



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo experimental dos efeitos da exposição repetida ao glifosato
sobre o comportamento de ratos**

Táisa Carla Rizzi Rialto

Ribeirão Preto
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo experimental dos efeitos da exposição repetida ao glifosato
sobre o comportamento de ratos

Taísa Carla Rizzi Rialto

Ribeirão Preto
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo experimental dos efeitos da exposição repetida ao glifosato
sobre o comportamento de ratos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestra em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Taísa Carla Rizzi Rialto

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Toxicologia em 07/05/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Ribeirão Preto
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rialto, Taísa Carla Rizzi

Estudo experimental dos efeitos da exposição repetida ao glifosato sobre o comportamento de ratos. Ribeirão Preto, 2019.

44 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Santos, Antonio Cardozo

Coorientador: Godinho, Antonio Francisco

1. Glifosato. 2. Neurotoxicidade. 3. Atividade motora. 4. Ansiedade. 5. Ratos. 6. Serotonina. 7. Dopamina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Taísa Carla Rizzi Rialto

Estudo experimental dos efeitos da exposição repetida ao glifosato sobre o comportamento de ratos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestra em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho
especialmente aos meus pais,
irmãos, minha companheira e
verdadeiros amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma participaram e colaboraram para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador, professor Dr. Antonio Cardozo dos Santos e coorientador, professor Dr. Antonio Francisco Godinho, pela confiança depositada nesse trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos, incentivos, compreensão e paciência, isso tudo foi fundamental para a execução desse estudo e para meu crescimento e amadurecimento profissional.

À Dra. Neife Guinaim dos Santos, por toda a ajuda disponibilizada sempre nos momentos em que precisei, pela confiança e dedicação.

À professora Dra. Janete Anselmo Franci e Dr. Ruither Carolino pela colaboração nesse estudo.

Ao Fábio Anselmo, Marina de Oliveira, Bruno Fumes, que colaboraram para a execução dessa pesquisa.

Às minhas colegas de laboratório, Flávia Sisti, Lilian Amaral, Carolina Petri, Rafaela Scalco que estiveram comigo nas mais diversas situações durante o desenvolvimento dessa pesquisa e pelas experiências compartilhadas.

Aos funcionários do CEATOX, Dr. Alair Aparecido Almeida, Fábio Iachel da Silva, João Leandro Chaguri, Sarah Setznagl, Juliano da Silva Otoni, Josie Michelle Juvencio, Rita de Cássia Ferrari pela disposição em ajudar na execução deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo auxílio financeiro - Código de Financiamento 001.

*“O começo de todas as ciências é
o espanto de as coisas serem o
que são (Aristóteles).”*

RESUMO

RIALTO, T. C. R. **Estudo experimental dos efeitos da exposição repetida ao glifosato sobre o comportamento de ratos**. 2019. 44f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O Brasil está entre os líderes mundiais no uso de praguicidas, dos quais, os mais aplicados atualmente são os herbicidas, seguidos por inseticidas e fungicidas. Dentre os herbicidas, os mais utilizados no país são aqueles baseados no glifosato. Nas plantas, o glifosato inibe a síntese dos aminoácidos aromáticos, uma via metabólica ausente em mamíferos. Então, a princípio considerava-se que o glifosato não representaria riscos para a saúde de mamíferos, mas alguns estudos recentes tem sugerido que esses herbicidas causam efeitos neurotóxicos. Porém, ainda há poucos dados e alguns achados são controversos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar (i) o efeito do herbicida Roundup® (baseado em glifosato) sobre o sistema nervoso central (SNC) e (ii) estabelecer a correlação das alterações da atividade motora e ansiedade, que são bioindicadores de efeito no SNC, com o conteúdo dos neurotransmissores (monoaminas) e de seus metabólitos em diferentes áreas do cérebro de ratos. Para tal, ratos *Wistar* foram expostos por via oral (gavagem) a: (i) 250 mg/kg de glifosato (Roundup®), diariamente por 15 dias (exposição de curto prazo) ou (ii) a 250 e 500 mg/kg de glifosato (Roundup®), diariamente por 28 dias (exposição subcrônica). Ao final dessas exposições, foram realizados os testes arena de campo aberto (atividade locomotora e ansiedade), *hole-board* (coordenação motora) e labirinto em cruz elevado (ansiedade). Foi determinado o conteúdo de serotonina (5HT) e dopamina (DA) e de seus respectivos metabólitos, ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) e 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC) no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado dos grupos de exposição subcrônica. Observou-se diminuição do ganho de peso corporal nos dois grupos de exposição subcrônica. Ao contrário de outros estudos sugerindo que o glifosato diminui a atividade motora e altera a ansiedade, no presente estudo não foram observadas alterações nesses parâmetros, seja na exposição de curto prazo ou subcrônica. No grupo de exposição subcrônica à maior dose (500 mg/kg), as seguintes alterações foram observadas: aumento de 5HIAA no córtex pré-frontal, diminuição de 5HIAA no hipocampo, aumento de DOPAC no córtex pré-frontal e estriado. Não houve alteração no conteúdo dos neurotransmissores 5HT e DA em nenhuma das áreas cerebrais analisadas. Apesar das alterações nos metabólitos, só houve aumento significativo do *turnover* de DA (DOPAC/DA) no estriado, porém sem reflexos na atividade motora. Estudos adicionais com doses e/ou tempo de exposição maiores são necessários para comprovar os efeitos neurotóxicos do glifosato em mamíferos.

Palavras-chave: glifosato, neurotoxicidade, atividade motora, ansiedade, ratos, serotonina, dopamina.

ABSTRACT

RIALTO, T. C. R. **Experimental study of the effects of repeated exposure to glyphosate on the behavior of rats.** 2019. 44f. Dissertation (Master's degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Brazil is among the world leaders in the use of pesticides, of which the most applied are herbicides, followed by insecticides and fungicides. Among the herbicides, the most used in the country are those based on glyphosate. In plants, glyphosate inhibits the synthesis of aromatic amino acids, a metabolic pathway absent in mammals. Therefore, it was first considered that glyphosate would pose no risk to the health of mammals, but some recent studies have suggested that these herbicides cause neurotoxic effects. However, there are still few data and some findings are controversial. Thus, the objective of this study was to evaluate: (i) the effect of the herbicide Roundup® (based on glyphosate) on the central nervous system (CNS) and (ii) to establish the correlation of motor activity and anxiety, which are bioindicators of effect in the CNS, with the content of the neurotransmitters (monoamines) and their metabolites in different areas of the rat brain. For this purpose, *Wistar* rats were exposed orally (gavage) to: (i) 250 mg / kg glyphosate (Roundup®) daily for 15 days (short term exposure) or (ii) 250 and 500 mg / kg of glyphosate (Roundup®) daily for 28 days (subchronic exposure). At the end of these exposures, open field (locomotor activity and anxiety), hole-board (motor coordination) and elevated plus maze (anxiety) tests were performed. The content of serotonin (5HT) and dopamine (DA) and their respective metabolites, 5-hydroxyindolacetic acid (5HIAA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) were determined in the prefrontal cortex, hippocampus and striatum of the subchronic exposure groups. There was a decrease in body weight gain in the subchronic exposure groups. Contrary to other studies suggesting that glyphosate decreases motor activity and alters the anxiety, in the present study no changes were observed in these parameters, either in short-term or subchronic exposure. In the subchronic exposure group at the highest dose (500 mg / kg), the following changes were observed: increase of 5HIAA in the prefrontal cortex, decrease of 5HIAA in the hippocampus, increase of DOPAC in the prefrontal cortex and striatum. There was no change in the content of 5HT and DA neurotransmitters in any of the brain areas analyzed. Despite the changes in the metabolites, there was only a significant increase in DA turnover (DOPAC / DA) in the striatum, but without reflexes in motor activity. Further studies using higher doses and / or exposure time are needed to confirm the neurotoxic effects of glyphosate in mammals.

Key words: glyphosate, neurotoxicity, motor activity, anxiety, rats, serotonin, dopamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do glifosato.....	3
Figura 2- Mecanismo de ação do glifosato nas plantas.	4
Figura 3 - Arena de campo aberto.....	13
Figura 4 - Hole-board.	14
Figura 5 - Labirinto em cruz elevado.	15
Figura 6 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o ganho de peso corporal na exposição subcrônica.	19
Figura 7 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o consumo de ração em diferentes períodos na exposição subcrônica.	19
Figura 8 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre a ingestão de água em diferentes períodos na exposição subcrônica.	20
Figura 9 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre atividade locomotora no teste da arena de campo aberto na exposição de curto prazo.	21
Figura 10 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre atividade locomotora no teste da arena de campo aberto na exposição subcrônica.	22
Figura 11 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre a coordenação motora no teste do hole-board na exposição de curto prazo.	22
Figura 12 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre a coordenação motora no teste do hole-board na exposição subcrônica.....	23
Figura 13 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o comportamento de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado na exposição de curto prazo.	24
Figura 14 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o comportamento de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado na exposição subcrônica.	25
Figura 15 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o comportamento de ansiedade no teste arena de campo aberto na exposição de curto prazo.	26
Figura 16 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o comportamento de ansiedade no teste arena de campo aberto na exposição subcrônica.	26
Figura 17 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o conteúdo de 5HT no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.	27
Figura 18 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o conteúdo de 5HIAA no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.	28
Figura 19 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o conteúdo de DA no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.....	29
Figura 20 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o conteúdo de DOPAC no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.	30
Figura 21 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o turnover de 5HT no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.	31
Figura 22 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o turnover de DA no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.	32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeito do tratamento a curto prazo sobre o peso relativo (%) de órgãos..20
Tabela 2 - Efeito do tratamento subcrônico sobre o peso relativo (%) de órgãos.21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
CEATOX	Centro de Assistência Toxicológica
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Ct	Controle
DA	Dopamina
DL ₅₀	Dose letal média
DOPAC	3,4 dihidroxifenilacético
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Eox.	Potencial de oxidação
E.P.M.	Erro padrão da média
Glif	Glifosato
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HVA	Ácido homovanílico
Icell	Corrente elétrica no eletrodo
Mn	Manganês
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
Rpm	Rotações por minuto
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SNC	Sistema Nervoso Central
UNESP	Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”
5HT	Serotonina
5HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Praguicidas	1
1.2 Química do glifosato	3
1.3 Modo de ação do glifosato nas plantas	3
1.4 Toxicocinética do glifosato	4
1.5 Toxicodinâmica do glifosato.....	4
2 OBJETIVO.....	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1 Aspectos Éticos	11
3.2 Animais.....	11
3.3 Agente químico utilizado	11
3.4 Procedimento experimental.....	12
3.4.1 Avaliação comportamental	13
3.5 Determinação de monoaminas – exposição subcrônica	16
3.6 Análise estatística	17
4 RESULTADOS	18
4.1 Ganho de peso corporal, consumo de ração e ingestão de água	18
4.2 Peso relativo (%) de órgãos	20
4.3 Avaliação comportamental	21
4.3.1 Atividade locomotora	21
4.3.2 Coordenação motora.....	22
4.3.3 Ansiedade	23
4.4 Determinação de monoaminas - exposição subcrônica	27
4.4.1 Serotonina (5HT).....	27
4.4.2 Ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA).....	28
4.4.3 Dopamina (DA).....	29
4.4.4 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC)	30
4.4.5 <i>Turnover</i> (taxa de renovação) de serotonina.....	31
4.4.6 <i>Turnover</i> (taxa de renovação) de dopamina.....	32
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 Praguicidas

O uso de praguicidas iniciou-se na década de 1920, quando havia pouco conhecimento sobre seu potencial tóxico. Na Segunda Guerra Mundial (1939 – 1945) essas substâncias foram empregadas como armas químicas (OPAS, 1996). No período do pós-guerra houve um crescimento populacional e econômico que exigiu um aumento pela demanda de alimentos e matérias-primas. Desta forma, o emprego dos praguicidas tornou-se necessário para aumentar a produtividade agrícola (MORAGAS; SCHNEIDER, 2003).

Esse aumento no uso de praguicidas, juntamente com o desenvolvimento de novas sementes (resistentes a doenças, com maior rendimento) e aplicação de novas práticas (mudança de irrigação, por exemplo) foram denominados Revolução Verde, a qual ocorreu por volta de 1960. A Revolução Verde impediu inúmeras mortes em decorrência da fome e possibilitou a criação de novas indústrias e empregos (RALEY-SUSMAN, 2014).

No Brasil, os praguicidas tiveram primeiramente seu uso em programas de saúde pública, no combate a vetores de parasitas, sendo mais utilizados de forma intensiva na agricultura somente a partir de 1960 (OPAS, 1996). Atualmente, grandes empresas produtoras de praguicidas, fertilizantes e sementes, dominam o agronegócio (RALEY-SUSMAN, 2014).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em 2017, as exportações brasileiras do agronegócio somaram US\$ 96,01 bilhões, registrando 13% de crescimento em relação ao ano de 2016. O setor foi responsável por 44,1% do total das vendas externas do Brasil. O superávit foi de US\$ 81,86 bilhões sendo o segundo maior da história, inferior apenas ao registrado em 2013 (R\$ 82,91 bilhões) (MAPA, 2018).

Por outro lado, as intoxicações por praguicidas são um grave problema de saúde pública mundial (REBELO et al., 2011). No Brasil, tal situação é ainda mais preocupante, pois está entre os líderes de consumo mundial de praguicidas (FAO, 2017; CARBONARI, 2017). Os praguicidas de uso agrícola somados aos de uso doméstico foram causadores de 5,67% dos casos de intoxicações registrados no ano de 2016 no Brasil. Com relação aos óbitos provocados por intoxicação humana, os

praguicidas foram responsáveis por 45,07% dos casos (SINITOX, 2016). Em 2016, o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX – registrou mais de 39 mil casos de intoxicação humana e mais de 100 casos de óbitos decorrentes de intoxicação, sendo os praguicidas os agentes de maior taxa de letalidade. Esses dados, entretanto, mostram parcialmente a realidade do Brasil, uma vez que segundo o Ministério da Saúde, para cada evento de intoxicação por praguicidas, existem outros 50 casos não notificados (FIOCRUZ, 2015).

Atualmente há uma crescente preocupação por parte de especialistas com o aumento do uso de praguicidas, uma vez que causam impacto ambiental desconhecido e vários problemas de saúde pública (CARNEIRO et al., 2015). Em humanos, a exposição aos praguicidas induz efeitos de saúde agudos e de longo prazo associados com uma variedade de condições clínicas, como efeitos reprodutivos, câncer e distúrbios neurológicos, incluindo déficit no desempenho neurocomportamental em crianças (KAMEL e HOPPIN, 2004; KALLIORA et al., 2018). Além disso, vem sendo sugerido que os praguicidas constituem um fator ambiental possivelmente associado à etiologia dos distúrbios neurodegenerativos, como as doenças de Parkinson e Alzheimer (CAMPDELACREU, 2014; PARRÓN et al., 2011; RICHARDSON et al., 2014; YAN et al., 2018), aumentando as preocupações existentes com este grupo de agentes químicos.

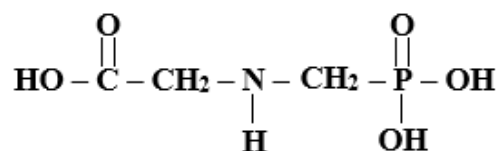
Os praguicidas mais utilizados atualmente no Brasil são os herbicidas, seguidos pelos inseticidas e fungicidas (CARNEIRO et al., 2015). Dentre os herbicidas disponíveis no mercado para uso agrícola, os que possuem como ingrediente ativo o glifosato, são os mais utilizados em nosso país (ANVISA, 2019).

1.2 Química do glifosato

O glifosato pertence ao grupo químico das glicinas substituídas e é classificado como um herbicida não-seletivo e de ação sistêmica. Possui amplo espectro de ação e possibilita o controle de plantas daninhas anuais ou perenes. Descoberto na década de 1950, a molécula de glifosato teve na década de 1970 suas características de herbicida desenvolvidas por pesquisadores da Monsanto *Company*. Sua comercialização iniciou-se em 1974, ano em que foi aprovada pelos Estados Unidos (GALLI e MONTEZUMA, 2005).

O glifosato possui fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ e é denominado quimicamente de N-(fosfometil) glicina como representado na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura química do glifosato.



Fonte: WHO, 1996.

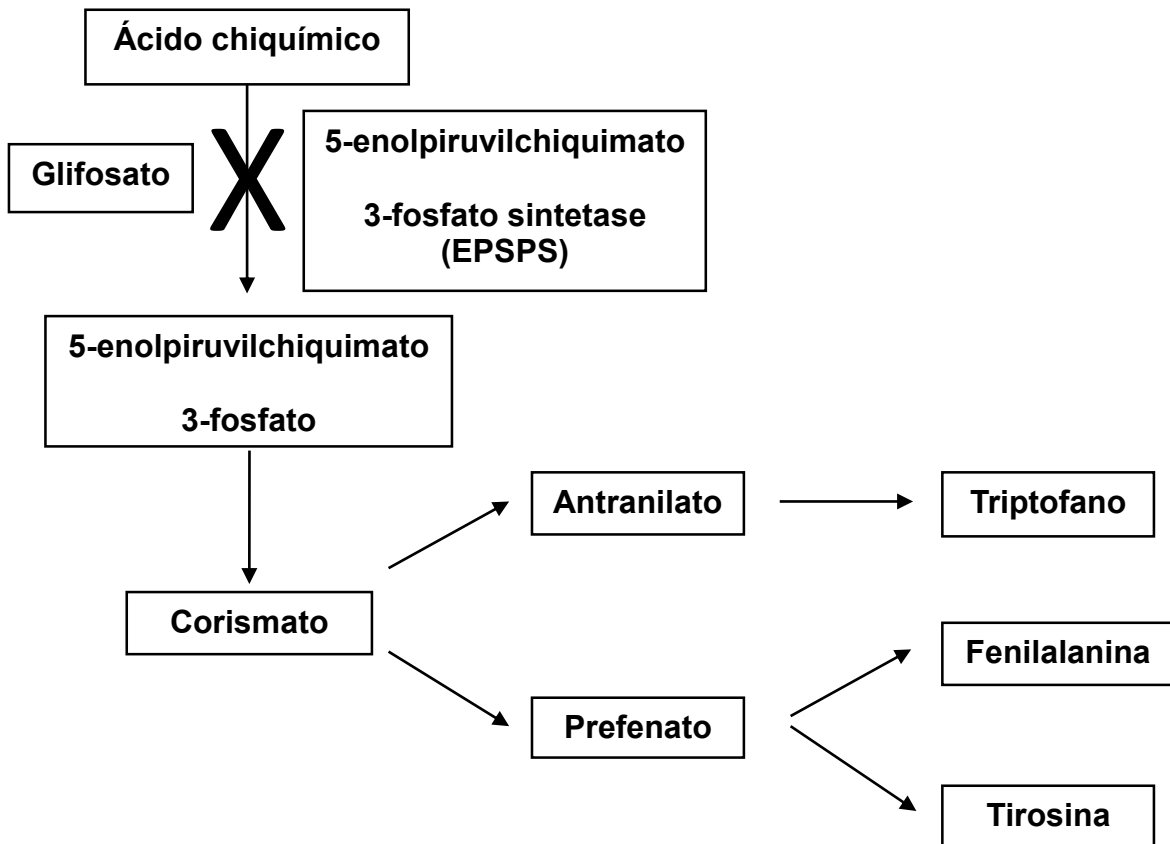
Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2003), a molécula do glifosato pode ser encontrada na forma dos sais de:

- Glifosato - sal de isopropilamina;
- Glifosato - sal de potássio;
- Glifosato - sal de amônio.

1.3 Modo de ação do glifosato nas plantas

O glifosato impede o crescimento das plantas através da inibição da enzima enolpiruvilchiquimato fosfato sintetase, responsável pela biossíntese de corismato, precursor da fenilalanina, tirosina e triptofano, considerados aminoácidos aromáticos essenciais (Figura 2). Para exercer sua ação herbicida com eficácia é necessário que o glifosato entre em contato direto com a folhagem das plantas e então seja translocado para toda a planta (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Figura 2- Mecanismo de ação do glifosato nas plantas.



Fonte: Adaptado de WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000.

1.4 Toxicocinética do glifosato

Sua absorção no trato gastrointestinal é limitada a 30-36%; pela via dérmica é de 5,5% ou menos. A eliminação total (99% de uma dose oral) ocorre em aproximadamente em 168 horas. Nos tecidos orgânicos, a concentração mais elevada se observa nos ossos. O glifosato é muito pouco metabolizado em humanos (o único metabólito, o ácido aminometilfosfônico, pode ser detectado em quantidade menor que 0,5% de glifosato) sendo o restante rapidamente excretado na urina como glifosato inalterado. A eliminação fecal é de 62-69% sem absorção e 14-29% na urina. Não é esperado bioacumulação do glifosato tendo em vista sua alta solubilidade em água e seu caráter iônico (IPCS, 1994).

1.5 Toxicodinâmica do glifosato

Como o mecanismo de ação do glifosato dá-se pela inibição da síntese dos aminoácidos aromáticos por uma via metabólica ausente em mamíferos, a princípio,

acreditava-se que o glifosato não apresentaria riscos para a saúde de mamíferos, incluindo humanos (HERNÁNDEZ-PLATA et al., 2015). Porém, dados obtidos com observações clínicas indicaram intoxicação humana com formulações comerciais de glifosato, especialmente com os que trabalham na agricultura, descreveram efeitos perigosos no sistema nervoso motor (BARBOSA et al., 2001; WANG et al., 2011), ansiedade e deficiências de memória de curto prazo (NISHIYORI et al., 2014).

Recentemente, alguns estudos tem demonstrado que herbicidas contendo o glifosato como ingrediente ativo podem causar efeitos neurotóxicos em ratos e camundongos expostos bem como à sua prole.

Hernández-Plata et al. (2015) avaliaram os efeitos do glifosato sobre o sistema nervoso, administrando-o durante duas semanas (três doses semanais) a ratos *Sprague-Dawley*, nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg, por via intraperitoneal. Foram avaliados os marcadores dopaminérgicos e sua relação com a atividade locomotora. A exposição repetida ao glifosato causou hipotividade imediatamente após cada injeção, e também foi evidente dois dias após a última injeção em ratos expostos à dose mais alta. Os resultados indicaram que a diminuição da atividade locomotora parece ligada aos receptores D1 de dopamina no núcleo *accumbens* na exposição repetida ao glifosato, quando medidos dois dias após a última injeção, e aos níveis extracelulares de dopamina no estriado, na exposição aguda. Esses resultados sugerem que o glifosato afeta o sistema dopaminérgico e conseqüentemente a atividade locomotora.

Gallegos et al. (2016) avaliaram os efeitos neurocomportamentais de filhotes de mães expostas a uma formulação comercial de glifosato durante a gestação e lactação de ratos *Wistar* (soluções de 0,2% e 0,4%, pela água de beber, equivalente a 100 e 200 mg/kg/dia de glifosato, respectivamente). A atividade locomotora e os níveis de ansiedade foram avaliados nos 45º e 90º dia de vida pós-natal. Foi observada diminuição da atividade locomotora e nos níveis de ansiedade nos grupos expostos ao herbicida. O estudo mostrou que a exposição perinatal ao composto afetou o sistema nervoso central dos filhotes, provavelmente alterando mecanismos ou sistemas de neurotransmissores que regulam a atividade locomotora e a ansiedade.

Em 2018, Gallegos et al. repetiram o perfil experimental anterior para realizar avaliações bioquímicas e memória de reconhecimento, no 90º. dia pós-natal. Foi verificada alteração no estado antioxidante do cérebro, além da diminuição da

atividade da acetilcolinesterase e transaminases, aumento da fosfatase alcalina no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo. A memória de reconhecimento após 24 horas também foi prejudicada. Tais alterações, poderiam estar relacionadas ao prejuízo da memória.

Ait Bali et al. (2017) avaliaram os efeitos comportamentais do Roundup® (glifosato) em camundongos (30 dias de idade) após exposição aguda, subcrônica (6 semanas) e crônica (12 semanas), nas doses de 250 ou 500 mg/kg/dia de glifosato, por gavagem. Seus resultados indicaram que tanto a exposição subcrônica como a crônica induziram uma diminuição no ganho de peso corporal e atividade locomotora, e aumento dos comportamentos de ansiedade e depressão. Os achados imunohistoquímicos mostraram que apenas o tratamento crônico reduziu a imunorreatividade da enzima tirosina hidroxilase. No entanto, tanto a exposição subcrônica como a crônica produziram uma redução da imunorreatividade para serotonina no núcleo dorsal da rafe, amígdala basolateral e córtex pré-frontal medial ventral. Em conjunto, esses dados sugerem que a exposição de camundongos ao herbicida à base de glifosato, desde a idade juvenil até a adulta, leva a mudanças comportamentais que resultam da deficiência dos processos de desenvolvimento neuronal.

Em 2018, Ait Bali et al. utilizando o mesmo perfil experimental do estudo anterior observaram novamente que a exposição subcrônica e crônica aumentaram os comportamentos de ansiedade e depressão. Além disso, observaram que o herbicida alterou significativamente a composição da microbiota intestinal em termos de abundância relativa e diversidade filogênica dos principais micróbios. Segundo os autores, esses resultados sugerem que a disbiose intestinal pode aumentar a prevalência de alterações neurocomportamentais.

Em 2019, com perfil experimental semelhante Ait Bali et al. verificaram que exposição subcrônica e crônica ao herbicida prejudicou os comportamentos de aprendizagem e memória dos animais expostos. Houve diminuição na atividade de acetilcolinesterase, superóxido dismutase e peroxidase no cérebro dos camundongos tratados após repetidas exposições. Este estudo demonstra que os prejuízos na aprendizagem e memória estão associados com a inibição da atividade da acetilcolinesterase e indução do estresse oxidativo.

Baier et al. (2017) investigaram os efeitos neurocomportamentais da administração intranasal de uma formulação comercial de glifosato em camundongos

CF-1 (65 dias) (~ 2 mg / narinas / dia, totalizando 50 mg/kg/dia de glifosato) três dias por semana, durante quatro semanas. Diminuição da atividade locomotora e aumento dos níveis de ansiedade foram observados. Além disso, a memória de reconhecimento foi significativamente prejudicada após 6 h no grupo tratado com o herbicida. O estudo sugere que essas observações podem ser consequência de alterações nos sistemas de neurotransmissão que compõem os sistemas GABAérgicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos e/ou colinérgicos.

Cattani et al. (2017) investigaram os efeitos da exposição subcrônica ao Roundup® (glifosato) sobre alguns parâmetros neuroquímicos e comportamentais em filhotes jovens e adultos. Os ratos foram expostos a 1% do herbicida na água de beber (correspondente a 0,36% de glifosato) do 5º dia gestacional até o 15º ou 60º dia pós-natal. Os resultados mostraram que a exposição durante os períodos pré e pós-natal causaram estresse oxidativo, afetaram a neurotransmissão colinérgica (diminuição da atividade da acetilcolinesterase) e glutamatérgica (excitotoxicidade de glutamato) e provocaram disfunção de astrócitos no hipocampo da prole jovem e adulta. Os efeitos da exposição ao herbicida foram associados ao estresse oxidativo e comportamento depressivo na prole no 60º dia pós-natal, demonstrado pelo tempo de imobilidade prolongado e diminuição do tempo de escalada observada no teste de natação forçada.

Além das ações neurotóxicas, outros efeitos do glifosato podem ser destacados. O glifosato age na via do ácido chiquímico, inibindo a síntese dos aminoácidos aromáticos, sendo tal efeito, em parte, devido à quelação do manganês (Mn). O glifosato reduz os níveis séricos de Mn, cuja deficiência pode explicar muitas das patologias associadas ao autismo e doença de Alzheimer. A falta de Mn, por sua vez, pode causar convulsões, e uma alta incidência de convulsões é encontrada em crianças com autismo, sendo elas associadas com níveis séricos reduzidos de Mn (SAMSEL; SENEFF, 2015).

Além disso, na literatura são encontrados estudos sugerindo que o glifosato também pode:

- Alterar diferenciação funcional do útero, afetando a fertilidade feminina e/ou promover o desenvolvimento de neoplasias (GUERRERO SCHIMPF et al., 2017);

- Causar extravasamento de enzimas hepáticas intracelulares, alanina transferase e aspartatotransferase, sugerindo danos irreversíveis nos hepatócitos (BENEDETTI et al., 2004);
- Aumentar peroxidação lipídica no fígado de ratas e dos fetos, sendo maior nesses últimos (BEURET; ZIRULNIK; GIMÉNEZ, 2005);
- Promover danos no DNA de células hepáticas (MAÑAS et al., 2013);
- Causar estresse oxidativo (EL-SHENAWY, 2009) e, além de induzi-lo, ativar múltiplas vias de resposta ao estresse levando à morte de células de *Sertoli* em testículos de ratos pré-púberes (DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013);
- Provocar inflamação e danos ao tecido renal (KARIMI JASHNI; NOVIN; POOR AHMADI, 2014);
- Ocasionar desregulação endócrina (DALLEGRAVE et al., 2007; PANDEY; RUDRAIAH, 2015; DE SOUZA et al., 2017);
- Induzir aberrações cromossômicas e micronúcleos acompanhados de inibição da proliferação celular (PRASAD et al., 2009);
- Retardar o desenvolvimento do esqueleto fetal (DALLEGRAVE et al., 2003).

Adicionalmente, segundo revisão de Myers et al. (2016) os herbicidas que possuem como ingrediente ativo o glifosato são os mais aplicados no mundo e seu uso continua aumentando; em todo o mundo, os praguicidas à base de glifosato contaminam frequentemente as fontes de água potável, a precipitação e o ar, especialmente nas regiões agrícolas; a meia-vida do glifosato na água e no solo é maior do que a previamente reconhecida; o glifosato e seus metabólitos estão amplamente presentes no suprimento mundial de soja; as exposições humanas aos herbicidas a base de glifosato estão aumentando. Estas conclusões são extremamente importantes para saúde humana e o ambiente, e sugerem que há uma necessidade urgente de mais pesquisas sobre esses compostos químicos.

O glifosato é um dos herbicidas com os dados mais controversos sobre segurança e toxicidade (CRESSEY, 2015). Como mencionado, acreditava-se inicialmente que o glifosato não apresentaria riscos para a saúde de mamíferos, no entanto, pouco se sabe sobre o impacto de doses não letais do glifosato na saúde humana e, de fato, sua segurança tem sido questionada em todo o mundo (GALLEGOS et al., 2016).

Com base no exposto, pode-se afirmar que os dados acerca dos efeitos neurotóxicos do glifosato em mamíferos ainda são controversos ou insuficientes. Ainda, considerando os dados conflitantes sobre os efeitos do herbicida à base de glifosato na saúde humana, e uma recente publicação de Landrigan e Belpoggi (2018), que aponta a necessidade de pesquisas independentes (desvinculadas do fabricante do herbicida) sobre os efeitos de herbicidas baseados em glifosato, estudos sobre possíveis efeitos do Roundup® no sistema nervoso central são bastante necessários. Neste sentido, trabalhamos com a hipótese de que exposição repetida a um herbicida baseado em glifosato, poderia afetar o sistema nervoso central, provocando efeitos sobre a ansiedade, atividade locomotora, coordenação motora e conteúdo de monoaminas no cérebro.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito do herbicida Roundup® (baseado em glifosato) sobre o sistema nervoso central (SNC) e estabelecer a correlação das alterações da atividade motora e ansiedade, bioindicadores de efeito no SNC, com o conteúdo e o *turnover* dos neurotransmissores serotonina e dopamina no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado do cérebro de ratos *Wistar*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, *Câmpus* de Botucatu. A realização do mesmo foi iniciada mediante aprovação pelo comitê sob processo 955/2017.

3.2 Animais

Foram utilizados 66 ratos *Wistar*, machos ~60 dias de idade, os quais foram mantidos no biotério do Centro de Assistência Toxicológica – CEATOX, unidade auxiliar vinculada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, *Câmpus* de Botucatu. Os ratos foram mantidos até a idade selecionada para os experimentos, sob condições padronizadas de temperatura, umidade e ventilação, recebendo água e ração à vontade. Os ratos foram mantidos em gaiolas de polipropileno (40 cm x 34 cm x 17 cm) em número de 3-4 por gaiola. A temperatura do biotério foi mantida em aproximadamente $21 \pm 2^\circ \text{C}$, tendo sido estabelecido um ciclo de 12 horas de claro/escuro, com início às 6 horas da manhã.

3.3 Agente químico utilizado

O agente químico estudado foi o glifosato, na forma do seu produto comercial Roundup® Original DI (Monsanto *Company*, St. Louis, Missouri, Estados Unidos; Monsanto do Brasil, São Paulo, Brasil), contendo 445g/L de sal de di-amônio de N-(fosfometil) glicina equivalente a 370 g/L de ácido de N-(fosfometil) glicina e 751 g/L de outros ingredientes, tendo em vista que nas práticas agrícolas são utilizadas formulações técnicas de glifosato, que contêm além do ingrediente ativo adjuvantes não declarados e de ação tóxica ainda pouco conhecida.

3.4 Procedimento experimental

Os animais foram divididos em dois experimentos, recebendo salina ou o herbicida por gavagem diariamente, com os seguintes períodos de exposição:

- Exposição de curto prazo (*short-term* - 15 dias) – estudo piloto, na qual os animais foram divididos em 2 grupos experimentais de 15 animais cada, sendo: grupo controle (0,3 ml de solução salina), e grupo tratado com 250 mg/kg de glifosato [sal de di-amônio de N-(fosfometil) glicina]. O período de exposição de curto prazo (*short-term*, 15 dias) foi baseado em estudos de Lin et al. (2013), Middlemore-Risher et al. (2010) e Speed et al. (2012).

- Exposição subcrônica (28 dias), na qual os animais foram divididos em 3 grupos experimentais de 12 animais cada, sendo constituídos por grupo controle, (recebendo 0,3 ml de solução salina); grupo tratado com glifosato, 250 mg/kg [sal de di-amônio de N-(fosfometil) glicina]; e grupo tratado com glifosato, 500 mg/kg [sal de di-amônio de N-(fosfometil) glicina]. O período de exposição de 28 dias foi selecionado considerando-se os dados obtidos na exposição de curto prazo deste estudo e orientações preconizadas pela OECD (1997) para toxicidade subcrônica em ratos.

Em ambos os experimentos os animais foram expostos diariamente sempre no período da manhã, entre 8:30 e 10:30 horas. A dose de glifosato usada no presente estudo foi superior aos níveis aos quais a população é normalmente exposta (SOLOMON, 2016), e foi semelhante/aproximada às doses empregadas nos estudos de Ait Bali et al. (2017, 2018) e Martínez et al. (2018), além de levar em conta a DL₅₀ oral maior que 5000 mg/kg de peso (WHO, 1996).

Para verificar o ganho de peso corporal total do período ocorreram pesagens dos animais no início e fim da exposição, enquanto que o consumo de ração e ingestão de água foram medidos durante os períodos de exposição, uma vez por semana. Ao final das exposições os animais foram submetidos aos testes comportamentais e após o término dos mesmos os ratos foram sacrificados e o peso relativo dos órgãos verificado. Para a exposição subcrônica, foi determinado o conteúdo de monoaminas cerebrais.

3.4.1 Avaliação comportamental

Os testes comportamentais arena de campo aberto e labirinto em cruz elevado foram realizados, respectivamente, 24 horas após o último dia de tratamento, enquanto o teste comportamental *hole-board* foi realizado 48 horas após o último dia de tratamento. Todos os experimentos foram realizados sem a habituação prévia dos animais aos aparelhos e sempre avaliando-se um animal controle e um de cada grupo de tratamento, em sequência, para minimizar possíveis variações que poderiam ser influenciadas pelo ciclo circadiano dos animais.

Após o término do teste de cada animal, os aparelhos eram limpos com algodão embebido em álcool etílico (5%, v/v) para eliminar os vestígios do animal antecessor. Os testes foram realizados em salas silenciosas e com a iluminação adequada, entre 08:30 e 17:00 horas e filmados para a posterior avaliação.

3.4.1.1 Atividade locomotora

- Arena de campo aberto: de acordo com metodologia descrita previamente por Trombini et al. (2001).

O aparelho consiste em equipamento circular de madeira, de 97 cm de diâmetro por 32,5 cm de altura, dividido em 18 espaços (Figura 3).

Figura 3 - Arena de campo aberto.



Fonte: arquivo pessoal.

Os animais foram colocados no centro da arena e permaneceram nesse teste durante 3 minutos. A avaliação da atividade locomotora baseou-se no número de quadrantes percorridos pelo animal (animal com as quatro patas sobre o mesmo quadrante). Quanto maior esse número, maior atividade locomotora.

3.4.1.2 Coordenação motora

- *Hole-board*: de acordo com metodologia descrita previamente em Godinho et. al. (2014) para estudos em ratos.

O equipamento consiste em uma caixa de madeira de dimensões iguais a 30 cm de altura, 54 cm de largura e 57 cm de comprimento, com 81 perfurações medindo 2 cm de diâmetro e 1 cm de profundidade cada, em uma disposição 9 por 9 (Figura 4).

Figura 4 - Hole-board.



Fonte: arquivo pessoal.

Os ratos permaneceram durante cinco minutos e foram avaliados quanto à coordenação motora. Para avaliar esse parâmetro observou-se o deslizamento de patas para dentro de um orifício. Um maior número de deslizamento de patas indica diminuição de coordenação motora.

3.4.1.3 Ansiedade

- Labirinto em cruz elevado: de acordo com metodologia descrita previamente por Pellow et al. (1985) e convalidada por Pellow e File (1986), para o estudo de drogas ansiolíticas e ansiogênicas em ratos.

O aparelho consiste em um labirinto em cruz, confeccionado em madeira, com dois braços fechados (50x10x40cm) e dois braços abertos (10x40cm), e elevado a 50 cm do chão (Figura 5).

Figura 5 - Labirinto em cruz elevado.



Fonte: arquivo pessoal.

Os ratos foram colocados no centro do labirinto de frente para um dos braços fechados para que pudessem explorá-lo livremente durante 5 minutos. Foram considerados os seguintes parâmetros para a avaliação da ansiedade:

- número de entradas nos braços abertos;
- número de entradas nos braços fechados;
- tempo de permanência nos braços abertos;
- tempo de permanência nos braços fechados.

Neste teste, um aumento do número de entradas e do tempo de permanência nos braços fechados indica maior ansiedade nos animais.

- Arena de campo aberto (Figura 3): considerou-se para a avaliação da ansiedade:

- tempo de latência de cruzamento do centro pela primeira vez;
- número de cruzamentos pelo centro.

Um aumento do tempo de latência para o primeiro cruzamento e um menor número de cruzamentos pelo centro da arena indicam aumento da ansiedade dos animais.

Os testes comportamentais empregados neste estudo são amplamente utilizados e já descritos na literatura, tendo sido devidamente validados. Em nosso laboratório de pesquisa estes testes são utilizados rotineiramente com excelentes resultados e publicações referentes ao estudo da neurotoxicidade por agentes químicos ambientais dos tipos praguicidas e metais pesados (TERÇARIOL; GODINHO, 2011; GODINHO et al., 2014; GODINHO; ANSELMO; HORTA, 2017; GODINHO et al., 2017).

3.5 Determinação de monoaminas – exposição subcrônica

Ao final dos testes comportamentais, 72 horas após o final do tratamento, 8 ratos de cada grupo submetidos a exposição subcrônica foram mortos por decapitação. O cérebro foi rapidamente removido e córtex pré-frontal, hipocampo e estriado foram dissecados sobre placa de gelo. As dissecações foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em -80°C até o momento das análises (COSTA et al. 2011; COSTA et al. 2013). A determinação de monoaminas foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia I, na Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O conteúdo de serotonina (5HT), dopamina (DA) e seus respectivos metabólitos, ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) e 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC), foram determinados por HPLC UltiMate 3000 acoplado ao detector eletroquímico Coulochem III (Dionex/Thermo Scientific). As dissecções foram homogeneizadas individualmente em 1000 μL de solução composta de ácido perclórico 0,15 M, EDTA 0,1 mM e isoproterenol 200 pg/volume de injeção em μL . Cada homogenato foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos a 4°C . Os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,22 μm (Durapore, Millipore), previamente preenchida com solução de ácido perclórico 0,15 M e, em seguida, esvaziada com ar. Essa mesma solução foi utilizada para lavagem do filtro entre amostras. A fase móvel era composta por di-hidrogenofosfato de sódio 75 mM, cloreto de sódio 10 mM, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 25 μM , ácido 1-octanossulfônico de sódio 1,7 mM e acetonitrila a 4%, na temperatura de 32°C e o pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico. A fase estacionária consistiu em uma coluna de fase reversa 250 \times 4,6 mm (Kinetex, 5 μm , EVO C18 100A PN – 00G-4633-E0), precedida por uma pré-coluna de 4,6 mm (Kinetex EVO C18 – PN – AJ0-9296). As condições de corrida foram: fluxo de 0,8 mL/min (1459 PSI) (bomba ISO-3100BM); volume de amostra injetado para as dosagens no córtex pré-frontal e hipocampo foi de 10 μL ; e para o estriado foi de 2 μL . Os potenciais dos eletrodos no detector foi: EoxGuarda = 500 mV; Eox1 = -300 mV; icell1 = -984,174 nA (2nA) e Eox2 = 400 mV; icell2 = 25,686 nA (5nA). A sensibilidade foi de 5 nA, a filtração ocorreu por 10 segundos e o tempo de corrida foi de 27 minutos. Os cromatogramas foram analisados com o software *Chromeleon 6.8*.

5HT, 5HIAA, DA, DOPAC e isoproterenol (padrão interno) foram identificados pelo tempo de retenção de seu pico e quantificados por um método de padronização

interna baseado na área sob a curva. As concentrações das amostras foram calculadas com base em uma curva de calibração contendo concentrações conhecidas de 5HT, 5HIAA, DA, DOPAC e isoproterenol. As concentrações da curva de calibração foram: 11,1; 33,3; 100; 300 pg/volume de injeção em μL para DA, DOPAC, 5HT e 5HIAA; e para o isoproterenol: 200 ng/volume de injeção em μL . Todas as amostras de cada área do cérebro foram processadas na mesma análise para evitar variação interensaio. Para o córtex pré-frontal e hipocampo, a variação intra-ensaio foi de 4,4% e para o estriado de 1,5%. Para cada amostra, os níveis dos neurotransmissores e metabólitos foram normalizados para o conteúdo de proteína e expressos em picogramas por micrograma de proteína (pg/ μg de proteína). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando reativo de cor BioRad (#500-0006, Bio-Rad Laboratories, Califórnia, Estados Unidos), de acordo com instruções do fabricante. Posteriormente, foram calculadas as relações 5HIAA/5HT e DOPAC/DA como indicadores de taxa de renovação (*turnover*) de 5HT e DA, respectivamente.

3.6 Análise estatística

Os dados obtidos na exposição de curto prazo foram analisados pelo *Student's t test*, e para a exposição subcrônica utilizou-se análise de variância (*one-way ANOVA*), complementado com o teste de *Tukey*. Os *outliers* foram identificados pelo método ROUT. As análises foram realizadas usando o software estatístico GraphPad Prism® (versão 6.01). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas se $P < 0,05$ (Snedecor e Cochran, 1991). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

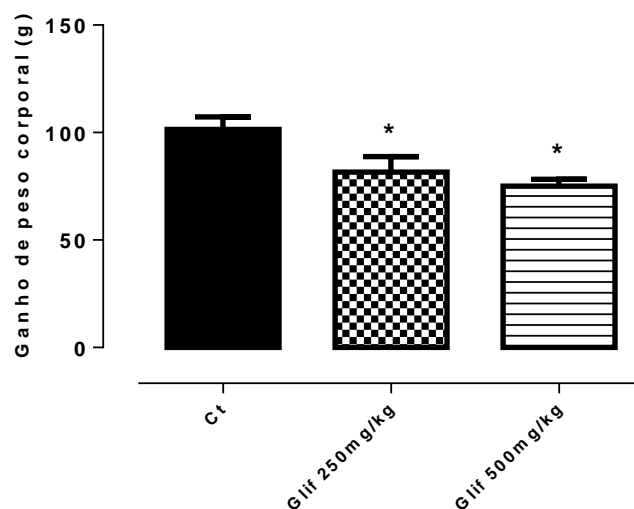
4 RESULTADOS

4.1 Ganho de peso corporal, consumo de ração e ingestão de água

O ganho de peso corporal (g) durante a exposição de curto prazo não foi afetado quando o grupo tratado, 250 mg/kg ($43,87 \pm 2,53$), foi comparado com seu respectivo controle ($42,47 \pm 3,15$). Com relação ao consumo de ração, não houve diferença significativa nos diferentes períodos analisados. Para 250 mg/kg e controle, respectivamente: 1º semana: $23,77 \pm 0,79$; $23,20 \pm 0,48$ e 2º semana: $24,87 \pm 0,079$; $24,87 \pm 0,079$. Para a ingestão de água houve diminuição significativa de 7,16% na 1º semana e 13,53% na 2º semana, quando o grupo tratado foi comparado ao seu controle. Para 250 mg/kg e controle, respectivamente: 1º semana: $43,33 \pm 0,75$; $46,67 \pm 0,97$ e 2º semana: $38,33 \pm 1,27$; $44,33 \pm 0,97$.

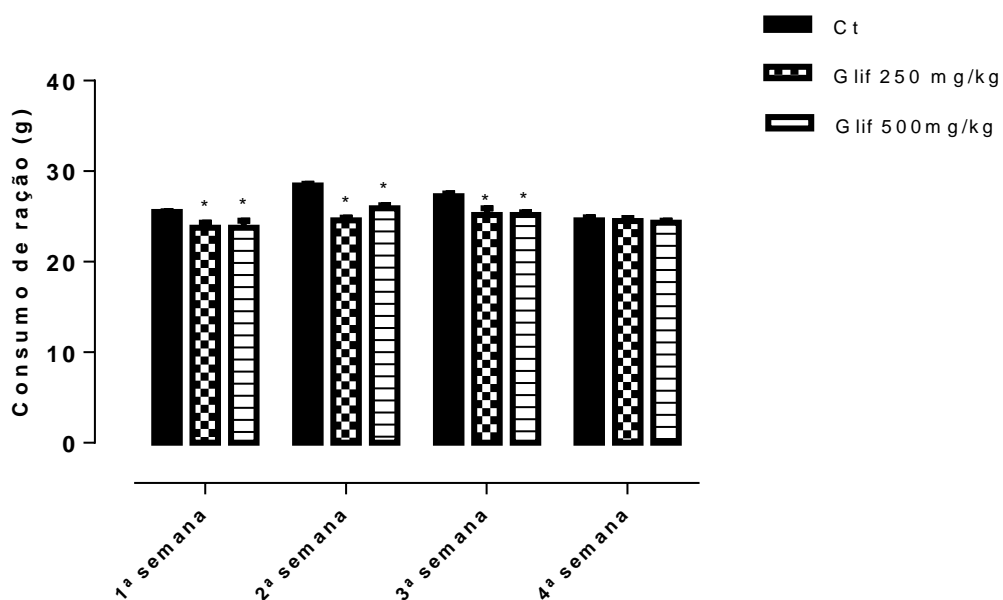
Para a exposição subcrônica os grupos tratados, 500 mg/kg ($75,00 \pm 3,28$) e 250 mg/kg ($81,58 \pm 7,19$) ganharam menos peso quando comparados a seu controle ($101,40 \pm 5,83$) (Figura 6). Com relação ao consumo de ração (g) e ingestão de água (mL) esses parâmetros apresentaram diferenças significativas em diferentes períodos quando os grupos tratados foram comparados ao controle (Figuras 7 e 8). O consumo de ração foi menor da primeira a terceira semana de tratamento quando os grupos que receberam o herbicida foram comparados ao controle. Para 500 mg/kg, 250 mg/kg e controle, respectivamente: 1º semana: $23,75 \pm 0,77$; $23,75 \pm 0,55$; $25,50 \pm 0,09$; 2º semana: $25,92 \pm 0,31$; $24,58 \pm 0,29$; $28,42 \pm 0,19$; 3º semana: $25,17 \pm 0,29$; $25,17 \pm 0,72$; $27,25 \pm 0,28$ e 4º semana: $24,30 \pm 0,23$; $24,50 \pm 0,33$; $24,58 \pm 0,34$. Enquanto a ingestão de água foi menor em todos os períodos analisados quando houve comparação dos tratamentos ao controle. Para 500 mg/kg, 250 mg/kg e controle, respectivamente: 1º semana: $37,92 \pm 0,77$; $36,67 \pm 1,16$; $41,67 \pm 0,47$; 2º semana: $41,67 \pm 0,35$; $37,50 \pm 0,61$; $45,83 \pm 1,55$; 3º semana: $37,50 \pm 0,61$; $35,42 \pm 0,77$; $40,42 \pm 0,77$ e 4º semana: $37,92 \pm 0,64$; $37,92 \pm 0,71$; $41,67 \pm 1,08$.

Figura 6 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o ganho de peso corporal na exposição subcrônica.



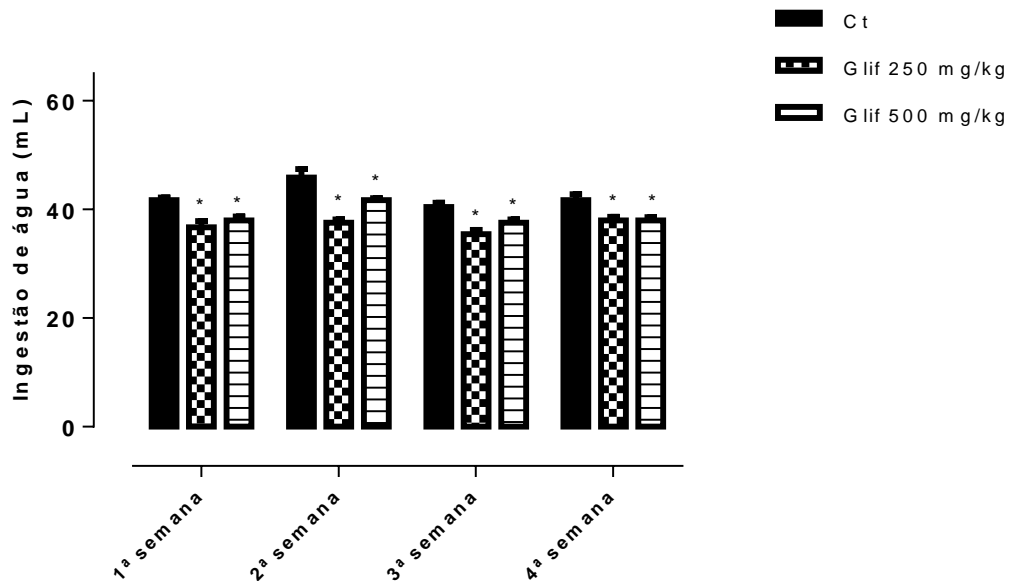
Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. N = 12 animais por grupo. Ct=controle, Glif=glifosato. *Significativo em relação ao controle, para $P < 0,05$ (*one-way ANOVA*).

Figura 7 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o consumo de ração em diferentes períodos na exposição subcrônica.



Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. N = 12 animais por grupo. Ct=controle, Glif=glifosato. *Significativo em relação ao controle, para $P < 0,05$ (*one-way ANOVA*).

Figura 8 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre a ingestão de água em diferentes períodos na exposição subcrônica.



Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. N = 12 animais por grupo. Ct=controle, Glif=glifosato. *Significativo em relação ao controle, para $P < 0,05$ (*one-way ANOVA*).

4.2 Peso relativo (%) de órgãos

Em ambas as exposições não foram verificadas diferenças significativas dos grupos tratados com relação ao seu respectivo grupo controle sobre o peso relativo de órgãos (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Efeito do tratamento a curto prazo sobre o peso relativo (%) de órgãos.

Órgãos	Controle	Glifosato (250 mg/kg)
Cérebro	0,482 \pm 0,016	0,465 \pm 0,016
Coração	0,339 \pm 0,009	0,337 \pm 0,008
Fígado	3,765 \pm 0,103	3,662 \pm 0,125
Rins	0,741 \pm 0,035	0,710 \pm 0,034
Baço	0,273 \pm 0,019	0,279 \pm 0,029
Testículos	0,950 \pm 0,039	0,927 \pm 0,037

Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). N =7. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos para $P < 0,05$ (*Student's t test*).

Tabela 2 - Efeito do tratamento subcrônico sobre o peso relativo (%) de órgãos.

Órgãos	Controle	Glifosato 250 mg/kg	Glifosato 500 mg/kg
Cérebro	0,495 ± 0,115	0,550 ± 0,021	0,520 ± 0,014
Coração	0,402 ± 0,134	0,428 ± 0,113	0,405 ± 0,012
Fígado	3,954 ± 0,110	3,974 ± 0,121	3,933 ± 0,116
Rins	0,760 ± 0,236	0,801 ± 0,017	0,816 ± 0,023
Baço	0,297 ± 0,012	0,302 ± 0,011	0,294 ± 0,007
Testículos	0,921 ± 0,022	1,047 ± 0,043	0,995 ± 0,036

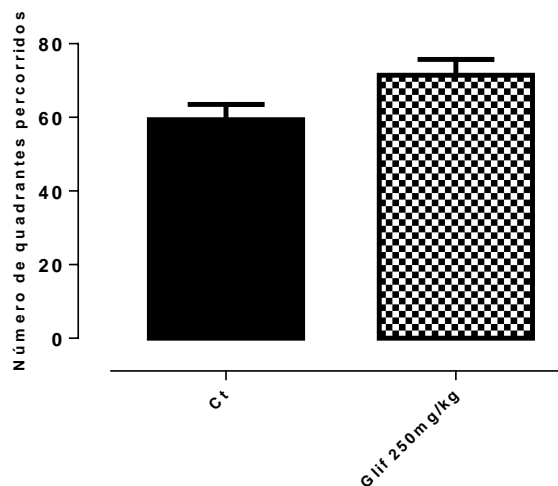
Resultados apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). N = 9-10. Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle para $P < 0,05$ (*one-way ANOVA*).

4.3 Avaliação comportamental

4.3.1 Atividade locomotora

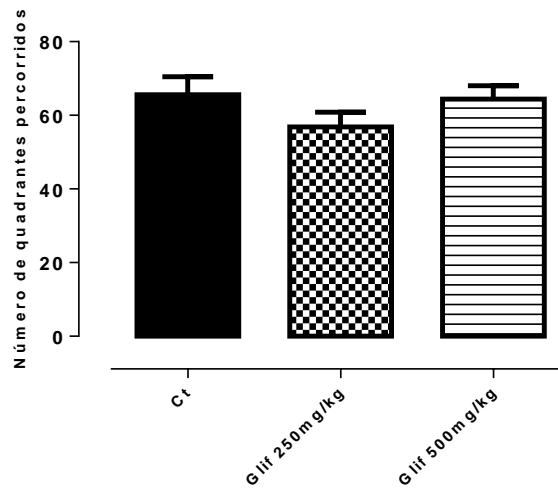
Nas duas exposições não foi constatada alteração na atividade locomotora quando houve comparação do(s) grupo(s) tratado(s) a seu respectivo controle (Figuras 9 e 10). Para a exposição de curto prazo, 250 mg/kg e grupo controle, respectivamente: $71,47 \pm 4,26$; $59,40 \pm 4,11$. Para a exposição subcrônica, 500 mg/kg 250 mg/kg e controle, respectivamente: $64,42 \pm 3,62$; $56,83 \pm 4,04$; $65,58 \pm 4,91$.

Figura 9 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre atividade locomotora no teste da arena de campo aberto na exposição de curto prazo.



Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. N = 15 animais por grupo. Ct=controle, Glif=glifosato. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos para $P < 0,05$ (*Student's t test*).

Figura 10 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre atividade locomotora no teste da arena de campo aberto na exposição subcrônica.

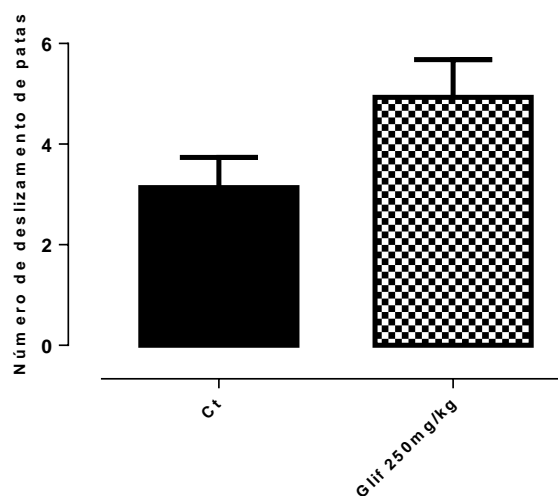


Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. N = 12 animais por grupo. Ct=controle, Glif=glifosato. Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle para $P < 0,05$ (*one-way ANOVA*).

4.3.2 Coordenação motora

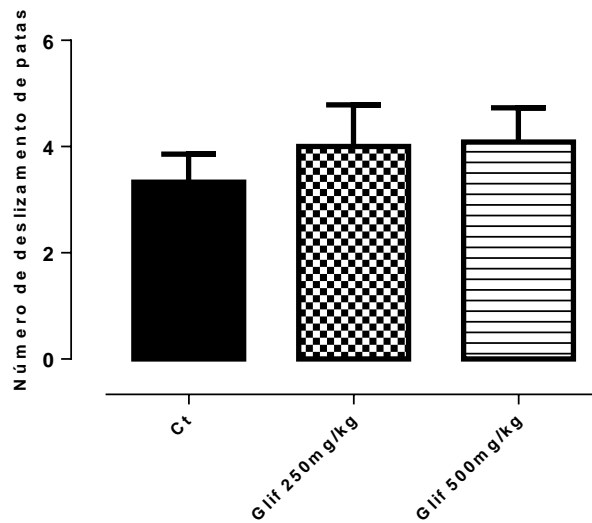
Para as duas exposições, de curto prazo 250 mg/kg ($4,93 \pm 0,75$) e controle ($3,13 \pm 0,60$), e subcrônica 500 mg/kg ($4,08 \pm 0,65$), 250 mg/kg ($4,00 \pm 0,79$) e controle ($3,33 \pm 0,53$), não foi verificada nenhuma diferença significativa na coordenação motora entre os grupos experimentais quando comparados com seu respectivo controle (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre a coordenação motora no teste do *hole-board* na exposição de curto prazo.



Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. N = 14-15 animais por grupo. Ct=controle, Glif=glifosato. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos para $P < 0,05$ (*Student's t test*).

Figura 12 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre a coordenação motora no teste do *hole-board* na exposição subcrônica.



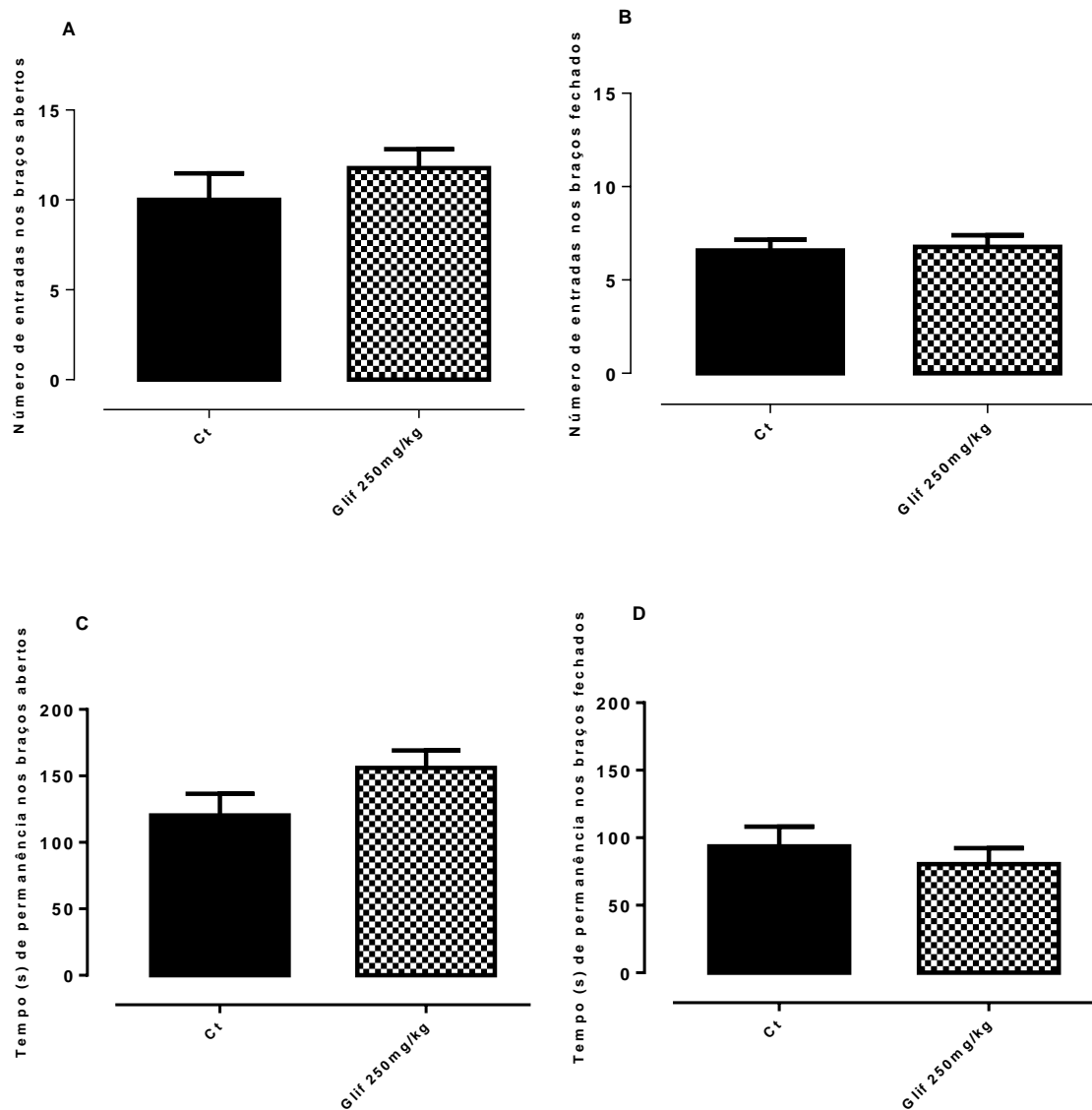
Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. N = 12 animais por grupo. Ct=controle, Glif=glifosato. Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle para $P < 0,05$ (*one-way ANOVA*).

4.3.3 Ansiedade

Na avaliação da ansiedade não se observou diferença significativa entre o(s) tratamento(s) e seu respectivo controle, nos testes labirinto em cruz elevado (Figuras 13 e 14) e arena de campo aberto (Figuras 15 e 16). No teste labirinto em cruz elevado, para a exposição de curto prazo, 250 mg/kg e para o grupo controle, respectivamente: número de entradas nos braços abertos $11,77 \pm 1,06$; $10,00 \pm 1,48$; número de entradas nos braços fechados $6,77 \pm 0,62$; $6,57 \pm 0,59$; tempo de permanência (s) nos braços abertos $155,94 \pm 13,26$; $120,19 \pm 16,48$; tempo de permanência (s) nos braços fechados $80,48 \pm 11,90$; $93,55 \pm 14,70$. Para a exposição subcrônica, 500 mg/kg, 250 mg/kg e controle respectivamente: número de entradas nos braços abertos $9,42 \pm 1,03$; $9,50 \pm 1,02$; $9,42 \pm 1,02$; número de entradas nos braços fechados $5,42 \pm 0,53$; $6,25 \pm 0,57$; $5,83 \pm 0,68$; tempo de permanência (s) nos braços abertos $138,55 \pm 15,98$; $122,99 \pm 12,95$; $140,78 \pm 13,98$; tempo de permanência (s) nos braços fechados $117,39 \pm 14,92$; $118,34 \pm 14,14$; $100,68 \pm 12,90$. No teste arena de campo aberto, para a exposição de curto prazo, 250 mg/kg e controle, respectivamente: número de cruzamentos pelo centro $0,80 \pm 0,24$; $1,33 \pm 0,23$; tempo (s) de latência para a primeira travessia $125,57 \pm 16,01$; $90,93 \pm 14,38$. Para a exposição subcrônica, 500 mg/kg, 250 mg/kg e grupo controle, respectivamente: número de cruzamentos pelo centro $0,50 \pm$

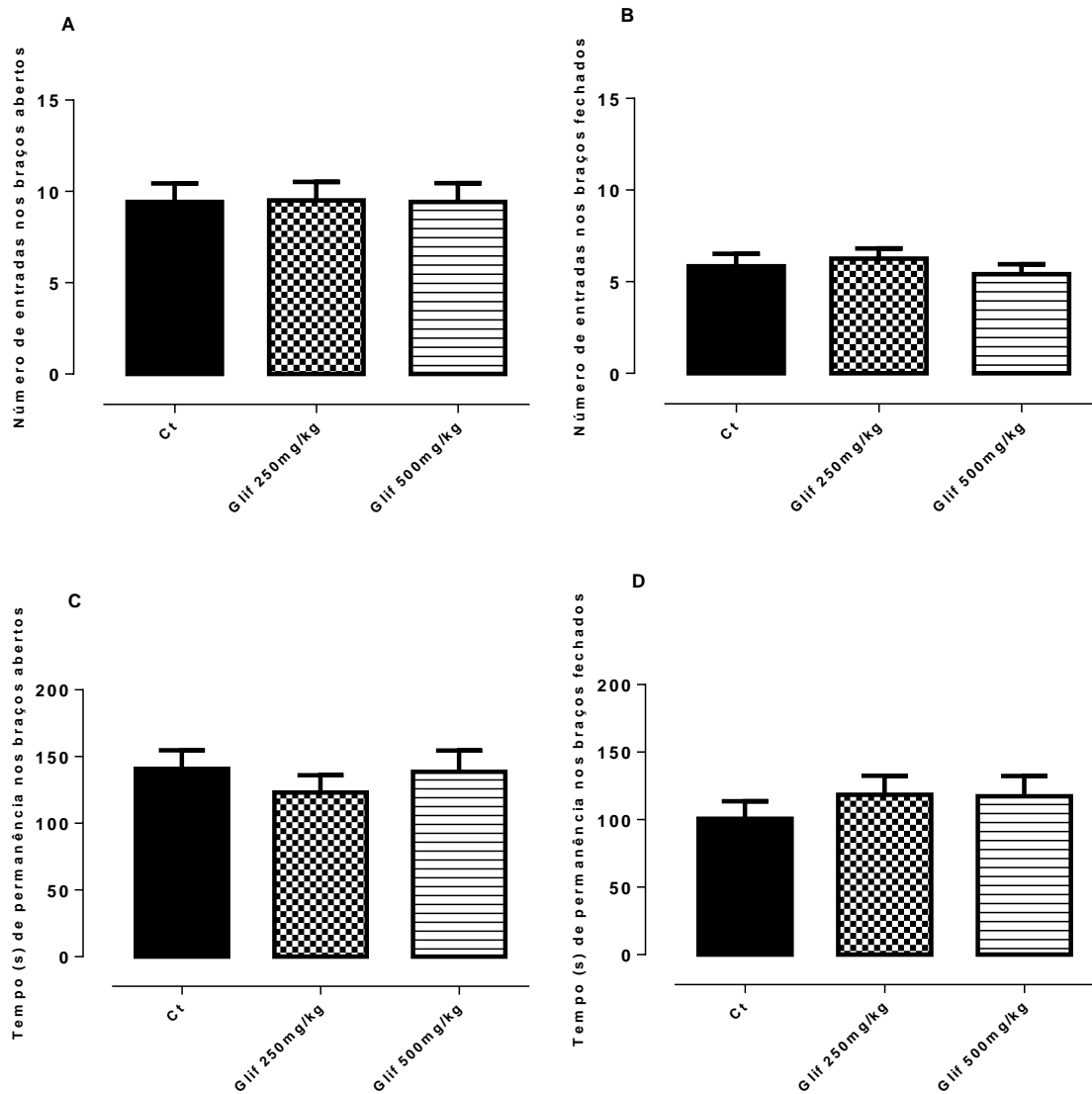
0,19; $0,83 \pm 0,27$; $0,33 \pm 0,14$; tempo (s) de latência para a primeira travessia $145,47 \pm 15,24$; $121,84 \pm 16,65$; $147,15 \pm 16,14$.

Figura 13 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o comportamento de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado na exposição de curto prazo.



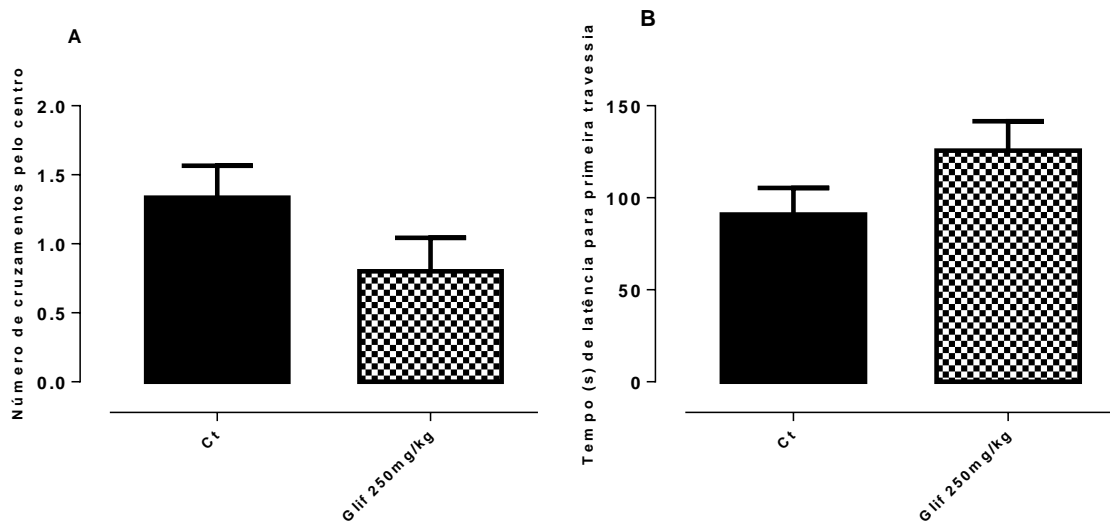
Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. N = 13-14 animais por grupo. Ct= controle; Glif=glifosato. (A) Número de entradas nos braços abertos; (B) Número de entradas nos braços fechados; (C) Tempo de permanência (s) nos braços abertos; (D) Tempo de permanência (s) nos braços fechados. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos para $P < 0,05$ (*Student's t test*).

Figura 14 - Efeito do tratamento com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o comportamento de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado na exposição subcrônica.



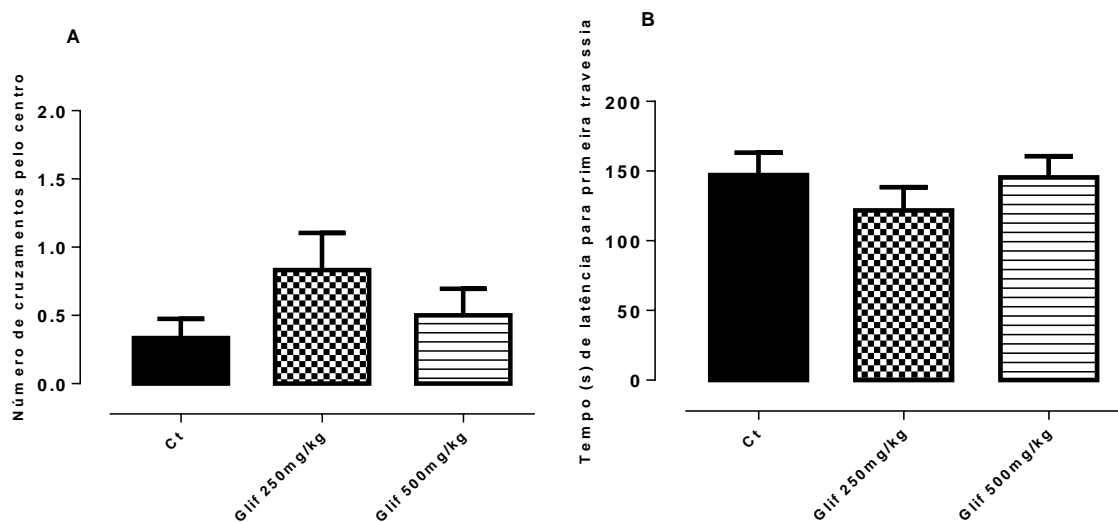
Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. N = 12 animais por grupo. Ct= controle; Glif=glifosato. (A) Número de entradas nos braços abertos; (B) Número de entradas nos braços fechados; (C) Tempo de permanência (s) nos braços abertos; (D) Tempo de permanência (s) nos braços fechados. Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle para $P < 0,05$ (*one-way ANOVA*).

Figura 15 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o comportamento de ansiedade no teste arena de campo aberto na exposição de curto prazo.



Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. N = 15 animais por grupo. Ct= controle; Glif=glifosato. (A) Número de cruzamentos pelo centro. (B) Tempo de latência (s) para primeira travessia pelo centro. Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos para $P < 0,05$ (*Student's t test*).

Figura 16 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o comportamento de ansiedade no teste arena de campo aberto na exposição subcrônica.



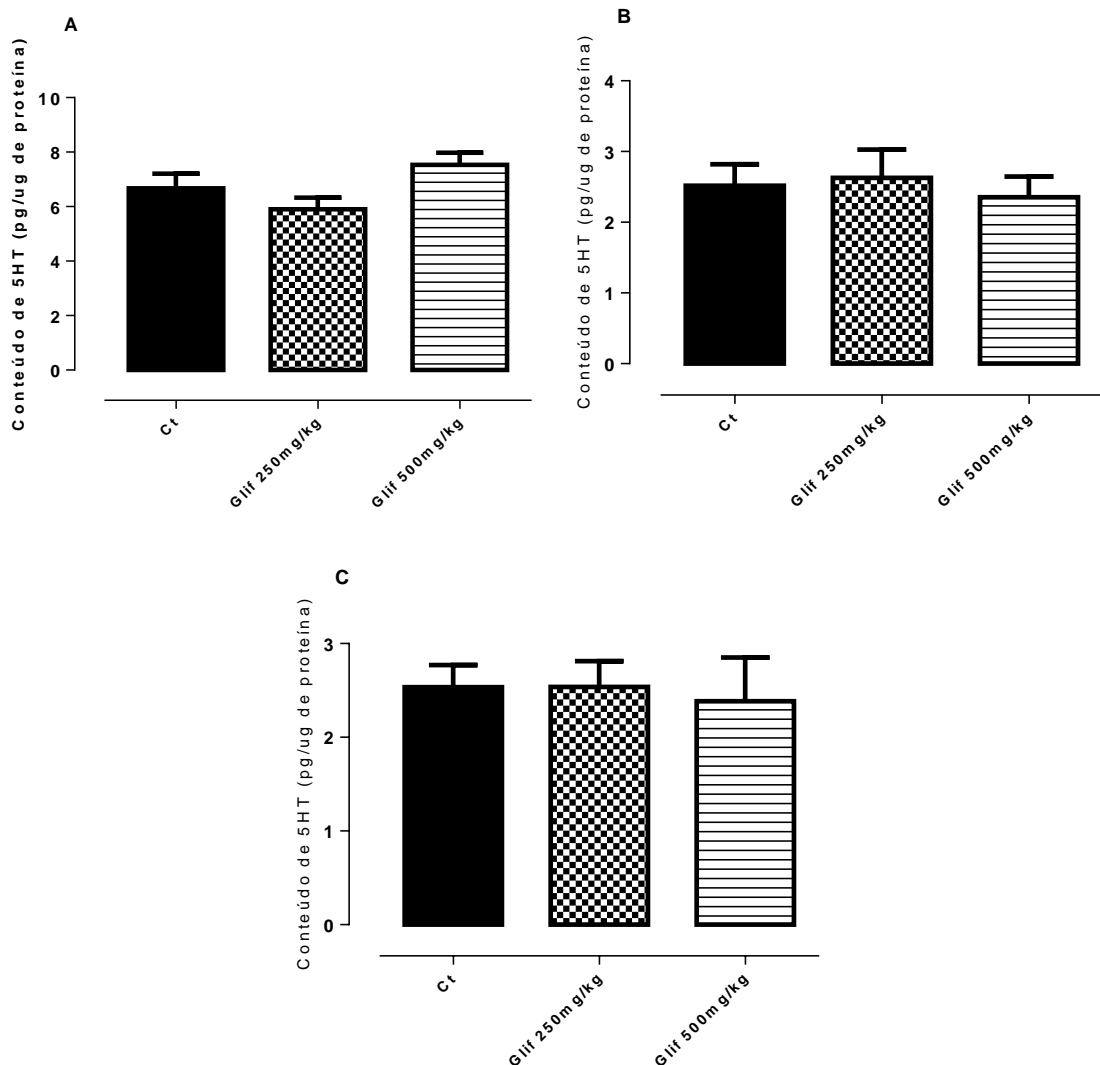
Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. N = 12 animais por grupo. Ct= controle; Glif=glifosato. (A) Número de cruzamentos pelo centro. (B) Tempo (s) de latência para primeira travessia pelo centro. Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle para $P < 0,05$ (*one-way ANOVA*).

4.4 Determinação de monoaminas - exposição subcrônica

4.4.1 Serotonina (5HT)

Para o conteúdo de 5HT, não houve diferença significativa nas diferentes áreas cerebrais quando os grupos tratados com o herbicida foram comparados com o controle (Figura 17). Para 500 mg/kg, 250 mg/kg e controle, respectivamente: córtex pré-frontal: $7,54 \pm 0,44$; $5,90 \pm 0,42$; $6,68 \pm 0,53$; hipocampo: $2,36 \pm 0,29$; $2,63 \pm 0,40$; $2,52 \pm 0,30$ e estriado: $2,39 \pm 0,47$; $2,54 \pm 0,27$; $2,53 \pm 0,24$.

Figura 17 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o conteúdo de 5HT no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.

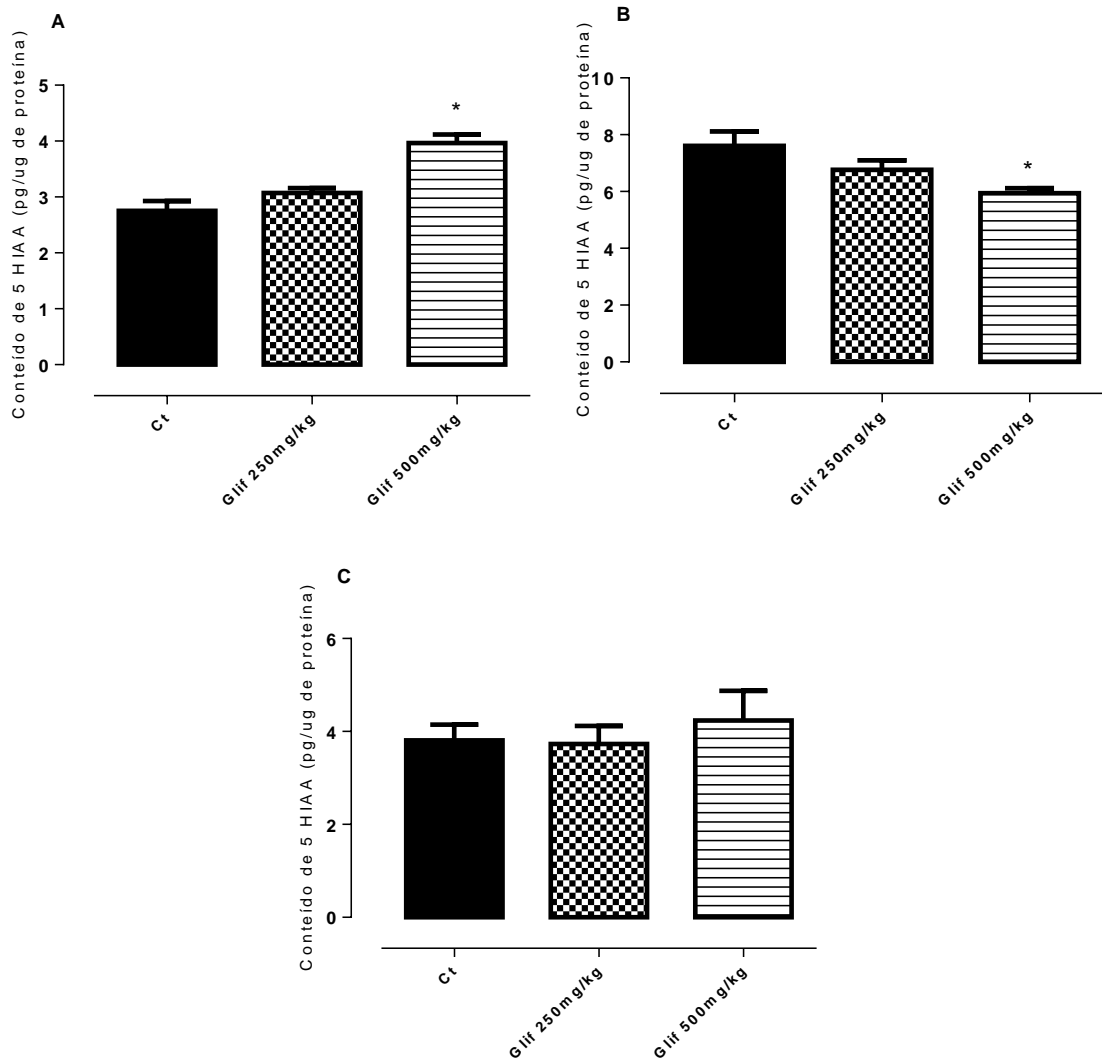


Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. Ct= controle; Glif=glifosato. (A) Córtex pré-frontal N = 8; (B) Hipocampo N = 8; (C) Estriado N = 8. Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle para $P < 0,05$ (*one-way ANOVA*).

4.4.2 Ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA)

Para o conteúdo de 5HIAA, foi verificado aumento significativo na dose de 500 mg/kg no córtex pré-frontal, enquanto no hipocampo houve diminuição significativa quando os grupos tratados com o herbicida foram comparados ao controle (Figura 18). Para 500 mg/kg, 250 mg/kg e controle, respectivamente: córtex pré-frontal: $3,97 \pm 0,15$; $3,07 \pm 0,09$; $2,75 \pm 0,17$; hipocampo: $5,94 \pm 0,18$; $6,77 \pm 0,33$; $7,61 \pm 0,51$ e estriado: $4,24 \pm 0,64$; $3,73 \pm 0,39$; $3,81 \pm 0,34$.

Figura 18 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o conteúdo de 5HIAA no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.

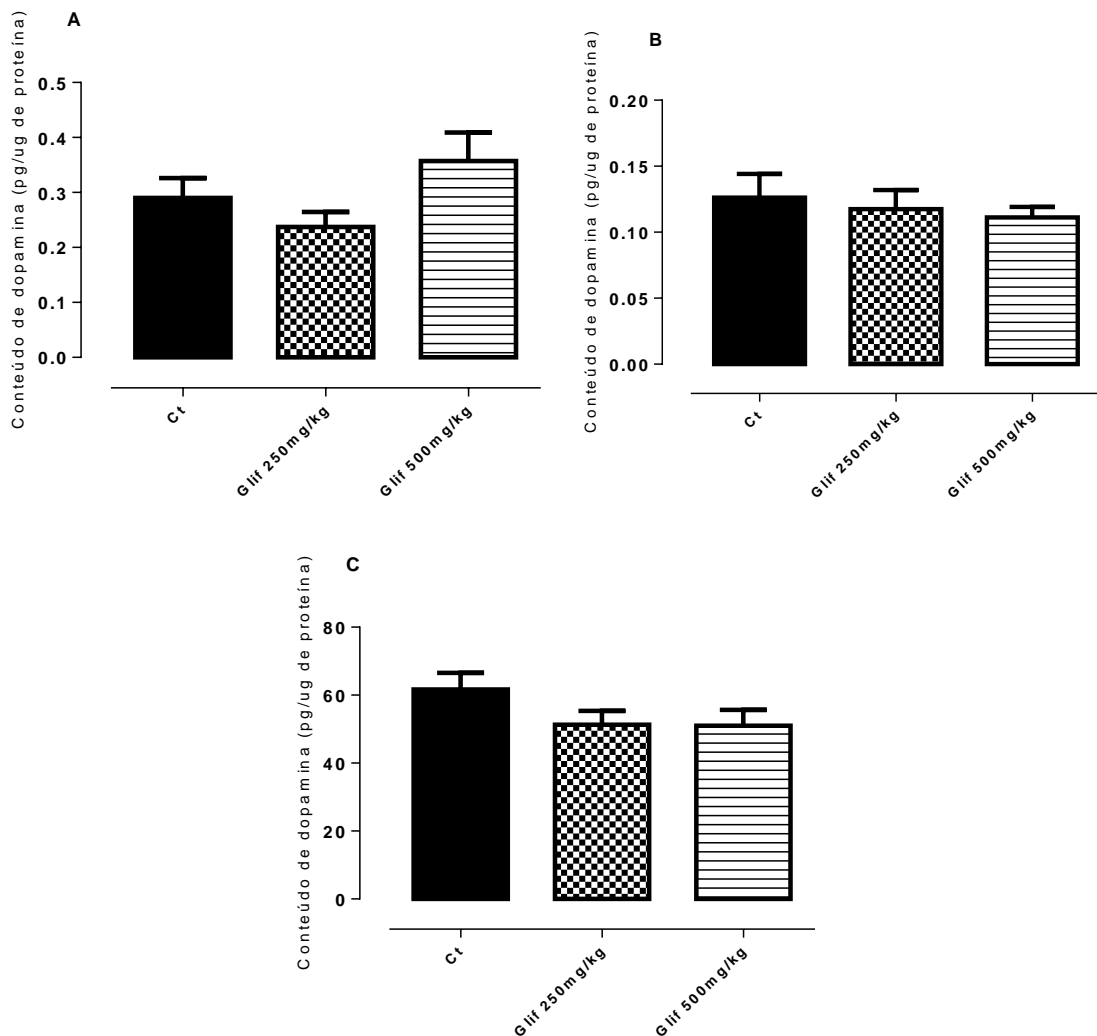


Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. Ct= controle; Glif=glifosato. (A) Córtex pré-frontal N = 7-8; (B) Hipocampo N = 8; (C) Estriado N = 8. *Significativo em relação ao controle, para $P < 0,05$ (one-way ANOVA).

4.4.3 Dopamina (DA)

Para o conteúdo de DA, não houve diferença significativa nas diferentes áreas do cérebro quando os grupos tratados com o herbicida foram comparados com o controle (Figura 19). Para 500 mg/kg, 250 mg/kg e controle, respectivamente: córtex pré-frontal: $0,36 \pm 0,052$; $0,24 \pm 0,027$; $0,29 \pm 0,036$; hipocampo: $0,11 \pm 0,008$; $0,12 \pm 0,014$; $0,13 \pm 0,018$ e estriado: $51,03 \pm 4,62$; $51,33 \pm 4,06$; $61,68 \pm 4,84$.

Figura 19 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o conteúdo de DA no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.

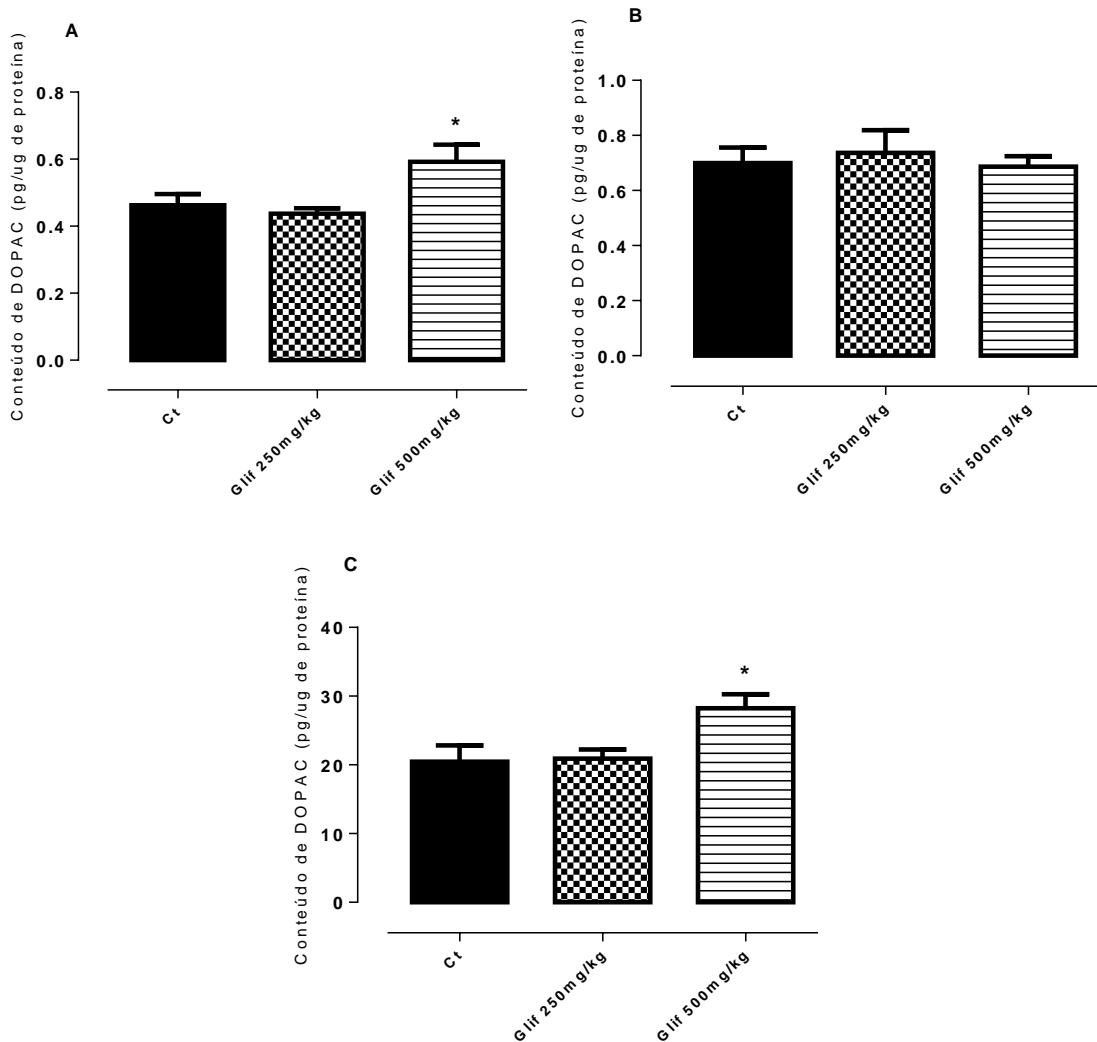


Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. Ct= controle; Glif=glifosato. (A) Córtex pré-frontal N = 7-8; (B) Hipocampo N = 8; (C) Estriado N = 8. Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle para $P < 0,05$ (*one-way ANOVA*).

4.4.4 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC)

Para o conteúdo de DOPAC, houve aumento significativo para a dose de 500 mg/kg no córtex pré-frontal e estriado quando os grupos tratados com o herbicida foram comparados ao controle (Figura 20). Para 500 mg/kg, 250 mg/kg e controle, respectivamente: córtex pré-frontal: $0,59 \pm 0,051$; $0,44 \pm 0,016$; $0,46 \pm 0,033$; hipocampo: $0,69 \pm 0,038$; $0,74 \pm 0,082$; $0,70 \pm 0,056$ e estriado: $28,25 \pm 2,02$; $20,91 \pm 1,31$; $20,46 \pm 2,37$.

Figura 20 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o conteúdo de DOPAC no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.

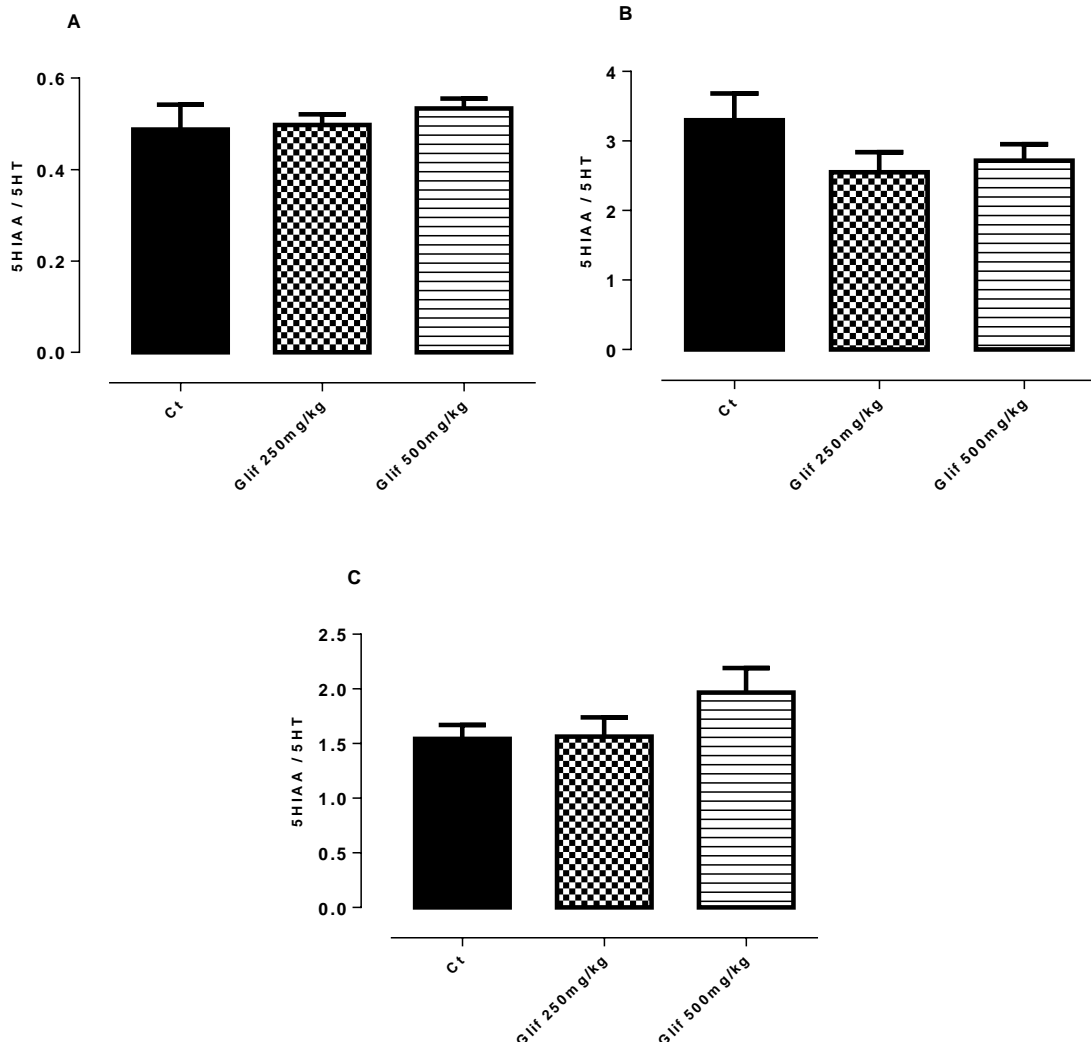


Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. Ct= controle; Glif=glifosato. (A) Córtex pré-frontal N = 8; (B) Hipocampo N = 8; (C) Estriado N = 8. *Significativo em relação ao controle, para $P < 0,05$ (one-way ANOVA).

4.4.5 Turnover (taxa de renovação) de serotonina

Para a taxa de renovação de 5HT (5HIAA / 5HT), não foi verificada diferença significativa nas diferentes áreas do cérebro quando os grupos tratados com o herbicida foram comparados com o controle (Figura 21). Para 500 mg/kg, 250 mg/kg e controle, respectivamente: córtex pré-frontal: $0,53 \pm 0,022$; $0,50 \pm 0,023$; $0,49 \pm 0,054$; hipocampo: $2,72 \pm 0,24$; $2,55 \pm 0,29$; $3,30 \pm 0,38$ e estriado: $1,97 \pm 0,22$; $1,56 \pm 0,18$; $1,54 \pm 0,13$.

Figura 21 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o turnover de 5HT no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.

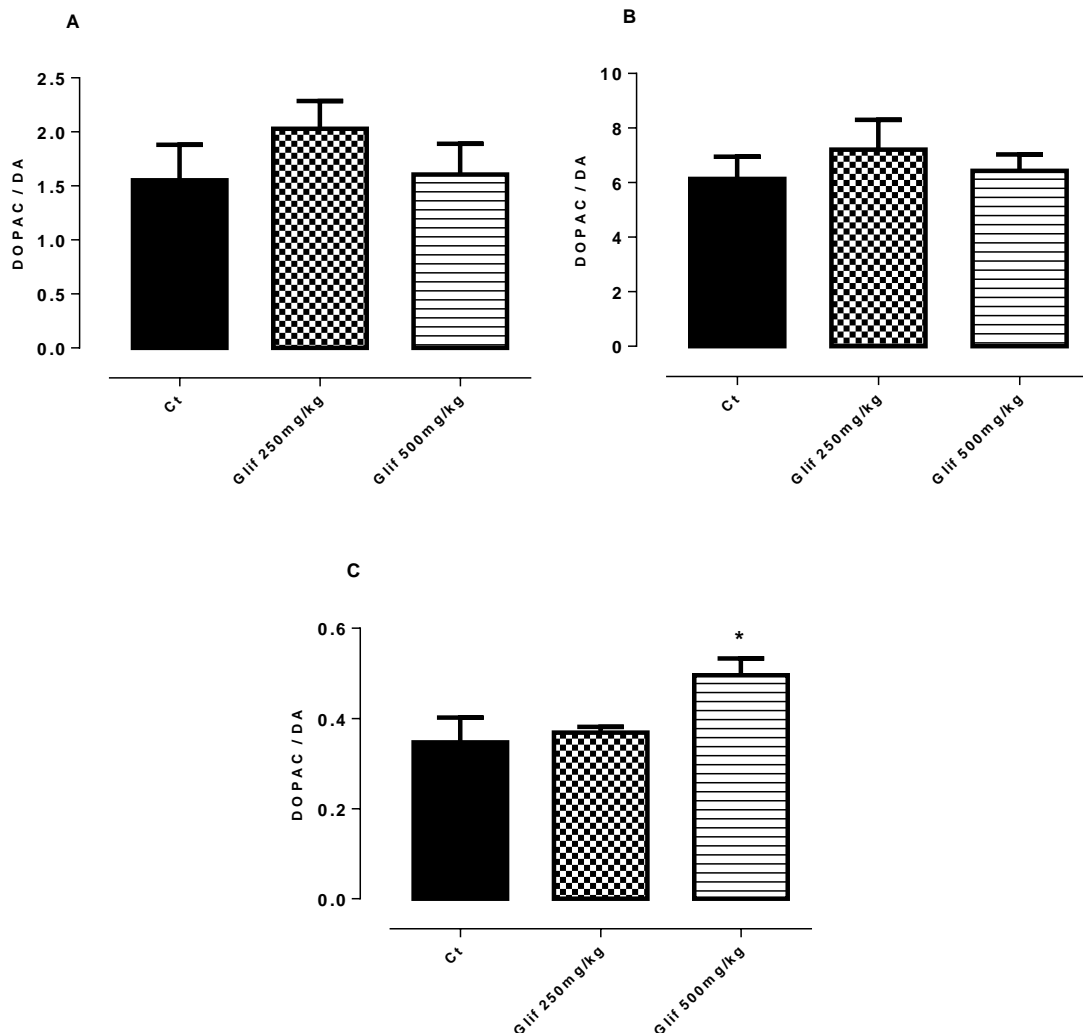


Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. Ct= controle; Glif=glifosato. (A) Córtex pré-frontal N = 7-8; (B) Hipocampo N = 7-8; (C) Estriado N = 8. Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle para $P < 0,05$ (one-way ANOVA).

4.4.6 Turnover (taxa de renovação) de dopamina

Para a taxa de renovação de DA (DOPAC / DA), houve aumento significativo na dose de 500 mg/kg no estriado quando os grupos tratados com o herbicida foram comparados ao controle (Figura 22). Para 500 mg/kg, 250 mg/kg e controle, respectivamente: córtex pré-frontal: $1,61 \pm 0,29$; $2,03 \pm 0,26$; $1,55 \pm 0,33$; hipocampo: $6,43 \pm 0,61$; $7,20 \pm 1,10$; $6,13 \pm 0,82$ e estriado: $0,50 \pm 0,038$; $0,37 \pm 0,013$; $0,35 \pm 0,055$.

Figura 22 - Efeito dos tratamentos com o herbicida Roundup® à base de glifosato, sobre o turnover de DA no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.



Os resultados estão apresentados como média \pm E.P.M. Ct= controle; Glif=glifosato. (A) Córtex pré-frontal N = 8; (B) Hipocampo N = 8; (C) Estriado N = 7-8. *Significativo em relação ao controle, para $P < 0,05$ (one-way ANOVA).

5 DISCUSSÃO

No presente experimento o Roundup® (glifosato) não alterou o ganho de peso corporal em relação ao grupo controle na exposição de curto prazo, apesar da menor ingestão de água. Entretanto, na exposição subcrônica houve diminuição significativa no ganho de peso corporal nos grupos tratados em relação a seu controle coincidindo com menor consumo de ração e ingestão de água em diferentes períodos analisados.

O resultado da exposição de curto prazo está em conformidade com prévios estudos que também não observaram alteração de peso corporal devido à exposição ao glifosato como em El-Shenawy (2009) em ratos albinos tratados (i.p.) com Roundup® (269.9 mg/kg) ou glifosato (134.95 mg/kg) a cada 2 dias, durante 2 semanas; Hernández-Plata et al. (2015) após a administração i.p. de glifosato nas doses 50, 100 e 150 mg/kg (2 semanas/ 3 injeções por semana) em ratos *Sprague-Dawley* e ainda, Martínez et al. (2018) após a administração oral de glifosato (35, 75, 150 e 800 mg/kg durante 6 dias consecutivos) em ratos *Wistar*. A exposição subcrônica, no entanto, está de acordo com estudos de Ait Bali et al. (2017) na exposição subcrônica (6 semanas) e crônica (12 semanas) ao Roundup® em camundongos à 250 ou 500 mg / kg / dia de glifosato (Roundup®), por gavagem, e Cattani et al. (2017), em diferentes períodos pós-natal em filhotes quando as mães foram expostas a 1% do herbicida na água de beber (correspondente a 0,36% de glifosato), do 5º dia gestacional até o 15º ou 60º dia pós-natal, que demonstraram diminuição no peso corporal nos diferentes tratamentos.

Alterações do peso corporal bem como do consumo de água e ração são comumente empregados como biomarcadores não invasivos relacionados ao estado geral de saúde dos animais e/ou de progressão de doenças associadas ou não à neurotoxicidade (HUANG; HO; MEHENDALE, 1981; HUNTER et al., 2014). A diminuição da ingestão de água dos animais expostos ao herbicida na exposição de curto prazo por si só não sugere toxicidade, uma vez que os animais não tiveram alterações significativas no ganho de peso corporal e consumo de ração. Já a diminuição do consumo de ração e ingestão de água, e por consequência diminuição do peso dos animais na exposição subcrônica, pode ser o reflexo de alguma forma de toxicidade provocado pela exposição ao agente estudado.

Com relação ao peso relativo dos órgãos analisados não foi verificada nenhuma diferença significativa em ambas as exposições (curto prazo e subcrônica) quando

houve comparação do(s) resultado(s) do(s) grupo(s) tratado(s) com seu respectivo grupo controle. Esses resultados estão de acordo com Dallegrave et al. (2003) no qual não foram observadas alterações significativas no peso relativo do coração, fígado, rins e baço em ratas *Wistar* tratadas com água, 500, 750 ou 1000 mg/kg de glifosato-Roundup® do dia 6 ao 15 de gestação. Entretanto, não está em conformidade com Ait Bali et al. (2017) na exposição ao glifosato (Roundup®) em camundongos onde houve diminuição significativa do peso relativo do cérebro e fígado após 6 semanas de tratamento (500 mg/kg), e após 12 semanas no cérebro (500 mg/kg), rins, fígado e peso do pulmão (250 e 500 mg/kg).

Em nossos experimentos, com relação à atividade motora, nenhuma alteração foi observada em ambas as exposições quando comparou-se o(s) tratamento(s) com Roundup® (glifosato) a seu respectivo controle, nos testes arena de campo aberto e *hole-board*. Este resultado, no entanto, contradiz os de outros estudos que sugerem redução da atividade locomotora associada à exposição ao glifosato, como nos exemplos a seguir: Hernández-Plata et al. (2015), dose de 150 mg/kg (glifosato), i.p., durante 2 semanas (3 injeções por semana) à ratos *Sprague-Dawley*, verificada 48 horas após o término da exposição; Gallegos et al. (2016) aos 45 e 90 dias de vida pós-natal de filhotes de mães expostas formulação comercial de glifosato durante a gestação e lactação de ratos *Wistar* (soluções de 0,2% e 0,4%, pela água de beber, equivalente a 100 e 200 mg / kg / dia de glifosato, respectivamente); Ait Bali et al. (2017) na exposição subcrônica (6 semanas) e crônica (12 semanas) ao Roundup® (glifosato) em camundongos (doses de 250 ou 500 mg / kg / dia de glifosato-Roundup®, gavagem) e Baier et al. (2017) na administração intranasal de uma formulação comercial de glifosato em camundongos CF-1 (50 mg/kg/dia de glifosato, 3 dias por semana, durante 4 semanas). Entretanto, nossos resultados se assemelham aos de Cattani et al. (2017), no qual ratos expostos a 1% do herbicida (Roundup®) na água de beber (correspondente a 0,36% de glifosato) do 5º dia gestacional até o 60º dia pós-natal não apresentaram alterações na atividade locomotora, nem na coordenação motora, apesar do diferente perfil experimental.

Na avaliação da ansiedade não se observou diferença significativa nas duas exposições quando houve comparação do(s) tratamento(s) com seu respectivo controle, em nenhum dos testes empregados: labirinto em cruz elevado e arena de campo aberto. Tais resultados indicam que Roundup® (glifosato) não alterou o nível

de ansiedade dos animais tanto na exposição de curto prazo como na exposição subcrônica.

Estes resultados não estão de acordo com Gallegos et al. (2016), que observaram diminuição nos níveis de ansiedade de filhotes nos 45º e 90º dia de vida pós-natal de mães expostas a uma formulação comercial de glifosato durante a gestação e lactação de ratos *Wistar* (soluções de 0,2% e 0,4%, pela água de beber, equivalente a 100 e 200 mg / kg / dia de glifosato, respectivamente). Também não estão em concordância com o aumento dos níveis de ansiedade observados por Ait Bali et al. (2017) na exposição subcrônica (6 semanas) e crônica (12 semanas) ao Roundup®, nas doses de 250 ou 500 mg / kg / dia de glifosato, por gavagem em camundongos, nem por Baier et al. (2017) quando uma formulação comercial de glifosato foi administrada por via intranasal em camundongos CF-1 (2mg/narinas/dia, totalizando 50 mg/kg/dia de glifosato) três dias por semana, durante quatro semanas.

Por meio dos diferentes testes comportamentais utilizados em nosso estudo, nenhuma alteração significativa na atividade motora e ansiedade foi observada, em ambas as exposições. Provavelmente, diferenças no perfil experimental (via de administração, idade do animal, dose, formulação do agente químico, período e tempo de tratamento, etc.) podem levar a resultados diversos em diferentes estudos realizados por diferentes autores. Além disso, para que pudéssemos aumentar a confiabilidade dos nossos resultados, mais de um tipo específico de aparelho foi utilizado para cada comportamento avaliado, arena de campo aberto (atividade locomotora e ansiedade), labirinto em cruz elevado (ansiedade) e *hole-board* (coordenação motora).

Na dosagem de monoaminas e seus metabólitos na exposição subcrônica, apenas na maior dose (500 mg/kg), foi verificado aumento de 5HIAA no córtex pré-frontal e diminuição desse metabólito no hipocampo, e para DOPAC verificou-se aumento no córtex pré-frontal e estriado. Não houve nenhuma mudança no conteúdo dos neurotransmissores 5HT e DA em nenhuma das partes cerebrais analisadas.

Na literatura, entretanto, são encontrados estudos em roedores que demonstram diminuição de 5HT e DA região e dose-dependente (estriado, hipocampo, córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo) como em Martínez et al. (2018); Ait Bali et al. (2017) onde observaram decréscimo de 5HT no núcleo dorsal da rafe, amígdala basolateral e córtex pré-frontal medial ventral ou ainda Hernandez-Plata et al. (2015) que verificaram decréscimo de DA no estriado.

Para dose de 500 mg/kg, em nosso estudo, houve decréscimo significativo no conteúdo de 5HIAA no hipocampo, resultado observado por Martínez et al. (2018) na dose mais alta (800 mg/kg). Já para DOPAC nessa mesma dose houve decréscimo significativo no hipocampo, enquanto em nosso estudo verificou-se aumento de DOPAC no córtex pré-frontal e estriado na dose de 500 mg/kg.

Apesar das variações nos metabólitos, apenas para o *turnover* de DA (DOPAC/DA) no estriado houve aumento significativo quando os grupos tratados foram comparados ao controle, fato observado (DOPAC+HVA/DA) no córtex pré-frontal (75, 150 e 800 mg/kg) e hipocampo (800 mg/kg) por Martínez et al. (2018).

O aumento de *turnover* de DA no estriado, encontrado em nosso estudo, deve-se predominantemente ao aumento de DOPAC, uma vez que não houve nenhuma mudança no conteúdo de dopamina. O controle motor é regulado pelo estriado (WATSON; KIRKCALDIE; PAXINOS, 2010), porém apesar do aumento de *turnover* de DA no estriado, não ocorreu nenhuma alteração motora. O aumento de *turnover* de DA é considerado um mecanismo compensatório que ocorre para manter os níveis fisiológicos de dopamina. Apesar de não poder ser considerado estritamente um mecanismo compensatório precoce, pode ocorrer em estágios iniciais da doença de Parkinson, por exemplo, na fase na qual ainda não há sintomas motores (BLESA et al. 2017; GRANDI; GIOVANNI; GALATI, 2018). A mesma situação poderia estar ocorrendo com relação à exposição subcrônica ao glifosato (Roundup®), ou seja um aumento precoce do *turnover* de DA ainda sem reflexos na atividade motora. Porém, estudos complementares com doses e/ou tempo de exposição maior são necessários para comprovar essa hipótese.

6 CONCLUSÕES

Os diferentes perfis de exposições utilizadas nesse experimento não foram capazes de modificar o comportamento motor nem o de ansiedade dos animais. Não houve alteração no conteúdo de monoaminas, nos animais sob exposição subcrônica, nas diferentes áreas cerebrais analisadas. Contudo, para a maior dose (500 mg/kg), foi verificado aumento de 5HIAA no córtex pré-frontal e diminuição desse metabólito no hipocampo, e para DOPAC verificou-se aumento no córtex pré-frontal e estriado. Apesar da alteração no *turnover* de dopamina no estriado, não houve nenhum reflexo em qualquer atividade motora avaliada, o que poderia sinalizar um efeito neurotóxico precoce. Porém, estudos adicionais são necessários para comprovar essa hipótese.

REFERÊNCIAS

AIT BALI, Y.; BA-MHAMED, S.; BENNIS, M. Behavioral and immunohistochemical study of the effects of subchronic and chronic exposure to glyphosate in mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, p. 1-13, 2017.

AIT BALI, Y. et al. Glyphosate based- herbicide exposure affects gut microbiota, anxiety and depression-like behaviors in mice. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 67, p. 44–49, 2018.

AIT BALI, Y. et al. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. **Toxicology**, v. 415, p. 18-25, 2019.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Consulta Pública nº 84, de 31 de outubro de 2003. **Diário Oficial da União**, 04 de nov. de 2003. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B5780-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 26/02/2018.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Aprovada consulta pública sobre glifosato**. 2019. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/aprovada-abertura-de-consulta-publica-sobre-glifosato/219201?inheritRedirect=false>. Acesso em: 31/03/2019.

BAIER, C. J. et al. Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 64, p. 63–72, 2017.

BARBOSA, E.R. et al. Parkinsonism after glycine-derivate exposure. **Movement Disorders**, v. 16, n. 3, p. 565–568, 2001.

BENEDETTI, A. L. et al. The effects of sub-chronic exposure of *Wistar* rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb®. **Toxicology Letters**, v. 153, 227-232, 2004.

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.

BLESA, J. et. al. Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification. **Experimental Neurology**, v. 298, p. 148–161, 2017.

BOURIN, M.; HASCOET, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p.55-65, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254.

CAMPDELACREU, J. Parkinson's disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. **Neurología**, v. 29, n. 9, p. 541-549, 2014.

CARBONARI, C. **Desafio 2050 - Eficiência no uso da terra e insumos**. 2017. Disponível em: < http://desafio2050.org/arquivos/pdf/Eficiencia_no_uso_da_Terra_e_Insumos-Caio_Carbonari.pdf>. Acesso em: 09/11/2018.

CARNEIRO, F. F. (Coord) et. al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p.

CATTANI, D. et al. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, p. 67–80, 2017.

COSTA, C. A. R. A. et al. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, 828–836, 2011.

COSTA, C. A. R. A. et al. *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolyticlike activity mediated by 5-HT_{1A}-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 42, p. 1-10, 2013.

COSTALL, B. et al. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemical and Behavior**, v. 32, p. 777-785, 1989.

CRESSEY, D. Widely used herbicide linked to cancer. **Nature**, 2015.

DALLEGRAVE, E. et al. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate Roundup® in *Wistar* rats. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 45-52, 2003.

DALLEGRAVE, E. et al. Pre and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in *Wistar* rats. **Archives of Toxicology**, v. 81, p. 665-673, 2007.

DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V. L. et al. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and *Sertoli* cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 335-346, 2013.

DE SOUZA, J. S. et al. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. **Toxicology**, v. 377 p. 25-37, 2017.

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

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Estudo revela que Brasil é um dos países mais eficientes no uso da terra e insumos agrícolas em função de sua alta produção.** 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/1070557/>>. Acesso em: 09/11/2018.

FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). **Artigo relaciona morte de trabalhadores por agrotóxicos e sua subnotificação.** 2015. Disponível em:< <https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/artigo-relaciona-morte-de-trabalhadores-por-agrotoxicos-e-sua-subnotificacao>>. Acesso em: 26/02/2018.

GALLEGOS, C. E. et al. Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring. **Neurotoxicology**, v. 53, p. 20-28, 2016.

GALLEGOS, C. E. et al. Perinatal glyphosate-based herbicide exposure in rats alters brain antioxidant status, glutamate and acetylcholine metabolism and affects recognition memory. **Neurotoxicity Research**, 2018.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura.** Editora ACADCOM Gráfica e Editora Ltda, 2005.

GODINHO, A. F. et al. Permethrin chronic exposure alters motor coordination in rats: effect of calcium supplementation and amlodipine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 878-888, 2014.

GODINHO, A. F.; ANSELMO, F.; HORTA, D. F. Perinatal exposure to type I and type II pyrethroids provoke persistent behavioral effects during rat offspring development. **Medical Research Archives**, v. 5, n. 1, 2017.

GODINHO, A. F. et al. *Ayahuasca* modifies amphetamine self ingestion and modifies anxiety and locomotor activity in adolescent rats. **Electronic Journal of Biology**, v. 13, n. 2, 159-165, 2017.

GRANDI, L. C.; GIOVANNI, G; GALATI, S. Reprint of “Animal models of early-stage Parkinson's disease and acute dopamine deficiency to study compensatory neurodegenerative mechanisms”. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 310, p. 75–88, 2018.

GUERRERO SCHIMPF, M. et al. Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the development of the rat uterus. **Toxicology**, v. 376, p. 2-14, 2017.

HERNÁNDEZ-PLATA, I. H.; et al. The herbicide glyphosate causes behavioral changes and alterations in dopaminergic markers in male *Sprague-Dawley* rat. **Neurotoxicology**, v. 46, p. 79-91, 2015.

HUANG, T. P.; HO, I. K.; MEHENDALE, H. M. Assessment of neurotoxicity induced by oral administration of chlordecone (Kepone) in the mouse. **Neurotoxicology**, v. 2, n. 1, p. 113-124, 1981.

HUNTER, J. E. et al. Using body temperature, food and water consumption as biomarkers of disease progression in mice with E μ -myc lymphoma. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 4, p. 928-934, 2014.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). **Environmental health criteria 159 - Glyphosate**. 1994. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>>. Acesso em 01/02/2016.

KALLIORA, C. et al. Association of pesticide exposure with human congenital abnormalities. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 346, p. 58-75, 2018.

KAMEL, F., HOPPIN, J.A. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. **Environmental Health Perspect**, v. 112, n. 9, p. 950–958, 2004.

KARIMI JASHNI, H.; NOVIN, L.; POOR AHMADI, M. Effect of the herbicide Glyphosate on renal tissues in adult female rats. **Journal of Jahrom University of Medical Sciences**, v. 11, n. 4, 2014.

LANDRIGAN, P.J., BELPOGGI, F. The need for independent research on the health effects of glyphosate-based herbicides. **Environmental Health**, v. 17, n. 51, p. 1-4, 2018.

LIN, Z.; DODD, C. A.; FILIPOV, N. M. Short-term atrazine exposure causes behavioral deficits and disrupts monoaminergic systems in male C57BL/6 mice. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 39, p. 26-35, 2013.

MAÑAS, F. et al. Oxidative stress and comet assay in tissues of mice administered glyphosate and AMPA in drinking water for 14 days. **Journal of Basic e Applied Genetics**, v. 24, p. 67-75, 2013.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Superávit de US\$ 81,86 bilhões do agronegócio foi o segundo maior da história**. 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/superavit-de-us-81-86-bilhoes-do-agronegocio-foi-o-segundo-maior-da-historia>>. Acesso em: 26/02/2018.

MARTÍNEZ, M. A. et al. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. **Environmental Research**, v. 161, p. 212-219, 2018.

MIDDLEMORE-RISHER M.L.; BUCCAFUSCO J.J.; TERRY JR. A.V. Repeated exposures to low-level chlorpyrifos results in impairments in sustained attention and increased impulsivity in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, p. 415-424, 2010.

MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 3, n. 10, p. 26-40, 2003.

MYERS, J. P. et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. **Environmental Health**, v. 15, n. 19, p. 1-13, 2016.

NISHIYORI, Y. et al. Unilateral hippocampal infarction associated with an attempted suicide: a case report. **Journal of Medical Case Report**, v. 8, 219, 2014.

OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development). **Test n°. 424: Neurotoxicity Study in Rodents**. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, 15 p., Paris, 1997.

OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Representação do Brasil. Brasília, 1996.

PANDEY, A.; RUDRAIAH, M. Analysis of endocrine disruption effect of Roundup® in adrenal gland of male rats. **Toxicology Reports**, v. 2, 1075–1085, 2015.

PARRÓN, T. et al. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 256, p. 379–385, 2011.

PELLOW, S. et. al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.24, p. 525-529, 1986.

PRASAD, S. et. al. Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of *Swiss* albino mice. **Journal of Toxicology**, 2009.

RALEY-SUSMAN, K. M. Like a canary in the coal mine: behavioral change as an early warning sign of neurotoxicological damage. In: LARRAMENDY M. L.; SOLONESKI, S. **Pesticides - Toxic Aspects**. InTech, 2014.

REBELO, F.M. et al. Intoxicação por agrotóxicos no Distrito Federal, Brasil, de 2004 a 2007 - análise da notificação ao centro de informação e assistência toxicológica. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 8, p. 3493-3502, 2011.

RICHARDSON, J.R. et al. Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease. **JAMA Neurology**, v. 71, n. 3, p. 284–290, 2014.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate, pathways to modern diseases III: manganese, neurological diseases, and associated pathologies. **Surgical Neurology International**, v. 6, 2015.

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas). **Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento**. 2016. Disponível em: <<https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais>>. Acesso em: 26/02/2018.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical Methods**, Iowa University Press, Iowa, 1991.

SOLOMON, K. R. Glyphosate in the general population and in applicators: a critical review of studies on exposures. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n. S1, p. 21-27, 2016.

SPEED, H. E. et al. Delayed reduction of hippocampal synaptic transmission and spines following exposure to repeated subclinical doses of organophosphorus pesticide in adult mice. **Toxicological Sciences**, v. 125, p. 196-208, 2012.

TERÇARIOL, P. R. G.; GODINHO, A. F. Behavioral effects of acute exposure to the insecticide fipronil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 221–225, 2011.

TROMBINI, T. V. et al. Developmental lead exposure in rats: is a behavioral sequel extended at F2 generation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.67, p. 743-751, 2001.

WANG, G. et al. Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 17, n. 6, p. 486–487, 2011.

WATSON, C.; KIRKCALDIE, M; PAXINOS, G. Command and control - the motor systems. In: **The Brain** - An introduction to functional neuroanatomy, p. 55-74, 2010.

WHO (World Health Organization). Promotion of Chemical Safety Unit & Food and Agriculture. Organization of the United Nations. 1996. **WHO/FAO data sheet on pesticides nº91, Glyphosate**. Geneva: World Health Organization.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, p. 117–165, 2000.

YAN, D. et al. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: Dose-response meta-analysis of observational studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 96, p. 57–63, 2018.

