOLDALDEA S, HARTWIEG EA, ET AL. Multipotent Neural Cell-Lines Can Engraft and Participate in Development of Mouse Cerebellum. **Cell**, v. 68, n. 1, p. 33–51, 1992.

SOUZA, J. S.; KIZYS, M. M.; DA CONCEIÇÃO, R. R.; GLEBOCKI, G.; ROMANO, R. M.; ORTIGA-CARVALHO, T. M.; GIANNOCCO, G.; DA SILVA, I. D.; DIAS DA SILVA, M. R.; ROMANO, M. A.; CHIAMOLERA, M. I. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. **Toxicology**, v. 377, p. 25–37, 2017.

SRIBANDITMONGKOL, P.; JUTAVIJITTUM, P.; PONGRAVEEVONGSA, P.; WUNNAPUK, K.; DURONGKADECH, P. Pathological and toxicological findings in Glyphosate-Surfactant Herbicide Fatality (Case Report). **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 33, p. 234-237, 2012.

STALLONES L.; BESELER C. Pesticide poisoning and depressive symptoms among farm residents. **Annals of Epidemiology**, v. 12, n. 6, p. 389-94, 2002.

STALLONES L. Suicide and potential occupational exposure to pesticides, Colorado 1990-1999. **Journal of Agromedicine**, v. 11, n. 3-4, p. 107-12, 2006.

STEINRUCKEN, H.C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 94, p. 1207-1212, 1980.

STELLA, J.; RYAN, M. Glyphosate herbicide formulation: a potentially lethal ingestion. **Emergency Medicine Australasia**, v. 16, n. 3, p. 235-9, 2004.

STUFFINS, C. B.; WEATHERALL, H. Determination of the peroxide value of oils and fats. **Analyst**, v. 70, p. 403-9, 1945.

SUGAMURA, K.; KEANEY, J.F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 5, p. 978-992, 2011.

SULUKAN, E.; KÖKTÜRK, M.; CEYLAN, H.; BEYDEMİR, S.; ISIK, M.; ATAMANALP, M.; CEYHUN, S. B. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 180, p. 77-85, 2017.

SUTOR, B.; LUHMANN, H.J. Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex. **Perspectives on Developmental Neurobiology**, v. 2, p. 409-419, 1995.

SWAMY, M.; YUSOF, W. R.; SIRAJUDEEN, K. N.; MUSTAPHA, Z.; GOVINDASAMY, C. Decreased glutamine synthetase, increased citrulline-nitric oxide cycle activities, and oxidative stress in different regions of brain in epilepsy rat model. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 67, p. 105-13, 2011.

TERNAN, N. G.; MC GRATH, J. W.; MC MULLAN, G.; QUINN, J. P. Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by

microorganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p, 635-647, 1998.

THAKUR, D. S.; KHOT, R.; JOSHI, P. P.; PANDHARIPANDE, M.; NAGPURE, K. Glyphosate poisoning with acute pulmonary edema. **Toxicology International**, v. 21, n. 3, p. 328-30, 2014.

THIRUCHELVAM, M.; RICHFIELD, E. K.; GOODMAN, B. M.; BAGGS, R. B.; CORY-SLECHTA, D. A. Developmental Exposure to the Pesticides Paraquat and Maneb and the Parkinson's Disease Phenotype. **NeuroToxicology**, v. 23, p. 621–633, 2002.

TIESMAN, H. M., KONDA, S., HARTLEY, D., CHAUMONT MENENDEZ, C., RIDENOUR, M. AND HENDRICKS, S. SUICIDE IN U.S. Workplaces, 2003-2010: a comparison with non-workplace suicides. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 48, n. 6, p. 674-82, 2015.

TILSON, H. A. Development neurotoxicology of endocrine disruptors and pesticides: identification of information gaps and research needs. **Environmental Health Perspectives**, p. 807-11, 1998.

TIWARI, B. K.; PANDEY, K. B.; ABIDI, A. B.; RIZVI, S. I. Markers of Oxidative Stress during Diabeter Mellitus. **Journal of Biomarkers**, 2013.

TKÁC, I.; RAO, R.; GEORGIEFF, M. K.; GRUETTER, R. Developmental and regional changes in the neurochemical profile of the rat brain determined by in vivo ¹H NMRspectroscopy. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 50, p. 24-32, 2003.

TRAN, N. Q. V.; MIYAKE, K. Neurodevelopmental Disorders and Environmental Toxicants: Epigenetics as an Underlying Mechanism. **International Journal of Genomics**, 2017.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-61, 2010.

TSUJI, R.; CROFTON, K. M. Developmental neurotoxicity guideline study: issues with methodology, evaluation and regulation. **Congenital Anomalies**, v. 52, p. 122–8, 2012.

TUNÇMEN, H.; TÜZMEN, M.N. Biochemical Effects of Pesticide Contaminated Drinking Water on Lipid Peroxidation and Free-Radical Scavenger. **Hacettepe Journal of Biology and Chemistry**, v. 35, p. 111-116, 2007.

TZINGOUNIS, A. V.; WADICHE, J. I. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. **Nature Reviews**, v.8, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701-18, 2005.

VAN VELZEN, L. S.; WIJDEVELD, M.; BLACK, C. N.; VAN TOL, M. J.; VAN DER WEE, N. J. A.; VELTMAN, D. J.; PENNINX, B. W. J. H.; SCHMAAL, L. Oxidative stress and brain morphology in individuals with depression, anxiety and healthy controls. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 76, p. 140-144, 2017.

VARAYOUD, J.; DURANDO, M.; RAMOS, J. G.; MILESI, M. M.; INGARAMO, P. I.; MUÑOZ-DE-TORO, M.; LUQUE, E. H. Effects of a glyphosate-based herbicide on the uterus of adult ovariectomized rats. **Environmental Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 1191-1201, 2017.

VERMA P, AUGUSTINE GJ, AMMAR MR, TASHIRO A, COHEN SM. A neuroprotective role for microRNA miR-1000 mediated by limiting glutamate excitotoxicity. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 379-85, 2015.

VINCENT, A. S.; LIM, B. G.; TAN, J.; WHITEMAN, M.; CHEUNG, N. S.; HALLIWELL, B.; WONG, K. P. Sulfite-mediated oxidative

stress in kidney cells. **Kidney International**, v. 65, n. 2, p. 393-402, 2004.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering**, v. 8, n. 2, p. 127-34, 1995.

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.

WALSH, R. N. E CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WANG, J.; WOLF, R. M.; CALDWELL, J. W.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A. Development and testing of a general amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157-74, 2004.

WANG, X. F.; LI, S.; CHOU, A.P.; BRONSTEIN, J. M. Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v.2, n.1: p.198-205, 2006.

WANG, X.; MICHAELIS, E.K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 2, 2010.

WEBER, J. T. Altered calcium signaling following traumatic brain injury. **Neuropharmacology**, v. 3, 2012.

WEBSTER, T. M. U.; SANTOS, E. M. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. **BMC Genomics**, v. 16, 2015.

WEISS, B. Vulnerability of children and the developing brain to neurotoxic hazards. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, Suppl 3, p. 375-81, 2000.

WESSELING, C.; VAN WENDEL DE JOODE, B.; KEIFER, M.; LONDON, L.; MERGLER, D.; STALLONES, L. Symptoms of

psychological distress and suicidal ideation among banana workers with a history of poisoning by organophosphate or n-methyl carbamate pesticides. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 67, n. 11, p. 778-84, 2010.

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**, n. 31, p. 117-165, 2000.

WILLNER, P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, p. 90-110, 2005.

WILLNER P.; TOWELL A.; SAMPSON D.; SOPHOKLEOUS S.; MUSCAT R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 93, p. 358-64, 1987.

WINNEKE, G. Developmental aspects of environmental neurotoxicology: Lessons from lead and polychlorinated biphenyls. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 308, p. 9–15, 2011.

WOJCIK; S. M.; RHEE, J. S. HERZOG, E.; SIGLER, A.; JAHN, R.; TAKAMORI, S.; BROSE, N.; ROSENMUND, C. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 101, n. 18, p. 7158-7163, 2004.

WUNNAPUK, K.; GOBE, G.; ENDRE, Z.; PEAKE, P.; GRICE, J. E.; ROBERTS, M. S.; BUCKLEY, N. A.; LIU, X. Use of a glyphosate-based herbicide-induced nephrotoxicity model to investigate a panel of kidney injury biomarkers. **Toxicology Letters**, v. 225, p. 192– 200, 2014.

XU, J.; LI, G.; WANG, Z.; SI, L.; HE, S.; CAI, J.; HUANG, J.; DONOVAN, M. D. The role of L-type amino acid transporters in the uptake of glyphosate across mammalian epithelial tissues. **Chemosphere**, v. 145, p. 487-94, 2016.

YANO, S.; TOKUMITSU, H.; SODERLING, T. R. Calcium promotes cell survival through CaM-k kinase activation of the protein-kinase-B pathway. **Nature**, v. 396, p. 584–587, 1998.

YUDKOFF, M.; DAIKHIN, Y.; NISSIM, I.; HORYN, O.; LUHOVYY, B.; LAZAROW, A.; NISSIM, I. Brain Amino Acid Requirements and Toxicity: The Example of Leucina. In: **The Fourth Workshop On The Assessment Of Adequate Intake Of Dietary Amino Acids**, 2004, Philadelphia, PA, EUA. *The Journal of Nutrition*, 2005.

ZAGANAS, I.; KAPETANAKI, S.; MASTORODEMOS, V.; KANAVOURAS, K.; COLOSIO, C.; WILKS, M. F.; TSATSAKIS, A. M. Linking pesticide exposure and dementia: what is the evidence? **Toxicology**, v. 307, p. 3-11, 2013.

ZAMONER, A.; ROYER, C.; BARRETO, K.P.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neuroscience Research**, v. 57, p. 98-103, 2007.

ZOUAOUI, K.; DULAURENT, S.; GAULIER, J. M.; MOESCH, C.; LACHATRE, G. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. **Forensic Science International**, v. 226, p. e20-e25, 2013.

ZWART, L.L.; MEERMAN, J.H.; COMMANDEUR, J.N.; VERMEULEN, N.P.; Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-26, 1999.

ANEXO I

Toxicology 320 (2014) 34–45

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol

Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity



Daiane Cattani, Vera Lúcia de Liz Oliveira Cavalli, Carla Elise Heinz Rieg, Juliana Tonietto Domingues, Tharine Dal-Cim, Carla Inês Tasca, Fátima Regina Mena Barreto Silva, Ariane Zamoner*

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2013
 Received in revised form 12 February 2014
 Accepted 6 March 2014
 Available online 15 March 2014

Keywords:

Glyphosate
 Calcium
 Cholinergic excitotoxicity
 Oxidative stress
 Kinase pathways

ABSTRACT

Previous studies demonstrate that glyphosate exposure is associated with oxidative damage and neurotoxicity. Therefore, the mechanism of glyphosate-induced neurotoxic effects needs to be determined. The aim of this study was to investigate whether Roundup® (a glyphosate-based herbicide) leads to neurotoxicity in hippocampus of immature rats following acute (30 min) and chronic (pregnancy and lactation) pesticide exposure. Maternal exposure to pesticide was undertaken by treating dams orally with 1% Roundup® (0.38% glyphosate) during pregnancy and lactation (all 15-day-old). Hippocampal slices from 15 day old rats were acutely exposed to Roundup® (0.00005–0.1%) during 30 min and experiments were carried out to determine whether glyphosate affects $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx and cell viability. Moreover, we investigated the pesticide effects on oxidative stress parameters, ^{14}C -methyl-amino-isobutyric acid (^{14}C -MeAIB) accumulation, as well as glutamate uptake, release and metabolism. Results showed that acute exposure to Roundup® (30 min) increases $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx by activating NMDA receptors and voltage-dependent Ca^{2+} channels, leading to oxidative stress and neural cell death. The mechanisms underlying Roundup®-induced neurotoxicity also involve the activation of CaMKII and ERK. Moreover, acute exposure to Roundup® increased ^3H -glutamate released into the synaptic cleft, decreased GSH content and increased the lipoperoxidation, characterizing excitotoxicity and oxidative damage. We also observed that both acute and chronic exposure to Roundup® decreased ^3H -glutamate uptake and metabolism, while induced ^{14}C -MeAIB uptake and ^{14}C -MeAIB accumulation in immature rat hippocampus. Taken together, these results demonstrated that Roundup® might lead to excessive extracellular glutamate levels and consequently to glutamate excitotoxicity and oxidative stress in rat hippocampus.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The annual consumption of pesticides in Brazil has increased alarmingly in recent years. The justification for the use of these substances is based on the improvement of agricultural productivity, which places the country as one of the world's largest producers of food. However, the risks to the environment and health are neglected. According to the Brazilian National Trade Union for the

Agricultural Defense Products (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola – SINDIAG), in 2008 Brazil became the largest consumer of pesticides in the world. The increase in pesticide consumption leads to high rates of intoxication among farmers. Moreover, it has been suggested important associations between the bulk sale of pesticides and the increased rates of several types of cancer, endocrine disorders and a high prevalence of neurodegenerative diseases in agricultural workers (Londres, 2011), reinforcing the need for mechanistic investigations.

Glyphosate-based herbicides lead the pesticide world market. Moreover, glyphosate is the primary active ingredient present in Roundup® (Monsanto Company, St. Louis, MO). It has been suggested that the toxicity of Roundup® is probably due to synergistic effects between glyphosate and other formulation products (Marc et al., 2002; El-Shenawy, 2009), such as the surfactant

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Campus Universitário, Bairro Trindade, CEP: 88040-070, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Tel.: +55 48 3721 4747; fax: +55 48 3721 9452.

E-mail addresses: ariane.zamoner@ufsc.br, arianez@gsul.com.br, arianezamoner@aloc.com.br (A. Zamoner).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.001>

0300-483X/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

ANEXO II

Toxicology 387 (2017) 67–80



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol

Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress



Daiane Cattani^{a,b}, Patrícia Acordi Cesconetto^{a,b}, Mauren Kruger Tavares^a,
Eduardo Benedetti Parisotto^{a,b}, Paulo Alexandre De Oliveira^c, Carla Elise Heinz Rieg^{a,b},
Marina Condi Leite^d, Rui Daniel Schröder Prediger^c, Nestor Cubas Wendt^e, Guilherme Razzera^a,
Danilo Wilhelm Filho^b, Ariane Zamoner^{a,b,*}

^a Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^c Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^d Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Exatas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Glyphosate-based herbicide
Glutamate excitotoxicity
Oxidative stress
Depressive-like behavior
NMDA glutamate receptor
Melanin deicing

ABSTRACT

We have previously demonstrated that maternal exposure to glyphosate-based herbicide (GBH) leads to glutamate excitotoxicity in 15-day-old rat hippocampus. The present study was conducted in order to investigate the effects of subchronic exposure to GBH on some neurochemical and behavioral parameters in immature and adult offspring. Rats were exposed to 1% GBH in drinking water (corresponding to 0.36% of glyphosate) from gestational day 5 until postnatal day (PND)-15 or (PND)60. Results showed that GBH exposure during both prenatal and postnatal periods causes oxidative stress, affects cholinergic and glutamatergic neurotransmission in offspring hippocampus from immature and adult rats. The subchronic exposure to the pesticide decreased ^{14}C -glutamate uptake and increased $^{45}Ca^{2+}$ influx in 60-day-old rat hippocampus, suggesting a persistent glutamate excitotoxicity from developmental period (PND15) to adulthood (PND60). Moreover, GBH exposure alters the serum levels of the astrocytic protein S100B. The effects of GBH exposure were associated with oxidative stress and depressive-like behavior in offspring on PND60, as demonstrated by the prolonged immobility time and decreased time of climbing observed in forced swimming test. The mechanisms underlying the GBH-induced neurotoxicity involve the NMDA receptor activation, impairment of cholinergic transmission, astrocyte dysfunction, ERK1/2 overactivation, decreased p65 NF- κ B phosphorylation, which are associated with oxidative stress and glutamate excitotoxicity. These neurochemical events may contribute, at least in part, to the depressive-like behavior observed in adult offspring.

1. Introduction

Glyphosate (*N*-phosphonomethylglycine) is an organophosphorus compound, widely used as a broad-spectrum, post-emergent, non-selective herbicide, as well as a crop desiccant. It has been used in both agricultural and non-agricultural activities (e.g. gardening). Commercial formulations containing glyphosate account for approximately 60% of the world market of non-selective herbicides (IBAMA, 2014; IARC, 2015). In Brazil, the planting of glyphosate-resistant soybeans (GRS) has greatly enhanced the consumption of glyphosate formulations in crops.

Glyphosate-based herbicides (GBH) are frequently formulated as isopropylamine salts and surfactants may be added in formulations (FAO, 2000/2001; IPCS, 1994). The use of polyethoxylated alcohols (POEA) as a surfactant in GBH formulations facilitate the herbicide uptake by plants (Sañudo and Davies, 2012). It has been suggested that formulations containing surfactants may be even more toxic than the glyphosate alone to mammal cells (de Lira Oliveira Cavalli et al., 2013; Message et al., 2013; Sribanditmongkol et al., 2012).

In 2000, Williams and coworkers reviewed the data concerning the safety of GBH to human and animal health. They suggested that the use of these herbicides did not cause adverse effects to mammals (Williams

* Corresponding author at: Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Laboratório de Biologia Experimental e Simulação Celular (Labiocel), sala 101, Bloco C, 1° and 2°, Campus Universitário, Bairro Trindade, CEP: 88040-970, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.
E-mail address: arazone@ffar.ufsc.br (A. Zamoner).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.001>

Received 2 February 2017; received in revised form 21 May 2017; Accepted 10 June 2017

Available online 12 June 2017

0304-423X/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.