

Daiane Cattani

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA EXCITOTOXICIDADE
GLUTAMATÉRGICA INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AGUDA
OU CRÔNICA AO ROUNDUP® SOBRE O HIPOCAMPO DE
RATOS IMATUROS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Ariane Zamoner Pacheco de Souza.

Florianópolis
2013

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

Cattani, Daiane

Mecanismos envolvidos na excitotoxicidade
glutamatérgica induzida pela exposição aguda ou crônica ao
Roundup® sobre o hipocampo de ratos imaturos / Daiane
Cattani ; orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza -
Florianópolis, SC, 2013.
126 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

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

Daiane Cattani

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA EXCITOTOXICIDADE
GLUTAMATÉRGICA INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AGUDA
OU CRÔNICA AO ROUNDUP® SOBRE O HIPOCAMPO DE
RATOS IMATUROS**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção de título de “mestre” e aprovado em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

UFSC, 20 de Fevereiro de 2013

Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Orientadora- Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marcelo Farina
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Universidade Federal de Santa Catarina

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé que tenho nele.

Aos meus pais Anilso e Diles Cattani, pelo amor e carinho incondicionais, por todas as oportunidades a mim proporcionadas, e ao meu irmão Rudivan, que apesar da distância sempre me apoiou e incentivou em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora Ariane Zamoner Pacheco de Souza pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a execução e conclusão desta dissertação, e por toda a confiança, aprendizado e atenção dedicada a mim.

À professora Dr.^a Fátima Regina Mena Barreto da Silva e à professora Dr.^a Carla Inês Tasca pela colaboração no desenvolvimento desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular – LaBioSignal e aos colegas do laboratório de Hormônios e Transdução de Sinais, pelos momentos de trabalho e descontração, principalmente à Leila Zanatta, Renata Gonçalves, Vera Lúcia de Liz Oliveira Cavalli, Juliana Tonietto Domingues, Paola Bez Goulart, Carla Elise Heinz Rieg, Bianka Almeida e Camila Mariana Andrade pelo auxílio nos experimentos.

Ao meu namorado Thiago Matheus Vieira Oliveira pelo carinho, paciência, força e incentivo, e por ser sempre meu companheiro de todas as horas e principalmente por poder contar com você, tanto para dividir minhas angústias quanto as alegrias.

As minhas amigas tão especiais Náthaly Matté, Jessica Edinger e Daiane Perondi, pelo apoio constante e por estarem sempre presentes nos momentos mais importantes, e as minhas amigas Kaethe Hesse e Micheli Corso, que mesmo longe sempre me incentivaram e deram apoio, só tenho a lhes agradecer pelas longas e boas conversas ao telefone.

A todos aqui não mencionados e que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

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

A CAPES-REUNI pela bolsa concedida.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPESC pelo apoio financeiro.

.

A vida me ensinou que as pessoas são amigáveis, se
eu sou amável,
que as pessoas são tristes, se estou triste,
que todos me querem, se eu os quero,
que todos são ruins, se eu os odeio,
que há rostos sorridentes, se eu lhes sorrio,
que há faces amargas, se eu sou amargo,
que o mundo está feliz, se eu estou feliz,
que as pessoas ficam com raiva quando eu estou
com raiva,
que as pessoas são gratas, se eu sou grato.
A vida é como um espelho: se você sorri para o
espelho, ele sorri de volta. A atitude que eu tome
perante a vida é a mesma que a vida vai tomar
perante mim.

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

Sugere-se que a exposição ocupacional a agrotóxicos pode levar a uma grande diversidade de alterações bioquímicas que podem ser correlacionadas ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Nosso estudo investigou as alterações bioquímicas induzidas pela exposição aguda (*in vitro*) ou crônica (durante o período gestacional e lactacional) ao herbicida Roundup® sobre fatias de hipocampo de ratos de 15 dias de idade. Para o tratamento *in vivo* as ratas prenhas receberam 1% de Roundup® (0,36% glifosato) na água de beber desde o 5º dia gestacional até os filhotes completarem 15 dias de vida pós-natal, sendo que os controles receberam apenas água durante o mesmo período. Para o tratamento *in vitro*, fatias de hipocampo de ratos imaturos foram incubadas por 30 minutos com ou sem 0,01% de Roundup® (0,0036% de glifosato). Agonista e antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (NMDA/glicina, AP-5 e MK-801), inibidores das vias de sinalização da CaMKII, ERK/MAPK, PKA e PLC/PKC (KN-93, PD98059, H89, Ro31-8220 e U73122, respectivamente) e bloqueador de canal de cálcio dependente de voltagem do tipo-L (nifedipina) foram utilizados para determinar os mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do Roundup® no hipocampo de ratos. Também foram determinados marcadores bioquímicos e de dano oxidativo, assim como a possível indução de excitotoxicidade glutamatérgica, através do estudo das alterações no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, bem como na captação, liberação e metabolismo do glutamato em fatias de hipocampo. Os resultados obtidos após o tratamento *in vivo* mostraram que a exposição ao Roundup® durante os períodos pré- e pós-natal aumentou o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$; diminuiu captação de [^3H]-glutamato e os níveis de GSH; promoveu acúmulo de ^{14}C -MeAIB; aumentou atividade das enzimas gama glutamil transferase (γ -GT) e aspartato aminotransferase (AST), assim como inibiu a atividade da glicose-6-P desidrogenase (G6PD), alanina aminotransferase (ALT) e glutamina sintetase (GS) no hipocampo de ratos imaturos. Além disso, observou-se que o pesticida induziu a ativação/fosforilação da ERK1/2, JNK1/2, Akt e GSK3 β . No tratamento *in vitro* os resultados demonstraram que a exposição ao glifosato-Roundup® aumentou o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$; diminuiu a captação e aumentou a liberação de [^3H]-glutamato; diminuiu os níveis de GSH; aumentou a lipoperoxidação; promoveu acúmulo de ^{14}C -MeAIB; inibiu a atividade enzimática da γ -GT, AST/ALT, G6PD e GS no hipocampo de ratos imaturos. Além disso, observou-se que o mecanismo de

toxicidade do agrotóxico induz o influxo de Ca^{2+} via ativação do receptor NMDA para glutamato e abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L. Além disso, o mecanismo do Roundup® também envolve a modulação das vias de sinalização da CaMKII, ERK/MAPK e PLC/PKC. Em conjunto, nossos resultados sugerem o envolvimento de excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo e de cascatas de sinalização celular nos efeitos do Roundup® sobre o hipocampo de ratos. O entendimento dos alvos celulares e moleculares de ação do Roundup®, assim como das vias de sinalização celular moduladas por este agrotóxico poderão indicar futuros alvos para intervenção preventiva, terapêutica e/ou diagnóstica em prol da saúde dos indivíduos expostos.

Palavras chaves: Roundup®. Excitotoxicidade glutamatérgica. Estresse oxidativo. Parâmetros bioquímicos.

ABSTRACT

It has been suggested that occupational exposure to pesticides may lead to biochemical changes which might be related to neurodegenerative conditions. Our study investigated the biochemical changes induced by acute (*in vitro*) or chronic (during the pre- and post-pregnancy) exposure to Roundup® on hippocampal slices from 15 days old rats. For *in vivo* treatment, pregnant females received 1% Roundup® (glyphosate 0.36%) in drinking water from gestational day 5 until the day of the experiments, which were carried out by using 15-day old pups. Control groups received only water during the same period. For *in vitro* treatment, hippocampal slices from immature rats were exposed to 0.01% Roundup® (0.0036% glyphosate) for 30 minutes. Glutamate receptor agonist and antagonists (NMDA/Gly, AP-5, MK-801), inhibitors of CaMKII, ERK/MAPK, PKA e PLC/PKC (KN-93, PD98059, H89, Ro31-8220 e U73122, respectively) and L-type voltage-dependent calcium channel blocker (nifedipine) were used in order to investigate the mechanisms underlying Roundup® neurotoxicity in rat hippocampus. The effect of the pesticide on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx, enzymatic activities, as well as on the uptake, release and metabolism of glutamate were determined in hippocampal slices in order to investigate the participation of oxidative damage and glutamatergic excitotoxicity in the mechanism of Roundup® neurotoxicity. The results obtained after treatment *in vivo* showed that exposure to Roundup® during gestational and lactational period increased $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx; decreased glutamate uptake and GSH levels; promoted ^{14}C -MeAIB accumulation; increased the activity of the enzymes aspartate aminotransferase (AST) and gamma glutamyl transferase (γ -GT) and inhibited the activity of glucose-6-P dehydrogenase (G6PD), alanine aminotransferase (ALT) and glutamine synthetase (GS) in immature rat hippocampus. Furthermore, it was observed that the pesticide induced activation/phosphorylation of ERK1/2, JNK1/2, Akt and GSK3 β . On the other hand, the acute (*in vitro*) exposure do the pesticide increased $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx; decreased [^3H]-glutamate uptake and increased its release; decreased GSH levels; increased lipid peroxidation; promoted ^{14}C -MeAIB accumulation; inhibited the enzymatic activity of γ -GT, AST/ALT, GS and G6PD in immature rat hippocampus. Moreover, it was observed that Roundup® exposure leads to calcium overload through NMDA receptor activation and L-type voltage dependent Ca^{2+} channels opening. Also, the mechanism of pesticide toxicity involves activation of kinase cascades

such as CaMKII, ERK/MAPK and PLC/PKC. Taken together, our results suggested the involvement of glutamatergic excitotoxicity, oxidative stress and the modulation of signaling pathways in mechanism of Roundup®. The knowledge of the molecular and cellular targets of Roundup®, as well as the signaling pathways modulated by this pesticide may indicate future targets for clinical intervention of exposed individuals.

Key words: Roundup®. Glutamatergic excitotoxicity. Oxidative stress. Biochemical parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da utilização de agrotóxicos por municípios brasileiros.....	28
Figura 2 - Estrutura do glifosato.....	30
Figura 3 - Mecanismo de ação do glifosato.....	32
Figura 4 - Hipocampo de rato.....	40
Figura 5 - Neurotransmissão glutamatérgica.....	44
Figura 6 - Glutamato como um metabólito chave.....	46
Figura 7 - Representação esquemática do transporte e ciclo glutamato/glutamina entre astrócitos e neurônios.....	47
Figura 8 - Ciclo glutamato-glutamina.....	49
Figura 9 - Metabolismo do glutamato.....	51
Figura 10 - Termodinâmica de captação dos transportadores de glutamato.....	52
Figura 11 – Possíveis alvos do Roundup® em hipocampo de ratos imaturos.....	63
Figura 12 - Efeito do Roundup® na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (A) e na viabilidade celular (B) em hipocampo de ratos imaturos.....	74
Figura 13 - Efeito da exposição ao Roundup® durante os períodos gestacional e lactacional na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampo de ratos imaturos.....	75
Figura 14 - Efeito da exposição pré- e pós-gestacional ao Roundup® na captação de L- ^3H]Glutamato em hipocampo de ratos de 15 dias de idade.....	76

Figura 15 - Envolvimento do sistema glutamatérgico no mecanismo de ação do Roundup® em hipocampo de ratos imaturos. Tratamento <i>in vitro</i>	77
Figura 16 – Avaliação do efeito do tratamento com Roundup® no metabolismo do glutamato, focando as aminotransferases ALT e AST (A) e a enzima GS (B). Tratamento <i>in vivo</i>	78
Figura 17 – Avaliação do efeito do tratamento com Roundup® no metabolismo do glutamato, focando as aminotransferases ALT e AST (A) e a enzima GS (B). Tratamento <i>in vitro</i>	79
Figura 18 - Efeito do tratamento <i>in vivo</i> (A) e <i>in vitro</i> (B) do Roundup® no acúmulo de ¹⁴ C-MeAIB em hipocampo de ratos imaturos, 15 dias de idade.....	80
Figura 19 - Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com Roundup® no conteúdo de TBARS no hipocampo de ratos imaturos.....	81
Figura 20 - Efeito do tratamento <i>in vivo</i> (A) e <i>in vitro</i> (B) com Roundup® no conteúdo de GSH no hipocampo de ratos imaturos...	81
Figura 21 - Efeito do tratamento <i>in vivo</i> (A) e <i>in vitro</i> (B) com Roundup® na atividade enzimática da G6PD em hipocampo de ratos de 15 dias de idade.....	82
Figura 22 - Modulação da atividade da γ -glutamil transferase pelo Roundup® em hipocampo de ratos imaturos.....	83
Figura 23 - Ativação das MAPKs, ERK 1/2 e JNK 1/2 ativadas pela exposição crônica ao Roundup® em células hipocampais de ratos imaturos.....	84
Figura 24 - Ativação das vias Akt e GSK-3 β ativadas pela exposição crônica ao Roundup® em células hipocampais de ratos imaturos.....	85
Figura 25 - Envolvimento das vias de sinalização e de receptores do sistema glutamatérgico no mecanismo do Roundup® na atividade da γ -GT em hipocampo de ratos imaturos.....	86

Figura 26 - Envolvimento das vias de sinalização e de receptores do sistema glutamatérgico no mecanismo do Roundup® no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampo de ratos imaturos..... 88

Figura 27 - Mecanismo de toxicidade proposto para o Roundup® sobre o hipocampo de ratos imaturos..... 98

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Proteína cinase B
ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Ácido aminometilfosfônico (metabólito glifosato)
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AST	Aspartato aminotransferase
BHE	Barreira hematoencefálica
Ca ⁺²	Cálcio
CaMKII	Proteína cinase II dependente de Ca ²⁺ /Calmodulina
CCDV	Canal de cálcio dependente de voltagem
DAG	Diacilglicerol
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
EPSPS	Enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas do oxigênio
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
Y-GT	Gama-glutamiltransferase
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutaciona reduzida
GSK3 β	Cinase da glicogênio sintase 3 β
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
IPA	Isopropilamina
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
JNK 1/2	Cinase c-Jun N-terminal
KA	Receptor cainato
KIC	Ácido α -cetoisocapróico
LDH	Lactato desidrogenase
MAPK	Proteína serina-treonina cinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MeAIB	Ácido α -(metil-amino)-isobutírico
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida

NMDA	N-metil-D-aspartato
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
[•] OH	Radical hidroxila
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
POEA	Polioxietilenoamino
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
Ras	Proteína GTPase monomérica
RE	Retículo endoplasmático
RO [•]	Radical alcóxil
ROO [•]	Radical peróxil
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
StAR	Proteína de regulação aguda da esteroidogênese
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VGLUT	Transportador de glutamato vesicular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	OBJETIVOS.....	25
1.1.1	Objetivos Gerais.....	25
1.1.2	Objetivos Específicos.....	25
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	27
2.1	AGROTÓXICOS.....	27
2.1.1	Herbicida Roundup®.....	29
2.1.1.1	Mecanismo de ação.....	31
2.1.2	Possíveis consequências da exposição ao Roundup® para a saúde.....	33
2.2	SISTEMA NERVOSO CENTRAL: NOÇÕES BÁSICAS....	36
2.2.1	Hipocampo.....	39
2.3	GLUTAMATO.....	41
2.3.1	Receptores glutamatérgicos.....	42
2.3.2	Metabolismo glutamato – Interações entre astrócitos e neurônios.....	44
2.3.2.1	Transporte de aminoácidos.....	46
2.3.2.1.1	<i>Ciclo Glutamato-Glutamina.....</i>	<i>48</i>
2.3.2.1.2	<i>Participação das aminotransferases no metabolismo de glutamato.....</i>	<i>50</i>
2.3.2.1.3	<i>Captação de Glutamato.....</i>	<i>51</i>
2.3.2.2	Liberação de Glutamato.....	52
2.3.3	Excitotoxicidade Glutamatérgica.....	53
2.4	CAPTAÇÃO DE CÁLCIO.....	54
2.5	ESTRESSE OXIDATIVO E O PAPEL DA GLUTATIONA.....	56
2.5.1	Glutathione.....	57
2.5.2	Papel da γ-GT.....	59
2.6	VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL - BREVE RELATO.....	60
2.7	HIPÓTESE.....	63
3	METODOLOGIA.....	65
3.1	MATERIAIS.....	65
3.2	MÉTODOS.....	65
3.2.1	Animais.....	65
3.2.1.1	Tratamento <i>in vivo</i> com Roundup®.....	66
3.2.1.2	Tratamento <i>in vitro</i> das fatias de hipocampo com Roundup®.....	66
3.2.2	Captação de L-[³H]Glutamato.....	67
3.2.3	Liberação de L-[³H]Glutamato.....	67
3.2.4	Captação de Cálcio.....	68
3.2.5	Acúmulo de aminoácidos neutros.....	68

3.2.6	Conteúdo de GSH.....	68
3.2.7	Conteúdo de TBARS.....	69
3.2.8	Vias de sinalização.....	69
3.2.9	Atividade enzimática.....	70
3.2.9.1	γ-Glutamil-Transferase.....	70
3.2.9.2	Glutamina Sintetase.....	70
3.2.9.3	Alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase.....	71
3.2.9.4	Lactato Desidrogenase.....	71
3.2.9.5	Glicose-6-fosfato Desidrogenase.....	71
3.2.10	Concentração de Proteínas.....	72
3.2.11	Análise estatística.....	72
4	RESULTADOS.....	73
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i> ATRAVÉS DA CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ E VIABILIDADE CELULAR.....	73
4.2	ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NA TOXICIDADE OCASIONADA PELO ROUNDUP® SOBRE CÉLULAS HIPOCAMPAIS.....	75
4.3	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA TOXICIDADE GERADA PELA EXPOSIÇÃO AO AGROTÓXICO ROUNDUP®.....	80
4.4	VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE AÇÃO DO ROUNDUP® EM HIPOCAMPOS DE RATOS IMATUROS.....	83
4.5	PARTICIPAÇÃO DE DIFERENTES ROTAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR NO MECANISMO DO ROUNDUP® SOBRE A ATIVIDADE DA Y-GT EM HIPOCAMPOS DE RATOS IMATUROS.....	85
4.6	MECANISMOS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS ENVOLVIDOS NA AÇÃO DO ROUNDUP® SOBRE O INFLUXO DE CÁLCIO EM HIPOCAMPOS DE RATOS IMATUROS.....	87
5	DISCUSSÃO.....	89
6	CONCLUSÕES.....	101
7	PERSPECTIVAS.....	103
	REFERÊNCIAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

O avanço industrial e agrícola no século XX foi determinante para o aumento intensivo na utilização de agrotóxicos, produtos químicos projetados especificamente para o controle de pragas, que emergiram durante a revolução verde com o propósito de diminuir os custos dos alimentos e melhorar a disponibilidade destes para uma população humana em contínuo crescimento (QUEIROZ; WAISSMANN, 2006; LONDRES, 2011).

O Brasil atualmente é o maior consumidor mundial destes produtos, tendo ultrapassado a marca de um milhão de toneladas de agrotóxicos utilizados por ano, número este que representa nada menos que aproximadamente 5 kg de pesticida por habitante (LONDRES, 2011). O uso exacerbado destes produtos e as condições insalubres as quais muitos trabalhadores agrícolas são expostos levam a uma contaminação tanto humana e de animais, quanto do ambiente. Esse uso intensivo e inadequado traz ainda um processo de resistência a pragas e ervas infestante, bem como a ligação destes pesticidas com o desenvolvimento de diversas doenças (AGRA; SANTOS, 2001; PARRÓN et al., 2011).

Correlações importantes entre o maior volume na venda de agrotóxicos e aumento nos índices de diversos tipos de câncer, distúrbios endócrinos e uma alta prevalência de doenças neurodegenerativas em trabalhadores agrícolas vem sendo descritas (LONDRES, 2011). Os pesticidas, mesmo em doses relativamente baixas, podem afetar as células neuronais através de mecanismos que envolvem estresse oxidativo, inflamação e ainda, a morte neuronal por apoptose. Essa perda neuronal em determinadas regiões do cérebro pode resultar em declínio cognitivo, perturbações da memória e atenção, e danos à função motora. Estes distúrbios neurocomportamentais podem, eventualmente, levar à doença de Alzheimer, doença de Parkinson e outras formas de demência (PARRÓN et al., 2011). Estimulação da produção de radicais livres, peroxidação de lipídios, e perturbações na capacidade antioxidante celular são mecanismos de toxicidade na maioria dos pesticidas (ABDOLLAHI et al., 2004).

Diversas evidências demonstram um importante papel da ativação excessiva dos receptores glutamatérgicos na indução de morte neuronal e neurodegeneração. A subclasse de receptores ionotrópicos para glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) é a subclasse mais seletiva e mais efetiva que as demais em mediar os danos neurodegenerativos. A superativação destes receptores pelo glutamato acarreta em aumento no influxo de Ca^{2+} e, níveis elevados anormais

deste íon são responsáveis pelo fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica, que leva a estresse oxidativo, dano mitocondrial e consequentemente à morte celular (FAN; RAYMOND, 2007; WANG; MICHAELIS, 2010).

Formulações de agrotóxicos contendo o herbicida glifosato são as mais vendidas no Brasil e no mundo. A Monsanto, que o comercializa sob a marca Roundup® deteve a patente do glifosato até o ano 2000. Essa grande popularidade do glifosato deriva da sua eficácia contra uma ampla gama de espécies de ervas daninhas, do seu baixo custo, e da publicidade de que este pesticida tem um baixo impacto ambiental, sendo seguro para com a saúde humana e de animais, já que ele atua em uma via presente exclusivamente em plantas e alguns microorganismos (LONDRES, 2011; POLLEGIONI; SCHONBRUNN; SIEHL, 2011).

Apesar da grande complexidade de efeitos causados pela exposição ambiental a estes agrotóxicos sobre a saúde humana, ainda não estão caracterizados biomarcadores que identifiquem uma ação biológica direta dos diferentes pesticidas sobre o organismo, à exceção dos pesticidas organofosforados. É descrito que estudos epidemiológicos, com agricultores como grupo ocupacional são muito gerais e limitados, não permitindo que se identifiquem os alvos de ação para cada agrotóxico, além da impossibilidade de se avaliar as alterações fisiológicas específicas para cada tipo de tecido.

Os mecanismos moleculares precisos pelos quais o Roundup® modifica a expressão e a atividade enzimática, bem como os envolvidos na indução de estresse oxidativo, não são conhecidos. Sendo assim, a investigação das alterações em diferentes rotas de sinalização em modelos animais de exposição a agrotóxicos pode ajudar a compreender os mecanismos envolvidos na fisiopatologia das disfunções celulares.

Nosso estudo investigou as ações da preparação comercial Roundup® sobre parâmetros bioquímicos em células neurais após exposição crônica (gestacional e pós-natal) e aguda (tratamento *in vitro*) ao agrotóxico, na tentativa de melhor compreender as alterações causadas por esta substância.

Os resultados deste estudo poderão contribuir para o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos processos de desenvolvimento de diversas patologias, incluindo doenças neurodegenerativas e neoplasias, potencialmente desencadeadas pela exposição crônica a pesticidas, que possam futuramente ser alvos de novas estratégias terapêuticas visando o controle ou monitoramento mais eficaz das disfunções celulares causadas por estas substâncias.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Investigar os mecanismos envolvidos na neurotoxicidade induzida pela exposição *in vivo* ou *in vitro* ao agrotóxico Roundup® sobre o hipocampo de ratos imaturos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito da exposição tanto *in vivo* quanto *in vitro* à formulação comercial Roundup®, contendo o herbicida glifosato, sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e a viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos imaturos;
- Investigar o efeito do Roundup® sobre a liberação e a captação do neurotransmissor excitatório glutamato;
- Estudar o envolvimento dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e dos CCDV-L nos mecanismos envolvidos na captação de Ca^{2+} e na atividade da γ -GT modulados pelo Roundup® em hipocampo de ratos imaturos;
- Avaliar o efeito da exposição aguda ou crônica ao Roundup® sobre o transporte de aminoácidos neutros, via sistema A (alanina, serina e glutamina), utilizando o aminoácido modelo ^{14}C -MeAIB;
- Investigar as consequências da exposição *in vivo* e *in vitro* ao Roundup® sobre a atividade da glutamina sintetase, da ALT, da AST, da G6PD e da γ -GT;
- Verificar o efeito do Roundup® sobre os níveis de TBARS e de GSH em hipocampo de ratos imaturos;
- Estudar o envolvimento de diferentes rotas de sinalização celular no mecanismo de toxicidade do Roundup® sobre o hipocampo de ratos imaturos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 AGROTÓXICOS

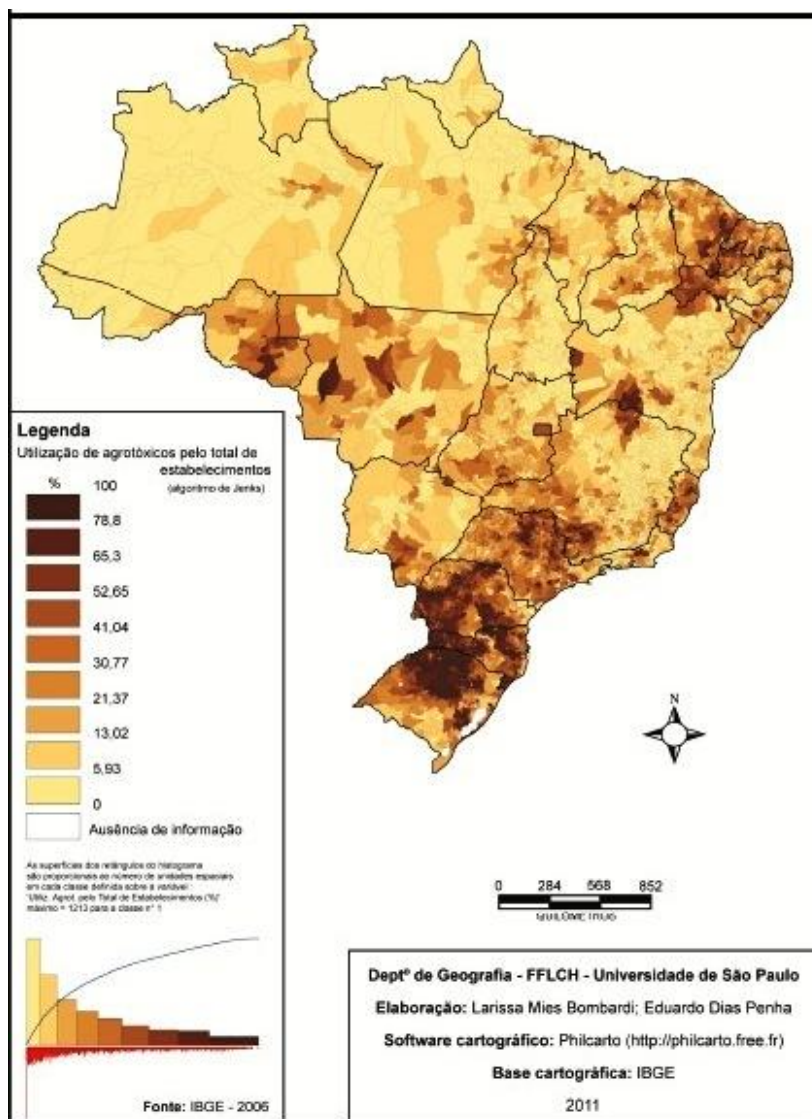
Os agrotóxicos constituem uma categoria heterogênea de produtos químicos projetados especificamente para o controle de pragas e sua aplicação constitui um meio eficaz para a elevação da produtividade agrícola mundialmente. Entretanto, o uso excessivo de agrotóxicos tem levado à contaminação dos recursos hídricos e, principalmente à do homem, tanto diretamente, como trabalhadores em estufas e na agricultura, quanto indiretamente, via consumo de alimentos. É provável que uma quantidade significativa destes pesticidas e seus metabólitos atinjam rios e estuários. A contaminação por agrotóxicos das águas superficiais provenientes de atividades industriais, agrícolas e domésticas já é um problema de importância mundial (AGRA; SANTOS, 2001; EL-SHENAWY, 2009; SALBEGO et al., 2010; EL-DEMERDASH, 2011).

A figura 1 representa a porcentagem de estabelecimentos rurais que utilizam agrotóxicos em cada município brasileiro, sendo possível perceber a grande concentração de uso nas regiões em que predomina o chamado agronegócio (municípios da região Sul e Centro Oeste), onde a soja e o milho tem papel central (BOMBARDI, 2011).

Em 2010, o Brasil utilizou cerca de 1 bilhão de litros de agrotóxicos, o que dá uma média de 5,08 L de agrotóxicos por brasileiro. Só no setor agrícola, cerca de 12 milhões de trabalhadores rurais são expostos diariamente aos agrotóxicos (ANVISA, 2011). Embora diversas condições de saúde sejam associadas à exposição a agrotóxicos, uma ligação clara entre esta exposição e os efeitos sobre a saúde humana permanece um grande desafio aos pesquisadores.

Desde 2008, o Brasil tornou-se o maior consumidor mundial de agrotóxicos e está entre os seis maiores importadores mundiais de agrotóxicos. Em 2010 o mercado mundial de agrotóxicos movimentou US\$ 51,2 bilhões e o brasileiro US\$ 7,3 bilhões. As vendas mundiais, entre 2000 e 2010, cresceram 93%, e as vendas brasileiras cresceram 190%, no mesmo período a área plantada aumentou 30% e a venda de agrotóxicos aumentou 190%. Esses dados demonstram a intensificação do uso do produto nas lavouras brasileiras, que estão usando cada vez mais agrotóxicos por hectare plantado (ANVISA, 2011).

Figura 1 – Mapa da utilização de agrotóxicos por municípios brasileiros.



Fonte: Adaptado de Bombardi (2011).

A toxicidade dos pesticidas vem sendo claramente relacionada com uma variedade de alterações nas funções fisiológicas, como as alterações bioquímicas resultando em estresse oxidativo, danos citogenéticos (TOPE et al., 2006; JIA; MISRA, 2007), alterações no sistema respiratório e hepático (KESAVACHANDRAN et al., 2006; SANTOS FILHO et al., 2005), além de uma importante correlação com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (WANG et al., 2006; PENG et al., 2007; HAYDEN et al., 2010). Tem sido descrito que os pesticidas estão associados tanto ao desenvolvimento quanto a progressão de doenças neurodegenerativas.

Recentes evidências relatam a atuação de alguns pesticidas como desreguladores endócrinos, contribuindo com vários efeitos adversos associados com a reprodução e o desenvolvimento. A exposição crônica a agrotóxicos também tem sido associada a sintomas psiquiátricos, incluindo transtornos afetivos, como depressão, ansiedade e comportamento agressivo, contribuindo assim para o risco de suicídio (FRANCO et al., 2010; PARRÓN et al., 2011).

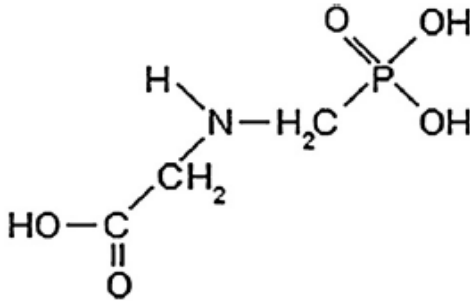
Pesticidas consistem de múltiplas classes e subclasses de componentes e são comumente classificados quanto ao organismo alvo (herbicidas, inseticidas, fungicidas) ou de acordo com sua classe química (organofosforados, triazina). Herbicidas são substâncias químicas fitotóxicas, utilizadas para destruição de várias ervas daninhas ou para inibir o seu crescimento. Eles tem diferentes graus de especificidade. Alguns, por exemplo, o paraquat, matam todas as plantas verdes, enquanto que os compostos fenóxi são específicos para determinado grupo de plantas. Os herbicidas representam cerca de 50% do total de agrotóxicos comercializados. Esse número se deve, em parte, às práticas de monocultura e a mecanização agrícola (GUPTA, 2004; GUPTA, 2007; FRANCO et al., 2010).

2.1.1 Herbicida Roundup®

O glifosato [N-(fosfonometil) glicina] é um herbicida pós-emergente, sistêmico, não seletivo, hidrossolúvel e de amplo espectro. É amplamente utilizado tanto em áreas agrícolas quanto urbanas em todo o mundo. Pertence a classe química dos organofosforados e geralmente é formulado com uma base orgânica, isopropilamina (IPA), onde se obtém um sal mais solúvel em água (BEURET; ZIRULNIK; GIMÉNEZ, 2005; EL-SHENAWY, 2009; SALBEGO et al., 2010; POLLEGIONI; SCHONBRUNN;

SIEHL, 2011; SRIBANDITMONGKOL et al., 2012). A estrutura química do glifosato está representada na figura 2.

Figura 2 – Estrutura do glifosato.



FONTE: Mesnage, Bernay e Séralini (2012).

Desenvolvido pela empresa Monsanto e introduzido na agricultura mundial em 1974, o glifosato é formulado comercialmente em Roundup® como seu sal de IPA. O Roundup® é comumente formulado com água a 2,13 M e um agente tensoativo (360 g de ácido/L livre ou 480 g/L de sal IPA). A proporção de glifosato para o agente tensoativo no Roundup® varia de acordo com o país no qual o produto é comercializado (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; EL-SHENAWY, 2009).

O surfactante predominante utilizado nos produtos Roundup® em todo o mundo é o polioxietilenoamina (POEA), o qual é uma mistura de alquilaminas de cadeias longas polietoxilado e sintetizado a partir de ácidos graxos derivados de animais. Este agente tensoativo não iônico favorece a penetração do glifosato na cutícula da planta, melhorando assim a sua efetividade. O POEA é 2 a 3 vezes mais tóxico do que o glifosato, e o produto formulado com este surfactante, como Roundup®, pode ser ainda mais tóxico que o herbicida isolado (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; MESNAGE; BERNAY; SÈRALINI, 2012; SRIBANDITMONGKOL et al., 2012).

A utilização crescente e desenfreada do agrotóxico Roundup® tende a aumentar ainda mais, considerando-se que a grande maioria das plantas geneticamente modificadas é tolerante a este herbicida. Em cultivos transgênicos resistentes ao glifosato (pós-emergentes), este pode ser aplicado em grande quantidade com o intuito de remover ervas daninha, sem causar danos às plantações. Este novo e “revolucionário”

padrão de uso do glifosato começou em 1996, com a introdução da soja transgênica resistente ao Roundup®, lançada e comercializada sob a marca Roundup Ready® nos EUA (ANADÓN et al., 2009; POLLEGIONI; SCHONBRUNN; SIEHL, 2011).

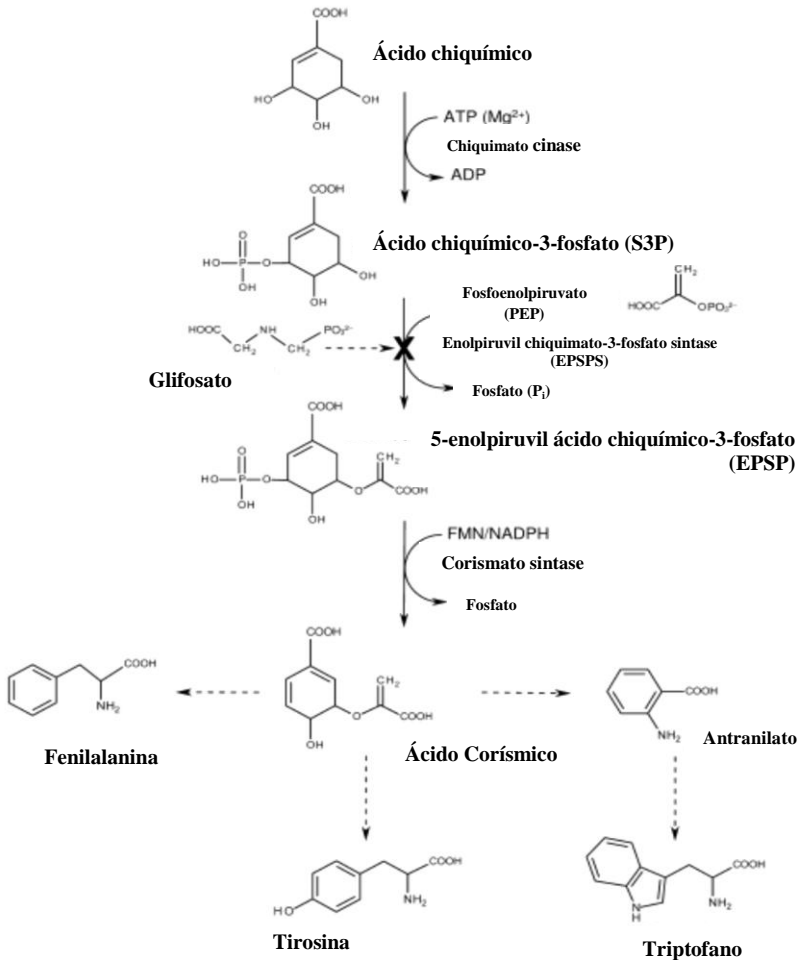
São descritas diferenças importantes na toxicidade das preparações comerciais em relação ao glifosato de grau analítico, que podem ser consequência de sinergismo entre os componentes da formulação do Roundup®. Peixoto (2005) descreveu toxicidade mitocondrial do Roundup®, sendo que esta toxicidade não foi reproduzida no tratamento com glifosato isolado. Martínez e colaboradores (2007) demonstraram citotoxicidade em células mononucleares humanas tanto após tratamento com Roundup® quanto com glifosato de grau analítico; porém, a preparação comercial foi significativamente mais tóxica, reforçando a hipótese de que a toxicidade deste agrotóxico deve-se provavelmente a um sinergismo entre o glifosato e os demais componentes da formulação. Mesnage, Bernay e Séralini (2012) demonstraram que o Roundup® e POEA são mais tóxicos do que o glifosato, por si só, em três tipos de linhagens celulares humanas: hepáticas, embrionárias e placentárias (HepG2, HEK293, JEG3, respectivamente). Acredita-se que os adjuvantes da formulação comercial promovam maior absorção celular do pesticida.

Cabe lembrar que o herbicida glifosato é promovido pelo fabricante como não apresentando risco para a saúde humana, com toxicidade aguda muito baixa em condições normais de utilização.

2.1.1.1 Mecanismo de Ação

O glifosato inibe o crescimento de plantas através da interferência com a produção de aminoácidos aromáticos essenciais. O glifosato inibe competitivamente uma enzima crítica da via do chiquimato, a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS). Esta enzima desempenha um papel fundamental na biossíntese do intermediário corismato, necessário para a síntese dos aminoácidos essenciais, fenilalanina, tirosina e triptofano. Consequentemente, ocorre redução na síntese de proteínas provocando o término do crescimento e, eventualmente, rompimento, e morte celular. Esta via de biossíntese de aminoácidos aromáticos (Figura 3) é encontrada em plantas, bem como fungos e bactérias, mas não em insetos, aves, peixes, mamíferos e seres humanos, proporcionando assim uma toxicidade específica e seletiva para espécies de plantas (GUPTA, 2007; ANADÓN et al., 2009).

Figura 3 - Mecanismo de ação do glifosato.



A via do chiquimato que leva a biossíntese de aminoácidos aromáticos, e o modo de ação do glifosato na reação catalisada pela EPSPS.

FONTE: Pollegioni, Schonbrunn e Siehl (2011).

2.1.2 Possíveis consequências da exposição ao Roundup® para a saúde

A exposição ao glifosato tem sido relacionada a alterações bioquímicas resultando em: estresse oxidativo (GEHIN; GUYON; NICOD, 2006; CATTANEO et al., 2011; LARSEN et al., 2012), danos citogenéticos (LUEKEN et al., 2004; MONROY et al., 2005; MAÑAS et al., 2009; CLAIR et al., 2012; KOLLER et al., 2012), alterações no ciclo celular (MARC et al., 2002, 2003; MARC; MULNER-LORILLON; BELLÉ, 2004), correlação com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (BARBOSA et al., 2001; ANADÓN et al., 2008; GUI et al., 2012), desregulação endócrina (WALSH et al., 2000; RICHARD et al., 2005; BENACHOUR et al., 2007; GASNIER et al., 2009; ROMANO; ROMANO; OLIVEIRA, 2009; ROMANO et al., 2012), alterações na cadeia transportadora de elétrons (PEIXOTO, 2005), na integridade do citoesqueleto (HEDBERG; WALLIN, 2010), entre outras.

Os pesticidas são amplamente difundidos no ambiente e o impacto do uso excessivo dessas substâncias para os indivíduos expostos de forma aguda ou crônica ainda é pouco conhecido. O efeito de doses baixas dos pesticidas bentazon, metalaxil e glifosato sobre o metabolismo celular de glutatona e cisteína foi avaliado em culturas de células HeLa e de hepatoma. Nenhum efeito foi observado quando as células foram expostas a bentazon ou metalaxil. No entanto, o tratamento com glifosato causou alterações significativas na concentração intra e extracelular da cisteína, um aminoácido precursor para a síntese de glutatona (HULTBERG, 2007). Além disso, Elie-Caille et al. (2010) demonstraram que a exposição a 50 mM de glifosato por 30 minutos induz alterações morfológicas em células epiteliais humanas (linhagem HaCaT), comprometendo a adesão celular, levando a desorganização do citoesqueleto e condensação da cromatina. Estes eventos estão associados à indução de apoptose pelo pesticida.

Menezes et al. (2011) demonstraram indução de estresse oxidativo em peixes após 8 dias de exposição ao Roundup®. Foi observado o aumento nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos tecidos hepático, muscular e no cérebro. Além disso, no fígado a exposição ao herbicida também aumentou os níveis de proteína carbonilada e diminuiu a atividade da glutatona S-transferase (GST). Posteriormente, os peixes foram mantidos por mais 8 dias em água sem o pesticida com o intuito de verificar a possível reversão nos parâmetros oxidativos. Os dados mostraram que a carbonilação de proteínas pode ser revertida, no entanto, a atividade da

GST foi induzida após o período de recuperação, possivelmente indicando uma resposta compensatória contra as condições tóxicas. Em contraste, as atividades da Catalase (CAT) e Superóxido dismutase (SOD), que não estavam alteradas anteriormente, diminuíram durante o período de recuperação, indicando toxicidade ao herbicida.

Dallegrave e colaboradores (2007) demonstraram o efeito da exposição ao Roundup® durante a gestação e lactação em ratas fêmeas e sua prole. Os resultados demonstraram que o Roundup® não induz toxicidade materna, entretanto, afeta a função reprodutiva dos filhotes machos causando diminuição do número e da produção de espermatozóides por dia na fase adulta, aumento da proporção de espermatozóides anormais e diminuição do nível de testosterona na puberdade. Na prole feminina observou-se um atraso na abertura do canal vaginal. A partir destes achados, os pesquisadores sugerem que a exposição no útero e durante o período lactacional ao Roundup® pode induzir efeitos adversos significativos sobre o sistema reprodutor de ratos machos durante a puberdade e na idade adulta.

Romano e colaboradores (2010) demonstram que a formulação comercial de glifosato atua como um desregulador endócrino causando diminuição dos níveis de testosterona e alterações na morfologia testicular, afetando conseqüentemente a progressão da puberdade. A toxicidade do Roundup® sobre o sistema reprodutivo também está relacionada com a inibição da proteína regulatória aguda da esteroidogênese (StAR) (WALSH; KURATKO; STOCCO, 2000) e da enzima aromatase (RICHARD et al., 2005), o que conseqüentemente leva a redução nos níveis de testosterona e estradiol.

Os efeitos tóxicos de concentrações subletais de glifosato puro foram testados em peixes *Cnesterodon decemmaculatus*. A sobrevivência dos peixes foi de 100%, mesmo na maior concentração testada, em conformidade com a baixa toxicidade letal relatada para o glifosato. No entanto, um efeito inibidor significativo sobre a atividade da acetilcolinesterase foi observado, mesmo com a menor concentração de herbicida testada. Estes resultados indicam que a acetilcolinesterase é um biomarcador de neurotoxicidade induzida por glifosato em *Cnesterodon decemmaculatus* (MENÉNDEZ-HELMAN et al., 2012), apesar deste herbicida não inibir a colinesterase plasmática em humanos.

No estudo de Mladinic et al. (2009) foram avaliados o potencial genotóxico e oxidativo do glifosato em linfócitos humanos, utilizando concentrações encontradas na exposição residencial e ocupacional a este herbicida. Uma vez que não foram observados efeitos dependentes de dose, os autores sugerem que o glifosato em concentrações relevantes

para a exposição humana não representaria riscos significativos para a saúde. Entretanto Guilherme e colaboradores (2012) demonstraram propriedades genotóxicas de Roundup® em guelras e células de fígado de peixes *Anguilla anguilla* após exposição a concentrações deste encontradas ambientalmente.

Hedberg e Wallin (2010) estudaram os efeitos do Roundup®, do glifosato e do sal de isopropilamina no transporte intracelular de *Xenopus laevis* e demonstraram que esses compostos inibem o transporte intracelular através da desintegração do citoesqueleto, possivelmente interferindo o equilíbrio de Ca^{2+} intracelular. Um estudo do efeito de uma formulação comercial de glifosato sobre a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células 3T3-L1 demonstraram que o pesticida inibiu a proliferação e a diferenciação nesta linhagem de células de mamíferos e induziu a apoptose, sugerindo danos celulares (MARTINI; GABRIELLI; VILA, 2012).

Gehin, Guyon e Nicod (2006) demonstraram que o glifosato sozinho ou incluído na formulação comercial Roundup®3plus, induziu alterações significativas na capacidade antioxidante celular, causando depleção dos níveis de glutathiona, alteração na atividade das enzimas antioxidantes CAT, glutathiona-peroxidase (GPx) e SOD, assim como aumento da peroxidação lipídica em linhagem de células epiteliais humanas, HaCaT. Os autores também relataram que a suplementação com vitamina C ou vitamina E aumentou a atividade das enzimas SOD, glutathiona-redutase (GR) e GPx, assim como reduziu a peroxidação lipídica.

Benachour e Séralini (2009) avaliaram a toxicidade de quatro herbicidas à base de glifosato em três diferentes tipos de células - células endoteliais da veia do cordão umbilical (HUVEC), células 293 provenientes de rins embrionários e linhagem celular placentária JEG3. Foi utilizada a diluição correspondente aos níveis residuais do pesticida encontrados na alimentação humana ou animal, muito inferior àquela recomendada para o uso na agricultura. Foram comparadas as formulações comerciais com o glifosato sozinho e com o seu principal metabolito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), assim como com o adjuvante POEA. Todas as formulações de Roundup® causaram morte celular após 24 h de exposição. Os mecanismos envolveram inibição da atividade da succinato desidrogenase mitocondrial, dano de membrana com liberação de adenilato cinase citosólica e necrose. As preparações de Roundup® também induziram a apoptose através da ativação das caspases 3/7, fragmentação de DNA, encolhimento nuclear (picnose) e fragmentação nuclear (cariorrexe). A presença do adjuvante POEA

interfere na permeabilidade da membrana celular aumentando a toxicidade do glifosato. Este trabalho confirma a toxicidade dos adjuvantes presentes nas formulações Roundup®.

Intoxicações agudas após a ingestão de glifosato podem ocorrer acidentalmente ou em tentativas de suicídio. Apesar da baixa toxicidade desse herbicida, casos de morte e consequências graves à saúde humana tem sido relatados. Em 13 casos de intoxicação ao glifosato estudados por Zouaoui e colaboradores (2013), no período de 2002 a 2009, os sintomas mais comuns observados foram ulceração orofaríngea, náuseas e vômitos. Os principais parâmetros alterados foram alta taxa de lactato e acidose. Também foram observados desconforto respiratório, arritmia cardíaca, insuficiência renal, toxicidade hepática e alteração de consciência. Nos casos que resultaram em morte, os sintomas mais comuns foram: choque cardiovascular, parada cardiorrespiratória, alterações na hemodinâmica, coagulação intravascular disseminada e falência múltipla de órgãos.

Sribanditmongkol et al. (2012), demonstraram um caso de fatalidade ocasionado pela ingestão oral de Roundup®. Eles determinaram as concentrações letais de glifosato no sangue (3,05 mg/mL), e observaram efeitos tóxicos relacionados à ingestão do agrotóxico no trato gastrointestinal, nos pulmões e no fígado, concluindo que a ingestão de doses elevadas de Roundup® é altamente tóxica para os seres humanos e pode ser fatal. Malhotra e colaboradores (2010) relataram o desenvolvimento de uma encefalopatia reversível em um homem de 71 anos após tentativa de suicídio com Roundup®, sugerindo toxicidade aguda no Sistema Nervoso Central (SNC). Além disso, também foi relatado o desenvolvimento de parkinsonismo em uma mulher cronicamente exposta ao glifosato (WANG et al., 2011). A mulher apresentou lentidão, tremores e rigidez dos membros, porém, sem prejuízo da memória de curto prazo.

Apesar dos relatos sobre alterações na consciência, desenvolvimento de processos neurodegenerativos e de encefalopatias como consequência da ingestão ao Roundup®, dados a respeito da toxicidade deste herbicida sobre o SNC ainda são escassos e inconclusivos.

2.2 SISTEMA NERVOSO CENTRAL: NOÇÕES BÁSICAS

No sistema nervoso central (SNC) podem ser encontrados diferentes tipos celulares, dentre estes podemos destacar os neurônios,

as células gliais, entre outros. Essas células exibem uma diversidade extraordinária quanto à forma, tamanho e número de interações entre si e com outras células. O neurônio é a célula mais polimórfica do corpo e sua classificação formal é feita com base em seu formato, localização, função, estrutura e substâncias de transmissão (BRADY et al., 2012).

Para diferentes tipos de neurônios pode haver desde algumas poucas centenas até cerca de 200.000 conexões sinápticas aferentes. As estruturas sinápticas são diversas na morfologia e função. Algumas são polarizadas ou assimétricas. Os terminais pré-sinápticos clássicos de uma sinapse química contêm uma coleção de vesículas sinápticas. A morfologia das vesículas sinápticas no terminal pode exibir sutis diferenças dependendo da liberação do neurotransmissor. Alternativamente, os tipos fisiológicos das sinapses se definem em três grupos: excitatório, inibitório e modulatório (BRADY et al., 2012).

O sistema nervoso adulto é geralmente descrito como um dos sistemas mais bem protegidos do corpo. É física e quimicamente protegido por estar envolvido em osso e pela barreira hematoencefálica, o que impede a passagem aleatória de muitos agentes tóxicos para o cérebro, o que não é observado no vulnerável SNC em desenvolvimento (RODIER, 1995; BONDY; CAMPBELL, 2005).

A maturação do cérebro humano é um processo prolongado e as consequências de uma exposição inicial aos agentes químicos que são especificamente prejudiciais para o cérebro (agentes neurotóxicos) podem ser muito sutis e se tornarem evidentes apenas após um longo período de tempo. Interrupção do desenvolvimento neural, durante os períodos iniciais da gestação, pode resultar em anormalidades severas no cérebro e na medula espinhal (RICE; BARONE, 2000; BONDY; CAMPBELL, 2005).

No início da segunda semana de gestação em roedores e no primeiro mês de gestação em seres humanos, áreas específicas do SNC começam a se formar com a neurogênese e migração das células do prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Segue-se uma sequência de processos de desenvolvimento, incluindo a proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, apoptose e mielinização. Em muitas estruturas do SNC, a produção de células cria um número excessivo de neurônios, e o período de proliferação é seguido por uma onda de morte celular que estabelece o número final adequado de neurônios. A maior parte da migração ocorre no início da gestação, quando as distâncias dentro do cérebro são pequenas. As migrações longas de pequenas células do córtex cerebelar, hipocampo e cerebelo continuam durante

vários meses após o nascimento (RODIER, 1995; BONDY; CAMPBELL, 2005).

O cérebro humano tem um longo período de maturação pós-natal, e muitos eventos do desenvolvimento, tais como a mielinização, não estão totalmente completos até a adolescência. Isto prolonga a oportunidade para que agentes neurotóxicos afetem de maneira sutil, mas permanente, o funcionamento integral do sistema nervoso adulto (BONDY; CAMPBELL, 2005). Em geral, se a exposição a agentes neurotóxicos ocorre antes ou depois do desenvolvimento de um órgão, este é menos vulnerável às perturbações do que se a exposição ocorreu durante o desenvolvimento do mesmo (RICE; BARONE, 2000).

Durante o primeiro trimestre da gestação o embrião apresenta uma taxa de proliferação elevada, o que o torna mais susceptível a agentes neurotóxicos, como os antimitóticos utilizados na terapia do câncer. Na segunda fase da gestação é quando se inicia a organogênese. No caso do sistema nervoso, isso envolve o estabelecimento irrevogável de vias neurais. Como a barreira hematoencefálica ainda não esta formada, agentes nocivos, como metais (chumbo e mercúrio) e drogas de abuso (fenciclidina) tem um acesso facilitado ao cérebro imaturo. Todos os órgãos do sistema são largamente desenvolvidos na fase final da gestação, no entanto a barreira hematoencefálica ainda não esta formada, com isso, insultos tóxico para o cérebro nesta fase não levam a uma anormalidade anatômica grave, mas podem levar a déficits comportamentais potencialmente permanentes (BONDY; CAMPBELL, 2005).

Ao longo da vida, há uma diminuição no número de células em certas regiões do cérebro, bem como uma diminuição nos níveis de neurotransmissores e de mecanismos de reparação. Se este processo for acelerado pela exposição crônica a neurotóxicos, o efeito observado neste indivíduo será uma diminuição adicional na capacidade funcional do que o tipicamente observado durante o envelhecimento. Um insulto durante o desenvolvimento pode ser manifestado em um momento muito distantes do período quando a exposição ocorreu (RICE; BARONE, 2000).

Exposição gestacional a neurotoxinas, mesmo em baixas concentrações, no SNC em desenvolvimento, pode lesionar áreas do cérebro como o córtex pré-frontal e o hipocampo, causando prejuízos em funções cognitivas, tais como a discriminação espacial e a memória (AINGE et al., 2007; MOGENSEN et al., 2007, CHEN et al., 2012).

2.2.1 Hipocampo

A formação hipocampal é um dos sistemas neuronais mais estudados no cérebro e está implicada num número cada vez maior de doenças. Caracterizações mais específicas da função do hipocampo, com base em dados experimentais de animais e seres humanos, como por exemplo, estudos de neuroimagem tem, entre outras observações, implicado na formação do hipocampo na doença de Alzheimer, epilepsia do lobo temporal, envelhecimento cognitivo, amnésia, esquizofrenia e transtornos depressivos e de ansiedade (BIRD; BURGESS, 2008; SMALL et al., 2011).

Speed et al. (2012) relataram que exposições repetidas ao pesticida clorpirifós (CPF) (5 mg/kg, durante 5 dias) resultaram em uma progressão bifásica de disfunção sináptica no hipocampo de ratos adultos. Os autores descreveram que uma semana após o tratamento, foi verificado um aumento da transmissão sináptica na região CA3-CA1 do hipocampo dos ratos tratados com o inseticida quando comparados ao grupo controle. Em contraste, três meses após a administração do CPF, observou-se uma redução de 50% na transmissão sináptica.

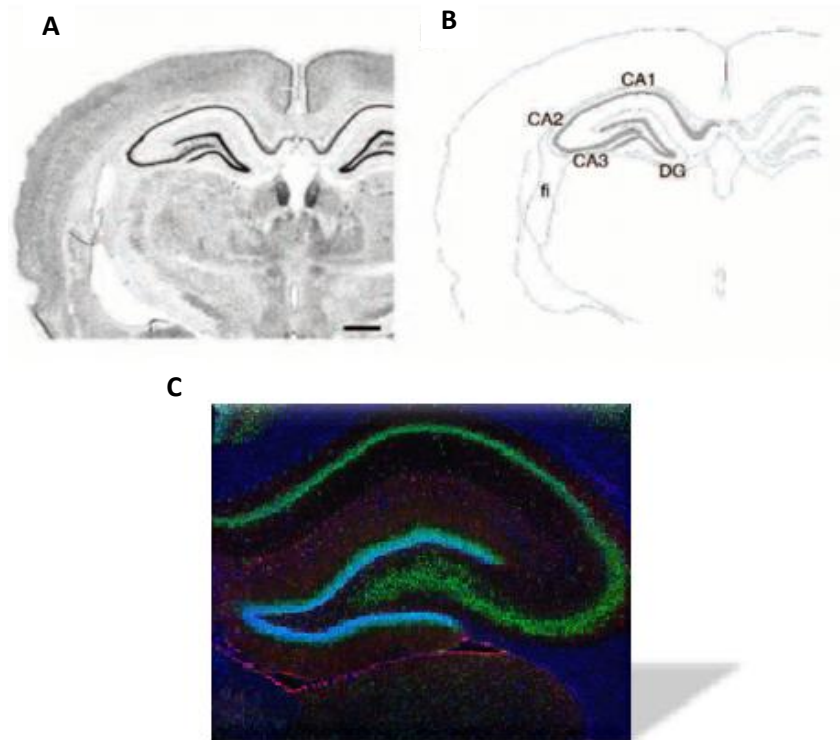
O hipocampo (Figura 4) pertence ao sistema límbico e desempenha um papel importante na consolidação de informações de memória de curto prazo a memória de longo prazo, aprendizagem e orientação espacial (BEST; WHITE, 1999; AMARAL; LAVENEX, 2007; HOU; YANG; YUAN, 2013). Está intimamente associado ao córtex cerebral e, em humanos está incorporado no corno temporal e em ratos e coelho encontra-se abaixo do neocórtex temporal e parietal. Os seres humanos e outros mamíferos possuem dois hipocampos, um em cada hemisfério cerebral (BRADY et al., 2012; HOU; YANG; YUAN, 2013).

A formação do hipocampo resulta do dobramento morfogênético da zona proliferativa medial da placa cortical para formar o subiculum, os campos de células piramidais, e, subsequentemente, o giro denteado (RICE; BARONE, 2000). O giro denteado é constituído por células granulares, e é uma das principais regiões do cérebro, pois possui a capacidade, ao longo da vida de formação de novos neurónios em mamíferos. No plano coronal, o hipocampo pode ser dividido em *Cornu ammonis* (corno de Ammon) 1-3 (CA1-CA3) (MOSER; MOSER, 1998; HOU; YANG; YUAN, 2013).

O hipocampo pode ser pensado como um conjunto de estruturas separadas com uma zona rostral/dorsal e uma zona caudal/ventral (FANSELOW; DONG, 2010). O hipocampo dorsal ou o hipocampo posterior em primatas está envolvido em funções cognitivas, enquanto o

hipocampo ventral ou hipocampo anterior em primatas está relacionado com a resposta ao estresse, regulação da emoção e expressão de afeto (FUSTER-MATANZO et al., 2011; HOU; YANG; YUAN, 2013).

Figura 4 - Hipocampo de rato.



Seção com coloração de Nissl (A) e desenho de linha (B) ilustrando as sub-regiões do hipocampo dorsal no plano coronal do cérebro de rato. FONTE: Amaral, Lavenex (2007).

Fotomicrografia de fluorescência do hipocampo de rato (C). Região em azul representando o Giro dentado e região em verde representando CA3 e CA1. FONTE: Melvin (2007).

No hipocampo, as conexões neuronais são altamente ordenadas. O esquema de ligações do hipocampo é tradicionalmente apresentado como um loop tri-sináptico, entre o giro dentado, CA3 e CA1. Axônio dos neurônios no córtex entorrinal entra no giro dentado como um caminho perfurante (assim chamado porque atravessa as fissuras do

hipocampo e perfura o giro denteado). Estes axônios formam as sinapses glutamatérgicas com células granulares do giro denteado (AMARAL; LAVENEX, 2007; BRADY et al., 2012).

2.3 GLUTAMATO

O glutamato é o principal mediador da transmissão sináptica excitatória no cérebro de mamíferos, e excita praticamente todos os neurônios. Participa de uma grande variedade de processos fisiológicos, desempenhando um importante papel na plasticidade sináptica, aprendizagem e memória; atuando também como mediador de informações sensoriais, coordenação motora e emoções (DANBOLT, 2001; SANACORA et al., 2008; BRADY et al., 2012); bem como em condições patológicas, tais como: a epilepsia, isquemia cerebral, esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esquizofrenia (KOGA et al., 2011).

Este aminoácido também produz mudanças de longa duração na excitabilidade neuronal, como por exemplo, o aparecimento de potenciação de longo prazo (LTP) da transmissão sináptica em neurônios do hipocampo e córtex visual e depressão em longo prazo (LTD) no cerebelo e córtex visual; além de sua função como um transmissor sináptico de atuação rápida, é, também, precursor para o GABA (ácido γ -aminobutírico) em neurônios GABAérgicos e para glutamina em células gliais; constituinte de proteínas e peptídeos, ex. glutatona (γ -glutamil-cisteil-glicina), a qual é o maior agente de defesa contra estresse oxidativo nas células (MICHAELIS, 1998; DANBOLT, 2001; BRADY et al., 2012).

Aproximadamente 80 a 90% das sinapses do hipocampo são glutamatérgicas e a repolarização de membranas que são despolarizadas durante atividade glutamatérgica pode ser responsável por até 80% da energia gasta pelo cérebro. A taxa metabólica cerebral de glicose em cérebro humano é aproximadamente 0,4 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tecido e o turnover do glutamato é de aproximadamente 0,8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tecido. Isto implica que grande parte da glicose que entra no cérebro pode ser metabolizada até glutamato. No cérebro de rato o *turnover* do glutamato é aproximadamente duas vezes o do cérebro humano (DANBOLT, 2001; BRADY et al., 2012).

Os neurônios contêm cerca de 5 mM de glutamato no seu citoplasma, ao passo que as concentrações nos astrócitos são de certo modo baixas, cerca de 2-3 mM. A menor concentração de glutamato em astrócitos é atribuída à presença da enzima glutamina sintetase, que

converte o glutamato em glutamina como parte da reciclagem de glutamato liberado sinápticamente (NEDERGAARD; TAKANO; HANSEN, 2002).

O glutamato desempenha um papel importante na diferenciação, migração e sobrevivência neuronal no SNC em desenvolvimento, principalmente por facilitar a entrada de Ca^{2+} . Sabe-se que o bloqueio de receptores NMDA, durante o período pré-natal pode induzir a apoptose destes neurônios (HACK; BALÁZS, 1994; YANO et al., 1998; IKONOMIDOU et al., 1999; MELDRUM, 2000).

Durante o desenvolvimento do SNC, o glutamato extrassináptico tem sido implicado na regulação da diferenciação precoce de neurônios na zona ventricular e pode modular a migração neuronal. Pensa-se que em fases posteriores de desenvolvimento do SNC, “potenciais despolarizantes gigantes” (GDPs) do hipocampo são mediados, pelo menos em parte, pelo glutamato extrassináptico (BLANKENSHIP; FELLER, 2010).

2.3.1 Receptores glutamatérgicos

Existem dois subtipos principais de receptores glutamatérgicos no SNC: receptores ionotrópicos, que são canais iônicos cuja abertura é favorecida (apesar do estado fechado) quando glutamato liga-se ao receptor; e receptores metabotrópicos (mGluRs), os quais são receptores acoplados à proteína G e conduzem fluxo de íons (SANACORA et al., 2008; BRADY et al., 2012).

Tanto os receptores ionotrópicos quanto os metabotrópicos estão ligados a vários mensageiros intracelulares, tais como Ca^{2+} , AMP cíclico, espécies reativas de oxigênio (EROs), e iniciam várias cascatas de sinalização, as quais podem determinar o crescimento, diferenciação e sobrevivência neuronal (MICHAELIS, 1998).

Os receptores metabotrópicos podem ser organizados em três subgrupos, com base nas vias de transdução de sinal que ativam: os do Grupo I (mGluR1a-d, mGluR5a,b) atuam principalmente através da fosfolipase C β e da ativação de sistemas de segundo mensageiros do trifosfato de inositol e diacilglicerol; e os receptores do Grupo II (mGluR2 e mGluR3) e do grupo III (mGluR4, mGluR6-8) estão acoplados negativamente a adenilato ciclase (PLATT, 2007; SANACORA et al., 2008).

Os receptores ionotrópicos são classificados em 3 sub-grupos:

- Receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico): são largamente expressos através do SNC e

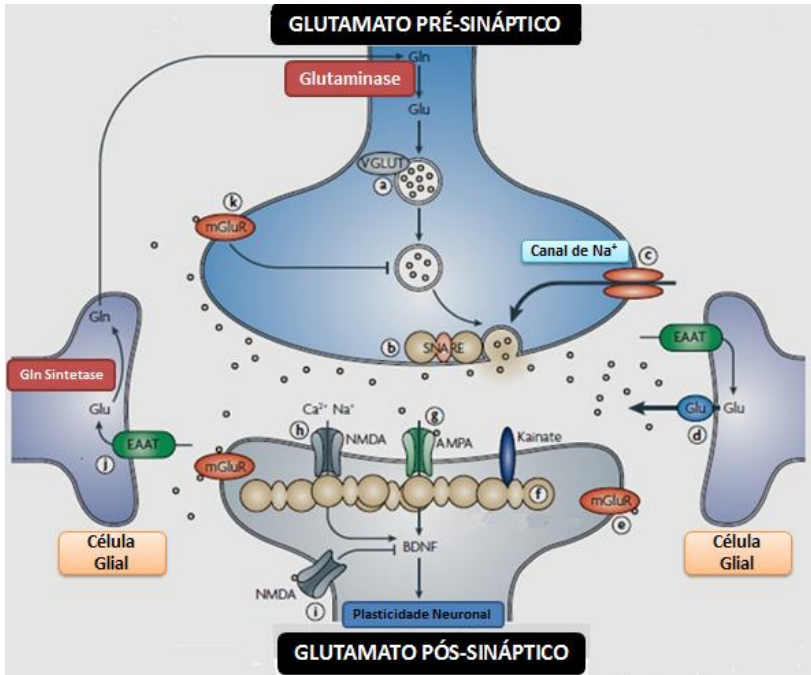
servem como receptor para transmissão sináptica excitatória rápida mediada por glutamato. Também são responsáveis pela reação inicial do glutamato na sinapse. As subunidades do receptor AMPA são GluA1-GluA4 (PLATT, 2007; SANACORA et al., 2008; BRADY et al., 2012);

- Receptores Cainato (KA): As subunidades do receptor cainato são GluK1-GluK5 (BRADY et al., 2012).

- Receptores NMDA (N-metil-D-aspartato): possuem múltiplos sítios regulatórios. Três famílias de subunidades dos receptores NMDA foram identificadas: GluN1; GluN2A-GluN2D; GluN3A-GluN3B. São normalmente bloqueados em condições de repouso pelos efeitos de obstrução de íons Mg^{2+} , o qual exerce um bloqueio de voltagem dependente na abertura do canal iônico. Outro importante inibidor alostérico endógeno do receptor NMDA é o próton H^+ . No entanto, uma vez que a membrana envolvente é despolarizada, estes receptores podem ser ativados pela ligação conjunta de duas moléculas de glutamato e duas moléculas de glicina. Como nem a glicina ou o glutamato agem sozinhos para abrir este canal iônico, eles são referidos como co-agonistas de receptores NMDA. A ativação de receptores NMDA produz excitação ao longo de períodos de tempo mais longos que os demais receptores ionotrópicos para glutamato (DANBOLT, 2001; SANACORA et al., 2008; BRADY et al., 2012).

Em um potencial de membrana mais negativo (hiperpolarizado) que 50 mV, a concentração de Mg^{2+} no fluido extracelular do cérebro é suficiente para praticamente abolir o influxo de íons através do receptor NMDA, mesmo na presença dos co-agonistas glutamato e glicina. Assim que o potencial de membrana ficar menos negativo ou mesmo positivo, a afinidade do Mg^{2+} por seu sítio de ligação decresce e o bloqueio torna-se inefetivo. O alívio do bloqueio do Mg^{2+} vem quando o sítio pós-sináptico é suficientemente despolarizado pela repetitiva ativação do canal de AMPA, o qual causa influxo de Na^+ e o consequente potencial pós-sináptico excitatório (EPSP). Então, a abertura do receptor NMDA é tanto dependente do ligante (liberação e ligação do glutamato) quanto de voltagem (despolarização de neurônios pós-sinápticos) (BRADY et al., 2012). O sistema de neurotransmissão glutamatérgica está representado esquematicamente na figura 5.

Figura 5 - Neurotransmissão glutamatérgica.



Glutamina (Gln) é convertida a glutamato (Glu) pela ação da glutaminase. Glu é empacotado em vesículas pré-sinápticas pelos transportadores Glu vesiculares (VGLUTs) e liberados pelo neurônio de uma forma dependente de atividade através de interações com proteínas SNAREs. Glu é retirado do espaço extracelular através dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) presentes predominantemente em células gliais. Em células gliais Glu é convertido a Gln pela Gln sintetase. Vários receptores glutamatérgicos estão presentes em neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos, bem como sobre as células gliais. Estes incluem os receptores ionotrópicos - AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico), NMDA (N-metil-D-aspartato), e receptores de cainato - bem como receptores metabotrópicos (mGluRs). FONTE: Sanacora et al. (2008).

2.3.2 Metabolismo glutamato – Interações entre astrócitos e neurônios

Múltiplos níveis de regulação evoluíram para assegurar que a excitação glutamatérgica seja mantida dentro de limites estreitos, os quais proporcionam uma função neuronal ótima e evitam uma

sobreativação do sistema, que pode causar excitotoxicidade. Um fator crucial na manutenção da homeostase do glutamato é o equilíbrio entre a liberação e eliminação de glutamato (SANACORA et al., 2008; KALIVAS, 2009).

As informações básicas sobre a síntese, liberação e ação do glutamato em neurônios do sistema nervoso de vertebrados e invertebrados já foi apresentada e amplamente discutida em diversos estudos (MICHAELIS, 1998).

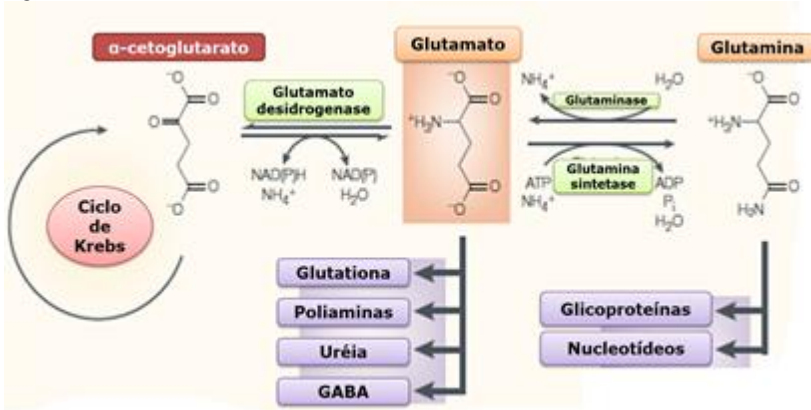
A barreira hematoencefálica (BHE), essencialmente, impede a entrada de glutamato derivado do sangue (plasma) no SNC. Deste modo, uma grande proporção de glutamato do cérebro é sintetizada a partir da glicose plasmática, que entra no cérebro por meio de uma família de moléculas transportadoras de glicose (GLUT) presente nas células endoteliais, astrócitos, neurônios, e, possivelmente, outras células no cérebro. Glicose entra primeiro no compartimento de astrócitos do cérebro e, ou é convertida em glicogênio através da reação da glicogênio sintase ou a piruvato via glicólise. Algumas moléculas de piruvato são convertidas em lactato pela lactato desidrogenase (LDH). E outras entram no ciclo de Krebs como acetil-coenzima A via piruvato desidrogenase. O intermediário do ciclo de Krebs, o α -cetoglutarato, em seguida, dá origem ao glutamato através de uma reação que requer NAD^+ e é catalisada pela glutamato desidrogenase (GDH). Além disso, o glutamato também pode ser gerado a partir de α -cetoglutarato por reações de transaminação. O glutamato também pode ser reciclado através do ciclo glutamato/glutamina (amidação de glutamato a glutamina pela enzima glutamina sintetase), via metabólica quantitativamente predominante nos astrócitos (PALMADA; CENTELLES, 1998; NEDERGAARD; TAKANO; HANSEN, 2002; SANACORA et al., 2008; COULTER; EID, 2012).

A figura 6 apresenta alguns aspectos do metabolismo do glutamato no SNC. Em neurônios, o glutamato é concentrado nas vesículas sinápticas através de transportadores de glutamato vesiculares (VGLUTs) e liberado para o espaço extracelular de uma forma Ca^{2+} -dependente na fenda sináptica (DANBOLT, 2001; COULTER; EID, 2012).

É importante notar que a síntese de glutamato a partir de glicose ou lactato, com subsequente liberação de glutamato das células irá esgotar os intermediários do ciclo de Krebs. Reconstituição dos intermediários deste ciclo, ou seja, anaplerose é, portanto, necessária para a síntese contínua de ATP. Somente os astrócitos são capazes de anaplerose devido à sua expressão preferencial da enzima piruvato carboxilase (PC), que converte piruvato em oxaloacetato. Já que a PC

não está presente em neurônios, estas células são incapazes de anaplerose e, por conseguinte, extremamente dependente dos astrócitos para prover intermediários para a síntese do glutamato (COULTER; EID, 2012).

Figura 6 - Glutamato como um metabólito chave.



O nitrogênio é necessário para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, e o glutamato e a glutamina são fundamentais neste processo. Transaminação de α -cetoglutarato, um intermediário no ciclo de Krebs, produz o glutamato, enquanto que a glutamina é sintetizada pela incorporação de um íon amônio ao glutamato. As duas enzimas que catalisam estas reações – glutamato desidrogenase e glutamina sintetase – estão presentes em quase todas as formas de vida. Glutamato e glutamina contribuem com o nitrogênio para a produção de várias moléculas importantes, incluindo a glutationa e poliaminas. GABA, ácido γ -aminobutírico. FONTE: Nedergaard, Takano e Hansen (2002).

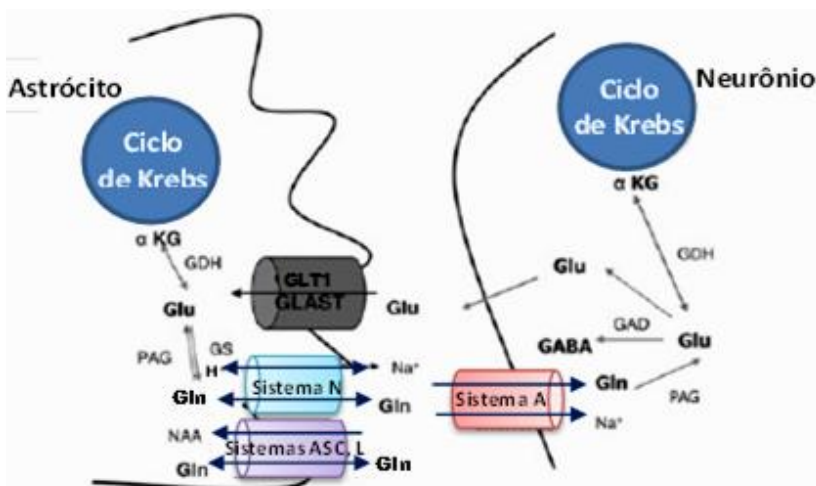
2.3.2.1 Transporte de aminoácidos

A disponibilidade de aminoácidos para a síntese proteica, neurotransmissores, glutationa (GSH), assim como para o metabolismo celular se dá através de diferentes sistemas de transporte de aminoácidos. O transporte de aminoácidos no SNC é complexo e mediado por difusão facilitada e por transporte dependente de Na^+ . Os transportadores dependentes de Na^+ são: família de transportadores de aminoácidos neutros - sistema A (Alanina), ASC (alanina, serina, cisteína), N (glutamina, asparagina, histidina) - assim como a família dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT, aspartato e

glutamato) (NORMAN; MANN, 1988; NAGARAJA; BROOKES, 1996; BRADY et al., 2012).

Aminoácidos neutros participam do metabolismo energético e do anabolismo influenciando a função e a sobrevivência neuronal no SNC. Por exemplo, a L-glutamina é uma moeda de energia neuronal importante derivada de astrócitos, L-serina é um elemento crucial para a síntese de esfingolípido neuronal, e L-cisteína é um regulador crítico para os níveis de glutathiona neuronais. A família de transportadores de aminoácidos neutros dependentes de Na^+ (A, ASC e N) e o sistema de transporte independente de Na^+ específico para leucina (L), são os principais transportadores de aminoácidos neutros, como a glutamina (GLIDDON et al., 2009). Na Figura 7 podemos ver o transporte de glutamina através dos diferentes sistemas de transporte.

Figura 7 - Representação esquemática do transporte e ciclo glutamato/glutamina entre astrócitos e neurônios.



Glu liberado a partir de terminais pré-sinápticos é transportado para os astrócitos via transportadores Glu (GLAST e GLT-1), onde é convertido a Gln pela GS. Por sua vez, os transportadores Gln medeiam a sua liberação para o espaço extracelular, e a sua transferência para os neurônios, onde Glu é regenerado via glutaminase. Glu pode ser subsequentemente convertido em GABA via descarboxilação por GAD. Tanto em astrócitos quanto em neurônios uma parte do Glu é utilizado para a síntese de α -cetoglutarato, um substrato do ciclo de Krebs, por desaminação oxidativa mediada pela glutamato desidrogenase. FONTE: Albrecht et al. (2011).

A principal direção do fluxo de glutamina é a partir dos astrócitos, onde ocorre a sua síntese, para os neurônios, onde é convertido ao neurotransmissor aminoácido L-glutamato e GABA. O estudo com células cultivadas *in vitro* tem demonstrado que o transporte de glutamina em astrócitos e neurônios envolve principalmente os três sistemas dependentes de sódio (A, ASC e N). Efluxo de glutamina em cultura de astrócitos de ratos parece ser efetuada por ASCT2, uma isoforma do sistema ASC, fortemente expresso nestas células, enquanto que os sistemas A e N medeiam à captação de glutamina tanto para os astrócitos quanto para os neurônios (DOLINSKA et al., 2004).

O sistema A de transportadores é distinguido dos demais sistemas de transporte de aminoácidos (L, ASC e N) pela sua propriedade de ser regulado por uma variedade de condições ambientais e pela sua capacidade de transportar substratos N-metilados como o aminoácido metil aminoisobutírico (MeAIB), um análogo não metabolizável da alanina e amplamente utilizado para o estudo destes sistemas (ARMANO et al., 2002).

2.3.2.1.1 *Ciclo Glutamato-Glutamina*

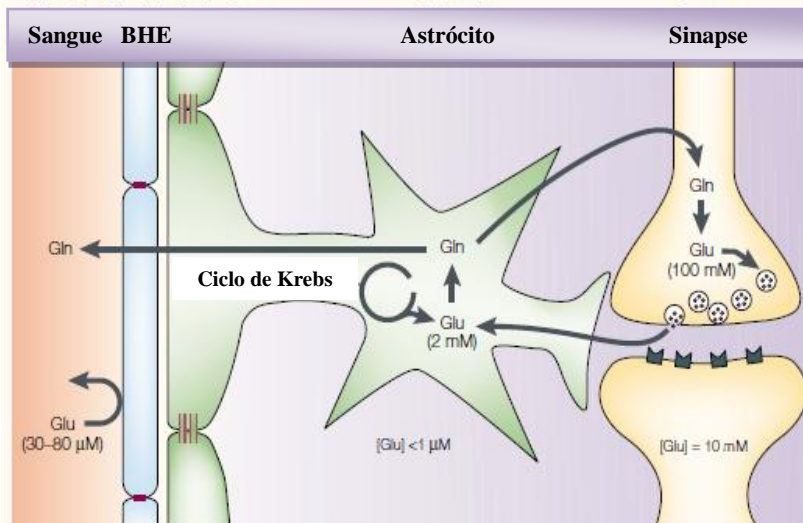
O tráfego do glutamato e glutamina entre neurônios e astrócitos é chamado de ciclo glutamato-glutamina. Proporções substanciais de pools do neurotransmissor glutamato (50-60%) tem sido estimadas como sendo derivadas do transporte glutamina-glutamato, com quantidades muito menores decorrentes da glicólise. Isto significa que quase a metade do glutamato formado nos neurônios é transferida para as células gliais (LEHMANN; BETTE; ENGELE, 2009; KOGA et al., 2011; BRADY et al., 2012).

O ciclo glutamato-glutamina ocorre entre astrócitos e neurônios. O glutamato extracelular é captado por transportadores glutamatérgicos astrocitários. Em astrócitos, o glutamato reage com a amônia para formar glutamina através da atividade da glutamina sintetase, uma enzima citosólica dependente de ATP que é expressa por astrócitos e oligodendrócitos, mas não por neurônios. Esta reação é importante para a detoxificação da amônia livre, pois seu acúmulo pode interferir com a função sináptica. O astrócito em seguida exporta a glutamina para o fluido extracelular, de onde esta é captada por neurônios (FERNANDES et al., 2010; JIANG; YAN; WENG, 2012).

Nos neurônios a enzima glutaminase, ativada por fosfato, desamina a glutamina, produzindo glutamato (FERNANDES et al., 2010; JIANG; YAN; WENG, 2012). O glutamato pode então ser internalizado

em vesículas sinápticas por transportadores VGLUT, lançado para o espaço extracelular e ser novamente captado por astrócitos e convertido novamente a glutamina pela glutamina sintetase, completando assim o ciclo metabólico (YUDKOFF et al., 2005; COULTER; EID, 2012), conforme representado na figura 8.

Figura 8 - Ciclo glutamato-glutamina



A barreira hematoencefálica tem uma baixa permeabilidade ao glutamato (Glu). Essencialmente todo o glutamato no cérebro é sintetizado por transaminação do α -cetoglutarato tanto em neurônios quanto em glias. Nas células da glia, o glutamato é convertido em glutamina (Gln), antes de ser liberado para o espaço extracelular. A glutamina é retomada por neurônios e convertida em glutamato, antes de ser internalizado em vesículas sinápticas. Glutamina funciona também como um transportador de amônia em excesso, e é transportada através da barreira hematoencefálica para ser eliminada por meio da circulação. A concentração de glutamato no fluido cerebrospinal é cerca de $1 \mu\text{M}$, mas pode aumentar para $20 \mu\text{M}$ em condições patológicas caracterizadas por um defeito na barreira hematoencefálica e/ou por dano celular, tais como acidente vascular cerebral, trauma, esclerose múltipla e meningite. FONTE: Nedergaard, Takano e Hansen (2002).

2.3.2.1.2 *Participação das aminotransferases no metabolismo de glutamato*

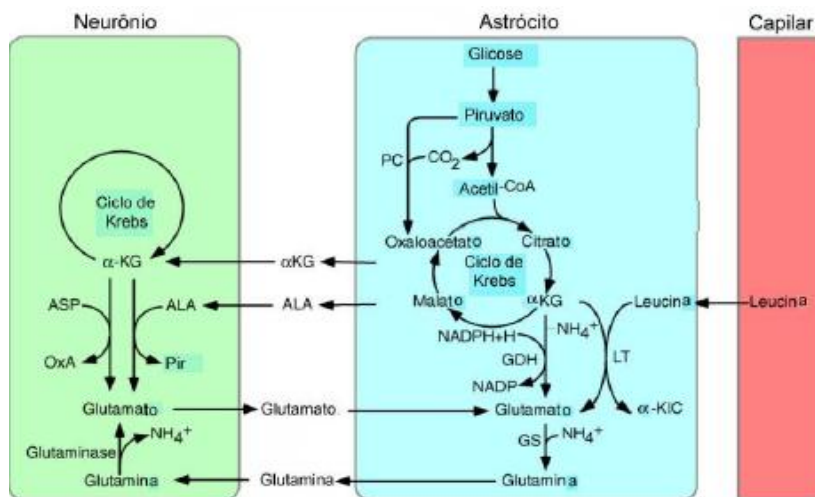
Considerando-se o ponto de vista metabólico, o glutamato pode ser pensado como um esqueleto de carbono (com hidrogênio e grupos hidroxilas) e contendo um grupo amino. Devido captação de aminoácido até o cérebro ser muito menor que a captação de glicose, o grupo amino do glutamato deve ser reciclado. O esqueleto de carbono derivado da glicose, a qual, através da glicólise e ciclo de Krebs, é convertido a α -cetoglutarato, recebe um grupo amino de outro aminoácido através da transaminação sendo convertido em glutamato. A atividade da aspartato aminotransferase (AST) (a qual amina α -cetoglutarato a glutamato) é muito maior que a da enzima do ciclo de Krebs α -cetoglutarato desidrogenase (YUDKOFF et al., 1993; LANOUE et al., 2001; DESAI; DESAI, 2008; BRADY et al., 2012). O aspartato representa uma importante reserva de grupamento amina para a síntese de glutamato. Os neurônios também apresentam uma via metabólica para síntese de glutamato a partir de alanina e α -cetoglutarato, liberados pelos astrócitos, os quais são convertidos em glutamato e piruvato, em uma reação de transaminação catalisada pela alanina aminotransferase (ALT) (LANOUE et al., 2001).

O metabolismo de aminoácidos derivados de proteínas também envolve transaminação de vários aminoácidos em cetoácidos; α -cetoglutarato recebe o grupamento amina nestas transaminações sendo consequentemente convertido em glutamato. A enzima GDH remove o grupo NH_2 do glutamato, liberando o NH_2 livre e desvia o glutamato de volta ao ciclo de Krebs, como α -cetoglutarato (YUDKOFF et al., 1993; BRADY et al., 2012).

O aminoácido leucina entra no cérebro a partir do sangue mais rapidamente do que qualquer outro aminoácido. Entre 30 a 50% de todos os grupos de α -amino de glutamato do cérebro e glutamina são derivados unicamente da leucina. Astrócitos liberam o cetoácido α -cetoisocaproato (KIC) para os neurônios, que tem uma aminotransferase que reamina o KIC a leucina, processo que consome glutamato e fornece um mecanismo para o "tamponamento" de glutamato se suas concentrações se tornarem excessivas (YUDKOFF et al., 2005).

Estas aminotransferase, bem como o ciclo glutamato-glutamina, desempenham um papel importante no metabolismo do glutamato, e provem de uma interação entre astrócitos, neurônios e capilares sanguíneos, conforme demonstrado na figura 9.

Figura 9 – Metabolismo do glutamato



FONTE: Zigmond et al. (1999)

2.3.2.1.3 Captação de Glutamato

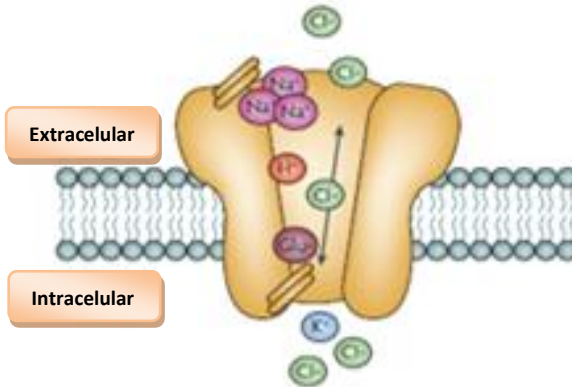
A remoção rápida do glutamato do espaço extracelular é importante para a sinapse funcionar corretamente em uma escala de tempo de milissegundos e para evitar a superativação das células pós-sinápticas. A manutenção de baixas concentrações de glutamato no ambiente extracelular é realizada principalmente por meio de mecanismos astrocitários (COULTER; EID, 2012).

Os astrócitos e neurônios expressam um total de cinco isoformas de transportadores de aminoácidos excitatório dependentes de sódio de elevada afinidade (EAAT): EAAC1 (EAAT3), GLT1 (EAAT2), GLAST (EAAT1), e EAAT4, EAAT5. Os subtipos GLAST do transportador EAAT (EAAT1) e GLT1 (EAAT2) são preferencialmente expressos em astrócitos. Dados obtidos em experimentos *in vivo* com camundongos deficientes de membros individuais da família de transportadores do glutamato, indicam que principalmente os transportadores gliais - GLT1 e GLAST - são os responsáveis pela eliminação de glutamato extracelular (DANBOLT, 2001; NEDERGAARD; TAKANO; HANSEN, 2002).

A captação celular de glutamato ocorre contra um gradiente de concentração e por isso é acoplada com o transporte de sódio e potássio,

através da atividade da Na^+/K^+ -ATPase. Glutamato entra na célula juntamente com três íons de sódio e um próton; um íon de potássio é transportado no sentido contrário. O transportador é eletrogênico, pois há um ganho líquido de duas cargas positivas para cada glutamato transportado (NEDERGAARD; TAKANO; HANSEN, 2002; BRADY et al., 2012). Representação esquemática na figura 10.

Figura 10 - Termodinâmica de captação dos transportadores de glutamato



FONTE: Tzingounis e Wadiche (2007).

De acordo com Nedergaard, Takano e Hansen (2002) trocadores cistina-glutamato também podem contribuir para a liberação de glutamato. Estes transportadores de troca de moléculas de uma cistina por uma de glutamato irão transportar normalmente o glutamato para fora das células, já que a concentração de glutamato é muitas vezes maior do lado de dentro do que de fora.

A captação de glutamato é dependente de uma família de proteínas de membrana conhecidas como transportadores de glutamato e a falha destas em “limpar” eficazmente o glutamato a partir do espaço extracelular resultará nas várias formas de dano celular (TZINGOUNIS; WADICHE, 2007; SANACORA et al., 2008).

2.3.2.2 Liberação Glutamato

Potenciais de ação invadem o terminal nervoso e iniciam o influxo de Ca^{2+} pré-sináptico por canais de Ca^{2+} dependente de voltagem (CCDV), resultando na liberação de neurotransmissores a partir das vesículas sinápticas. Estes neurotransmissores se difundem através da

fenda sináptica e iniciam uma resposta no neurônio pós-sináptico, com a natureza da resposta dependente tanto da identidade do neurotransmissor quanto a composição dos receptores que se ligam a molécula de sinalização. Uma vez que uma resposta sináptica é gerada, o término do sinal é uma exigência absoluta para a codificação de alta fidelidade da informação (COULTER; EID, 2012).

2.3.3 Excitotoxicidade Glutamatérgica

O potencial do glutamato como um mediador de acontecimentos neuropatológicos foi estabelecido juntamente com a sua atividade como um transmissor excitatório no SNC. Michaelis (1998) já relatava que em uma análise de estudos paralelos, os quais definiram o glutamato como o transmissor excitatório mais predominante nas sinapses do sistema nervoso central, também demonstraram que a aplicação direta de concentrações elevadas de glutamato em neurônios da retina, e de injeções de glutamato monossódico em camundongos neonatal produziam ambas as lesões, hipotalâmicas e retina.

Foi visto também que a administração de agonistas de glutamato no corpo estriado de ratos produziu alterações bioquímicas semelhantes às encontradas nos gânglios da base de pacientes com a doença de Huntington. Na sequência destes estudos, tornou-se claro que este sistema transmissor pode ser parte de uma via final comum levando a neurodegeneração em uma variedade de doenças. Esse acúmulo de glutamato na fenda sináptica tem sido então relacionado tanto em lesões agudas, como convulsões, isquemia, hipoglicemia, ou epilepsia, quanto em desordens neurodegenerativas progressivas, como a doença de Alzheimer, Huntington e Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, esquizofrenia e outros distúrbios psiquiátricos (MICHAELIS, 1998; PATRICK, 2000; MOLZ et al., 2008a; ALEKSEENKO et al., 2012).

Desde o início do desenvolvimento da ideia da excitotoxicidade, o dogma central tem sido que o dano celular induzido por glutamato e a morte celular são o resultado da ativação dos receptores de aminoácidos excitatórios. A subclasse de receptores ionotrópicos para glutamato do tipo NMDA é a mais seletiva e mais efetiva que as demais em mediar danos neurodegenerativos. A superativação deste receptor pelo glutamato acarreta em aumento no influxo de Ca^{2+} e níveis elevados anormais deste íon são responsáveis pelo fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica que leva a estresse oxidativo, dano mitocondrial e morte celular (MICHAELIS, 1998; NEDERGAARD; TAKANO; HANSEN, 2000; FAN; RAYMOND, 2007;

MOLZ et al., 2008a; WANG; MICHAELIS, 2010; ALEKSEENKO et al., 2012).

2.4 CAPTAÇÃO DE CÁLCIO

O Ca^{2+} é um segundo mensageiro altamente versátil que controla respostas celulares críticas em todos os organismos eucariotos. Sinais de Ca^{2+} controlam tanto os processos biológicos de curto prazo que ocorrem em milissegundos, tais como contração muscular e a neurotransmissão, bem como processos de longa duração que requerem vários dias, como a proliferação e o desenvolvimento celulares (SANTO-DOMINGO; DEMAUREX, 2010).

A especificidade dos sinais celulares de Ca^{2+} é controlada por canais de íon, bombas e trocadores que orientam os fluxos de íons de Ca^{2+} através da membrana plasmática e através das membranas de organelas intracelulares (CLAPHAM, 2007; SANTO-DOMINGO; DEMAUREX, 2010; BRADY et al., 2012):

- Canais iônicos seletivos para Ca^{2+} ativados por voltagem (CCDV): representam a rota mais significativa e servem como via primária para o rápido influxo de Ca^{2+} em células excitáveis, sendo responsáveis pela despolarização rápida e sustentada da membrana, bem como a fusão das vesículas sinápticas e o desencadeamento da contração muscular.

- Canais ionotrópicos operados por ligantes: muitos são relativamente não seletivos para cátions, e tem significativa permeabilidade para Ca^{2+} . Por exemplo, receptores de glutamato (NMDA, AMPA, KA), bem como os receptores de Acetilcolina (ACh) e ATP enquadram-se nesta categoria. O influxo de Ca^{2+} através destes canais pode produzir diversos efeitos, como a ativação do receptor rianodina (RyR) no retículo endoplasmático (RE) para liberar Ca^{2+} , ou na passagem adjacente de canais de potássio ativados por Ca^{2+} na membrana plasmática.

- Canais operados por estoque (SOC): ativados sobre o esvaziamento dos estoques de Ca^{2+} do RE.

- Membros da família do canal do potencial receptor transitório (TRP): na maioria são canais de cátions não específicos.

O influxo de Ca^{2+} para dentro das células através de canais de Ca^{2+} específicos da membrana plasmática, ou da liberação do Ca^{2+} sequestrado no RE ou na mitocôndria, elevam, em qualquer um dos casos, a concentração de Ca^{2+} citosólica e iniciam a resposta celular. A sinalização celular modulada por Ca^{2+} compreende uma série de eventos

moleculares e biofísicos conectando os estímulos externos com as respostas intracelulares. Em células excitáveis, o estímulo químico inicial pode envolver a excitação da membrana, ativando rotas de sinalização via Ca^{2+} . O influxo de Ca^{2+} pode estar envolvido em diversas funções celulares e pode também ser regulado por diversos mecanismos, incluindo atividade de proteínas cinases, neurotransmissores, hormônios, nucleotídeos e fatores de crescimento (BIRD; PUTNEY, 2006).

A concentração de Ca^{2+} livre no citosol de qualquer célula é extremamente baixa ($\leq 10^{-7}$ M), enquanto que a concentração no fluido extracelular ($\sim 10^{-3}$ M) e no RE, é alta. Assim há um grande gradiente tendendo para entrada de Ca^{2+} para o citosol através, tanto da membrana plasmática quanto da membrana do RE. O RE é o principal estoque de Ca^{2+} intracelular nas células, enquanto que as mitocôndrias formam e decodificam sinais celulares de Ca^{2+} , liberando estes íons. Os mecanismos de captação de Ca^{2+} em mitocôndrias tem atraído muita atenção recentemente, devido ao papel central da mitocôndria no metabolismo e morte celulares (ALBERTS et al., 2002; SANTO-DOMINGO; DEMAUREX, 2010).

Um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular em dendritos neuronais através de canais NMDA é crucial para o início da formação da plasticidade sináptica e LTP, no hipocampo. O Ca^{2+} citoplasmático também é necessário para outros tipos de plasticidade sináptica, como por exemplo, LTD, no hipocampo e cerebelo (WEBER, 2012).

O Ca^{2+} participa de uma elevada gama de funções fisiológicas no sistema nervoso, o que torna este íon e a manutenção da sua homeostasia celular fatores cruciais para o bom funcionamento deste sistema, pois além de ser essencial para o crescimento e desenvolvimento de células nervosas, o Ca^{2+} é também um componente necessário para a neurotransmissão, e contribui para padrões distintos da expressão diferencial de genes em neurônios. Alterações nos níveis de Ca^{2+} intracelular, ou alterações na sinalização pelo Ca^{2+} podem contribuir para uma variedade de patologias. Por exemplo, mudanças no metabolismo e homeostase do Ca^{2+} são bem observadas durante o processo de envelhecimento, em doenças neurodegenerativas tais como Huntington, Parkinson e doença de Alzheimer, bem como esclerose lateral amiotrófica, epilepsia, isquemia cerebral, e dependendo da carga e da via de entrada de Ca^{2+} , estes mecanismos podem causar a morte das células por vias rápidas (necrose) ou através de morte celular mais tardia (apoptose) (WEBER, 2012).

Como já foi relatado, o Ca^{2+} possui grande importância para a função neuronal normal e por isso estas células tem desenvolvido diversos mecanismos homeostáticos para controlar a localização subcelular e para manter baixos os níveis de concentração intracelular de Ca^{2+} . Estes mecanismos incluem influxo de Ca^{2+} através de canais operados por receptor (ROCs), tamponamento de Ca^{2+} pela membrana plasmática e por proteínas citosólicas, armazenamento de Ca^{2+} em organelas intracelulares e efluxo de Ca^{2+} (WEBER, 2012).

Um único neurônio pode ter vários tipos diferentes de canais CCDVs e ROCs, os quais são vias importantes para o influxo de Ca^{2+} . A ativação dos receptores de NMDA pelo ligante endógeno, glutamato, leva a um influxo de Ca^{2+} a partir do espaço extracelular para o citosol. A ativação de CCDVs é dependente da voltagem da membrana celular, quando a membrana se torna despolarizada, por exemplo, devido ao influxo de Na^+ através de canais de íons ou devido ao influxo de Ca^{2+} através de ROCs, estes CCDVs permitem o influxo de Ca^{2+} na célula. Certas classes de CCDVs também ativam a liberação de neurotransmissores nos terminais sinápticos. (ALBERTS et al., 2002; CLAPHAM, 2007; WEBER, 2012).

Aumento exacerbado nos níveis intracelulares de cálcio e excitotoxicidade glutamatérgica são fenômenos muitas vezes associados à indução de estresse oxidativo e estes eventos são comumente observados em patologias neurodegenerativas.

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E O PAPEL DA GLUTATIONA

O estresse oxidativo pode resultar de uma situação em que há uma diminuição nos níveis das enzimas antioxidantes, uma elevada velocidade de produção de EROs ou uma combinação de ambas as condições. Em condições fisiológicas normais, a formação de espécies reativas é mantida sob controle rigoroso por mecanismos de defesa celular. Entretanto, em situações patológicas, essa produção pode aumentar substancialmente, comprometendo esses mecanismos, podendo causar lesão celular por peroxidação de proteínas, DNA e membranas lipídicas (DRINGEN, 2000; HALLIWELL, 2006; WEBER, 2012).

EROs incluem moléculas não orgânicas, tais como o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), bem como as moléculas orgânicas, tais como os radicais alcóxila ($\text{RO}\cdot$) e peróxila ($\text{ROO}\cdot$). EROs são continuamente

gerados durante o metabolismo oxidativo. A reação de Fenton, catalisada pelo ferro, e a reação de Haber-Weiss geram, através do ânion superóxido e H_2O_2 , a espécie mais reativa dentro da família dos EROs, o radical hidroxila, pois tem a capacidade de oxidar qualquer molécula orgânica (DRINGEN, 2000; FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009).

Quando $\cdot OH$ é produzido próximo a membrana plasmática, lipídios de membrana podem ser oxidados e iniciar uma reação em cadeia de radicais livre que danificam a membrana. No início da peroxidação lipídica por $\cdot OH$, a reação com uma molécula de lipídio reduzida produz um radical lipídico (L) e água. O L pode reagir com o oxigênio para produzir radical hidroperóxido (LOO), que então reage com outra molécula de lipídio, gerando um peróxido lipídico (LOOH) e outro radical L que pode continuar a reação em cadeia (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009).

O intenso acúmulo de Ca^{2+} intracelular é controlado pelo transporte de Ca^{2+} para dentro da mitocôndria, um fenômeno dependente de energia. É provável que o acúmulo excessivo de Ca^{2+} no citoplasma de neurônios levaria a um aumento do transporte de elétrons mitocondrial e da formação de $O_2^{\cdot -}$ (MICHAELIS, 1998). Um segundo, mas relativamente menor caminho, para formação $O_2^{\cdot -}$ é através do metabolismo lipídico; onde, um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} pode ativar fosfolipases, mais notavelmente PLC e fosfolipase A2 citosólica (cPLA2). Ativação cPLA2 conduz à liberação e acúmulo de ácido araquidônico livre (AA) e o metabolismo do ácido araquidônico por ciclooxigenases conduz à geração de $O_2^{\cdot -}$ (MICHAELIS, 1998; WEBER, 2012).

2.5.1 Glutathiona

O tripeptídeo, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina (Gly-Cis-Glu) conhecido como glutathiona (GSH), é o mais abundante tiol não proteico presente nas células e também o antioxidante mais importante de baixo peso molecular sintetizado em células. Possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na detoxificação celular de EROs nas células gliais. Pode ser encontrado na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). É sintetizado por meio da adição sequencial de cisteína ao glutamato, seguida pela adição de glicina. O grupo sulfidrilo (-SH) da cisteína está envolvido na redução de reações de conjugação. Estas reações proporcionam os meios para a remoção de peróxidos e muitos compostos xenobióticos. A GSH também esta

envolvida na regulação do ciclo celular (DRINGEN, 2000; DICKINSON; FORMAN, 2002b; HUBER; ALMEIDA, 2008; FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009).

A glutathiona pode reagir não enzimaticamente com compostos oxidantes ou suportar a atividade da GPx. Durante a detoxificação de EROs, GSH pode reagir diretamente com radicais livres, tais como o ânion radical superóxido e radical hidroxila, e atuar como um doador de elétrons para a redução dos peróxidos catalisados por GPx. Detoxificação de peróxido mediada pela glutathiona oxidase e glutathiona peroxidase leva à formação de GSSG, que pode ser convertido de volta para GSH pela glutathiona redutase, numa reação dependente de NADPH. GSH também participa nas reações de detoxificação, como na de compostos eletrofilicos, através da GST (DICKINSON; FORMAN, 2002a; BRONGHOLI et al., 2006; HUBER; ALMEIDA, 2008; KOGA et al., 2011).

Para manter a alta taxa intracelular de GSH/GSSG, GSSG tem que tanto ser excretada da célula ou reduzida a GSH à custa de NADPH. Esta via de reciclagem é mediada pela reação da glutathiona redutase e é dependente do ciclo das pentoses e, portanto, do fornecimento de glicose. A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) produz NADPH para suprir as necessidades celulares deste nucleotídeo reduzido. GSSG é normalmente mantida a menos de 1% do total de glutathiona. Aumentos na GSSG durante estresse oxidativo são geralmente transitórios, já que a redução pela glutathiona redutase é relativamente rápida (DICKINSON; FORMAN, 2002a; DICKINSON; FORMAN, 2002b; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; DAMMEYER; ARNÉR, 2011).

Enquanto a restauração da GSH a partir de GSSG pode ser facilmente realizada, depleção através de conjugação ou perda pela excreção de GSSG demanda reposição. Entretanto, poucas células podem regenerar GSH, e, nestes casos a síntese *de novo* é a via predominante de restauração (DICKINSON; FORMAN, 2002b). A biossíntese da GSH ocorre no meio intracelular (exceto em células epiteliais).

A diminuição de GSH-total pode ser atribuída à conjugação de GSH a produtos de derivados da oxidação de lipídios, a conversão para formas reversíveis ou irreversíveis, o efluxo aumentado, ou perturbação no processo de síntese da glutathiona, bem como deficiência energética e/ou deficiência de transportador de glutamato que podem limitar a absorção de aminoácido dependente de sódio, diminuindo a absorção de cisteína, causando a depleção dos níveis de glutathiona. Também já foi

identificada uma diminuição da glutatona em desordens neuropsiquiátricas, como a Doença de Parkinson, de Alzheimer e esquizofrenia (BRONGHOLI et al., 2006; KOGA et al., 2011).

O cérebro contém baixa a moderada atividade de SOD, CAT, e GPx em relação a outros órgãos, portanto, no SNC, os astrócitos secretam GSH contribuindo para diminuir a produção de radicais livres. Além disso, a GSH extracelular serve como precursor e indutor para síntese de GSH neuronal, cuja redução tem sido associada à morte celular e neurodegeneração. Um sistema GSH comprometido no cérebro pode ser relacionado com o estresse oxidativo que ocorre em doenças neurobiológicas (DRINGEN, 2000).

2.5.2 Papel da γ -GT

A γ -glutamil-transferase (γ -GT) é uma proteína glicosilada, parcialmente incorporada na superfície externa da membrana plasmática, que catalisa a transferência da porção de γ -glutamil da glutatona, ou conjugados de glutatona, para aceptores tais como aminoácidos e dipeptídeos (DICKINSON; FORMAN, 2002a; MAREŠ et al., 2005).

Ao quebrar a GSH extracelular nos seus aminoácidos constituintes, γ -GT fornece cisteína, para a síntese *de novo* de GSH (MAREŠ et al., 2005). Como tal, γ -GT é crítica para a manutenção da homeostase da GSH e cisteína, e sua deficiência resulta em estresse oxidativo e susceptibilidade celular à lesão oxidativa. Além disso, a γ -GT também catalisa o metabolismo de compostos endógenos, tais como leucotrieno C4 e xenobióticos após sua conjugação com GSH. Nesta reação, os conjugados de GSH são clivados pela γ -GT em grupo γ -glutamil e conjugados cisteinilglicina; estes últimos são ainda clivados por peptidases até a sua conversão final a ácidos mercaptúricos e excreção pela urina. Muitas substâncias, especialmente aquelas que geram espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) e/ou perturbam a homeostase redox, tais como a aflatoxina B1, NO₂, e álcool, aumentam a expressão da γ -GT em várias células e tecidos. Portanto, γ -GT desempenha um papel crítico na defesa antioxidante, na detoxificação de xenobióticos, e em processos inflamatórios (DICKINSON; FORMAN, 2002a; ZHANG et al., 2005; ZHANG; FORMAN, 2009).

γ -GT participa na manutenção da homeostase redox de células e processos dependentes de reações de oxidorredução, tais como a

proliferação celular, diferenciação, adesividade ou reatividade a condições adversas intra ou extracelulares (MAREŠ et al., 2005).

γ -GT vem sendo utilizado também como preditor de diabetes tipo 2, doença renal crônica e cardiovascular e risco de câncer. A associação positiva entre os níveis de γ -GT e incidência de tumor pode ser explicados pela ligação entre γ -GT e o estado redox da célula (HEMELRIJCK et al., 2011).

2.6 VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL - BREVE RELATO

A capacidade de um neurônio para transmissão sináptica é particularmente controlada via fosforilação de enzimas que sintetizam neurotransmissores. A chegada de um potencial de ação no terminal pré-sináptico gera abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem o que resulta em influxo de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico que induz ao mecanismo molecular que leva a exocitose da vesícula sináptica, fusão de vesículas com a membrana plasmática e subsequente liberação de neurotransmissores. Liberação de neurotransmissores pré-sinápticos estimula receptores pós-sinápticos ionotrópicos, como AMPA e NMDA, os quais são ativados por glutamato, levando a um influxo de cátions, incluindo Ca^{2+} , o qual funciona como um segundo mensageiro. As proteínas cinases que medeiam os processos de aprendizado e memória são ativadas tanto diretamente (CaMKII e PKC) ou indiretamente (PKA via adenilato ciclase ativada por Ca^{2+}) por aumento intracelular de Ca^{2+} induzidos pela neurotransmissão glutamatérgica excitatória (BRADY et al., 2012).

O termo PKC (Proteína cinase C) define uma família de cinases serina/treonina, a qual compreende 10 diferentes genes em mamíferos, e é dividida em três classes, dependendo da sua estrutura e os requisitos para a sua ativação. A isoforma convencional da PKC requer Ca^{2+} , bem como diacilglicerol (DAG) para sua ativação. Ela tem uma distribuição heterogênea no sistema nervoso central e desempenha um importante papel na regulação da excitabilidade neuronal, a liberação de neurotransmissores, e em longo prazo, alterações na expressão de genes e plasticidade. A isoforma PKC ϵ é predominantemente expressa no cérebro em comparação com outros tecidos, e a PKC γ está localizada exclusivamente no cérebro (SZABO et al., 2009; ABRIAL et al., 2011).

Para sua ativação, a PKA requer o segundo mensageiro AMPc, o qual é sintetizado pela adenilato ciclase sob estímulo de receptores acoplados a proteína G. As subunidades de PKA mostram uma ampla

distribuição no cérebro, onde irão afetar muitas funções neuronais via fosforilação de uma ampla gama de substratos neuronais (ALBERTS et al., 2002; BRADY et al., 2012).

As fosfolipases C (PLC) estão implicadas em vários processos fisiológicos, incluindo a proliferação celular, diferenciação, migração, sobrevivência e morte. Treze membros da família PLC foram identificados e classificados em seis isoenzimas de acordo com as suas estruturas primárias. PLC específica-g1 (PLC-g1) é um regulador importante de sinalização envolvida em vários processos celulares. No cérebro, PLC-g1 é altamente expressa e participa de funções celulares neuronais mediados por neurotrofinas. Significativamente, a expressão anormal e ativação de PLC-g1 aparecem em várias doenças cerebrais tais como a epilepsia, a depressão, a doença de Huntington e doença de Alzheimer (JANG et al., 2012).

A maioria dos efeitos do Ca^{2+} nas células é mediado pela fosforilação de proteínas catalisadas por uma família de proteínas cinases dependente de Ca^{2+} /Calmodulina (CaMKs). O melhor exemplo estudado de CaMK é a CaMKII, uma cinase serina/treonina multifuncional, a qual é encontrada em todas as células animais, mas especialmente no sistema nervoso, onde esta altamente concentrada nas sinapse e medeia a fosforilação dependente de Ca^{2+} de uma grande variedade de alvos neuronais (ASHPOLE; HUDMON, 2011; MAGUPALLI et al., 2012; SKELDING et al., 2012).

Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) desempenham importantes papéis na fisiologia celular. Diversos sinais extracelulares podem ativar as cascatas das MAPKs, incluindo o neurotransmissor excitatório glutamato, fatores de crescimento (por exemplo, fator de crescimento derivado de plaquetas - PDGF, fator de crescimento epidérmico - EGF e fator de crescimento de fibroblastos - FGF), citocinas inflamatórias e estressores ambientais. Os membros da família das MAPKs são estrutura e funcionalmente relacionados e muitos deles são expressos no cérebro e medeiam importantes funções neuronais, tais como modulação do metabolismo, neurotransmissão, neuroplasticidade (LTP e LTD, no hipocampo), sobrevivência ou morte celular (neurotoxicidade mediada pelo glutamato) e proliferação ou diferenciação celular. Os principais membros desta família são classificados em três grupos: proteína cinase regulado por sinal extracelular (ERKs); p38 MAPKs; e c-Jun N-Terminal cinases (JNKs) (MOLZ et al., 2008b; KRISHNA; NARANG, 2008; KAPFHAMER et al., 2012).

ERK1/2 tem uma ampla gama de substratos e podem fosforilar muitas proteínas alvos no citosol ou no núcleo de células neuronais, regulando funções celulares importantes, tais como proliferação, diferenciação, apoptose e plasticidade sináptica (NUTTALL; OTEIZA, 2012). JNKs estão envolvidas numa variedade de processos biológicos incluindo a proliferação celular, a migração celular e a produção de citocinas (neuroinflamação) e apoptose. São fortemente expressas no sistema nervoso e desempenham papéis importantes no desenvolvimento, migração, polaridade e regeneração neuronal, bem como nos processos de aprendizagem e memória (HAEUSGEN et al., 2009; MEHAN et al., 2011; QU et al., 2012).

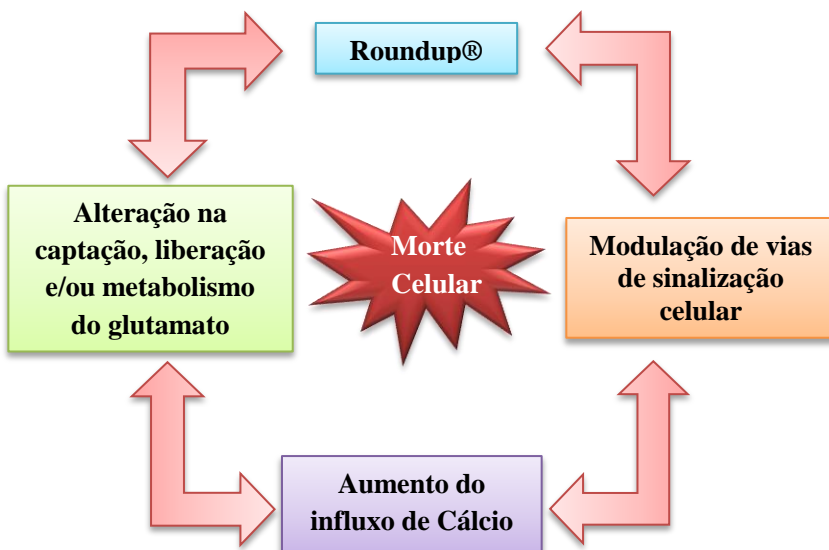
Cérebro contém muitos outros tipos de proteínas cinases Ser/Thr que são independentes de segundos mensageiros, como por exemplo, a GSK3, que é uma proteína cinase multifuncional, expressa ubiquamente e encontrada em altos níveis especificamente no cérebro. GSK3 esta implicada em uma variedade de processos neuronais bem como transporte axonal; polarização neuronal; sinalização pós-sináptica; regulação da plasticidade sináptica e memória; e também vem sendo envolvida na patogenia de doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e doença de Huntington; e em doenças psiquiátricas, como esquizofrenia e desordem bipolar. Existem duas isoformas da enzima denominadas GSK3 α e GSK3 β . GSK3 β é um dos principais alvos da sinalização antiapoptótica mediada pela via PI3K/Akt, a qual é um transdutor crítico para diversas vias importantes de sobrevivência em neurônios do sistema nervoso (LI et al., 2004; FUSTER-MATANZO et al., 2011; MOLZ et al., 2011).

A atividade das duas isoformas GSK3 α e GSK3 β é normalmente regulada pela fosforilação inibitória na Ser21 em GSK3 α e Ser9 em GSK3 β . Estes locais podem ser fosforilados por várias cinases diferentes, incluindo Akt (também conhecida como proteína cinase B), PKA, PKC, e outras, o que indica que muitas cascatas de sinalização convergem para GSK3 e regulam a sua atividade. Deficiências deste controle inibitório de GSK3 podem resultar em aumento exacerbado de sua atividade, uma condição que pode ter efeitos prejudiciais sobre a plasticidade neural, estrutura e sobrevivência (LI et al., 2004; MINES; JOPE, 2012). Desregulação da sinalização Akt/GSK3 está associada a muitos distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos (MORISSETTE et al., 2010).

2.7 HIPÓTESE

Este estudo propôs demonstrar que tanto a exposição *in vivo* quanto *in vitro* ao Roundup® induz aumento excessivo nos níveis extracelulares de glutamato levando a hiperativação dos receptores NMDA e, conseqüentemente, a sobrecarga nas concentrações do íon cálcio no citosol (Figura 11). Estes eventos, associados à indução de estresse oxidativo, induzem o fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica. Para comprovar esta proposta, estudos preliminares do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o hipocampo é a estrutura cerebral mais vulnerável às ações tóxicas do Roundup® quando comparado ao córtex cerebral, ao estriado e ao cerebelo (dados não mostrados). Apoiados nestes dados, este trabalho investigou as conseqüências da exposição ao Roundup® sobre o influxo de cálcio, indução de estresse oxidativo, assim como captação, liberação e metabolismo do glutamato no hipocampo de ratos de 15 dias de idade.

Figura 11 - Possíveis alvos do Roundup® em hipocampo de ratos imaturos.



3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

As substâncias radiotivas ($[^{14}\text{C}]$ MeAIB) (sp.act. 1.85 GBq/mmol), $[^{45}\text{Ca}^{2+}]\text{CaCl}_2$ (sp. act. 321 KBq/mg Ca^{2+}) foram obtidos da “Du Pont NEN Products” (Boston, EUA) e o líquido de cintilação biodegradável Optiphase Hisafe III foi adquirido da Perkin Elmer (São Paulo, SP, Brasil). L- $[^3\text{H}]$ -glutamato e D- ^3H -aspartato (atividade específica 0.33 Ci/ml), anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase foram adquiridos da Amersham® (Oakville, Ontario, Canada). O Roundup® foi adquirido da empresa Monsanto Company (St Louis, MO, EUA). Os anticorpos anti-p44/42 MAP cinase (anti-ERK1/2), anti-fosfo-p44/42 MAP cinase (anti-phospho ERK1/2), anti-JNK1/2 e anti-fosfo-JNK1/2, anti-GSK3 β e anti-fosfo-GSK3 β , anti-Akt e anti-fosfo-Akt foram adquiridos da Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, EUA). Os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo, todos os inibidores enzimáticos, antagonistas de receptores, bloqueadores de canais, substâncias antioxidantes, foram adquiridos da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). O “Immobilon TM Western chemiluminescence HRP substrate kit” foi adquirido da Millipore (©EMD Millipore Corporation, Bilerica, Ma, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar Machos com 15 dias de idade ou ratas Wistar fêmeas gestantes, provenientes do Biotério Central da UFSC, os quais foram mantidos em gaiolas com controle do ciclo claro/escuro 12/12 h a 21 °C, com água e ração *ad libitum*. Foram seguidos os Princípios Éticos do COBEA durante todos os experimentos. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela CEUA/UFSC (PP00471). O tamanho das ninhadas foi padronizado de forma que cada rata foi mantida com 8 filhotes/gaiola durante todo o período de tratamento e manutenção dos animais.

3.2.1.1 Tratamento *in vivo* com Roundup®

Ratas Wistar fêmeas foram expostas a 1% de Roundup® (equivalente a 0,38% de glifosato) na água de beber (DARUICH; ZIRULNIK; GIMENEZ, 2001; BEURET; ZIRULNIK; GIMÉNEZ, 2005) a partir do 5º dia gestacional. O tratamento continuou até os filhotes completarem 15 dias de idade, que corresponde ao período imaturo do desenvolvimento. O consumo materno de água durante os períodos gestacional e lactacional das ratas controles e tratadas foi monitorado diariamente. No dia do experimento os filhotes de 15 dias de idade foram mortos por decapitação, seguida de rápida remoção do hipocampo. Posteriormente, o hipocampo foi fatiado e os testes bioquímicos foram realizados nestas fatias. As fatias foram homogeneizadas nos tampões específicos dependendo da determinação bioquímica a ser realizada, conforme descrito abaixo.

3.2.1.2 Tratamento *in vitro* das fatias de hipocampo com Roundup®

Para os experimentos *in vitro*, as fatias de hipocampo foram previamente pré-incubadas por 15 min. em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb = NaCl 122mM; KCl 3mM; CaCl₂ 1,3mM; MgSO₄ 1,2mM; KH₂PO₄ 0,4mM; NaHCO₃ 25mM; D-glicose 10mM) e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂), seguido por uma incubação de 30 minutos com ou sem Roundup® em diferentes concentrações. A concentração de 0,01% do Roundup® foi a utilizada na maioria dos ensaios bioquímicos e é equivalente a 100 ppm de Roundup® ou 36 ppm de glifosato. Salienta-se que a diluição de Roundup® utilizada na agricultura corresponde a 10.000 ppm.

Com o intuito de investigar os mecanismos envolvidos na toxicidade induzida pelo Roundup® sobre as células hipocampais, em alguns experimentos as fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de inibidores enzimáticos (KN-93 10 µM; PD98059 10 µM; U73122 1 µM; Nifedipina 10 µM; H89 10 µM; Ro 31-8220 1 µM), e/ou antagonistas (AP-5 10 µM; MK-801 50 µM) ou agonistas (NMDA/Gly 100 µM/10 µM) do receptor ionotrópico do glutamato (NMDA) e mantidos durante a incubação de 30 minutos na presença do Roundup®.

3.2.2 Captação de L-[³H]Glutamato

A captação foi realizada conforme previamente descrito (MOLZ et al., 2005). As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos a 37°C, em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl₂ 1,29mM, NaCl 136,9mM, KCl 5,36mM, MgSO₄ 0,65mM, Na₂HPO₄ 0,27mM, KH₂PO₄ 1,1mM, D-glicose 2mM e Hepes 5mM) (Quando necessário, Roundup® foi incubado junto com a captação, no tempo de 30 minutos). A captação tem início com a adição de 0,33 µCi L-[³H]Glutamato. As fatias permanecem por 7 minutos nesse meio de captação. A incubação é interrompida com a retirada do meio de captação e lavagem por duas vezes com 1 ml de HBSS gelado. 300µl de uma solução de NaOH 0,1N/SDS 0,01% foram adicionados para solubilização das fatias. Após a completa solubilização, foi determinado o conteúdo intracelular de glutamato pela avaliação de cintilação líquida. A captação de glutamato foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Os resultados são expressos como nmol L-[³H]Glutamato/mg proteína/min.

3.2.3 Liberação de L-[³H]Glutamato

Após o tempo de pré-incubação em tampão KRb, fatias de hipocampo foram incubados em 280 µl de solução salina equilibrada de Hank (HBSS - mM: CaCl₂ 1,29mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36mM, MgSO₄ 0,65mM, Na₂HPO₄ 0,27mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, e HEPES a 5mM) (quando necessário, Roundup® foi incubado junto com a captação) durante 30 min, nos 7 minutos finais 20 µL de D-[³H] aspartato foi adicionado a incubação. Foi utilizado o D-aspartato, ao invés do L-glutamato com o intuito de prevenir a metabolização do mesmo nos compartimentos intracelulares. Entretanto, resultados similares são obtidos quando se utiliza o D-aspartato ou o L-glutamato. Após este tempo a incubação é interrompida com a retirada do meio e lavagem das fatias por três a quatro vezes com 300 µl de HBSS gelado. A solução HBSS é novamente trocada e as fatias de hipocampo são incubadas com 300µl de HBSS por 15 minutos. O tampão (efluxo) é retirado para posterior determinação da cintilação. As fatias são lisadas com uma solução de NaOH 0,1N/SDS 0,01%. Alíquotas deste lisado foram tomadas para determinação do conteúdo intracelular de L-[³H]Glutamato (MOLZ et al, 2005). Conteúdo de L-[³H]Glutamato extracelular e intracelular foi determinado através de contagem de

cintilação, calculada como nmol de glutamato por miligrama de proteína por minuto, sendo que a quantidade de glutamato liberado foi expressa como porcentagem do total de L-[³H] glutamato.

3.2.4 Captação de Cálcio

A captação de ⁴⁵Ca²⁺ (ZAMONER et al., 2007) foi determinada em fatias de hipocampo de ratos tratadas com Roundup®. O tecido foi pré-incubado em tampão KRb (NaCl 122 mM; KCl 3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; CaCl₂ 1,3 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM) por 15 min a 37 °C, pH 7,4 e gaseificada com uma mistura contendo O₂:CO₂ (95:5, v/v). Após, o meio foi trocado por KRb fresco com 0,1 µCi/mL ⁴⁵Ca²⁺ e o tecido incubado durante 30 minutos. O ⁴⁵Ca²⁺ extracelular foi totalmente lavado em solução de lantânio (NaCl 127,5 mM, KCl 4,6 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 10 mM, Glicose 11 mM, LaCl₃ 10 mM, pH 7.3). O tecido foi lisado em solução NaOH 0,5 M e foi determinada a concentração de proteínas em cada amostra. A radioatividade foi medida em um cintilador. Captação específica foi considerada como a diferença entre a captação total e a não específica. Os resultados foram expressos como pmol ⁴⁵Ca²⁺/µg proteína ou % do controle.

3.2.5 Acúmulo de aminoácidos neutros

Fatias de hipocampo foram pré-incubados em solução tampão KRb (NaCl 122 mM; KCl 3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; CaCl₂ 1,3 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM) durante 15 minutos em um incubador metabólico Dubnoff a 37 °C, pH 7,4 e gaseificada com uma mistura contendo O₂:CO₂ (95:5, v/v). As fatias de hipocampo foram incubadas na presença de [¹⁴C] MeAIB (3,7 kBq/ml) durante 1 hora, sendo que para os experimentos relacionados ao modelo *in vitro* o Roundup® 0,01% foi adicionado nos 30 minutos finais (SILVA et al., 2001). Alíquotas de 40 µl de tecido e meio externo foram colocados em líquido de cintilação e contadas num espectrômetro de cintilação Beckman beta líquido (modelo LS 6500; Fullerton, Califórnia, EUA) para medições de radioatividade. Os resultados foram expressos como o tecido/meio/mg proteína/mL ou % do controle (SILVA et al., 2001).

3.2.6 Conteúdo de GSH

Os níveis de glutatona foram medidos em homogenato de hipocampo, preparado em 10 volumes de ácido tricloroacético 12%,

seguido por centrifugação a 5000 xg durante 5 minutos. Uma alíquota de 50 µL das amostras foi acrescentado em 950 µL de Tampão Fosfato 0,2 M pH 8,0. 100 µL de DTNB 2,525 mM (5,5'-Ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) foi adicionado e a absorbância foi medida em um comprimento de onda de 412 nm (BEUTLER; DURON; KELLY, 1963). GSH reage com ácido ditionitrobenzóico (DTNB) e por redução de GSSG, a GSH total (GSH + GSSG) pode ser medida. DTNB reage com GSH para produzir um ânion conjugado, TNB, 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 µmol/mL ou mmol/µg proteína.

3.2.7 Conteúdo de TBARS

O malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um pigmento rosa que pode ser medido espectrofotometricamente (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979; BIRD; DRAPER, 1984). Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidos em fatias de hipocampo, homogeneizadas em tampão fosfato 0,02 M pH 7,4 (1:20, p:v), seguido por centrifugação a 5.000 xg durante 5 min. A uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi acrescentado 1 mL de TCA 12% e agitado em vórtex. Posteriormente, foi adicionado 900 µL de tampão Tris-HCl 0,06M pH 7,4 e 1 mL TBA 0,73%, novamente agitado em vórtex e levado para aquecimento por 1 hora a 100°C. Após este período as amostras foram resfriadas em banho de gelo e centrifugadas a 5000 xg 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.

3.2.8 Vias de sinalização

Para investigar o envolvimento das vias de sinalização no mecanismo de toxicidade do Roundup® foram realizados ensaios de imunodeteccção utilizando anticorpos específicos para as formas totais e fosforilada das MAPKs (ERK1/2, JNK 1/2), da Akt e da GSK-3β. Fatias de hipocampo de ratos expostos ao Roundup® durante o período gestacional e lactacional foram lisadas e homogeneizadas em tampão contendo 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS e a

concentração de proteínas foi determinada (LOWRY et al., 1951). Quantidades iguais de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e analisadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (Trizma 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% e SDS 0,25%) (60 min). As membranas de nitrocelulose foram lavadas, seguida por uma incubação de 2h em solução de bloqueio (TBS; NaCl 0,5M, Trizma 20 mM e leite em pó desnatado 5%). Após a incubação, as membranas foram lavadas e então incubadas durante a noite (18h) a 4 °C com anticorpo primário (anti-ERK1/2, anti-fosfo-ERK1/2, anti-JNK1/2, anti-fosfo-JNK1/2, anti-Akt, anti-fosfo-Akt, anti-GSK3 β ou anti-fosfo-GSK3 β diluídos 1:2000). Após a incubação com os anticorpos, as membranas foram lavadas e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, diluído 1:2000) para posterior revelação. O blot foi revelado (Immobilon TM Western chemiluminescence HRP substrate kit) e as autoradiografias foram quantificados com scanner Hewlett-Packard Scanjet 6100C e a densidade óptica foi determinada com o programa OptiQuant versão 02.00 da Packard Instrument Company (ZAMONER et al., 2008).

3.2.9 Atividade enzimática

3.2.9.1 γ -Glutamyl-Transferase

Os hipocampus foram homogeneizados em Tampão Tris 100 mM pH 8,5 e a atividade enzimática da γ -Glutamyltransferase foi realizada através da seguinte reação: o grupo glutamil, da γ -Glutamyl-p-Nitroanilida (substrato) é transferido pela γ -GT para a Glicilglicina (receptor), com liberação de p-Nitroanilina, a qual é diazotada, gerando um composto final de cor rósea com uma absorbância que pode ser medida num comprimento de onda de 530 nm. Resultados foram expressos como U/L/ μ g proteína.

3.2.9.2 Glutamina Sintetase

Para o ensaio da enzima glutamina sintetase fatias de hipocampo foram homogeneizados em 150 μ L de Tampão de Lise (Imidazol 20 mM; KCl 150 mM; EDTA 0,1 mM – pH 6,8), em seguida as amostras foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi separado. 50 μ L deste sobrenadante foi adicionado em 100 μ L de imidazol-HCl 80 mM, pH 7,0 (imidazol-HCl 80 mM,

glutamina 30 mM, $MnCl_2$ 3 mM, hidroxilamina-HCl 30 mM, arseniato de sódio 20 mM, ADP 4 mM). Após 30 minutos de incubação a 37°C a reação foi parada por adição de 200 μ L de uma mistura contendo $FeCl_3$ 3,7 mM; Ácido tricloroacético 1,2 M; HCl 10 M e água. O produto da reação, γ -glutamilhdroxamato, foi medido a 540 nm utilizando um leitor de ELISA e convertido para a quantidade de produto formado por comparação com uma curva padrão. A atividade enzimática foi expressa como mM hidroxamato/mg proteína (SHAPIRO; STADTMAN, 1970; STADTMAN et al., 1970; COSTA et al., 2012).

3.2.9.3 Alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase

Os hipocampos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e a atividade enzimática foi medida colorimetricamente. A alanina aminotransferase (ALT/TGP) catalisa especificamente a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. A aspartato aminotransferase (AST/TGO) catalisa especificamente a transferência do grupo amina do aspartato para o 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. Os resultados foram expressos como U/L/ μ g proteína.

3.2.9.4 Lactato Desidrogenase

Os hipocampos foram homogeneizados em Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e a atividade enzimática da Lactato desidrogenase foi determinada através de uma mistura de reagentes contendo lactato (substrato), difosfopiridino nucleótido (NAD^+), fenazina metossulfato (FMS), alumínio férrico e 1,10-fenantrolina, utilizando a reação de lactato à piruvato, com determinação quantitativa e simultânea do NADH formado na reação enzimática. Os resultados foram expressos como % do controle.

3.2.9.5 Glicose-6-fosfato Desidrogenase

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) foi determinada através da reação com G6PD na presença do $NADP^+$, que

catalisa a oxidação da G-6P a 6-fosfogliconato. O NADPH produzido é medido colorimetricamente de modo cinético, corrigindo para atividade enzimática de acordo com a concentração de proteína (hipocampo homogeneizado em Tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4). Resultados foram expressos como U/ μ g de proteína.

3.2.10 Concentração de Proteínas

A concentração de proteínas 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.

3.2.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações feitas em triplicata. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey-Kramer. Também foi utilizado para avaliação de algumas amostras o teste “t” de Student. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

4 RESULTADOS

Neste trabalho foram utilizados modelos experimentais de exposição materna e tratamento *in vitro*, assim como de exposição materna ao pesticida Roundup®, durante os períodos gestacional e pós-natal, com o intuito de avaliar as alterações bioquímicas induzidas no hipocampo de ratos imaturos. Foram determinados o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, a captação e liberação de L-[^3H]glutamato, o acúmulo de aminoácidos neutros, os níveis de GSH e TBARS, assim como a atividade das enzimas GS, γ -GT, G6PD, AST e ALT no hipocampo de ratos controles e tratados *in vivo* ou *in vitro* com Roundup®.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* ATRAVÉS DA CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ E VIABILIDADE CELULAR

Para investigar o efeito do Roundup® sobre o influxo de Ca^{2+} , fatias de hipocampo foram incubadas com $0,1 \mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ durante 30 minutos com concentrações do agrotóxico variando de 0,00005 a 0,1%. Também foi avaliada, nestas mesmas condições, a viabilidade celular através da determinação da atividade da LDH citosólica liberada no meio extracelular (meio de incubação).

Conforme demonstrado na figura 12 nossos resultados demonstraram que o Roundup® leva a um aumento no influxo de Ca^{2+} na concentração de 0,01% (Figura 12A), sugerindo que este agrotóxico é capaz de induzir o fenômeno de excitotoxicidade. Esta mesma concentração também induziu a morte celular, como demonstrado pela liberação da enzima LDH para o meio extracelular. Entretanto, a concentração de 0,1 % não alterou o influxo de Ca^{2+} , mas promoveu uma proporção maior de morte celular em relação às demais concentrações (Figura 12B). Sendo assim, os experimentos subsequentes envolvendo os estudos *in vitro* foram realizados com Roundup® na concentração de 0,01% com o intuito de investigar os mecanismos envolvidos na neurotoxicidade deste herbicida. As barras correspondentes ao tratamento *in vivo* com o Roundup® estão representadas em verde e aquelas relacionadas ao tratamento *in vitro* estão em azul nos gráficos subsequentes.

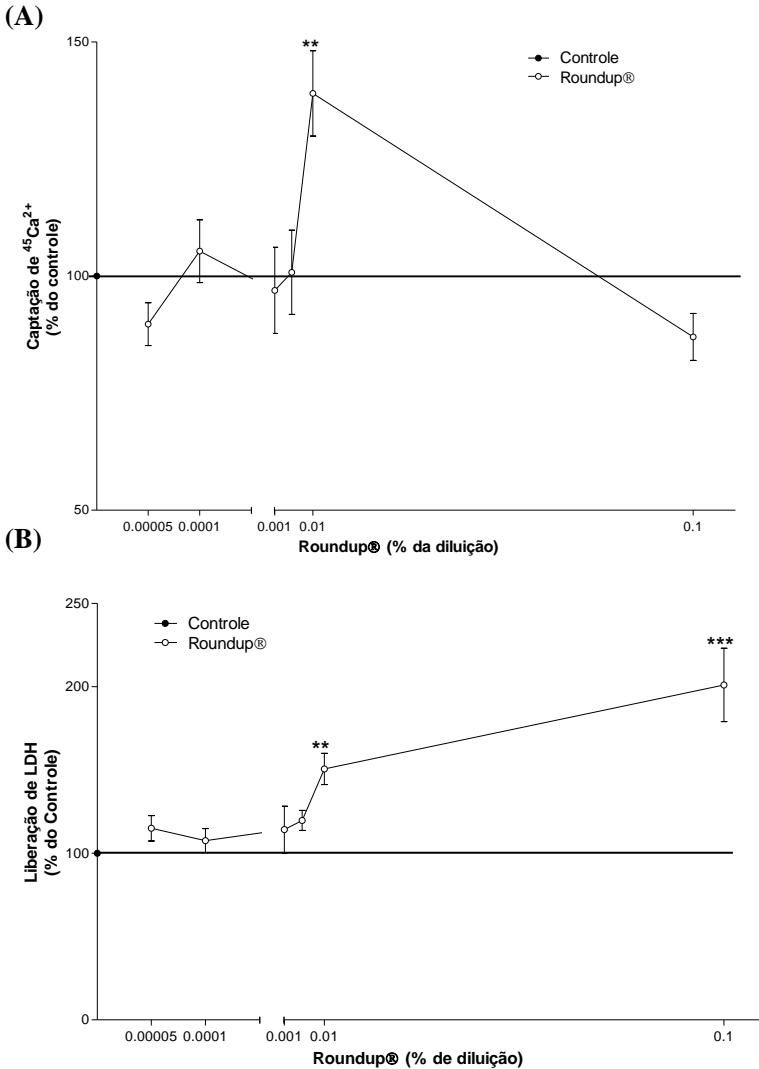


Figura 12 - Efeito do Roundup® na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (A) e na viabilidade celular (B) em hipocampo de ratos imaturos. Fatias do tecido foram expostas durante 30 minutos com o agrotóxico. Os resultados foram expressos como % do controle. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através teste ANOVA de uma via seguida por teste de comparação múltipla Tukey-Kramer: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

O efeito da exposição ao Roundup® durante o período gestacional e lactacional sobre o influxo de Ca^{2+} também foi investigado em fatias de hipocampo de ratos imaturos. Similarmente aos resultados observados após incubação *in vitro*, o tratamento *in vivo* com o pesticida induziu o aumento na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Figura 13).

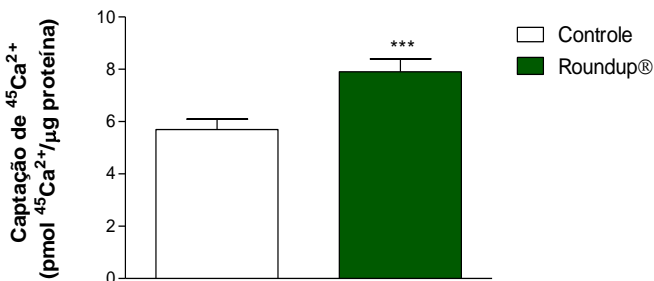


Figura 13 - Efeito da exposição ao Roundup® durante os períodos gestacional e lactacional na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampo de ratos imaturos. Tratamento *in vivo* com 1% de Roundup® na água de beber durante período gestacional e lactacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. Resultados foram expressos pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /μg de proteína. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste *t* de Student: *** $p < 0,0001$ (N=8).

4.2 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NA TOXICIDADE OCACIONADA PELO ROUNDUP® SOBRE CÉLULAS HIPOCAMPAIS

A fim de investigar o envolvimento do sistema glutamatérgico na toxicidade induzida pelo Roundup® em fatias de hipocampo de ratos imaturos, experimentos *in vivo* e *in vitro* investigando a liberação e a captação de glutamato foram realizados após tratamento com o herbicida.

Os resultados mostraram que o tratamento *in vivo* com Roundup® promoveu diminuição na captação de L-[^3H]glutamato (Figura 14), corroborando com altos níveis deste neurotransmissor na fenda sináptica, o que está de acordo com o aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ demonstrado anteriormente, sugerindo a indução do fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica.

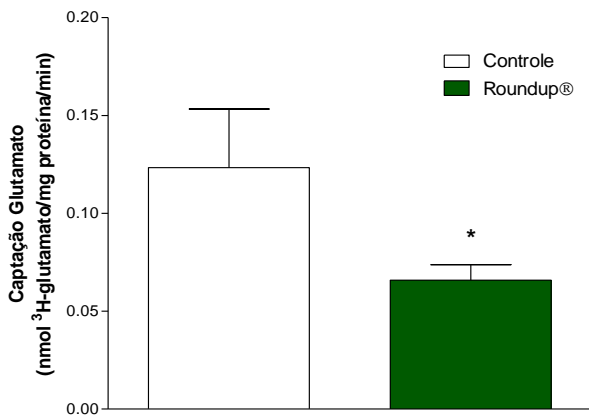


Figura 14 - Efeito da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na captação de L-[³H]glutamato em hipocampo de ratos de 15 dias de idade. Tratamento *in vivo* com 1% de Roundup® na água de beber durante período gestacional e lactacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. Resultados são expressos como média \pm SEM. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,001$ (N=8).

O efeito da exposição aguda ao Roundup® foi avaliado tanto sobre a captação dependente de Na⁺ quanto na independente deste íon (Figura 15 A e B). Quanto aos resultados *in vitro* para a captação de glutamato, estes seguiram o mesmo padrão obtido com o modelo *in vivo*, onde ocorreu uma diminuição na captação de glutamato dependente de Na⁺ (Figura 15 A) 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. Entretanto, observou-se aumento na captação de glutamato independente de Na⁺ (Figura 15 B), o que provavelmente deve ser consequência da ativação do trocador glutamato/cistina. Além disso, os resultados mostraram aumento na liberação de glutamato (Figura 15 C) após exposição *in vitro* das fatias de hipocampo com o Roundup®. Em conjunto (Figura 15), estes dados fortemente sugerem a indução de excitotoxicidade glutamatérgica.

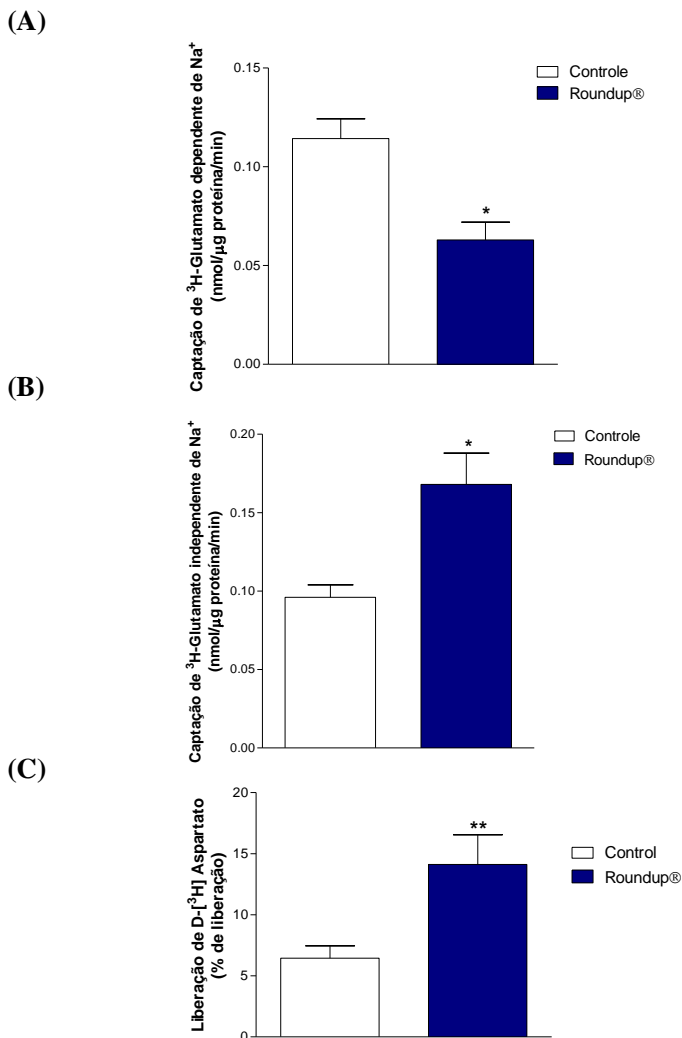


Figura 15 - Envolvimento do sistema glutamatérgico no mecanismo de ação do Roundup® em hipocampo de ratos imaturos. Fatias de hipocampo foram expostas ao Roundup® durante 30 min., e foram avaliadas a captação de L-[³H]glutamato dependente e a independente de Na⁺, assim como a liberação deste neurotransmissor. Para os ensaios de liberação do aminoácido excitatório glutamato, utilizou-se o análogo não metabolizável D-[³H]Aspartato. Os resultados são expressos como média ± SEM. Análise estatística: Teste “t” de Student. *p<0,01; **p<0.001.

O aumento na liberação do neurotransmissor excitatório glutamato associado à diminuição na sua captação indicam um aumento da quantidade de glutamato na fenda sináptica. Sendo assim, investigaram-se as enzimas envolvidas no metabolismo do glutamato, como a enzima chave do ciclo glutamato-glutamina, a glutamina sintetase (GS), e as aminotransferases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

Nos estudos de exposição *in vivo* (Figura 16A) verificamos diminuição na atividade da enzima ALT sem alterar a atividade da AST; entretanto, no modelo *in vitro* (Figura 17A), ambas as aminotransferases apresentaram atividade diminuída após exposição ao pesticida. Quanto a glutamina sintetase, tanto os experimentos envolvendo exposição *in vivo* (Figura 16B) quanto *in vitro* (Figura 17B) ao Roundup® demonstraram uma diminuição na atividade desta enzima.

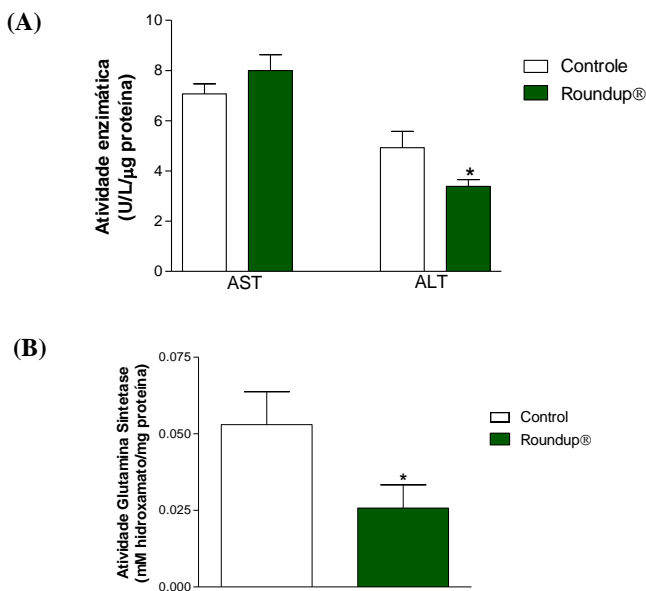


Figura 16 – Avaliação do efeito do tratamento com Roundup® no metabolismo do glutamato, focando as aminotransferases ALT e AST (A) e a enzima GS (B). Tratamento *in vivo* com 1% de Roundup® na água de beber durante período gestacional e pós-gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. Os resultados são expressos como média \pm SEM. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,01$ e ANOVA de uma via seguida do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (N=8).

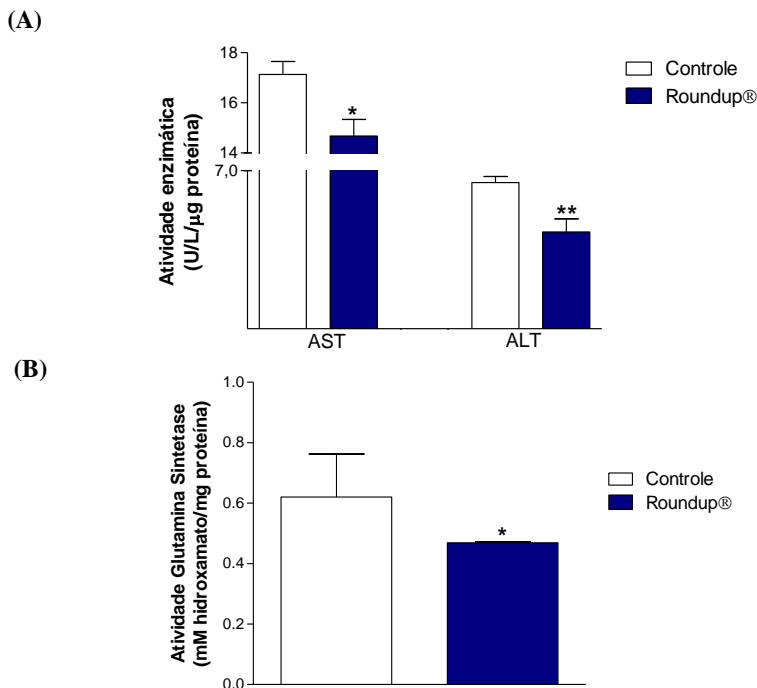
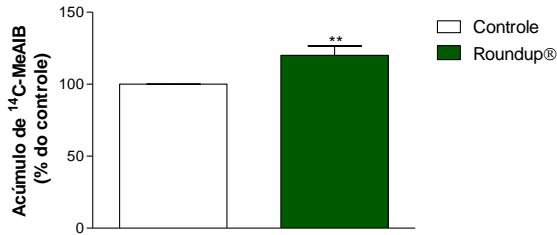


Figura 17 – Avaliação do efeito do tratamento com Roundup® no metabolismo do glutamato, focando as aminotransferases ALT e AST (A) e a enzima GS (B). Tratamento *in vitro*, com 0,01% Roundup®, durante 30 min. Os resultados são expressos como média \pm SEM. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,01$ e ANOVA de uma via seguida do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (N=8).

O transporte de aminoácidos é fundamental para aumentar sua disponibilidade para a síntese proteica ou para o metabolismo energético. O transporte de aminoácidos neutros utilizando o MeAIB como modelo é essencial para investigar sistemas de entrada de aminoácidos como a alanina e a glutamina. Sendo assim, investigou-se o efeito da exposição aguda e crônica ao Roundup® sobre o acúmulo de [14 C]-MeAIB em hipocampo dos ratos imaturos. Os resultados mostraram que tanto o tratamento *in vivo* quanto *in vitro* com o herbicida estimularam a entrada deste aminoácido em células neurais (Figura 18).

(A)



(B)

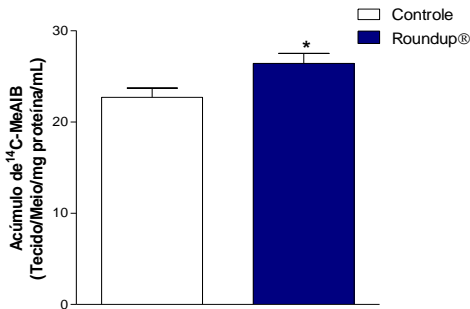


Figura 18 - Efeito do tratamento *in vivo* (A) e *in vitro* (B) do Roundup® no acúmulo de ¹⁴C-MeAIB em hipocampo de ratos imaturos, 15 dias de idade. Tratamento *in vivo* com 1% de Roundup® na água de beber durante período gestacional e pós-gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. Tratamento *in vitro*, com 0,01% Roundup®, durante 30 min. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foi determinada pelo teste “t” de Student: *p<0,01; **p<0,001.

4.3 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA TOXICIDADE GERADA PELA EXPOSIÇÃO AO AGROTÓXICO ROUNDUP®

A provável indução de estresse oxidativo desencadeada pelo Roundup® no hipocampo de ratos imaturos foi avaliada através da determinação do conteúdo do antioxidante mais prevalente no cérebro, a GSH, e pela atividade das enzimas envolvidas na regeneração deste antioxidante, a G6PD e a γ-GT. Também foi medida a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

O efeito da exposição *in vitro* com Roundup® elevando o conteúdo de TBARS (Figura 19) indica fortemente a indução de estresse oxidativo por este herbicida em hipocampo de ratos imaturos.

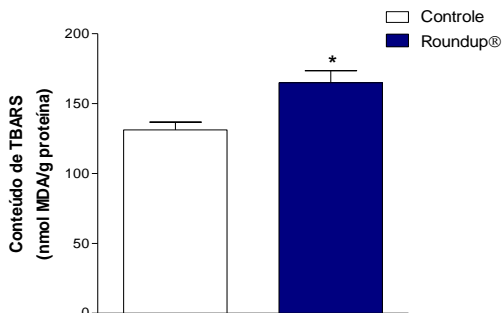


Figura 19 - Efeito do tratamento *in vitro* com Roundup® no conteúdo de TBARS no hipocampo de ratos imaturos. Tratamento *in vitro*, com 0,01% Roundup®, durante 30 min. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. Análise estatística: teste “t” de Student. * $p < 0,01$.

Os baixos níveis de GSH observados nas fatias hipocampais após ambas as formas de tratamento com Roundup®, *in vivo* e *in vitro* (Figura 20 A e B), confirmam a participação de eventos oxidativos no mecanismo de toxicidade deste agrotóxico.

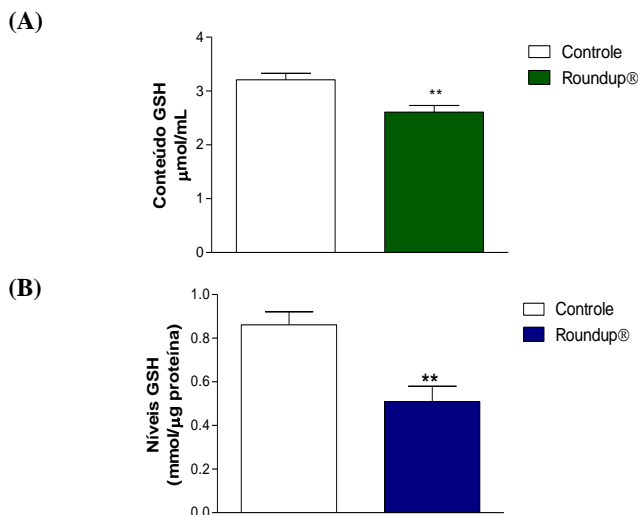
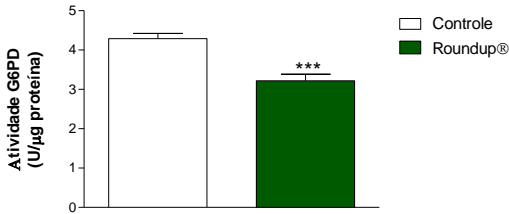


Figura 20 - Efeito do tratamento *in vivo* (A) e *in vitro* (B) com Roundup® no conteúdo de GSH no hipocampo de ratos imaturos. Tratamento *in vivo* com 1% de Roundup® na água de beber durante período gestacional e pós-gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. Tratamento *in vitro*, com 0,01% Roundup®, durante 30 min. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. Análise estatística: teste “t” de Student. ** $p < 0.001$.

A exposição aguda e crônica ao Roundup® induziu à inibição da atividade da enzima G6PD (Figura 21 A e B), responsável pela disponibilidade de NADPH para a redução da glutatona, em hipocampus imaturos.

(A)



(B)

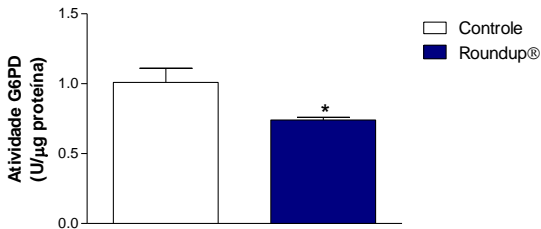


Figura 21 - Efeito do tratamento *in vivo* (A) e *in vitro* (B) com Roundup® na atividade enzimática da G6PD em hipocampo de ratos de 15 dias de idade. Tratamento *in vivo* com 1% de Roundup® na água de beber durante período gestacional e pós-gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. Tratamento *in vitro* com 0,01% Roundup®, durante 30 min. Resultados foram expressos como média \pm E.P.M. Análise estatística: Teste “t” Student. * $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Considerando-se que a γ -GT é a principal enzima envolvida no “turnover” da GSH, foi investigada a consequência do tratamento com Roundup® sobre a atividade desta enzima. Os resultados mostraram que a atividade da γ -GT está aumentada após exposição crônica ao Roundup®, enquanto que o tratamento *in vitro* induziu a inibição enzimática (Figura 22 A e B).

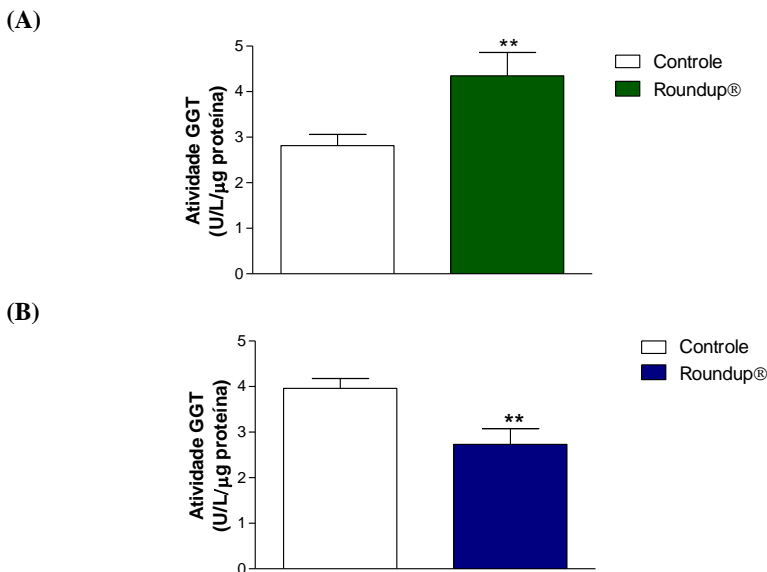


Figura 22 - Modulação da atividade da γ -glutamil transferase pelo Roundup® em hipocampo de ratos imaturos. Fatias do hipocampo foram expostas durante 30 minutos com ou sem 0,01% agrotóxico para tratamento *in vitro* (B) e os animais receberam 1% de Roundup® na água de beber, no tratamento *in vivo* (A). O tecido foi homogeneizado e a atividade enzimática foi determinada. Resultados são expressos como U/L/μg de proteína. Análise estatística: Teste “t” de Student. **P<0,001.

4.4 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE AÇÃO DO ROUNDUP® EM HIPOCAMPOS DE RATOS IMATUROS

Uma vez que os resultados apresentados sugerem que o Roundup® pode levar a excitotoxicidade glutamatérgica e morte celular, as possíveis vias de sinalização envolvidas nesses processos foram investigadas.

Como pode ser observado na figura 23, o tratamento com Roundup® induziu um aumento na fosforilação de duas das vias das MAPKs, a ERK 1/2 e a JNK 1/2, indicando a ativação destas. Também foi avaliada a participação da via Akt/GSK-3 β , figura 24, e em ambas houve um aumento estatisticamente significativo na fosforilação destas enzimas quando comparadas ao grupo controle. Estes dados demonstram a participação das rotas de transdução de sinais das

MAPKs e da Akt/GSK-3 β modulando os mecanismos do Roundup® em fatias hipocâmpais de animais expostos durante período pré e pós-gestacional, até 15 dias de idade.

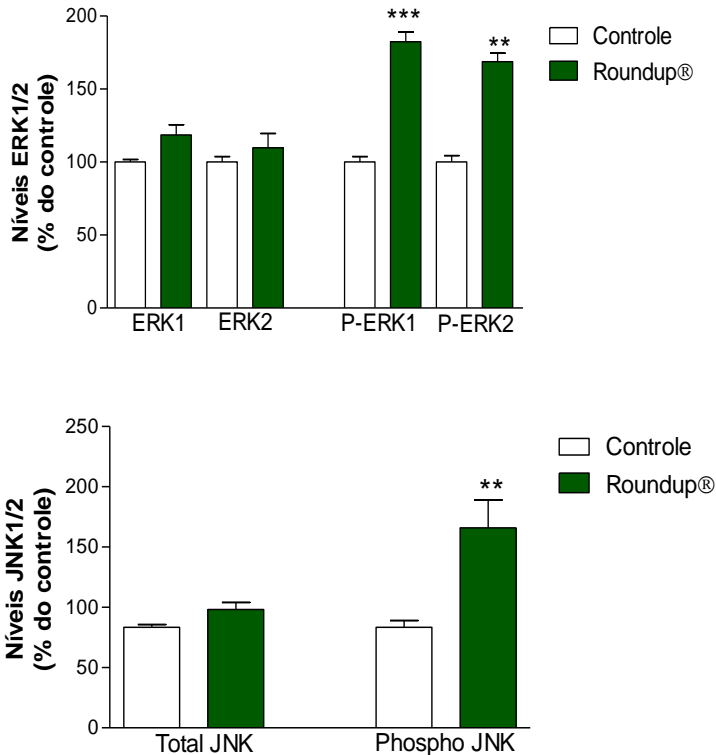


Figura 23 - Ativação das MAPKs ERK1/2 e JNK 1/2 ativadas pela exposição crônica ao Roundup® em células hipocâmpais de ratos imaturos. Níveis totais e fosforilados das MAPKs foram determinados por análise imunoblotting com anticorpos específicos. Tratamento *in vivo* com 1% de Roundup® na água de beber durante período gestacional e pós-gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. Resultados são expressos como média \pm SEM. Análise estatística: Teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$.

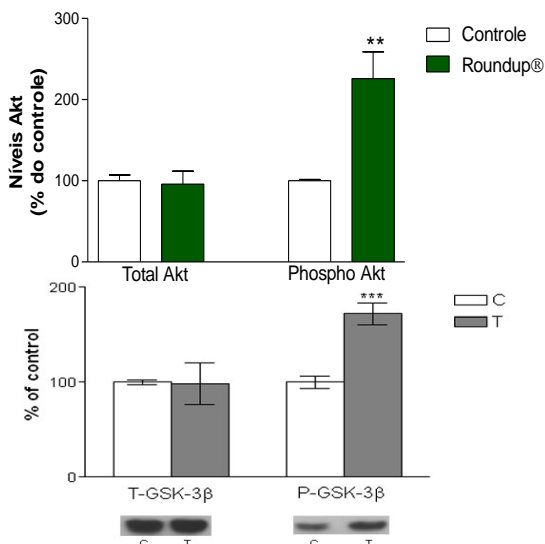


Figura 24 - Ativação das vias Akt e GSK-3 β ativadas pela exposição crônica ao Roundup® em células hipocâmpais de ratos imaturos. Níveis totais e fosforilados das vias foram determinados por análise de imunoblotting com anticorpos específicos. Tratamento *in vivo* com 1% de Roundup® na água de beber durante período gestacional e pós-gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. Teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$.

4.5 PARTICIPAÇÃO DE DIFERENTES ROTAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR NO MECANISMO DO ROUNDUP® SOBRE A ATIVIDADE DA γ -GT EM HIPOCAMPOS DE RATOS IMATUROS

Como verificado anteriormente, o tratamento com 0,01% Roundup® em fatias hipocâmpais de ratos imaturos (15 dias de idade) levou a uma diminuição da atividade da enzima γ -GT. Sendo assim, investigamos os mecanismos que podem estar modulando essa diminuição. Com intuito de avaliar a participação do receptor ionotrópico NMDA de glutamato na modulação da atividade da γ -GT, em fatias hipocâmpais, foram utilizados antagonistas (AP-5 e MK-801) e agonistas (NMDA/Gly) deste receptor. Os resultados mostraram que a associação NMDA/Gly, assim como o Roundup®, diminuiu a atividade da γ -GT (figura 25 B). Além disso, o AP-5 preveniu o efeito do Roundup® sobre a atividade da γ -GT (figura 25 A e B). Estes dados

indicam que a ativação dos receptores NMDA participa ativamente no mecanismo de toxicidade do pesticida sobre o SNC.

Para melhor entender o envolvimento das vias de sinalização da CaMKII, ERK e fosfolipase C (PLC), foram utilizados inibidores destas, como: KN-93 (Inibidor seletivo da CaMKII); PD98059 (inibidor da MEK) e U73122 (inibidor da PLC). Os resultados mostraram ainda que as vias da ERK/MAPK, da CaMKII e da PLC não participam do mecanismo do Roundup® sobre a modulação da γ -GT em hipocampo de ratos imaturos (Figura 25 C).

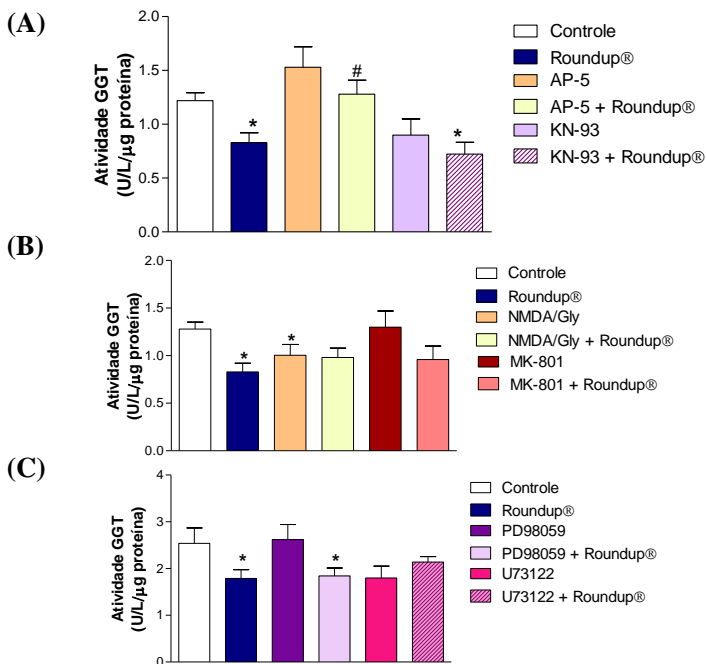


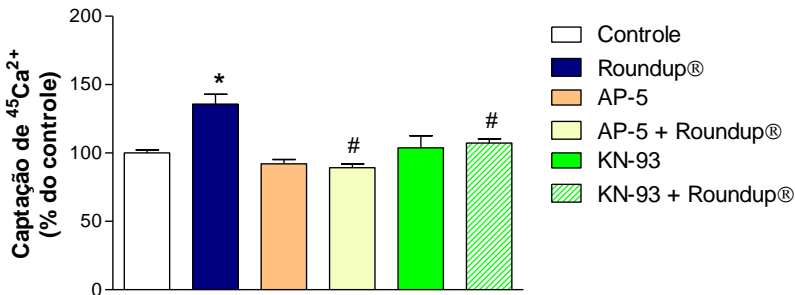
Figura 25 - Envolvimento das vias de sinalização e de receptores do sistema glutamatérgico no mecanismo do Roundup® na atividade da γ -GT em hipocampo de ratos imaturos. Fatias de tecido foram pré-incubadas na presença ou ausência de AP-5 10 μ M (antagonista NMDA), KN-9310 μ M (inibidor CaMKII), NMDA/Gly 100 μ M/10 μ M (agonista NMDA); MK-801 50 μ M (antagonista NMDA); PD98059 10 μ M (Inibidor ERK) ou U73122 1 μ M (Inibidor da PLC) e posteriormente expostas durante 30 min. com ou sem o Roundup® 0,01% e/ou inibidores. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. * $p < 0,01$ comparado com o grupo controle; # $P < 0,01$ comparado com grupo Roundup®.

4.6 MECANISMOS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS ENVOLVIDOS NA AÇÃO DO ROUNDUP® SOBRE O INFLUXO DE CÁLCIO EM HIPOCAMPOS DE RATOS IMATUROS

Para determinar se receptores glutamatérgicos ou canais de Ca^{2+} dependente de voltagem contribuem com os mecanismos de toxicidade ocasionados pelo Roundup®, as fatias hipocâmpais foram pré-incubadas por 15 minutos com inibidor do receptor de glutamato NMDA (AP-5) e inibidor de canal de Ca^{2+} dependente de voltagem do tipo L (nifedipina) e posteriormente incubadas por 30 minutos com Roundup®. Ambas as substâncias preveniram o aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ocasionado pelo pesticida, sugerindo a participação destes canais no influxo de Ca^{2+} .

Também foi estudada a participação das vias de sinalização da CaMKII, ERK, PKC, PKA e PLC na modulação do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por Roundup®. Para isso as fatias foram pré-incubadas por 15 minutos com KN-93 (inibidor CaMKII), PD98059 (inibidor da ERK), H89 (inibidor da PKA), Ro 31-8220 (inibidor da PKC) ou U73122 (inibidor da PLC). Interessantemente, apesar da CaMKII não estar envolvida no mecanismo de ação do Roundup® sobre a atividade da γ -GT, observou-se que esta cinase está intimamente relacionada ao influxo de Ca^{2+} induzido por Roundup® via receptores NMDA e/ou CCDV-L em células hipocâmpais, como demonstrado na Figura 26. Além da CaMKII, também demonstrou-se a participação da via da ERK/MAPK na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ desencadeada pelo herbicida. Entretanto, a PKA não está envolvida no mecanismo do Roundup®, enquanto a via PLC/PKC parecem desempenhar uma participação parcial na entrada de Ca^{2+} , considerando-se que tanto a incubação dos inibidores desta via ou do Roundup® isoladamente, assim como, a co-incubação destes inibidores com o herbicida produziram efeitos semelhantes (Fig. 26 A e B). Entretanto, os mecanismos envolvidos neste efeito não são conhecidos.

(A)



(B)

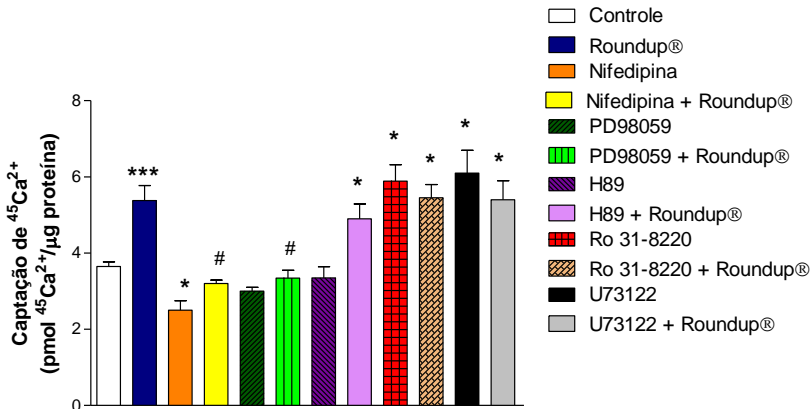


Figura 26 - Envolvimento das vias de sinalização e de receptores do sistema glutamatérgico no mecanismo do Roundup® no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampo de ratos imaturos. Fatias de tecido foram pré-incubadas na presença ou ausência de AP-5 10 μM (antagonista NMDA), KN-93 10 μM (inibidor CaMKII), Nifedipina 10 μM (Bloqueadora CCDV-L), PD98059 10 μM (Inibidor ERK), H89 10 μM (Inibidor PKA), Ro 31-8220 1 μM (Inibidor PKC) ou U73122 1 μM (Inibidor da PLC) e posteriormente expostas durante 30 min. com ou sem Roundup® 0,01% e/ou inibidores. Resultados foram expressos como porcentagem do controle ou em $\text{pmol } ^{45}\text{Ca}^{2+}/\mu\text{g}$ proteína. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida de teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. * $p < 0,01$ comparado com o grupo controle; # $P < 0,01$ comparado com grupo Roundup®.

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos vem sendo desenvolvidos quanto à exposição aguda e crônica aos agrotóxicos, e os resultados obtidos sugerem a ligação destas exposições com o desenvolvimento de uma variedade de condições clínicas, incluindo cânceres, distúrbios endócrinos, e uma série de doenças neurológicas (DALLEGRAVE et al, 2007; NEGGA et al., 2012; PARRÓN et al., 2011).

Em nosso estudo foram investigadas possíveis alterações ocasionadas pela exposição ao agrotóxico Roundup® em modelos animais *in vivo* e *in vitro*, visando o conhecimento dos mecanismos de ação envolvidos na toxicidade deste pesticida em hipocampo de ratos imaturos. Através dos modelos experimentais estudados demonstrou-se a indução do fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica, caracterizada pelo aumento no influxo de Ca^{2+} associado a maior disponibilidade de glutamato na fenda sináptica (diminuição na captação com aumento na liberação do neurotransmissor). Além disso, os resultados deste estudo mostraram alterações importantes no metabolismo do glutamato, assim como o envolvimento de diversas vias de sinalização celular no mecanismo excitotóxico do Roundup®.

Neste trabalho utilizou-se a formulação comercial Roundup® ao invés de somente seu princípio ativo, glifosato, pois diversos dados da literatura demonstram que esta formulação comercial apresenta maior toxicidade em relação ao seu princípio ativo (glifosato) utilizado isoladamente. Os autores propõem que a presença de adjuvantes, como o tensoativo polioxietilenoamina (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 (EL-SHENAWY, 2009; KOLLER et al., 2012; MESNAGE; BERNAY; SÈRALINI, 2012).

Embora avanços significativos na toxicologia de agrotóxicos tenham sido feitos ao longo das últimas décadas, a maioria das investigações examina a toxicidade de combinações de herbicidas utilizando, por exemplo, um herbicida e um inseticida ou um fungicida. Entretanto, de acordo com Song et al. (2012) a presença de surfactantes nas preparações comerciais de glifosato pode não só causar toxicidade direta, mas pode também resultar em efeitos tóxicos sinérgicos entre os componentes da formulação. Neste contexto, os autores enfatizam a necessidade de estudos não só com o agrotóxico isoladamente, mas também com as substâncias consideradas inertes nas formulações.

Nossos resultados apontam para um aumento no influxo de Ca^{2+} em fatias hipocâmpais tratadas com Roundup®. Sabe-se que esse aumento de Ca^{2+} intracelular de forma descontrolada pode levar a morte celular. De acordo com Bird e Putney (2006) o influxo de Ca^{2+} pode estar envolvido em diversas funções celulares e pode também ser regulado por diversos mecanismos, incluindo atividade de proteínas cinases, neurotransmissores, hormônios, nucleotídeos e fatores de crescimento. Por outro lado, o cálcio é um contribuinte chave para a morte neuronal excitotóxica. Sabe-se que altas concentrações intracelulares deste íon estão envolvidas na morte de neurônios em diversas condições patológicas, como nas doenças neurodegenerativas (GLEICHMANN; MATTSON, 2009).

A morte neuronal por excitotoxicidade resulta muitas vezes no aumento do Ca^{2+} intracelular subsequente a uma superexcitabilidade dos neurônios, através de uma excessiva ativação dos receptores de aminoácidos excitatórios ionotrópicos (MODY; MACDONALD, 1995). Este fenômeno comumente chamado de excitotoxicidade glutamatérgica é bastante conhecido e está ligado a várias doenças neurodegenerativas; e, baseia-se no aumento do glutamato na fenda sináptica, levando a uma superativação de seus receptores, principalmente os ionotrópicos, como o NMDA. A ativação desse receptor leva ao influxo de Ca^{2+} , sendo que uma ativação excessiva deste receptor induz a um aumento excessivo na concentração de Ca^{2+} intracelular, levando ao fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica (DANBOLT, 2001; PESSOA-PUREUR; WAJNER, 2007).

Neste contexto, o aumento no influxo de Ca^{2+} observado em hipocampo de ratos de animais expostos *in vivo* ou *in vitro* ao pesticida pode estar associado à excitotoxicidade glutamatérgica, descrita em diversas doenças neurodegenerativas. Entretanto, os mecanismos pelos quais o Roundup® induz o aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} não são conhecidos. Provavelmente, há uma combinação complexa de mecanismos que podem ser modulados por CCDV ou pelos níveis intracelulares do próprio Ca^{2+} . Além disso, não podemos descartar o possível envolvimento da modulação de Ca^{2+} -ATPases específicas, além da ativação de receptores acoplados a canais de Ca^{2+} , como o NMDA para o glutamato (DANBOLT, 2001; BIRD E PUTNEY, 2006). Com o intuito de verificar o envolvimento do sistema glutamatérgico nas alterações observadas no hipocampo de ratos expostos ao Roundup®, foi investigada a captação de L-[^3H]glutamato nesta estrutura cerebral. Observou-se diminuição significativa na captação específica (dependente de Na^+) do neurotransmissor excitatório glutamato em

ambos os modelos experimentais utilizados. Além disso, também foi observado o aumento na liberação de glutamato. Estes dados demonstram um aumento da transmissão glutamatérgica, com subsequente ativação dos receptores NMDA levando ao aumento no influxo de Ca^{2+} em hipocampo de animais expostos ao pesticida, evidenciando claramente o fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica induzido por Roundup®. Neste contexto, Deng et al. (2012) demonstraram uma diminuição na captação de glutamato mediada pela exposição crônica ao Manganês em células astrocíticas isoladas do córtex cerebral de ratos recém nascidos (1 dia de idade). Além disso, redução na captação de glutamato também foi associada a insultos neurotóxicos como isquemia e doenças neurodegenerativas (MOLZ; DAL-CIM; TASCA, 2009), corroborando nossos resultados. Jiang; Yan e Weng (2012) relataram que a baixa expressão de transportadores de glutamato gliais tem sido associada à hiperativação neuronal na dor neuropática e a deleção de genes de transportadores de glutamato gliais tem sido associada à excitotoxicidade neuronal e epilepsia.

O metabolismo do glutamato é um processo muito importante mediado pelos astrócitos, e tem como objetivo captar esse neurotransmissor da fenda sináptica, através de transportadores específicos dependentes de Na^+ , e conseqüentemente parar o processo de ativação dos receptores excitatórios pós-sinápticos desencadeado por ele (DANBOLT, 2001; COSTA et al., 2012). Esta regulação astrocítica da homeostase de glutamato é um aspecto crítico da função cerebral, pois acúmulo de níveis tóxicos de glutamato no espaço extracelular pode levar a excitotoxicidade devido a uma superativação dos receptores de glutamato e excessiva entrada de Ca^{2+} nos neurônios (STRUZYNSKA; CHALIMONIUK; SULKOWSKI, 2005; COSTA et al., 2012; COULTER; EID, 2012).

A inibição na atividade da GS tanto nos modelos *in vitro* quanto nos *in vivo*, indica uma deficiência na conversão de glutamato a glutamina, conseqüentemente aumentando os níveis do neurotransmissor. Salienta-se que a glutamina é considerada uma maneira não tóxica de transporte do glutamato (FERNANDES et al., 2010; CASTEGNA et al., 2011). Neste contexto, Deng e colaboradores (2012) demonstraram que exposição crônica ao manganês promove diminuição na captação de glutamato e na atividade da GS, indo de acordo com nossos achados após exposição ao Roundup®. Sendo assim, sugere-se que o Roundup®, tal como o Manganês, é um possível disruptor do sistema de transporte e do metabolismo do glutamato. Costa e

colaboradores (2012) também verificaram uma diminuição da atividade da GS após administração intrahipocampal de ácido ocadaico, inibidor de fosfatases, em ratos, sugerindo a participação destas enzimas na modulação da atividade da GS. Sendo assim, 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+} celular (CASTEGNA et al., 2011).

Além da GS, também apresentaram-se alteradas as atividades das aminotransferases ALT e AST. Segundo Zigmond e colaboradores (1999), mudanças na atividade de enzimas que convertem α -cetoglutarato em glutamato ou succinil-CoA, podem afetar a eficácia do ciclo de Krebs ou os níveis de glutamato intracelulares. As enzimas AST e ALT estão presentes tanto no citosol quanto na mitocôndria, sendo que a ALT esta envolvida na síntese do neurotransmissor glutamato em neurônios glutamatérgicos (DESAI; DESAI, 2008). Sendo assim, a modulação na atividade das aminotransferases após exposição ao Roundup® pode afetar a disponibilidade de glutamato nas células neurais.

Nos experimentos *in vitro* as duas enzimas apresentaram uma atividade diminuída após tratamento com Roundup®. O mesmo foi observado por Çağlar e Kolonkaya (2008) nos níveis destas enzimas no soro de ratos tratados com Roundup® numa dose de 56 a 560 mg/kg durante 5 a 13 semanas. Entretanto, em nossos resultados obtidos com modelo *in vivo*, apenas a ALT teve atividade diminuída, ao contrário, a aspartato teve um aumento de sua atividade. No estudo de Çavusoglu et al. (2011), após tratamento com uma dose intraperitoneal de 50 mg/kg de Roundup® em camundongos Swiss Albinos, os níveis de ALT/AST séricos foram aumentados. Os autores sugerem que o tempo de exposição ao Roundup® é um fator determinante na modulação da atividade destas enzimas, podendo desencadear tanto o estímulo quanto a inibição das aminotransferases.

O sistema A de transporte de aminoácidos neutros é a principal via envolvida na captação de glutamina dentro dos neurônios (KANAMORI; ROSS, 2004; JENSTAD et al., 2009) e serve como um controle para manter o equilíbrio glutamina/glutamato dentro dos neurônios e dos astrócitos. Esse transporte foi estimulado após exposição ao Roundup®, tal como demonstrado pelo aumento no acúmulo de ^{14}C -MeAIB observado no hipocampo de ratos tratados com o herbicida, o que pode estar contribuindo com a maior entrada de glutamina nos neurônios podendo levar a formação de glutamato no

interior dessas células. Morken et al. (2013) demonstraram recentemente que a transferência de glutamato a partir de neurônios para astrócitos foi muito mais baixa no cérebro de rato neonatal do que em um adulto, enquanto que a transferência de glutamina a partir de astrócitos para neurônios glutamatérgicos era relativamente mais elevada.

A geração de EROs leva a uma alteração nos mecanismos antioxidantes presentes no organismo, bem como uma mudança significativa em sistemas de enzimas antioxidantes (ASTIZ; ALANIZ; MARRA, 2009; ABDOLLAHI et al., 2004). GSH é o componente mais importante nos processos de defesa contra toxicidade de xenobióticos e componentes oxidantes a qual as células são expostas diariamente. O metabolismo normal requer constante e rápido reabastecimento de GSH, o qual é realizado através tanto da redução da GSSG quanto da síntese *de novo* (DICKINSON; FORMAN, 2002a).

Nossos resultados demonstraram uma diminuição nos níveis de GSH, tanto nos modelos *in vivo* quanto *in vitro*, sugerindo a indução de estresse oxidativo. Segundo Dickinson e Forman (2002b) a depleção de GSH pode ser resultante de reações de conjugação via glutathione S-transferase, ou pela formação de GSSG via aumento na produção de H₂O₂ e da atividade da glutathione peroxidase. Além disso, a inibição da captação de glutamato dependente de Na⁺, ou inibição do trocador cistina/glutamato resultam na depleção de glutathione e aumento no estresse oxidativo, sugerindo também um efeito tóxico do glutamato (TSAI et al., 1996; MICHAELIS, 1998; MCBEAN; FLYNN, 2001; KOGA et al., 2011). Neste contexto, Hultberg (2007) demonstrou que elevadas concentrações extracelulares de glutamato inibem competitivamente o trocador cistina/glutamato levando a depleção de glutathione e morte celular em células de glioma e em macrófagos.

El-Demerdash (2011) relata depleção nos níveis de GSH em homogenato de cérebro de ratos tratados com um inseticida de amplo espectro, composto de uma mistura de organofosforados e piretróides. O autor também verificou um aumento significativo nos níveis de TBARS. Esses resultados corroboram a diminuição do conteúdo de GSH e o aumento dos níveis de TBARS induzidos por Roundup® em hipocampo de ratos imaturos. A peroxidação lipídica é um processo que envolve a redução da integridade da membrana, podendo alterar diversas funções biológicas e contribuindo significativamente para o desenvolvimento das disfunções neurais observadas após exposição a pesticidas.

El-Shenawy (2009) demonstrou uma depleção tempo-dependente nos níveis de GSH e indução de estresse oxidativo via lipoperoxidação no fígado de ratos tratados intraperitonealmente com

uma dose sub-letal de Roundup® (269,9 mg/Kg) ou glifosato (134,95 mg/kg) a cada 2 dias, durante 2 semanas. Exposição oral a 1% de glifosato também causou lipoperoxidação no soro materno e no fígado de ratas grávidas, assim como nos fetos aos 21 dias de gestação (BEURET, ZIRULNIK; GIMÉNEZ, 2005). Os resultados sugerem que a excessiva indução da lipoperoxidação após ingestão de glifosato leva a uma sobrecarga nos sistemas antioxidantes materno e fetal. Cattaneo et al. (2011) demonstraram que a exposição a uma formulação de glifosato por 96 horas em diferentes concentrações provoca aumento nos níveis de TBARS, indicando peroxidação lipídica, em peixes *Cyprinus carpio*. Estes dados estão de acordo com nossos resultados obtidos em hipocampo de ratos. Além disso, Gehin, Guyon e Nicod (2006) observaram uma diminuição significativa de glutathione nos queratinócitos humanos, após tratamento com uma alta concentração de glifosato (10 mM).

Considerando-se a importância da GSH para a função das células neurais, investigou-se a atividade de duas enzimas chaves nos processos de regeneração da mesma, a G6PD e a γ -GT. O Roundup® causa diminuição na função do citocromo P450, da GST e da G6PD, enzimas fundamentais para o processamento de toxicantes no corpo (EL-SHENAWY, 2009). Nossos resultados demonstraram inibição na atividade da G6PD hipocampal em ratos expostos tanto *in vivo* quanto *in vitro* ao Roundup®. Deficiência na atividade desta enzima está relacionada a eventos oxidativos levando a alterações nas rotas de sinalização celular, desenvolvimento embrionário anormal e aumento na susceptibilidade a infecções virais e a doenças neurodegenerativas (HO; CHENG; CHIU, 2007). Dessa forma, os resultados demonstrando diminuição na atividade da G6PD corroboram o desencadeamento de possíveis eventos oxidativos no sistema nervoso que podem estar relacionados à depleção de GSH encontrada.

Neste contexto, a inibição da γ -GT observada após a exposição *in vitro* com Roundup® também pode desencadear a depleção de GSH intracelular, considerando-se que esta enzima é responsável pela degradação extracelular da GSH o que aumenta a disponibilidade de aminoácidos para serem captados pela célula e reutilizados na síntese *de novo* de GSH (DICKINSON; FORMAN, 2002a; ZHANG; FORMAN; CHOI, 2005). Entretanto, o tratamento *in vivo* com Roundup® induziu a atividade da γ -GT. A elevada atividade enzimática pode estar associada a um maior “turnover” da glutathione e/ou indução de estresse oxidativo neste tecido. Os mecanismos envolvidos nas respostas opostas obtidas nos diferentes modelos experimentais não são conhecidos. Entretanto, a

exposição crônica ao Roundup® desde o período gestacional pode estar alterando a expressão desta enzima na tentativa de restaurar a síntese *de novo* de GSH nas células neurais. A expressão da γ -GT é afetada por muitos fatores fisiológicos e patológicos. Recentemente, tem sido demonstrado que a expressão da γ -GT pode ser aumentada mediante a exposição a oxidantes, como uma resposta adaptativa para proteger contra o estresse oxidativo esta enzima facilita a recuperação da cisteína da GSH extracelular e exportação de GSH S-conjugados (ZHANG; FORMAN, 2009).

Estresse oxidativo, alterações na sinalização celular e excitotoxicidade são eventos clássicos em diversas doenças que acometem o SNC. É descrita também uma importante correlação entre exposição ocupacional a pesticidas e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como as doenças de Parkinson (WANG et al., 2006) e de Alzheimer (HAYDEN et al., 2010), entre outras. Com o intuito de compreender as vias de sinalização envolvidas nas alterações neurais induzidas pela exposição crônica ao Roundup®, investigou-se a possível ativação das vias das MAPKs, da Akt e da GSK3 β em hipocampo de ratos imaturos. Os resultados indicaram que o pesticida induziu a ativação/fosforilação da ERK1/2, JNK1/2, Akt e GSK3 β , demonstrando claramente que o Roundup® leva a modulação de vias de transdução de sinais e, conseqüentemente, a importantes alterações neuroquímicas no cérebro dos animais expostos.

De acordo com Fuster-Matanzo e colaboradores (2011) desregulação da GSK-3 β tem sido associada a várias condições neuropatológicas, incluindo transtorno de humor, esquizofrenia, doença de Huntington e doença de Alzheimer. Em sua pesquisa, os autores demonstraram que aumento nos níveis de GSK3 β induz uma perda neuronal no giro denteado do hipocampo dorsal, reforçando assim a hipótese que a GSK3 β contribui com a neurodegeneração.

Superexpressão de GSK3 β em camundongos transgênicos induz déficits de aprendizagem e algumas características associadas com a doença de Alzheimer, incluindo a atrofia do giro denteado (DG) (SIREROL-PIQUER et al., 2011). GSK3 β fosforila a proteína tau e contribui para hiperfosforilação desta seguida pela formação de emaranhados neurofibrilares, apoptose neuronal e disfunção sináptica (LY et al., 2013).

Cheng e colaboradores (2010) investigaram o papel da Sinvastatina e seus efeitos sobre a via Akt/GSK-3 β após hemorragia subaracnóidea experimental (SAH). Os resultados do estudo sugeriram que a sinvastatina melhora lesão cerebral aguda após SAH através da

ativação da via Akt/GSK3 β . Segundo Endo e colaboradores (2006) a via da Akt/GSK3 β desempenha um papel importante na morte/sobrevivência celular após uma variedade de estímulos. Eles sugerem que esta via pode estar envolvida na sobrevivência neuronal em lesão cerebral aguda após hemorragia subaracnóidea (SAH), já que a fosforilação da Akt e GSK3 β estava aumentada após a SAH e uma redução em sua fosforilação aumentou a lesão cerebral após SAH.

JNK são importantes cinases que respondem a estresse e que são ativadas por diferentes formas de ofensas, incluindo isquemia. Ativação desta via precede a morte celular por apoptose e inflamação em muitos tipos de células. Wang e colaboradores (2012) demonstraram, após estudos *in vivo*, que ocorre a ativação precoce e duradoura de JNK após a isquemia cerebral.

Algumas das principais vias de sinalização ativadas por uma lesão oxidante incluem cascatas de sinalização das MAPKs (ERK, JNK e MAPK p38), via fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K/Akt), fator nuclear (NF)- κ B, bem como p53. Destes, a ativação p53, JNK e p38 é mais frequentemente associada a apoptose após lesão oxidante, ao passo que a ativação da ERK e da PI3K/Akt promove a sobrevivência celular. Envolvimento da via JNK na morte celular foi observado anteriormente em células granulares cerebelares maduras após a depleção de potássio ou perda de potássio. Os autores citam que a ativação de JNK pode ser mediada pela produção de EROs (BERNTSEN et al., 2013). A ativação desta via através da produção de EROs pode também ser um possível mecanismo de ação para a indução de morte celular após uma exposição ao Roundup®.

Ativação aberrante de JNK é implicada na patogênese da doença de Alzheimer. Inibição farmacológica da JNK foi demonstrada por atenuar a ativação da microglia e a liberação de produtos químicos neurotóxicos incluindo citocinas pró-inflamatórias. As JNKs (JNK1, 2, e 3) são conhecidos como reguladores do gene de transcrição que tem papel importante na morte neuronal associada com doenças neurodegenerativas (MEHAN et al., 2011).

Nossos resultados mostraram que a associação NMDA/Gly, assim como o Roundup®, diminuiu a atividade da γ -GT. Além disso, o antagonista do receptor glutamatérgico do tipo NMDA (AP-5) preveniu o efeito do Roundup® sobre a atividade da γ -GT. Estes dados indicam que a ativação dos receptores NMDA participa ativamente no mecanismo de toxicidade do pesticida sobre o SNC. Além disso, demonstramos que os CCDV, bem como o receptor NDMA, contribuem

para a toxicidade ocasionada pelo Roundup® já que quando inibidos, o influxo de cálcio é revertido.

Também foi estudada a participação das vias de sinalização da CaMKII, ERK, PKC, PKA e PLC na modulação do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por Roundup®. Interessantemente, apesar da CaMKII não estar envolvida no mecanismo de ação do Roundup® sobre a atividade da γ -GT, observou-se que esta cinase está intimamente relacionada ao influxo de Ca^{2+} induzido por Roundup® via receptores NMDA e/ou CCDV-L em células hipocâmpais. Devido ao seu proeminente papel na sinalização neuronal do Ca^{2+} , a CaMKII pode contribuir com a neurodegeneração excitotóxica (ASHPOLE; HUDMON, 2011).

Além da CaMKII, também demonstrou-se a participação da via da ERK/MAPK na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ desencadeada pelo herbicida. Entretanto, a PKA não está envolvida no mecanismo do Roundup®, enquanto a via PLC/PKC parece desempenhar uma participação parcial na entrada de Ca^{2+} , considerando-se que tanto a incubação dos inibidores desta via ou do Roundup® isoladamente, assim como a co-incubação destes inibidores com o herbicida produziram efeitos semelhantes. Entretanto, os mecanismos envolvidos neste efeito não são conhecidos.

Dados emergentes de pesquisas pré-clínica e clínica sugerem um desequilíbrio do sistema de sinalização da PKC em transtornos de humor (SZABO et al., 2009; ABRIAL et al., 2011; ABRIAL et al., 2013).

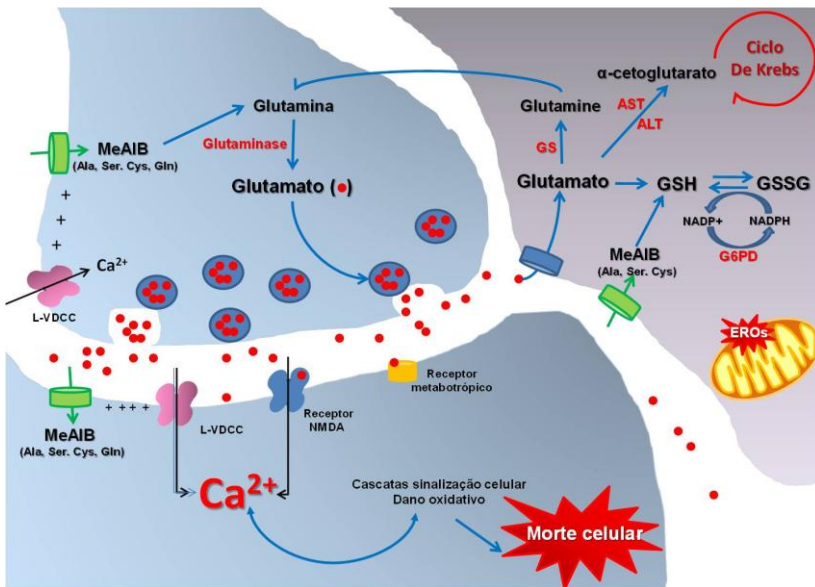
Com base nos dados obtidos com esse trabalho, verificamos que o Roundup® desencadeia um processo de excitotoxicidade glutamatérgica, via aumento da liberação do glutamato, diminuição da sua captação, aumento no influxo de Ca^{2+} , diminuição da atividade das enzimas relacionadas com o metabolismo do glutamato, e diminuição do antioxidante GSH, bem como de enzimas envolvidas em sua regeneração.

Este estudo tem rendido importantes achados quanto ao mecanismo de ação do Roundup®, que suportam a hipótese de que os mecanismos envolvidos na toxicidade do Roundup® são excitotoxicidade glutamatérgica, pois em hipocâmpos tratados com este agrotóxicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, foi demonstrado que este diminui a captação de glutamato da fenda sináptica, fazendo com que ocorra uma superativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos da classe NMDA com aumento do influxo de Ca^{2+} desencadeando a morte celular.

O conjunto dos resultados apresentados sugere fortemente a participação do Ca^{2+} , do sistema glutamatérgico e de estresse oxidativo

no mecanismo de toxicidade do Roundup® sobre o hipocampo de ratos imaturos. Os resultados também mostraram que a exposição ao glifosato-Roundup® durante os períodos pré- e pós-natal levou a diminuição nos níveis de GSH, induziu a atividade da γ -GT e inibiu da G6PD no hipocampo de ratos imaturos, indicando provável indução de estresse oxidativo neste tecido. Estes dados, associados ao aumento no influxo de Ca^{2+} , diminuição na captação de glutamato e ativação/fosforilação da ERK1/2, Akt, JNK1/2 e GSK3 β sugerem que o pesticida apresenta diversas consequências sobre a função do sistema nervoso, que podem estar associadas, pelo menos em parte a elevada prevalência de doenças neurológicas nos agricultores ocupacionalmente expostos. O mecanismo de toxicidade proposto para o Roundup® sobre células de hipocampo de ratos imaturos está representado na figura 27.

Figura 27 - Mecanismo de toxicidade proposto para o Roundup® sobre o hipocampo de ratos imaturos.



A formulação comercial do herbicida glifosato promove aumento da liberação e diminuição da captação do aminoácido excitatório glutamato, levando a ativação dos receptores glutamatérgicos, em especial o NMDA, com consequente aumento no influxo de Ca^{2+} e modulação de diferentes vias de sinalização celular. Estes processos parecem estar induzindo o fenômeno de

excitotoxicidade glutamatérgica, corroborado também pelas demais alterações observadas no metabolismo de aminoácidos: inibição da glutamina sintetase, modulação da AST e ALT, acúmulo de aminoácidos neutros e indução de estresse oxidativo.

Novos experimentos são necessários para esclarecer as consequências destas alterações neuroquímicas e os mecanismos pelos quais o glifosato atua sobre células neurais. O conhecimento dos alvos de ação para os agrotóxicos e de suas vias de sinalização pode fornecer futuramente alvos para intervenção terapêutica, preventiva e/ou diagnóstica em prol da melhora na qualidade de vida dos indivíduos expostos e na diminuição dos riscos de desenvolvimento de patologias supostamente associadas à exposição crônica a pesticidas.

6 CONCLUSÕES

- A formulação comercial Roundup®, contendo o herbicida glifosato, aumenta o influxo de Ca^{2+} em fatias de hipocampo de ratos imaturos, expostos tanto *in vivo* quanto *in vitro* ao agrotóxico, acarretando em morte celular;
- Os mecanismos envolvidos na captação de Ca^{2+} induzida pelo Roundup® são dependentes da entrada deste íon via receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e/ou CCDV-L;
- O Roundup® aumenta a liberação e diminui a captação do neurotransmissor excitatório glutamato, induzindo, provavelmente o fenômeno conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica em hipocampo de ratos imaturos;
- O transporte de aminoácidos neutros via sistema A (alanina, serina e glutamina), foi estimulado pela exposição ao Roundup® em hipocampo de ratos, conforme evidenciado pelo estudo utilizando o aminoácido modelo ^{14}C -MeAIB;
- Além de alterar o transporte de aminoácidos, a exposição ao pesticida Roundup® afetou o metabolismo do glutamato inibindo a atividade da glutamina sintetase, assim como da ALT; entretanto, a AST foi induzida apenas após tratamento *in vivo* com o herbicida;
- A atividade da γ -GT, enzima chave na regeneração da glutatona, foi induzida após exposição crônica ao Roundup®, enquanto que o tratamento *in vitro* com este pesticida resultou em inibição desta enzima;
- A atividade da G6PD, enzima responsável pela produção de NADPH para a redução da GSH, foi inibida pela exposição aguda ou crônica ao Roundup®;
- A indução de estresse oxidativo em hipocampo de ratos imaturos foi confirmada através do aumento nos níveis de TBARS e da redução nos níveis de GSH provocados por Roundup®;
- Os mecanismos de sinalização envolvidos na toxicidade do Roundup® sobre o hipocampo são dependentes da ativação das vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} , da PLC/PKC, MAPKs (ERK1/2 e JNK1/2), CaMKII, Akt e GSK3 β .

7 PERSPECTIVAS

Este estudo apresenta inúmeras perspectivas. Estamos padronizando novas técnicas para avaliar o mecanismo de morte neuronal, assim como pretendemos realizar a análise morfométrica em hipocampo dos animais cronicamente expostos ao Roundup®. As modificações no transporte e metabolismo de aminoácidos sugerem que o déficit energético pode estar envolvido no mecanismo de toxicidade do Roundup®. Sendo assim, pretende-se melhor investigar a participação de diferentes sistemas de defesa antioxidante, de enzimas envolvidas no metabolismo energético celular, bem como a formação de espécies reativas nos efeitos tóxicos induzidos por Roundup® sobre o hipocampo de ratos em desenvolvimento.

REFERÊNCIA

ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, v. 10, p. 141-7, 2004.

ABRIAL, E.; ETIEVANT, A.; BÉTRY, C.; SCARNA, H.; LUCAS, G.; HADDJERI, N.; LAMBÁS-SEÑAS. Protein kinase C regulates mood-related behaviors and adult hippocampal cell proliferation in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 43, p. 40-48, 2013.

ABRIAL, E.; LUCAS, G.; SCARNA, H.; HADDJERI, N.; LAMBÁS-SEÑAS, L. A Role for the PKC Signaling System in the Pathophysiology and Treatment of Mood Disorders: Involvement of a Functional Imbalance? **Mol Neurobiol.**, v. 44, p. 407-419, 2011.

AGRA, N. G.; SANTOS, R. F. **Agricultura brasileira: situação atual e perspectivas de desenvolvimento**. Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural. Recife, 2001.

AINGE, J. A.; VAN DER MEER, M. A.; LANGSTON, R. F.; WOOD, E. R. Exploring the role of context-dependent hippocampal activity in spatial alternation behavior. **Hippocampus**, v. 17, p. 988-1002, 2007.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4 ed. New York, 2002.

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

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.

AMARAL, D. G.; LAVENEX, P. **Hippocampal neuroanatomy**. In: ANDERSEN, P.; MORRIS, R. G.; AMARAL, D. G.; BLISS, T.;

O'KEEFE, J. (Eds.), *The Hippocampus Book*. Oxford University Press: New York, p. 37–114, 2007.

ANADÓN, A.; DEL PINO, J.; MARTÍNEZ, M.A.; CABALLERO, V.; ARES, I.; NIETO, I.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.

Neurotoxicological effects of the herbicide glyphosate. In: 45th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2008), 5–8 October, Rhodes, Greece. **Toxicol.Lett.** 180S, S164, 2008.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A.; CASTELLANO, V. J.; MARTÍNEZ, M.; MARTIN, M. T.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology letter**, v. 190, p 91–95, 2009.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monitoramento do Mercado de Agrotóxicos: Observatório da Indústria de Agrotóxicos, 2010. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 01 out.2011.

ARMANO, S.; COCO, S.; BACCI, A.; PRAVETTONI, E.; SCHENK, U.; VERDERIO, C.; VAROQUIS, H.; ERICKSON, J. D.; MATTEOLI, M. Localization and Functional Relevance of System A Neutral Amino Acid Transporters in Cultured Hippocampal Neurons. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 10467-10472, 2002.

ASHPOLE, N. M.; HUDMON, A. Excitotoxic neuroprotection and vulnerability with CaMKII inhibition. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 46, p. 720-730, 2011.

ASTIZ, M.; ALANIZ, M. A. T.; MARRA C. A. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 465-473, 2009.

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

BENACHOUR, N.; SIPAHUTAR, H.; MOSLEMI, S.; GASNIER, C.; TRAVERT, C.; SERALINI, 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.; SÉRALINI, G.-E. Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, p. 97-105, 2009.

BERNTSEN, H. F.; WIGESTRAND, M. B.; BOGEN, I. L.; FONNUM, F.; WALAAS, S. I.; MOLDES-ANAYA, A. Mechanisms of penitrem-induced cerebellar granule neuron death in vitro: possible involvement of GABAA receptors and oxidative processes. **NeuroToxicology**, s.n., 2013.

BEST, P. J.; WHITE, A. M. Placing hippocampal single-unit studies in a historical context. **Hippocampus**, v. 9, p. 346–51, 1999.

BEURET, C. J.; ZIRULNIK, F.; GIMÉNEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. **Reproductive Toxicology**, v.19, p. 501-504, 2005.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med**, 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: SIEGEL, G.J.; ALBERS, R.W.; BRADY, S.T.; PRICE, D.L. (Eds). **Basic Neurochemistry – Molecular, Cellular, and Medical Aspects**.7.ed. Canada: Elsevier Academic Press, 2006.

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

BLANKENSHIP, A. G.; FELLER, M. B. Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. **Nature reviews**, v. 11, 2010.

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.

BONDY, S. C.; CAMPBELL, A. Mini-Review: Developmental Neurotoxicology. **Journal of Neuroscience Research**, v. 81, p. 605–612, 2005,

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

BRONGHOLI, K.; SOUZA, D. G.; BAINY, A. C. D.; DAFRE, A. L.; TASCA, C. I. Oxygen-glucose deprivation decreases glutathione levels and glutamate uptake in rat hippocampal slices. **Brain Research**, v. 1083, p. 211 – 218, 2006.

ÇAĞLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environ. Toxicol Pharmacol.**, v. 25, p. 57-62, 2008.

CASTEGNA, A.; PALMIERI, L.; SPERA, I.; PORCELLI, V.; PALMIERI, F.; FABIS-PEDRINI, M. J.; KEAN, R. B.; BARKHOUSE, D. A.; CURTIS, M. T.; HOOPER, D. C. Oxidative stress and reduced glutamine synthetase activity in the absence of inflammation in the cortex of mice with experimental allergic encephalomyelitis. **Neuroscience**, v. 185, p. 97-105, 2011.

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. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 87, p. 597-602, 2011.

ÇAVUŞOĞLU, K.; YAPAR, K.; ORUÇ, E.; YALÇIN, E. Protective effect of *Ginkgo biloba* L. leaf extract against glyphosate toxicity in Swiss Albino mice. **J Med Food**, v. 14, p. 1263-1272, 2011.

CHEN, X. P.; CHEN, W. Z.; WANG, F. S.; LIU, J. X. Selective cognitive impairments are related to selective hippocampus and prefrontal cortex deficits after prenatal chlorpyrifos exposure. **Brain Res.**, v. 1474, p. 19-28, 2012.

CHENG G.; CHUNLEI W.; PEI W.; ZHEN L.; XIANGZHEN L. Simvastatin activates Akt/glycogen synthase kinase-3 β signal and inhibits caspase-3 activation after experimental subarachnoid hemorrhage. **Vascul Pharmacol.**, v. 52, p. 77-83, 2010.

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. 131, p. 1047-1058, 2007.

COSTA, A. P.; TRAMONTINA, A. C.; BIASIBETTI, R.; BATASSINI, C.; LOPES, M. W.; WARTCHOW, K. M.; BERNARDI, C. TORTORELLI, L. S.; LEAL, R. B.; GONÇALVES, C. A. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. **Behav Brain Res.**, v. 226, p. 420-427, 2012.

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

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; OLIVEIRA, R. T.; ANDRADE, A. J. M.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Arch Toxicol**, v. 81, p. 665-673, 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.

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.

- 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. **Biol Trace Elem Res**, 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.
- DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Glutathione in Defense and Signaling: Lessons from a Small Thiol. **Ann. N.Y.Acad. Sci.**, v. 973, p. 488-504, 2002a.
- DICKINSON, D.A; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochemical pharmacology**, v. 64, p. 1019-1026, 2002b.
- DOLIŃSKA, M.; ZABŁOCKA, B.; SONNEWALD, U.; ALBRECHT, J. Glutamine uptake and expression of mRNA's of glutamine transporting proteins in mouse cerebellar and cerebral cortical astrocytes and neurons. **Neurochemistry International**, v. 44, p. 75-81, 2004.
- DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p.649-671, 2000.
- 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.
- ELIE-CAILLE, C.; HEU, C.; GUYON, C.; NICOD, L. Morphological damages of a glyphosate-treated human keratinocyte cell line revealed by a micro- to nanoscale microscopic investigation. **Cell Biol Toxicol**, v. 26, p 331-339, 2010.
- EL-SHENAWY, N. S. Oxidative stress response of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 379-385, 2009.
- ENDO H.; NITO C.; KAMADA H.; YU F.; CHAN P. H. Akt/GSK3beta survival signaling is involved in acute brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. **Stroke**, v. 37, p. 2140-6, 2006.

FAN, M. M.; RAYMOND, L. A. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. **Prog Neurobiol.**, v. 81, p. 272-293, 2007.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures? **Neuron.**, v. 14, p. 7-19, 2010.

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.

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.

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

FUSTER-MATANZO, A.; LLOREN-MARTÍN, M.; BARREDA, E. G.; ÁVILA, J.; HERNÁNDEZ, F. Different Susceptibility to Neurodegeneration of Dorsal and Ventral Hippocampal Dentate Gyrus: A Study with Transgenic Mice Overexpressing GSK3b. **PLoS One**, v. 6, 2011.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M.-C.; SÉRALINI, Gilles-Eric. 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.

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.

GUI, Y-X.; FAN, X.-N.; WANG, H.-M.; WANG, G.; CHEN, S.-D. Glyphosate induced cell death through apoptotic and autophagic mechanisms. **Neurotoxicology and Teratology**, v.34 p. 344-349, 2012.

GUILHERME, S.; GAIVÃO, I.; SANTOS, M. A.; PACHECO, M. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide – Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. **Mutation Research**, v. 743, p. 1-9, 2012.

GUPTA, P. K. Pesticide exposure – Indian scene. **Toxicology**, v. 198, p. 83-90, 2004.

GUPTA, P. K. Toxicity of herbicides. In: GUPTA, R. C. **Veterinary toxicology**. USA, KY: Murray State University, p. 567-586, 2007.

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. **Neurochem.**, v. 25, p. 235–241, 1994.

HAEUSGEN, W.; BOEHM, R.; ZHAO, Y.; HERDEGEN, T.; WAETZIG, V. Neuroscience Forefront Review Specific Activities of Individual C-Jun N-Terminal Kinases in the Brain. **Neuroscience**, v. 161, p. 951-959, 2009.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem.**, v.97, p. 1634-1658, 2006..

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Free radicals in biology and medicine, 3ed. Clarendon, Oxford, 2000.

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.

HEMELRIJCK, M. V.; JASSEM, W.; WALLDIUS, G.; FENTIMAN, I. S.; HAMMAR, N.; LAMBE, M.; GARMO, H.; JUNGNER, I.; HOLMBERG, L. Gamma-glutamyltransferase and risk of cancer in a cohort of 545,460 persons – the Swedish AMORIS study. **Europens Journal of Cancer**, v. 47, p.2033-2041, 2011.

HO, H. Y., CHENG, M. L.; CHIU, D. T. Glucose-6-phosphate dehydrogenase – from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. **Redox Rep.**, v 12, p. 109–118, 2007.

HOU, G.; YANG, X.; YUAN, T.-F. Hippocampal Asymmetry: Differences in Structures and Functions. **Neurochem Res**, 2013.

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.

HULTBERG, M. Cysteine turnover in human cell lines is influenced by glyphosate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, p. 19-22, 2007.

IKONOMIDOU, C.; BOSCH, F.; MIKSA, M.; BITTIGAU, P.; VÖCKLER, J.; DIKRANIAN, K.; TENKOVA, T. I.; STEFOVSKA, V.; TURSKI, L.; OLNEY, J. W. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. **Science.**, v. 283, p. 70-74, 1999.

JANG, H. J.; YANG, Y. R.; KIM, J. K.; CHOI, J. H.; SEO, Y. K.; LEE, Y. H.; LEE, J. E.; RYU, S. H. SUH, P. G. Phospholipase C- γ 1 involved in brain disorders. **Advances in Biological Regulation**, p. 1-12, 2012.

JENSTAD, M.; QUAZI, A.Z.; ZILBERTER, M.; HAGLERØD, C.; BERGHUIS, P.; SADDIQUE, N.; GOINY, M.; BUNTUP, D.; DAVANGER, S.; S HAUG, F.M.; BARNES, C.A.; MCNAUGHTON, B.L.; OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J.; HARKANY, T.; CHAUDHRY, F.A. System A transporter SAT2 mediates replenishment

of dendritic glutamate pools controlling retrograde signaling by glutamate. **Cereb. Cortex**, v. 19, p. 1092-106, 2009.

JIA Z.; MISRA H.P..Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (sh-sy5y) cytotoxicity: role of NFkappaB and caspase-3. *Free Radical Biology & Medicine*; v. 42, p.288-98, 2007.

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.

KALIVAS, P. W. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction.**Nature Reviews**, v.10, 2009.

KANAMORI, K.; ROSS, B. D. Quantitative determination of extracellular glutamine concentration in rat brain, and its elevation in vivo by system A transport inhibitor, alpha-(methylamino)isobutyrate. **J. Neurochem.**, v. 90, p. 203-10, 2004.

KAPFHAMER, D.; KING, I.; ZOU, M. E.; LIM, J. P.; HEBERLEIN, U.; WOLF, F. W. JNK Pathway Activation Is Controlled by Tao/TAOK3 to Modulate Ethanol Sensitivity. **PLoS One**, v. 7, 2012.

KESAVACHANDRAN, C.; SINGH, V.K.; MATHUR, N.; RASTOGI, S.K.; SIDDIQUI, M.K.; REDDY, M.M.; BHARTI, R.S.; KHAN, A.M. Possible mechanism of pesticide toxicity-related oxidative stress leading to airway narrowing. **Redox Report**, v.11, p.159-62, 2006.

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.**Arch Toxicol**, v. 86, p. 805-813, 2012.

KRISHNA M., NARANG H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cell Mol Life Sci.**, v. 65, p. 3525-44, 2008.

LANOUE, K. F.; BERKICH, D. A.; CONWAY, M.; BARBER, A. J.; HU, L. Y.; TAYLOR, C.; HUTSON, S. Role of specific aminotransferases in de novo glutamate synthesis and redox shutting in the retina. **Journal of Neuroscience Research**, v. 66, p. 914-922, 2001.

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.

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.

LI, X.; ZHU, W.; ROH, M. S.; FRIEDMAN, A. B.; ROSBOROUGH, K.; JOPE, R. S. In Vivo Regulation of Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK3 β) by Serotonergic Activity in Mouse Brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 1426-1431, 2004.

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

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

LUEKEN, A.; JUHL-STRAUSS, U.; KRIEGER, G.; WITTE, I. Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H₂O₂) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. **Toxicology Letters**, v. 147, p. 35-43, 2004.

LY P. T. T.; WU Y.; ZOU H.; WANG R.; ZHOU W.; KINOSHITA A.; ZHANG M.; YANG Y.; CAI F.; WOODGETT J.; SONG W. Inhibition

of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. **J Clin Invest.**, v. 2, p. 224-235, 2013.

MAGUPALLI, V. G.; MOCHIDA, S.; YAN, J.; JIANG, X.; WESTENBROEK, R. E.; NAIRN, A. C.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. Ca²⁺-independent Activation of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Bound to the C-terminal Domain of CaV2.1 Calcium Channels. **JBC Papers in Press.**, 2012.

MALHOTRA, R. C.; GHIA, D. K.; CORDATO, D. J.; BERAN, R. G. Glyphosate–surfactant herbicide-induced reversible encephalopathy. **J Clin Neurosci.**, v. 17, p. 1472-1473, 2010.

MAÑAS, F.; PERALTA, L.; RAVIOLO, J.; OVANDO, H. G.; WEYERS, A.; UGNIA, L.; CID, M. G.; LARRIPA, I.; GORLA, N.. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 37-41, 2009.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BELLÉ, R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 245–249, 2004.

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. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 15, p. 326–331, 2002.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; DURAND, G.; BELLÉ, R. Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. **Environ. Chem. Lett.**, v. 1, p. 8–12, 2003.

MAREŠ, V.; MALÍK, R.; LISÁ, V.; ŠEDO, A. Up-regulation of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activity in growth perturbed C6 astrocytes. **Molecular Brain Research**, v. 136, p. 75-80, 2005.

MARTÍNEZ, A; REYES, I; REYES, N. Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférico humana. **Biomédica**, v. 27, p.594-604, 2007.

MARTINI, C. N.; GABRIELLI, M.; VILA, M. D. C. A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 1007-1013, 2012.

MCBEAN, G. J.; FLYNN, J. Molecular mechanisms of cystine transport. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, 2001.

MEHAN, S.; MEENA, H.; SHARMA, D.; SANKHLA, R. JNK: A Stress-Activated Protein Kinase Therapeutic Strategies and Involvement in Alzheimer's and Various Neurodegenerative Abnormalities. **J Mol Neurosci.**, v. 43, p. 376-390, 2011.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. In: Glutamate and Glutamine in the Brain. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1007S-1015S, 2000.

MELVIN, N. Fotomicrografia de fluorescência de hipocampo do rato. Menção honrosa. In: Olympus BioScapes International Digital Imaging Competition Website, 2007. Disponível em: <http://www.olympusbioscapes.com/staticgallery/2007/hm33.html>. Acesso em: jan., 2013.

MENÉNDEZ-HELMAN, R. J.; FERREYROA, G. V.; AFONSO, M. S.; SALIBIÁN, A. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 88, 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 Contaminations and Toxicology**, v. 60, p. 665-671, 2011.

MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SÉRALINI, G. –E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology**, 2012.

MICHAELIS, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Progress in neurobiology**, v. 54, p. 360 – 415, 1998.

MINES, M. A.; JOPE, R. S. Brain region differences in regulation of Akt and GSK3 by chronic stimulant administration in mice. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 1398-1405, 2012.

MLADINIC, M.; BEREND, S.; VRDLJAK, A. L.; KOPJAR, N.; RADIC, B.; ZELJEZIC, D. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 50, p. 800-807, 2009

MODY, I.; MACDONALD, J. F. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca^{2+} release. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, p. 356-359, 1995.

MOGENSEN, J.; HJORTKJAER, J.; IBERVANG, K.L.; STEDAL, K.; MALÁ, H. Prefrontal cortex and hippocampus in posttraumatic functional recovery: spatial delayed alternation by rats subjected to transection of the fimbria-fornix and/or ablation of the prefrontal cortex. **Brain Res. Bull.**, v. 73, p. 86-95, 2007.

MOLZ, S.; DAL-CIM, T.; TASCA, C. I. Guanosine-5'-monophosphate induces cell death in rat hippocampal slices via ionotropic glutamate receptors activation and glutamate uptake inhibition. **Neurochemistry International**, v. 55, p. 703-709, 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, 2008a.

MOLZ, S.; DECKER, H.; DAL-CIM, T.; CREMONEZ, C.; CORDOVA, F. M.; LEAL, R. B.; TASCA, C. I. Glutamate-induced Toxicity in Hippocampal Slices Involves Apoptotic Features and p38MAPk Signaling. **Neurochem Res**, v. 33, p. 27-36, 2008b.

MOLZ, S.; DECKER, H.; OLIVEIRA, I. J. L.; SOUZA, D. O.; TASCA, C. I. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. **Neurochemical Research**, v. 30, p. 83-89, 2005.

MOLZ, S.; DAL-CIM, T.; BUDNI, J.; MARTÍN-de-SAAVEDRA, M. D.; EGEEA, J.; ROMERO, A.; BARRIO, L. D.; RODRIGUES, A. L. S.; LÓPEZ, M. G.; TASCA, C. I. Neuroprotective Effect of Guanosine Againsts Glutamate-Induced Cell Death in Rat Hippocampal Slices Is Mediated by the Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt/Glycogen Synthase Kinase 3 β Pathway Activation and Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibition. **Journal of Neuroscience Research**, v.89, p. 1400-1408, 2011.

MONROY, C. M.; CORTÉS, A.C.; SICARD, D.M.; GROOT DE RESTREPO, H. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. **Biomédica**,v. 25,p. 335-345, 2005.

MORISSETTE, M.; SAMADI, P.; TAHAR, A. H.; BÉLANGER, N.; PAOLO, T. D.Striatal Akt/GSK3 signaling pathway in the development of L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, p. 446-454, 2010.

MORKEN, T. S.; BREKKE, E.; HÅBERG, A.; WIDERØE, M.; BRUBAKK, A. M.; SONNEWALD, U. Neuron-Astrocyte Interactions, Pyruvate Carboxylation and the Pentose Phosphate Pathway in the Neonatal Rat Brain. *Neurochem. Res.*, 2013.

MOSER, M. B.; MOSER, E. I. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, v.8, p. 608-619, 1998.

NAGARAJA, T. N.; BROOKES, N.; Glutamine transport in mouse cerebral astrocytes.**J. Neurochem.**, v. 66, p. 1665-1674, 1996.

NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter.**Nature Reviews**, v.3, 2002.

NEGGA, R.; STUAR, J. A.; MACHEN, M. L.; SALVA, J.; LIZEK, A. J.; RICHARDSON, S. J.; OSBORNE, A. S.; MIRALLAS, O.; MCVEY, K. A.; FITSANAKIS, V. A. Exposure to glyphosate- and/or Mn/Zn-ethylene-bis-dithiocarbamate-containing pesticides leads to degeneration of γ -Aminobutyric Acid and dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*.**Neurotox Res.**, v. 21, p. 281-290, 2012.

NORMAN, P. S. R.; MANN, G. E. Secretagogue-induced changes in system-A amino acid transport in the rat exocrine pancreas – stimulation of 2-methylaminoisobutyric acid efflux by carbachol. **Biochim Biophys Acta**, v. 943, p. 541-546, 1988.

NUTTALL J. R.; OTEIZA P. I. Zinc and the ERK kinases in the developing brain. **Neurotox Res.**, v. 21, p. 128-41, 2012.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, v. 95, p. 351-8, 1979.

PALMADA, M.; CENTELLES, J. J. Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. **Frontiers in Bioscience**, s.v., p. 701-718, 1998.

PARRÓN, T.; REQUENA, M.; HERNÁNDEZ, A. F.; ALARCÓN, R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2011.

PATRICK, R. L. Synaptic Clefts Are Made to Be Crossed: Neurotransmitter Signaling in the Central Nervous System. **Toxicologic Pathology**, v. 28, p. 31-36, 2000.

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

PENG, J.; PENG, L.; STEVENSON, F.F.; DOCTROW, S.; ANDERSEN, J.K. Iron and Paraquat as Synergistic Environmental Risk Factors in Sporadic Parkinson's Disease Accelerate Age-Related Neurodegeneration. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 6914–6922, 2007.

PESSOA-PUREUR, R; WAJNER, M. Cytoskeleton as a potential target in the neuropathology of maple syrup urine disease: insight from animal studies. **J Inherit Metab Dis**, v. 30, p. 664-72, 2007.

PLATT, S. R. The role of glutamate in central nervous system health and disease – a review. **The Veterinary Journal**, v. 173, p. 278-286, 2007.

POLLEGIONI, L.; SCHONBRUNN, E.; SIEHL, D. Molecular basis of glyphosate resistance – different approaches through protein engineering. **FEBS Journal**, v. 278, p. 2753-2766, 2011.

QU, C.; LI, W.; SHAO, Q.; DWYER, T.; HUANG, H.; YANG, T.; LIU, G. c-Jun N-Terminal Kinase 1 (JNK1) Is Required for Coordination of Netrin Signaling in Axon Guidance. **JBC Papers in Press**, 2012.

QUEIROZ, E. K. R.; WAISSMANN, W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. **Caderno de saúde pública**, v. 22, p. 485-493, 2006.

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. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 716-720, 2005.

RODIER, P. M. Developing brain as a target of toxicity. **Environ Health Perspect.**, v. 103, p. 73-76, 1995.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M.A.; OLIVEIRA, C.A. Glyphosate as endocrine chemical disruptor. **Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 5 n. 2 Maio/Ago. 2009.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; BERNARDI, M. M.; FURTADO, P. V.; OLIVEIRA, C. A. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. **Arch Toxicol.** , v. 84, p. 309-317, 2010.

ROMANO, M.A.; ROMANO, R.M.; SANTOS, L.D.; WISNIEWSKI, P.; CAMPOS, D.A.; SOUZA, P.B.; VIAU, P.; BERNARDI, M.M.; NUNES, M.T.; OLIVEIRA, C.A. Glyphosate impairs male offspring

reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Arch Toxicol**, v. 86, p.663–673, 2012.

SALBEGO, J.; PRETTO, A.; GIODA, C. R.; MENEZES, C. C.; LAZZARI, R.; NETO, J. R.; BALDISSEROTTO, B.; LORO, V. L.. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 58, p. 740-745, 2010.

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.

SANTOS FILHO, E.; SILVA, R. S.; LEMES, V. R. R. ; BARRETTO, H. H. C.; INOMATA, O. N.K. ;KUSSUMI, T. A.; ROCHA, O.B. Alterações clínicas e laboratoriais relacionadas à exposição ambiental aos praguicidas organoclorados em moradores de aterro à céu aberto, Cubatão, S.P. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, p. 70-8, 2005.

SANTO-DOMINGO, J.; DEMAUREX, N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 907-912, 2010.

SHAPIRO, B. M.; STADTMAN, E. R.; The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. **Annu Rev Microbiol**, v. 24, p. 501-524, 1970.

SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; D'AGOSTINI, C.; ZAMONER, A. Effect of 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. **Life Science**, v. 69, p.977-986, 2001.

SIREROL-PIQUER M.; GOMEZ-RAMOS P.; HERNÁNDEZ F.; PEREZ M.; MORÁN M. A.; FUSTER-MATANZO A.; LUCAS J. J.; AVILA J.; GARCÍA-VERDUGO J. M. GSK3b Overexpression Induces Neuronal Death and a Depletion of the Neurogenic Niches in the Dentate Gyrus. **Hippocampus**, v. 21, p. 910-922, 2011.

SKELDING, K. A.; SPRATT, N. J.; FLUECHTER, L.; DICKSON, P. W.; ROSTAS, J. A. P. α -CaMKII is differentially regulated in brain

regions that exhibit differing sensitivities to ischemia and excitotoxicity. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 32, p. 2181-2192, 2012.

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.

SONG, H.-Y.; KIM, Y.-H.; SEOK, S.-J.; GIL, H.-W.; HONG, S.-Y.. In vitro cytotoxic effect of glyphosate mixture containing surfactants. **J Korean Med Sci.**, v. 27, p. 711-715, 2012.

SPEED, H. E., BLAISS, C. A.; KIM, A.; HAWS, M. E.; MELVIN, N. R.; JENNINGS, M.; EISCH, A. J.; POWELL, C. M. Delayed reduction of hippocampal synaptic transmission and spines following exposure to repeated subclinical doses of organophosphorus pesticide in adult mice. **Toxicol Sci.**, v. 125, p. 196-208, 2012.

SRIBANDITMONGKOL, P., JUTAVIJITTUM, P., PONGRAVEEVONGSA, P., WUNNAPUNK, K., DURONGKADECH, P. Pathological and toxicological findings in Glyphosate-Surfactant Herbicide Fatality (Case Report). **Am J Forensic Med Pathol**, v. 33, p. 234-237, 2012.

STADTAMN, E. R.; GINSBURG, A.; CIARDI, J. E.; YEH, J. HENNIG, S. B.; SHAPIRO, B. M. Multiple molecular forms of glutamine synthetase produced by enzyme catalyzed adenylation and deadenylation reactions. **Adv Enzyme Regul**, v. 8, p. 99-118, 1970.

STRUZYŃSKA, L.; CHALIMONIUK, M.; SULKOWSKI, G. The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. **Toxicology**, v. 212, p. 185-195, 2005.

SZABO, S.; MACHADO-VIEIRA, R.; YUAN, P.; WANG, Y.; WEI, Y.; FALKE, C.; CIRELLI, C.; TONONI, G.; MANJI, H. K.; DU, J. Glutamate Receptors as Targets of Protein Kinase C in the Pathophysiology and Treatment of Animal Models of Mania. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 47-55, 2009.

TOPE, A.; BEBE, F.N.; PANEMANGALORE, M. Micronuclei frequency in lymphocytes and antioxidants in the blood of traditional limited-resource farm workers exposed to pesticides. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 41, p. 843-53, 2006.

TSAI, M. J.; CHANG, Y. F.; SCHWARCZ, R.; BROOKES, M. Characterization of L- α -amino adipic acid transport in cultured rat astrocytes. **Brain Research**, v. 741, p. 166-173, 1996.

TZINGOUNIS, A. V.; WADICHE, J. I. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. **Nature Reviews**, v.8, 2007.

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, L. P.; KURATKO, C. N.; STOCCO, D. M. Econazole and miconazole inhibit steroidogenesis and disrupt steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression post-transcriptionally. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 75, p. 229–236, 2000.

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, p.198- 205, 2006.

WANG, G; FAN, X. N.; TAN, Y. Y.; CHEGN, Q.; CHEN, S. D. Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 17, p. 486-487, 2011.

WANG, L. W.; TU, Y. F.; HUANG, C. C.; HO, C. J. JNK signaling is the shared pathway linking neuroinflammation, blood–brain barrier disruption, and oligodendroglial apoptosis in the white matter injury of the immature brain. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 6-17, 2012.

WANG, X.; MICHAELIS, E.K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Front Aging Neurosci.**, v. 2, 2010.

WEBER, John, T. Altered calcium signaling following traumatic brain injury. **Neuropharmacology**, v. 3, 2012.

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.

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, USA. **The Journal of Nutrition**, 2005.

YUDKOFF, M.; NISSIM, I.; DAIKHIN, Y.; LIN, Z. –P.; NELSON, D.; PLEASURE, D.; ERECINSKA, M. Brain glutamate metabolism: neuronal-astroglial relationships. **Dev. Neurosci.**, v. 15, p. 343-350, 1993.

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 45Ca^{2+} uptake in cerebral cortex from young rats. **Neuroscience Research**, v. 57, p. 98-103, 2007.

ZAMONER, A.; HEIMFARTH, L.; OLIVEIRA, S.; ROYER, C.; SILVA, F.R.M.B.; PESSOA-PUREUR, R. Nongenomic actions of thyroxine modulate intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of rats. **Neuroscience**, p. 549, 2008.

ZIGMOND, M. J.; BLOOM, F. E.; LANDIES, S. C.; ROBERTS, J. L.; SQUIRE, L. R. Brain Energy Metabolism. In: **Fundamental Neuroscience**. Ed. Academic Press. Chapter 14, p. 389-409, 1999.

ZHANG, H.; FORMAN, H. J.; CHOI, J. Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. **Methods Enzymol**, v.401, p.468-483, 2005.

ZHANG, H.; DICKINSON, D. A.; LIU, R.-M.; FORMAN, H. J. 4-Hydroxynonenal increases g-glutamyl transpeptidase gene expression through mitogen-activated protein kinase pathways. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 463-471, 2005.

ZHANG, H.; FORMAN, H. J. Redox Regulation of g-Glutamyl Transpeptidase. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 41, 2009.

ZOUAOU, K.; DULAURENT, S.; GAULIER, J. M.; MOESCH, C.; LACHÂTRE, G. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. **Forensic Science International**, 2013.