



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

RENATA MANO SCATAMBURLO BIFARONI

**AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE DO HERBICIDA À BASE DE
GLIFOSATO MEDIANTE EXPOSIÇÃO CRÔNICA INALATÓRIA E ORAL EM
RATOS**



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

RENATA MANO SCATAMBURLO BIFARONI

**AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE DO HERBICIDA À BASE DE
GLIFOSATO MEDIANTE EXPOSIÇÃO CRÔNICA INALATÓRIA E ORAL EM
RATOS**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai

636.089
B591a Bifaroni, Renata Mano Scatamburlo.
 Avaliação da neurotoxicidade do herbicida à base de
 glifosato mediante exposição crônica inalatória e oral em
 ratos / Renata Mano Scatamburlo Bifaroni. – Presidente
 Prudente, 2022.
 64f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2022.
Bibliografia.
Orientador: Gisele Alborghetti Nai.

1. Glifosato. 2. Toxicidade. 3. Cérebro. 4. Modelo
experimental. I. Título.

Catálogo na fonte: Michele Mologni – CRB 8-6204

RENATA MANO SCATAMBURLO BIFARONI

**AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE DO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO
MEDIANTE EXPOSIÇÃO CRÔNICA INALATÓRIA E ORAL EM RATOS**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 27 de fevereiro de
2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Fernando Antonio Pino Anjolette
Instituto Federal do Paraná (IFPR) - Campus Palmas
Palmas-PR

Profa. Dra. Juliana Minardi Nascimento
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Campinas-SP

Profa. Dra. Cecilia Laposy Santarém
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

A Deus, minha força espiritual e que faz tudo valer a pena.

À minha amada filha, Maria Julia, razão da minha vida, minha motivação de seguir em frente e não desistir mediante as tempestades. Obrigada por ser a minha força, meu sorriso e minha luz!

Ao Helton, meu eterno e amado esposo, que sempre foi meu companheiro, apoio e alicerce, mas no decorrer do doutorado retornou à pátria espiritual, essa conquista é nossa!

A minha amada mãe, meu exemplo de força, resiliência e coragem, esteve ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus amados sobrinhos, afilhados e filhos, Giovana e Luiz Felipe, que me fazem sorrir sempre.

AGRADECIMENTOS

A professora, orientadora e amiga Dra. Gisele Alborghetti Nai, por toda ajuda, paciência, incentivo e confiança no meu trabalho! Minha eterna gratidão e respeito pela profissional que és!

Ao meu amado pai, que deixou um legado de luta, dedicação, estudos, disciplina e perseverança.

A minha amada irmã Fabíula e meu cunhado José Luiz que me apoiam diariamente e fazem parte da minha caminhada.

A todos os meus familiares, afilhados e amigos que incentivaram e torceram por mim, especialmente a tia Matilde, kika e a minha psicóloga Gabi.

Aos amigos da Farmacologia e Análises Clínicas pela minha ausência e auxílio em diversos momentos, especialmente, minha amiga irmã Cristiane M. Ruiz Pegoraro que foi e continua sendo meu alicerce.

A veterinária Gracielle do Biotério de Experimentação de Ciência Animal, da UNOESTE, pela disponibilidade, e a todos os alunos colaboradores desse projeto.

A professora Dra Rose Meire Riçado Ueda pelos ensinamentos dos testes comportamentais e a aluna de graduação do curso de medicina Giovana Rampazzo Teixeira que colaborou na execução destes testes.

A professora Dra. Camila Renata Corrêa da Unesp de Botucatu que ensinou os testes do estresse oxidativo auxiliando a aluna de graduação de medicina Karen Pompei Bruneri que executou esses testes.

A doutoranda Maria Eduarda Almeida Tavares da Unesp de Presidente Prudente pela realização da imuno-histoquímica e ao Laboratório de Anatomia Patológica da Unoeste pela elaboração das lâminas de histologia.

As professoras da banca de qualificação e defesa, Dra Cecilia Laposy Santarém e Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira, e aos professores Dr. Fernando Antônio Pino Anjolette e. Dra. Juliana Minardi Nascimento que participaram apenas da defesa, a todos, agradeço pelas considerações e sugestões de aprimoramento.

A secretária Keid da pós-graduação pela disponibilidade e ajuda em diversos momentos e a bibliotecária Michele pelo auxílio na formatação da tese.

Aos professores, funcionários e colegas do curso de Pós Graduação em Ciência Animal, pelas disciplinas, oportunidades, auxílio, convívio e pelos ensinamentos.

A vida é feita de momentos, momentos pelos quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso aprendizado. Nada é por acaso. Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar o nosso papel no palco da vida, lembrando que a vida nem sempre segue o nosso querer, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.

Chico Xavier

RESUMO

Avaliação da neurotoxicidade do herbicida à base de glifosato mediante exposição crônica inalatória e oral em ratos

Apesar dos estudos realizados pela indústria sugerirem que o glifosato é pouco tóxico para as espécies não alvo, os estudos realizados colocam em dúvida a segurança do glifosato para a saúde de outras espécies. O objetivo desse estudo foi avaliar a neurotoxicidade da exposição crônica por via oral e inalatória ao herbicida glifosato em ratos. Para a realização dos experimentos, foram utilizados 60 ratos Wistar albinos, machos, adultos, distribuídos em seis grupos (n=10): CI - Grupo Controle Inalatório, expostos à nebulização com água destilada por 15 minutos, diariamente; CO - Grupo Controle Oral, ração nebulizada com água destilada por 15 minutos; LCI: Grupo de Baixa Concentração Inalatório, expostos à nebulização ao herbicida com $2,99 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), durante 15 minutos, diariamente; LCO: Grupo de Baixa Concentração Oral, ração nebulizada com o herbicida com $2,99 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) por 15 minutos; HCI: Grupo de Alta Concentração Inalatório, expostos à nebulização ao herbicida com $7,48 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), durante 15 minutos, diariamente; HCO: Grupo de Alta Concentração Oral, ração nebulizada com o herbicida com $7,48 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), por 15 minutos. Para avaliação comportamental foram utilizados os seguintes testes: Teste de campo aberto, Teste de reconhecimento de objetos e Labirinto em Cruz Elevado, para a observação do estado geral de saúde, dos reflexos neurológicos, das habilidades sensoriais e da função motora dos animais utilizados. Animais de todos os grupos foram eutanasiados 6 meses após o início do experimento. Foi coletado cérebro para análise histológica, imuno-histoquímica e avaliação do estresse oxidativo. Os animais expostos ao herbicida a base de glifosato (GBH) não apresentaram alteração de locomoção ou prejuízo de memória. Somente os expostos a alta concentração oral apresentaram maior nível de ansiedade. Congestão tecidual ocorreu somente nos animais expostos a alta concentração de GBH. Houve maior espessura do córtex cerebral e aumento da expressão da proteína BCL-2 nos animais expostos ao GBH. As dosagens de malonaldeído de carbonilação de proteínas não diferiram entre os grupos expostos e não expostos. Sob as condições de exposição estudadas e nas concentrações do produto avaliadas, concluímos que o GBH avaliado não apresenta efeito neurotóxico.

Palavras-chave: herbicidas, cérebro; estresse oxidativo; modelo experimental; exposição ambiental; testes neuropsicológicos.

ABSTRACT

Neurotoxicity associated with chronic inhalation and oral exposure to glyphosate based in rats

Although industry studies suggest that glyphosate is mildly toxic to non-target species, studies on glyphosate cast doubt on the safety of glyphosate for the health of other species. To evaluate the neurotoxicity of chronic oral and inhalation exposure to the herbicide glyphosate in rats. For the accomplishment of the experiments, 60 male, adult, albino Wistar rats were used, divided into six groups (n=10): CI - Inhalation Control Group, exposed to nebulization with distilled water for 15 minutes, daily; CO - Oral Control Group, feed nebulized with distilled water for 15 minutes; LCI: Low Inhalation Concentration Group, exposed to herbicide spray with 2.99×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (g.a.i./ha) for 15 minutes daily; LCO: Low Oral Concentration Group, ration sprayed with the herbicide with 2.99×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (g.a.i./ha) for 15 minutes; HCI: High Inhalation Concentration Group, exposed to herbicide spray with 7.48×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (g.a.i./ha) for 15 minutes daily; HCO: High Oral Concentration Group, ration sprayed with the herbicide with 7.48×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (g.a.i./ha), for 15 minutes. For behavioral evaluation, we used: Open Field Test, Object Recognition Test and Elevated Plus Maze, whose objective was to observe the general state of health, neurological reflexes, sensory abilities and motor function of the animals used. Animals from all groups were euthanized 6 months after the beginning of the experiment. Brain was collected for histological, immunohistochemical and oxidative stress assessment. The animals exposed to GBH showed no change in locomotion or memory impairment. Only those exposed to high oral concentration had a higher level of anxiety. Tissue congestion occurred only in animals exposed to high concentration of GBH. There was a greater thickness of the cerebral cortex and an increase in the expression of the BCL-2 protein in the animals exposed to GBH. Protein carbonylation and malonaldehyde dosages did not differ between exposed and unexposed groups. Under the exposure conditions studied and at product concentrations evaluated, we concluded that the GBH evaluated does not present a neurotoxic effect.

Keywords: herbicides; brain; oxidative stress; experimental model; environmental exposure; neuropsychological tests.

LISTA DE SIGLAS

AMPA	- Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOE	- Nível aceitável de Exposição Ocupacional
BAK	- <i>BCL-2 relative bak</i>
BAX	- <i>BCL-2 associated protein X</i>
BCL-2	- <i>B-cell lymphoma protein 2</i>
CGA	- Campo de grande aumento
CI	- Grupo Controle Inalatório
CO	- Grupo Controle Oral
cRfD	- dose crônica de referência
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
EFSA	- <i>European Food Safety Authority</i> (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar)
EPA	- <i>Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental)
EPI	- Equipamento de Segurança Individual
FIOCRUZ	- Fundação Oswaldo Cruz
GBH	- Herbicida a Base de Glifosato
g.i.a/ha	- gramas de ingrediente ativo por hectare
HCI	- Grupo de Alta Concentração Inalatório
HCO	- Grupo de Alta Concentração Oral
IA	- Ingrediente Ativo
IARC	- <i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)
IDA	- Ingestão Diária Aceitável
LCI	- Grupo de Baixa Concentração Inalatório
LCO	- Grupo de Baixa Concentração Oral
mg/kg pc/dia	- Miligrama de resíduo por quilograma de peso corpóreo por dia
MDA	- Malonaldeído

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA.....	11
1.1	Agrotóxicos.....	11
1.2	Herbicida à base de glifosato.....	13
1.3	Herbicida Glifosato: neurotoxicidade.....	16
1.4	Herbicida Glifosato: estresse oxidativo.....	17
1.5	Apoptose e neurodegeneração.....	18
1.6	Testes comportamentais.....	19
1.6.1	Teste de Campo Aberto.....	20
1.6.2	Teste do Labirinto em Cruz.....	21
1.6.3	Teste de Reconhecimento de Objetos.....	22
	REFERÊNCIAS.....	23
2	ARTIGO.....	27
	ANEXO A- APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE).....	57
	ANEXO B - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA COMPARATIVE MEDICINE.....	58

1 REVISÃO DA LITERATURA

Os agrotóxicos são constituídos por uma grande variedade de substâncias químicas ou produtos biológicos utilizados no controle de pragas (animais e vegetais) e doenças de plantas (FUNDACENTRO, 2005). Assim, por atuarem sobre processos vitais, em sua maioria, essas substâncias têm ação sobre a saúde do ser humano. Os efeitos sobre a saúde podem ser de dois tipos: 1) agudos, resultantes da exposição a concentrações de um ou mais agentes tóxicos capazes de causarem dano efetivo aparente em um período de 24 horas; 2) crônicos, resultantes de uma exposição continuada a doses relativamente baixas de um ou mais produtos (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

Os agrotóxicos são utilizados nas florestas nativas e plantadas, nos ambientes hídricos, urbanos e industriais e, em larga escala, na agricultura e nas pastagens para a pecuária, sendo também empregados nas campanhas sanitárias para o combate a vetores de doenças (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003).

1.1 Agrotóxicos

A Lei Federal nº 7.802 de 11/07/1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074 de 04/01/2002, Artigo 1º, Inciso IV, define o termo "agrotóxico" da seguinte forma:

“Consideram-se os agrotóxicos e afins como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, híbridos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento” (BRASIL, 1989).

Os agrotóxicos são produtos que tem a finalidade de alterar a composição da fauna e da flora a fim de preservá-las da ação de seres vivos considerados nocivos (VILLALOBOS; FAZOLLI, 2017). Os agrotóxicos, para obtenção do registro, são avaliados quanto aos impactos à saúde humana, ao meio ambiente e sua eficácia agronômica. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável no âmbito do Ministério da Saúde pela avaliação da toxicidade dos agrotóxicos e seus impactos à saúde humana, emitindo o Informe de Avaliação

Toxicológica que pode ser favorável ou desfavorável à concessão do registro pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 1989).

Os agrotóxicos surgiram para eliminarem os seres vivos considerados nocivos ou pragas. Muitos produtores e comerciantes chegaram a denominá-los de “defensivos agrícolas”. Contudo a situação é complexa pois os agrotóxicos poderão ter características carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas. Sendo assim, o nome oficial desses produtos no Brasil é “agrotóxicos”, devendo a sua propaganda comercial conter advertências sobre malefícios decorrentes de seu uso (BRASIL, 1988).

A expansão do uso de agrotóxicos no Brasil se deu a partir dos anos 1960 e 1970, com a revolução verde, que incluiu a mecanização, a utilização de agrotóxicos e fertilizantes, o desenvolvimento de grandes variedades de sementes e plantas geneticamente modificadas, a irrigação, visando modernizar o campo e aumentar a produtividade. A revolução verde acarretou, contudo, sérios problemas socioambientais, especificamente em relação aos agrotóxicos, na medida em que se ignoraram os efeitos nocivos ao meio ambiente e à saúde humana (VASCONCELLOS *et al.*, 2020).

A produção agrícola no Brasil é favorecida pelas condições climáticas e pela grande quantidade de terras disponíveis. Atualmente, nosso país é o segundo maior exportador mundial de produtos agrícolas. Os agrotóxicos são amplamente utilizados nas lavouras brasileiras devido à sua alta eficiência, baixo custo e legislação permissiva (BROVINI *et al.*, 2021).

A exposição aos agrotóxicos pode ocorrer no ambiente laboral, incluindo as fábricas e as empresas que transportam e comercializam, além da produção agrícola, pecuária e na capina química. Também ocorre a exposição no caso de moradores que residem próximos a áreas rurais ou urbanas, sendo atingidos pela contaminação do ar, do solo e da água (VASCONCELLOS *et al.*, 2020). No Brasil, são comercializados aproximadamente 2000 tipos de agrotóxicos, com 300 princípios ativos diferentes e que se dividem em grupos como os herbicidas, inseticidas, raticidas, acaricidas, molusquicidas, nematocidas e fumigantes (CAIRES; DÍAZ CASTRO, 2002).

Os herbicidas são conhecidos como reguladores de crescimento, inibidores do crescimento de plântulas e da fotossíntese, inibidores da biossíntese de aminoácidos e lipídios, desreguladores da membrana celular e inibidores da

biossíntese de pigmentos, enquanto os fungicidas incluem inibidores da biossíntese de ergosterol, biossíntese de proteínas e respiração mitocondrial (LUSHCHAK *et al.*, 2018).

O estudo de Lushchak *et al.* (2018) revela a importância de avaliar o impacto de pesticidas e de outros produtos químicos a possíveis riscos à saúde animal e humana, uma vez que a exposição a estes compostos podem causar muitas doenças, incluindo síndrome metabólica, desnutrição, aterosclerose, inflamação e neurotoxicidade.

Outros pesquisadores relatam também que há um aumento de evidências sobre a relação entre a exposição a pesticidas e a elevada taxa de doenças crônicas como diferentes tipos de câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer e Esclerose Lateral Amiotrófica), defeitos congênitos, distúrbios reprodutivos, problemas respiratórios (asma e doença pulmonar obstrutiva crônica), doenças cardiovasculares (aterosclerose e doença arterial coronariana), nefropatias crônicas, doenças autoimunes (lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide), síndrome da fadiga crônica e envelhecimento (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013).

Estudos futuros devem ser direcionados a investigar a influência dos efeitos a longo prazo de baixas doses de pesticidas e minimizar ou eliminar a influência desses pesticidas em organismos vivos não-alvos. O objetivo é produzir pesticidas mais específicos e usar tecnologias modernas para diminuir a contaminação dos alimentos (LUSHCHAK *et al.*, 2018).

1.2 Herbicida Glifosato

O glifosato é um pó cristalino, de cor branca e sem odor. Esse herbicida é uma substância anfotérica, e devido à sua alta polaridade, é praticamente insolúvel em etanol, acetona e benzeno (BECKING; CHEN, 1998).

No Brasil, quatro tipos de sais de glifosato estão registrados: o glifosato sal de isopropilammina, o glifosato sal de potássio, o glifosato sal de amônio e o glifosato trimésio (ANVISA, 2020).

O glifosato é absorvido pela pele e pelas vias respiratórias e digestivas (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002). Quando ingerido, 30 a 36% é absorvido e, em seguida, eliminado, em grande parte, pela urina. A excreção biliar é reduzida e a eliminação pelo ar expirado é muito pequena (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002). É

um herbicida de amplo espectro e atualmente um dos pesticidas mais estudados. Os Estados Unidos lideraram a publicação sobre esse herbicida, seguidos por Brasil, Canadá e China (SOARES *et al.*, 2021). Em 1974, o glifosato foi introduzido pela Monsanto Company sob o nome comercial Roundup e tornou o herbicida mais utilizado em todo o mundo (MEFTAUL *et al.*, 2020).

O glifosato é o único herbicida que tem como alvo a enzima 5-enolpiruvil-3-shiquimato fosfato sintase. É considerado não seletivo de alta taxa de uso que se transloca principalmente para sumidouros metabólicos, matando tecidos meristemáticos longe do local de aplicação. Suas propriedades de mobilidade no floema e ação lenta em matar ervas daninhas permitem que o herbicida se mova por toda a planta para matar todos os meristemas, tornando-o eficaz no controle de ervas daninhas perenes. Grande parte de seu uso é em culturas transgênicas (especialmente de soja, milho, algodão e cana-de açúcar) que têm sido as culturas dominantes em todo o mundo (DUKE, 2018).

De acordo com Rodríguez-Gil *et al.* (2021), o glifosato por ser solúvel em água, não se acumula em altos níveis no ambiente. Ele absorve as partículas no solo e isso reduz sua biodisponibilidade, de modo que as exposições a organismos não-alvo diminuem com o passar dos dias. Sendo assim, o uso de formulações de glifosato sob boas práticas agrícolas apresenta um risco de mínimo de efeitos adversos diretos e indiretos em organismos não-alvo.

Os produtos de degradação do glifosato variam segundo o tipo de cultura em que o ingrediente ativo é aplicado. O resíduo mais comum é o ácido aminometilfosfônico (AMPA), que possui toxicidade semelhante ao glifosato (ANVISA, 2018). Embora os efeitos de intoxicação aguda desse herbicida e do seu produto de degradação, AMPA, sobre os mamíferos serem baixos, existem dados que levantam a possibilidade de efeitos crônicos em animais relacionados ao acúmulo desses compostos no meio ambiente. Estudos demonstram que é necessário revisar os limites de tolerância para resíduos de glifosato na água, ar e alimentos, tendo em conta todos os possíveis riscos para a saúde (VAN BRUGGEN *et al.*, 2018).

O uso intensivo do glifosato tem potencial para causar efeitos nocivos aos microrganismos do solo, levando a alterações na fertilidade e desequilíbrio ecológico, além de impactos nos ambientes aquáticos decorrentes de alterações na cadeia alimentar (MARQUES *et al.*, 2021).

Devido ao fato do glifosato ser aplicado principalmente nos campos e poder persistir por vários meses no solo, surgiram preocupações sobre o impacto que sua presença nos alimentos pode causar em humanos. No entanto, não há um consenso da comunidade científica até o presente momento, e sua segurança para a saúde é controversa (SOARES *et al.*, 2021).

O glifosato aumenta o risco de câncer, distúrbios endócrinos, doença celíaca, autismo, efeito nos eritrócitos, síndrome do intestino irritável, entre outras doenças (MEFTAUL *et al.*, 2020).

Atualmente, as recomendações em bula, se utilizadas corretamente protegem todos operadores dos riscos associados à exposição dos produtos à base de glifosato, uma vez que são indicadas a utilização de todos os Equipamentos de Proteção Individual (EPI) (ANVISA, 2020).

Após a publicação da RDC n° 10, de 22 de fevereiro de 2008, que estabeleceu a reavaliação toxicológica do ingrediente ativo (IA) glifosato, a ANVISA firmou contrato com a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) que ficou responsável pela elaboração de Nota Técnica abordando todos os aspectos toxicológicos relevantes sobre esse herbicida a partir de levantamento bibliográfico e da análise de estudos técnicos científicos dos produtos técnicos, incluindo a análise de carcinogenicidade desse ingrediente ativo (ANVISA, 2018).

De acordo com os estudos atualmente disponíveis há evidência limitada de carcinogenicidade em animais experimentais sugerindo ausência de carcinogenicidade em humanos. Esses critérios classificam o glifosato na Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) no Grupo 3, que indica não ser carcinogênico para humanos (ANVISA, 2018).

Em relação aos aspectos toxicológicos, a reavaliação dos agrotóxicos ocorre quando há alguma indicação de perigo ou risco à saúde humana, em comparação a avaliação feita para a concessão de registro. As novas evidências podem ser apresentadas mediante novos estudos e pelo avanço dos conhecimentos científicos. Alertas em função de observações epidemiológicas, clínicas ou por eventuais acidentes podem servir como evidências, mesmo quando os estudos experimentais conduzidos em animais de laboratório não são suficientes para concluir sobre a nocividade do produto em humanos (ANVISA, 2020). Essa mesma Nota Técnica N° 12/2020 descreve a reavaliação do ingrediente ativo (IA) do glifosato e conclui que até o momento esse herbicida não apresenta características mutagênicas,

teratogênicas, carcinogênicas, neurotóxicas, também não desregula o sistema endócrino e não é tóxico para a reprodução e desenvolvimento embrionário (BRASIL, 2020).

Após avaliação dos estudos científicos e regulação de agências reguladoras internacionais, a ANVISA determinou novos parâmetros de referência para a avaliação do risco de ingestão diária aceitável (IDA) = 0,5 mg/kg pc/dia; Dose de Referência Aguda (DRfA) = 0,5 mg/Kg pc/dia; Nível aceitável de Exposição Ocupacional (AOEL) = 0,1 mg/kg pc/dia. Com base nesses parâmetros, a avaliação do risco dietético relacionado ao glifosato mostrou nível seguro de exposição, sem extrapolação das doses de referência aguda e crônica, incluindo nessa avaliação os resíduos encontrados em alimentos e na água (ANVISA, 2020).

1.3 Herbicida Glifosato: neurotoxicidade

Desde o ano 2000, vêm aumentando as pesquisas que investigam a neurotoxicidade do glifosato. As informações fornecidas indicam que a exposição a esse herbicida e suas formulações comerciais pode induzir vários efeitos neurotóxicos, mas esses dados ainda são controversos. Um estudo demonstrou que a exposição a este pesticida durante as fases iniciais da vida pode afetar seriamente o desenvolvimento celular normal, desregulando algumas das vias de sinalização envolvidas neste processo, levando a alterações na diferenciação, crescimento neuronal e mielinização. O glifosato também parece exercer um efeito tóxico significativo na neurotransmissão e induzir estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunção mitocondrial, processos que levam à morte neuronal por autofagia, necrose ou apoptose, além do aparecimento de distúrbios comportamentais e motores. As doses de glifosato que produzem esses efeitos neurotóxicos variam muito, mas são inferiores aos limites estabelecidos pelas agências reguladoras (COSTAS-FERREIRA; DURÁN; FARO, 2022).

De acordo com Bicca *et al.* (2021), uma dose subcrônica desse herbicida poderia induzir alterações no sistema nervoso central em camundongos como a depressão. Apesar do progresso considerável na descrição do potencial neurotóxico do glifosato, os efeitos nocivos sobre a citoarquitetura cerebral e o comportamento ainda não estão claros. Os estudos de Ait-Bali *et al.* (2020) expondo camundongos fêmeas durante a gravidez mostrou que a exposição pré e neonatal ao glifosato

prejudica os parâmetros de fertilidade e reprodução, bem como o comportamento materno das mães expostas. Na prole, o glifosato foi responsável por um atraso global nos reflexos inatos e um déficit no desenvolvimento motor. Na idade adulta, os animais expostos apresentaram diminuição da atividade locomotora, sociabilidade, aprendizado e memória a curto e longo prazo associada a alterações dos sistemas colinérgico e dopaminérgico.

Um estudo de intoxicação humana por glifosato relatou efeitos adversos no sistema nervoso, particularmente na substância negra (CATTANI *et al.*, 2021). Exposições mais elevadas a esse herbicida por proximidade com a pulverização agrícola estão associadas a vários efeitos neurotóxicos em humanos. Essa neurodegeneração foi atribuída à inibição mitocondrial e aumento do estresse oxidativo, que pode ser atribuído pela excitotoxicidade do glutamato (RICHARDSON *et al.*, 2019). Eriguchi *et al.* (2019) relatou o caso de um homem de 38 anos que desenvolveu parkinsonismo quatro anos após a ingestão acidental de glifosato. O paciente apresentou bradicinesia do lado direito e rigidez em roda dentada sem sintomas autonômicos.

O estudo de Caballero *et al.* (2018) relacionou a exposição prolongada a esse herbicida com a doença de Parkinson em humanos, mas ainda faz-se necessário outras investigações para confirmar tal efeito.

1.4 Herbicida Glifosato: estresse oxidativo

Um estudo que investigou os efeitos da exposição perinatal ao herbicida à base de glifosato no fígado da prole de ratos fêmeas Wistar mostrou um aumento no influxo de cálcio no fígado da prole. Foram relatadas alterações no sistema antioxidante enzimático e aumento das atividades enzimáticas das transaminases e gama-glutamil transferase no fígado e no sangue da prole, sugerindo uma lesão hepática induzida por pesticidas (RIEG *et al.*, 2022).

O glifosato tem como alvo os sistemas monoaminérgicos dos peixes, levando ao estresse oxidativo e à ansiedade. O cérebro de peixes expostos apresentou um aumento significativo da atividade da catalase e da superóxido dismutase, com concomitante diminuição das reservas de glutathione. Essas alterações no sistema antioxidante corroboram com o aumento observado no

estresse oxidativo, refletido pelo aumento dos níveis de peroxidação lipídica no cérebro (FARIA *et al.*, 2021).

Outro estudo em linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y demonstraram que o glifosato e o AMPA induziram efeitos citotóxicos no desenvolvimento neuronal, estresse oxidativo e morte celular via apoptose, autofagia e vias necróticas e confirmaram que a exposição ambiental ao glifosato torna-se uma preocupação (MARTÍNEZ *et al.*, 2020).

1.5 Apoptose e neurodegeneração

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é caracterizada por uma série de alterações morfológicas na estrutura da célula, juntamente com uma série de processos bioquímicos dependentes de enzimas (D'ARCY, 2019). Nesse processo, a membrana plasmática da célula permanece íntegra, porém, sua estrutura é alterada tornando-se alvo para fagócitos. Os restos celulares são rapidamente fagocitados e removidos, não formando um processo inflamatório por essa via no hospedeiro. Esse processo pode ocorrer tanto em situações fisiológicas, eliminando células que não são mais necessárias e mantendo seu número constante, quanto em situações patológicas. Nessas últimas, a apoptose elimina células com lesões irreversíveis decorrentes de diversas situações, dentre elas, lesão de DNA por citotoxicidade (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Seu mecanismo pode ocorrer por via intrínseca (mitocondrial) e via extrínseca (morte iniciada por receptor). Na via intrínseca, determinados estímulos levam ao aumento de permeabilidade mitocondrial e liberação de moléculas mitocondriais pró-apoptóticas que induzirão o processo de apoptose. A liberação dessas moléculas é controlada por proteínas pró e antiapoptóticas da família BCL-2, que residem no citoplasma e nas próprias membranas mitocondriais. Perda dos sinais de sobrevivência, lesões no DNA e outros estímulos ativam essas proteínas presentes no citoplasma (sensores de lesão da família BCL-2) as quais, por sua vez, ativam efetores BAX e BAK pró-apoptóticos, que formam canais na membrana mitocondrial permitindo que suas proteínas internas extravasem para o citoplasma, como o citocromo C, e ativem a cascata de caspases, enzimas capazes de degradar

componentes celulares críticos gerando morte celular (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Acredita-se que a apoptose seja o principal mecanismo de morte celular em doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer, Esclerose Lateral Amiotrófica e retinite pigmentosa, tendo como indutores principalmente o estresse oxidativo, aumento de cálcio intracelular, defeitos mitocondriais, toxicidade por aminoácidos excitatórios, deficiências de fatores de crescimento ou aumento da concentração de glutamato no meio extracelular (CORDEIRO, 1999).

O aumento moderado (200 – 400 nM) e a liberação do estoque de cálcio armazenado no retículo endoplasmático é um indutor de apoptose pela ativação da calpaína, protease dependente de cálcio. Já o estresse oxidativo, de maneira semelhante ao cálcio, pode promover ou inibir a apoptose de acordo com sua intensidade. Nele, a produção de agentes oxidantes ultrapassa as capacidades antioxidantes gerando dano oxidativo de constituintes celulares levando a célula à morte. De maneira geral, o encéfalo e tecidos nervosos estão mais propensos aos danos oxidativos devido a fatores como o alto fluxo de cálcio pelos neurônios, presença de neurotransmissores excitatórios, principalmente o glutamato, e o fato de possuir poucas defesas antioxidantes (GARCIA, 2010)

Desse modo, lesões e degenerações de tecidos nervosos mantém relação próxima com apoptose. Segundo Correia *et al.* (2013), a doença de Parkinson apresenta possíveis fatores associados ao seu surgimento, sendo um deles, o processo de apoptose. As manifestações clínicas características dessa patologia estão associadas a depleção de dopamina, decorrente da morte dos neurônios dopaminérgicos que compõe a substância negra compacta do mesencéfalo.

Em relação ao Alzheimer, os neurônios entram em processo de morte celular por apoptose precocemente, o que resulta em demência progressiva e perda da cognição e da memória (ANAZETTI; MELO, 2007). Já na Doença de Huntington, a atividade de caspases e calpaínas encontra-se aumentada e fragmentos de huntingtina mutante, proteína mutante presente nessa patologia, podem induzir diretamente o aumento da permeabilidade mitocondrial, ativando o processo apoptótico por via intrínseca (GIL-MOHAPEL; REGO, 2011).

1.6 Testes Comportamentais

O córtex pré-frontal regula a expressão do medo com base em informações previamente aprendidas. Recentemente, essa área do cérebro emergiu novos caminhos para estudar a neurobiologia em transtornos de ansiedade (GILMARTIN; BALDERSTON; HELMSTETTER, 2014). Vários testes existem para medir comportamentos relacionados à ansiedade em roedores de laboratório. Entretanto, a interpretação dos parâmetros e o entendimento dos comportamentos observados nestes testes ainda não são satisfatórios. Para uma avaliação mais completa do perfil emocional dos animais é interessante utilizar diferentes testes e medidas comportamentais. Porém, o mesmo animal não pode ser testado ao mesmo tempo em diferentes testes comportamentais. Para tentar resolver esta questão, foi proposto testes distintos que são realizados em dias alternados (WEHRMEISTER, 2012).

1.6.1 Teste de Campo Aberto

O Teste de campo aberto foi o criado por Hall (1934) e permite avaliar atividade locomotora e ansiedade. O teste consiste em colocar o animal em uma arena circundada por parede. As dimensões e o formato do campo aberto variam entre os modelos quadrado ou redondo. O modelo quadrado, possui paredes altas, feitas de madeira compensada branca com uma parede frontal de vidro. O soalho do campo aberto é dividido em 12 quadrantes iguais por linhas pretas. Observa-se por 5 minutos o número de vezes que o animal cruzara as linhas pretas e o número de vezes que o animal se elevou sobre as patas traseiras (MELLO *et al.*, 2008).

Figura A – Caixa usada para realizar o teste de campo aberto iluminada com luz vermelha de 15W.



1.6.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado foi elaborado por Pellow *et al.* (1985), com o objetivo de avaliar comportamentos relacionados à ansiedade (ITO, 2010). Consiste em um aparato de madeira com cor natural em formato de cruz, com quatro braços, elevados 50 cm do chão. Dois braços possuem paredes, sendo chamados de braços fechados (49 x10x 30 cm) e outros dois não possuem as paredes, correspondendo aos braços abertos (49x 10 cm), dispostos em forma de cruz. Dois dos braços são abertos e contornados por uma pequena borda de acrílico transparente de 0,5 cm de altura para diminuir eventuais quedas dos animais. Os outros dois braços, dispostos perpendicularmente aos abertos, são revestidos por paredes laterais de 50 cm de altura, sendo denominados braços fechados. Uma arena central de 10x10cm une os quatro braços entre si (Figura B). Os animais são colocados individualmente na área central, voltados para um dos braços fechados e são observados durante cinco minutos (MEZADRI *et al.*, 2011).

Figura B – Teste de labirinto em cruz elevado usado no experimento. Vista frontal e vista superior.

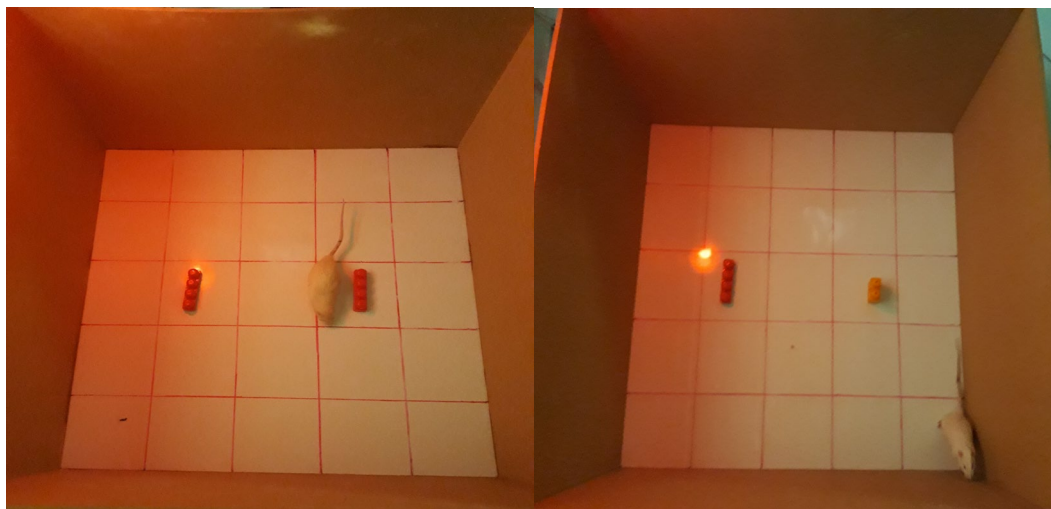


1.6.3 Teste de Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objeto é um teste comportamental para acessar a memória em roedores que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais um objeto novo do que o familiar que foi inserido num contexto anterior já conhecido pelo animal (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Deve-se utilizar a mesma caixa do teste do campo aberto e esse novo teste é dividido em três sessões, a sessão de treinamento, que será seguida de duas sessões de teste (1h após treinamento e 24h após o treinamento). Os animais são expostos a dois objetos idênticos (em tamanho, forma e cor) definidos como objetos familiares, F1 e F2 (brinquedos Lego quadrados) nas primeiras duas sessões, passadas as 24 horas um dos objetos é trocado para avaliar a memória do animal frente ao objeto diferente (Figura C) (MEZADRI *et al.*, 2011).

Figura C – Teste de reconhecimento de objetos: sessão treino e sessão teste.



O herbicida glifosato é um dos produtos mais utilizados para pulverização de lavouras no Brasil e no mundo. A neurotoxicidade ao glifosato ainda é controversa e os mecanismos pela qual esta ocorre ainda não estão bem definidos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito neurotóxico da exposição crônica por via oral e inalatória a um herbicida a base de glifosato em ratos.

REFERÊNCIAS

AIT-BALI, Y. *et al.* Pre- and postnatal exposure to glyphosate-based herbicide causes behavioral and cognitive impairments in adult mice: evidence of cortical and hippocampal dysfunction. **Archives of Toxicology**, v.94, n.5, p.1703-1723, 2020.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, n.1, p.37-58, jan./jun. 2007. Disponível em: www.metrocamp.com.br/pesquisa. Acesso em: 20 set. 2019.

ANVISA. **Nota técnica:** reavaliação toxicológica do ingrediente ativo glifosato parecer nº 1/2018/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIARE/ANVISA Brasília: ANVISA, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 02 nov. 2022.

ANVISA. **Nota técnica:** 2/2020/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA. Apresenta as conclusões da reavaliação do Glifosato após a consolidação das contribuições da Consulta Pública nº 613, de 28 de fevereiro de 2019 e as recomendações para proposição de Resolução da Diretoria Colegiada (RDC). Brasília: ANVISA, 2020. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 02 nov. 2022.

AMARANTE JUNIOR, O. P. *et al.* Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v.25, n.4, p.589–593, jul. 2002.

BECKING, G. C.; CHEN, B.-H. International programme on chemical safety (IPCS) environmental health criteria on boron human health risk assessment. **Biological Trace Element Research**, v.66, n.1–3, p.439-452, 1998. <https://doi.org/10.1007/BF02783154>.

BICCA, D. F. *et al.* A subchronic low-dose exposure of a glyphosate-based herbicide induces depressive and anxious-like behavior in mice: quercetin therapeutic approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v.28, n.47, p.67394–67403, 2021.

BRASIL. **Constituição Federal de 1988**. Art. 220. Disponível em: <https://www.jusbrasil.com.br/topicos/10646742/artigo-220-da-constituicao-federal-de-1988>. Acesso em: 24 out. 2022.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. **Lei n.7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm. Acesso em: 18 dez. 2019.

BRASIL. Resolução rdc nº 441, de 2 de dezembro de 2020. 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-441-de-2-de-dezembro-de-2020-293190758>. Acesso em: 09 jan. 2023.

BROVINI, E. M. *et al.* Three-bestseller pesticides in Brazil: freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of the Total Environment**, v.771, p.144754, jun. 2021.

CABALLERO, M. *et al.* Estimated residential exposure to agricultural chemicals and premature mortality by Parkinson's Disease in Washington State. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.15, n.12, p.2885, 2018.

CAIRES, S. M.; DÍAZ CASTRO, J.G. Levantamento dos agrotóxicos usados por produtores rurais do município de Alta Floresta Mato Grosso. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.2, n.1, 2002.

CATTANI, D. *et al.* Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide causes dysregulation of dynorphins and an increase of neural precursor cells in the brain of adult male rats. **Toxicology**, v.461, p.152922, set. 2021.

CORDEIRO, M.P. **Apoptose: o suicídio das células.** 1999. 39f. Monografia (Especialização) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

CORREIA, M.P.S.G. *et al.* Doença de Parkinson: uma desordem neurodegenerativa. **Cadernos de Graduação - Biológicas e da Saúde**, v.1, n.16, p.57-65, 2013.

COSTAS-FERREIRA, C.; DURÁN, R.; FARO, L.R.F. Toxic effects of glyphosate on the nervous system: a systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, n.9, p.4605, abr. 2022.

D'ARCY, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v.43, n.6, p.582–592, jun. 2019.

DUKE, S. O. The history and current status of glyphosate. **Pest management science**, v.74, n.5, p.1027-1034, maio 2018.

ERIGUCHI, M. *et al.* Parkinsonism relating to intoxication with glyphosate. **Internal Medicine**, v.58, n.13, p.1935-1938, jul. 2019.

FARIA, M. *et al.* Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety. **Environment International**, v. 146, p. 106253, jan. 2021.

FUNDACENTRO. **Aspectos de prevenção e controle de acidentes com agrotóxicos.** 2015. Disponível em: <https://www.studocu.com/pt-br/document/universidade-de-sao-paulo/engenharia-de-seguranca/agrotoxicos-livro-da-fundacentro-sobre-prevencao-e-controle-de-acidentes-com-agrotoxicos/10759015>. Acesso em: 1 nov. 2022.

GARCIA, R.C.T. **Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo**. 2010. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GILMARTIN, M.R.; BALDERSTON, N.L.; HELMSTETTER, F.J. Prefrontal cortical regulation of fear learning. **Trends in Neurosciences**, v.37, n.8, p.455-464, ago. 2014.

GIL-MOHAPEL, J.M.; REGO, A.C. Huntington's disease: a review on the physiopathological aspects. **Revista Neurociências**, v.19, n.4, p.724-734, 2011.

GUIMARÃES, A.T.B. *et al.* Memory and depressive effect on male and female Swiss mice exposed to tannery effluent. **Neurotoxicology and Teratology**, v.61, p. 123-127, maio 2017.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v.18, n.3, p.385, 1934.

ITO, P.H. **Avaliação comportamental de ratos submetidos à anóxia neonatal**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2010. <https://doi.org/10.11606/D.47.2010.TDE-30072010-112514>.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. p.1421.

LUSHCHAK, V.I. *et al.* Pesticide toxicity: a mechanistic approach. **EXCLI Journal**, v.17, 2018.

MARQUES, J.G.C. *et al.* Glyphosate: a review on the current environmental impacts from a brazilian perspective. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.107, n.3, p.385-397, set. 2021.

MARTÍNEZ, M.-A. *et al.* Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. **Environment International**, v.135, p.105414, fev. 2020.

MELLO, P.B. **Efeitos do exercício físico sobre diferentes tipos de memória em ratos normais e com prejuízo mnemônico causado pela separação materna**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

MEFTAUL, I.M.D. *et al.* Controversies over human health and ecological impacts of glyphosate: Is it to be banned in modern agriculture? **Environmental Pollution**, v.263, p.114372, ago. 2020.

MEZADRI, T.J. *et al.* Avaliação do comportamento de ratos alojados em caixas de cores diferentes. **Revista de Etologia**, v.10, n.1, p.21-26, 2011.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.268, n.2, p.157-177, abr. 2013.

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.

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S. **Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. p.21-41. Disponível em: <http://www.cesteh.ensp.fiocruz.br/agrotoxicos-saude-e-ambiente-uma-introducao-ao-tema>. Acesso em: 02 nov. 2022.

RICHARDSON, J.R. *et al.* Neurotoxicity of pesticides. **Acta Neuropathologica**, v.138, n.3, p.343-362, set. 2019.

RIEG, C.E.H. *et al.* Perinatal exposure to a glyphosate pesticide formulation induces offspring liver damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.454, p.116245, nov. 2022.

RODRÍGUEZ-GIL, J.L. *et al.* Ecotoxicology of glyphosate, its formulants, and environmental degradation products. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.255, p.129-205, 2021. DOI: 10.1007/398_2020_56

SOARES, D. *et al.* Glyphosate use, toxicity and occurrence in food. **Foods**, v.10, n.11, p. 2785, 12 nov. 2021.

VAN BRUGGEN, A.H.C. *et al.* Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of The Total Environment**, v.616-617, p.255-268, mar. 2018.

VASCONCELLOS, P.R.O. *et al.* Exposição a agrotóxicos na agricultura e doença de Parkinson em usuários de um serviço público de saúde do Paraná, Brasil. **Cadernos Saúde Coletiva**, v.28, n.4, p.567-578, dez. 2020.

VILLALOBOS, J.U.G.; FAZOLLI, S.A. **Agrotóxicos: um enfoque multidisciplinar**. EDUEM, 2017. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/6yss8>. Acesso em: 01 nov. 2022.

WEHRMEISTER, T.D. **Validação farmacológica de um novo modelo comportamental integrado de ansiedade/emocionalidade em ratos**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010. Disponível em: <repositorio.ufsc.br:123456789/93898>. Acesso em: 28 out. 2022.

2 ARTIGO

Ausência de Neurotoxicidade na Exposição Crônica Inalatória e Oral a Herbicida a Base de Glifosato em Ratos Adultos

Título resumido: **Neurotoxicidade e Glifosato**

Renata MS Bifaroni^{1,2,3}, Giovanna D Binotti³, Karen P Bruneri³, Maria Eduarda A Tavares⁴, Rose Meire R Ueda⁵, Renata C Rossi^{3,6}, Giovana R Teixeira⁴, Camila Renata Corrêa⁷, Gisele A Nai^{1,3,8,*}.

¹Animal Science - Master's Degree and Doctoral Program, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

²Department of Pharmacology, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

³Medical College, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

⁴Department of Physical Education, Faculdade de Ciências e Tecnologia, São Paulo State University (UNESP), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

⁵Faculty of Psychology, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

⁶Environment and Regional Development - Master's Degree Program, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

⁷Botucatu Medical School, Department of Pathology and Experimental Research Unit (UNIPEX), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

⁸Department of Pathology, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

*Correspondência: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil. Phone: +55-18-3229-1059. Fax: +55-18-3229-1194. E-mail: patologia@unoeste.br

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: *Comparative Medicine*, Fator de impacto 1.565, Classificação Qualis A4.

Resumo

O uso de herbicidas a base de glifosato (GBH) para produção agrícola tem aumentado muito ao redor do mundo, assim como seus resíduos no meio ambiente. Sua ação sobre o sistema nervoso central e as vias de neurotoxicidade ainda não estão totalmente esclarecidas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito neurotóxico da exposição crônica a um GBH em ratos adultos. Para isto, foram utilizados 60 ratos Wistar albinos, machos, adultos, divididos em 6 grupos, 2 grupos controle e 4 grupos expostos ao GBH (n=10/grupo). Os animais foram expostos a duas concentrações de GBH, por via oral e inalatória: $2,99 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) e $7,48 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha. Os animais foram expostos durante seis meses. Foram realizados estudos comportamentais. O cérebro foi coletado para análise histopatológica, imuno-histoquímica e de estresse oxidativo. Os animais expostos ao GBH não apresentaram alteração de locomoção ou prejuízo de memória. Somente os expostos a alta concentração oral apresentaram maior nível de ansiedade. Congestão tecidual ocorreu somente nos animais expostos a alta concentração de GBH. Houve maior espessura do córtex cerebral e aumento da expressão da proteína BCL-2 nos animais expostos ao GBH. As dosagens de malonaldeído de carbonilação de proteínas não diferiram entre os grupos expostos e não expostos. Sob as condições de exposição estudadas e nas concentrações do produto avaliadas, concluímos que o GBH avaliado não apresenta efeito neurotóxico.

Palavras-chave: dano encefálico crônico, exposição a praguicidas, exposição ocupacional, toxicidade crônica, espécies reativas de oxigênio.

Abreviações: AMPA, ácido aminometil fosfônico; CGA, campos de grande aumento; CI, controle inalatório; CO, controle oral; cRfD, dose crônica de referência; EFSA, Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*); g.i.a/ha, gramas de ingrediente ativo por hectare; GBH, herbicida a base de glifosato; HCl, grupo alta concentração inalatório; HCO, grupo alta concentração oral; IDA, ingestão diária “aceitável”; LCI, grupo baixa concentração inalatório; LCO, grupo baixa concentração oral; MDA, Malonaldeído.

Introdução

O herbicida glifosato, N-(fosfonometil)glicina, é um herbicida para plantas de folhas largas, que foi introduzido no mercado em 1970 e desde então se tornou a substância ativa mais usada mundialmente para o controle de ervas daninhas. O glifosato é a segunda substância ativa mais vendida para usos profissionais e a primeira para usos não profissionais.¹¹ Herbicidas à base de glifosato (GBH) foram autorizados para uso agrícola nos Estados Unidos em 1974 pela Agência de Proteção Ambiental (*U.S. Environmental Protection Agency* - EPA) e na Europa, em 2002 pela Comissão Europeia.¹⁸

Os GBHs são utilizados na agricultura e silvicultura, em gramados e jardins urbanos e para controle de ervas daninhas em áreas industriais. Há, também, alguns GBHs que controlam a quantidade de plantas aquáticas.¹⁵ As lavouras que mais utilizam os GBHs são milho, soja, canola, trigo, cevada e feijão, entre outras.²⁵ Atualmente, um dos problemas é o uso aumentado de GBH pelos agricultores (aumento das taxas de aplicação e pulverização mais frequente) para combater ervas daninhas menos sensíveis a este herbicida.⁸

Os GBHs, além da contaminação do ar e do solo, contaminam também fontes de água potável, principalmente em regiões agrícolas. Atualmente, se sabe que a meia-vida do glifosato na água e no solo é maior do que se era conhecida anteriormente.²⁵ Isto pode acarretar em contaminação de alimentos e animais e posteriormente na contaminação de seres humanos não expostos diretamente a este herbicida.

A exposição a pesticidas tem efeitos no sistema nervoso, tanto central quanto periférico. Exposições a altas doses de pesticidas já tem suas consequências bem estabelecidas (déficits no desempenho neurocomportamental e anormalidades na função nervosa). Porém, neurotoxicidade associada à exposição crônica a baixas doses é controversa.²

A exposição ao glifosato, tanto aguda quanto crônica, pode causar parkinsonismo, uma condição semelhante à doença de Parkinson.^{7,40} Estudos *in vitro* tem mostrado efeito citotóxico do glifosato no desenvolvimento neuronal,²² alterações comportamentais em camundongos jovens^{4,5} e neurotoxicidade em estudos de desenvolvimento em ratos.⁹

O estresse oxidativo tem sido associado à neurotoxicidade induzida por pesticidas, devido a sua ação em uma série de alterações bioquímicas que levam à morte de células neuronais dopaminérgicas.²¹ Estudos mostram que o glifosato e seu produto de degradação ácido aminometil fosfônico (AMPA) induzem estresse oxidativo e morte celular via apoptótica, autofagia e por vias necróticas em neurônios.²²

Os efeitos tóxicos agudos do glifosato e do AMPA em mamíferos são baixos. Porém, os efeitos na saúde mediante a exposição crônica e a doses ultrabaixas associadas ao acúmulo desses compostos no meio ambiente ainda não está totalmente esclarecida.³⁷

O glifosato não foi testado sozinho em sua ingestão diária aceitável ou em concentrações relevantes para exposições humanas e sua toxicidade crônica em adultos ainda precisa ser avaliada em condições controladas de animais de laboratório e em concentrações ambientalmente relevantes.²⁴ Além disso, a maioria dos estudos de neurotoxicidade ao glifosato ou GBHs avaliou exposição materna (efeito sobre a prole) ou exposição de filhotes.^{1,9}

Existem diversos produtos contendo glifosato à venda.¹⁵ Este herbicida é aplicado em várias formas, incluindo sal de isopropilamina, sal de amônio, sal de diamônio, sal de dimetilamônio e sal de potássio.¹² Estes sais são considerados pela indústria como “produtos inertes” e a formulação dos GBHs é um segredo industrial.²⁴ Assim, a avaliação constante dos GBHs é importante devido à composição muito variável desses herbicidas comercializados no mundo todo.²⁶

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito neurotóxico da exposição crônica a um GBH comumente utilizado no Brasil em ratos adultos, de acordo com parâmetros comportamentais e histológicos, e avaliar o possível papel das vias apoptóticas e do estresse oxidativo nas alterações cerebrais. Para isto, realizamos exposição crônica dos animais por vias e concentrações relevantes à exposição humana.

Material e Métodos

Aprovação ética do estudo. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes nacionais e internacionais de manejo animal e os protocolos aprovados pela Comissão de Ética para Uso Animal da Universidade

do Oeste Paulista (aprovação CEUA-UNOESTE nº 6095) (Anexo 1). O estudo foi desenhado e monitorado de acordo com as diretrizes ARRIVE.¹⁶

Herbicida utilizado. A exposição ao herbicida a base de glifosato (GBH) foi realizada com Glifosato [N-(phosphonomethyl) glycine] (Roundup Original DI, Monsanto, São Paulo, Brasil) com a seguinte composição: Sal de Di-amônio de N-(phosphonomethyl)glycine (GLIFOSATO): 445 g/L (370 g/L equivalente ácido), equivalente ácido de N-(phosphonomethyl) glycine (GLIFOSATO): 370 g/L (37,0% m/v) e outros ingredientes: 751 g/L (75,1% m/v).

Protocolo animal. Para a realização dos experimentos, foram utilizados 60 ratos Wistar albinos, machos, adultos, com peso entre 200-250g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), e alocados em gaiolas plásticas grandes, em biotério experimental climatizado a temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclos de 12 horas de luminosidade. Os animais foram separados aleatoriamente em 6 grupos (n=10/grupo): CI - grupo controle inalatório: expostos à nebulização com água destilada; CO - grupo controle oral: ração nebulizada com água destilada; LCI - grupo de baixa concentração inalatório: expostos a nebulização ao herbicida com $2,99 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) (correspondendo a $91,17 \text{ mg/m}^3$); LCO - grupo de baixa concentração oral: ração nebulizada com o herbicida na concentração de $2,99 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha (correspondendo a $91,17 \text{ mg/m}^3$); HCI - grupo de alta concentração inalatório: expostos a nebulização ao herbicida com $7,48 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha (correspondendo a $228,06 \text{ mg/m}^3$); HCO - grupo de alta concentração oral: ração nebulizada com o herbicida na concentração de $7,48 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha (correspondendo a $228,06 \text{ mg/m}^3$). As concentrações utilizadas foram baseadas na menor e na maior concentração descritas na bula do produto para uso em diferentes lavouras. Para a nebulização foram utilizadas duas caixas (32x 24x 32 cm), uma para os grupos controles e outra para os grupos expostos ao herbicida. As caixas foram ligadas a um nebulizador do tipo ultrassônico (Pulmosonic Star[®], Soniclear Ind. Com. Imp. e Exp. Ltda., São Paulo, Brasil). A exposição dos animais e da ração foi realizada até que toda a solução fosse nebulizada (aproximadamente 15 minutos).²³ Os animais expostos por via inalatória foram nebulizados uma vez ao dia, por cinco dias consecutivos durante a semana (simulação da exposição ocupacional). Os animais expostos por via oral tiveram sua

ração nebulizada um dia antes de ser consumida e esta foi trocada a cada dois dias (simulação da exposição por via alimentar).²⁹ A ração residual foi pesada a cada troca para controle da ingesta pelos animais. Os animais foram pesados mensalmente até o final do experimento. Os animais de todos os grupos foram expostos durante 6 meses. A eutanásia foi realizada ao final do experimento com Tiopental sódico (Syntec, EUA), na dose de 100 mg/Kg de peso via peritoneal.²⁷

Avaliação comportamental. Para avaliação comportamental, os testes comportamentais utilizados foram Teste de campo aberto e Labirinto em Cruz Elevado, com o objetivo de observar o estado geral de saúde, os reflexos neurológicos, as habilidades sensoriais e a função motora dos animais e o Teste de reconhecimento de objetos para avaliar a memória. Os testes e a observação foram realizados uma semana antes da eutanásia. Foi realizado um teste por dia e em ordem crescente de estresse, visando evitar a influência do teste anterior. Os testes foram realizados entre 8 e 17 horas^{30,31} (Figura 1). Os testes foram registrados em vídeo, durante cinco minutos, utilizando uma câmera de 8 MP com resolução de vídeo: 1080 p (1920 × 1080 px) orientada para os aparatos. Um mesmo observador permaneceu dentro da sala para realizar o registro em uma posição mais alta que os aparatos.

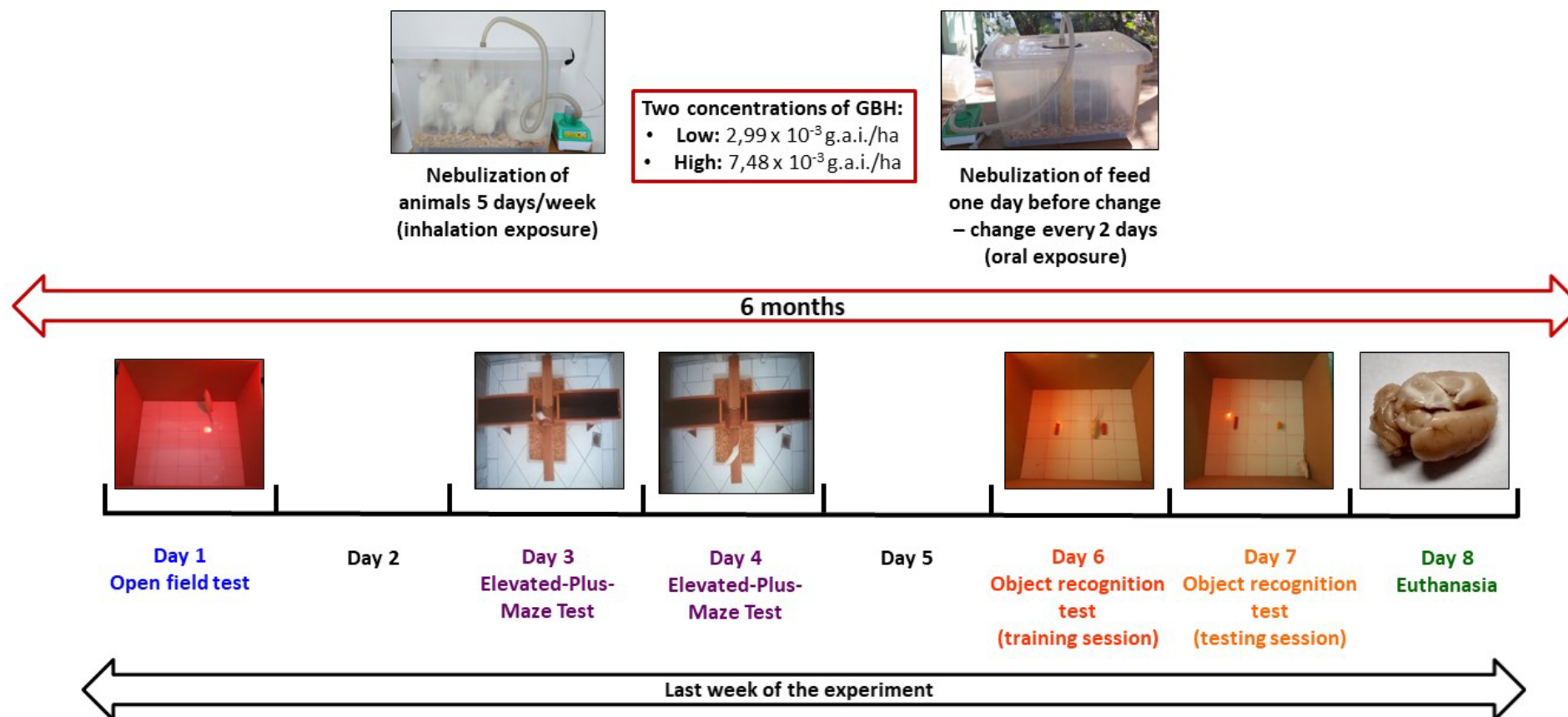


Figura 1. Delineamento experimental do estudo. GBH: herbicida a base de glifosato; g.a.i.: gramas de ingrediente ativo por hectare.

Teste de campo aberto. O Teste de campo aberto teve como objetivo avaliar atividade locomotora e emocionalidade/ansiedade dos animais.²⁸ Neste experimento, foi utilizada uma caixa quadrada (100x100cm), de paredes altas, feitas de madeira compensada branca. O soalho do campo aberto foi dividido em 12 quadrantes iguais divididos por linhas pretas (20x20cm cada). A caixa foi limpa com álcool 10% após cada teste. A sala dos testes tinha uma luz vermelha de 15 W que fornecia 3 lux de iluminação sobre o centro da caixa. Antes do início dos testes, os animais foram submetidos a um tempo de adaptação a caixa de 10 minutos. Após a adaptação, os animais foram observados por 5 minutos. Os parâmetros avaliados nas gravações foram o número de entradas no centro, o tempo de permanência no centro do aparelho e a distância total percorrida, contabilizando a locomoção total de cada animal.²⁸ Neste experimento, a locomoção total foi medida pela contagem do número de quadrantes cruzados com quatro patas pelo animal. A área central do aparelho foi definida como 20x20 cm.²⁰

Labirinto em Cruz Elevado. O teste do labirinto em cruz elevado teve como objetivo avaliar o nível de ansiedade e foi realizado como descrito por Pellow et al.³⁰ A sala onde foi realizado o teste possuía uma luz com uma intensidade que não excedeu 44 lux. O Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated Plus Maze*) consiste em um aparato de madeira com cor natural e quatro braços, elevados 50 cm do chão. Dois braços possuem paredes, sendo chamados de braços fechados (49 x10x 30 cm) e outros dois não possuem as paredes, correspondendo aos braços abertos (49x 10 cm), dispostos em forma de cruz. Uma arena central de 10x10cm une os quatro braços entre si. Os animais foram colocados individualmente na área central, voltados para um dos braços fechados e foram observados durante cinco minutos após o início da exploração do labirinto.³⁰ Os parâmetros avaliados nos registros foram a frequência de entrada nos braços aberto e fechado, o tempo de permanência em ambos os braços e no centro e seus percentuais, calculados de acordo com as fórmulas abaixo:³⁰

- **% de entrada no braço aberto** =
$$\frac{\text{entrada no braço aberto} \times 100}{\text{entrada no braço aberto} + \text{entrada no braço fechado}}$$
- **% de tempo no braço aberto** =
$$\frac{\text{tempo no braço aberto} \times 100}{\text{tempo no braço} + \text{tempo no braço fechado}}$$

A ansiedade foi avaliada contando as entradas nos braços aberto e fechado, sendo uma entrada contada quando o animal colocou todas as quatro patas em um dos braços do labirinto. O efeito de ansiedade foi definido como uma diminuição na frequência de entradas no braço aberto e no tempo de permanência neste.

Teste de reconhecimento de objetos. O teste de reconhecimento de objetos teve como objetivo avaliar a exploração de objetos e a memória de reconhecimento.³ O teste de reconhecimento de objeto utilizou uma caixa quadrada, de paredes altas, feitas de madeira compensada branca. O soalho da caixa foi dividido em 12 quadrantes iguais por linhas pretas e foi realizado segundo Antunes e Biala.³ A caixa foi limpa com álcool 10% após cada teste. A sala de teste era iluminada com uma luz vermelha de 15 W que fornecia 3 lux de iluminação sobre o centro da caixa. O teste foi dividido em três sessões, uma sessão de habituação, seguida de uma sessão de treinamento (5 minutos após a sessão de habituação) e uma sessão teste (24h após a sessão de treinamento). Na sessão treino, os animais individualmente foram expostos a dois objetos idênticos (em tamanho, forma e cor) definidos como objetos familiares, F1 e F2 (brinquedos Lego® quadrados, São Paulo, Brasil), durante cinco minutos. Após 24 h, ocorreu a sessão de teste. Um animal foi colocado no centro da caixa e expostos a dois objetos na mesma posição da sessão de treinamento; um dos objetos era o mesmo que um da sessão de treino (objeto familiar) e o segundo objeto era novo (objeto desconhecido) (brinquedo Lego® redondo, São Paulo, Brasil). O tempo de exposição na sessão de teste foi de cinco minutos. Considerou-se comportamento de exploração os animais terem tocado o objeto com o nariz, as patas dianteiras, e ficarem em pé 2 cm ou mais perto dos objetos. O tempo de exploração dos objetos foi medido manualmente usando um cronômetro digital e a seguinte fórmula foi usada para calcular o índice de reconhecimento:³

$$\frac{\text{Tempo de exploração do objeto não familiar} - \text{Tempo de exploração no objeto familiar}}{\text{Tempo objeto não familiar} + \text{Tempo objeto familiar}}$$

Onde, índice 1,0: reconhece o objeto novo; índice 0,0: explora os dois objetos; e índice -1,0: não reconhece os objetos.

Análise dos produtos do estresse oxidativo. Após a eutanásia, o encéfalo foi retirado e um fragmento do lobo frontal foi congelado para análise dos produtos de

estresse oxidativo. As dosagens de Malonaldeído (MDA) e Carbonilação foram realizadas em homogenato (1:10 em PBS) de tecido cerebral. Para a quantificação do MDA foram utilizados 250 μL de homogenato para 750 μL de ácido tricloroacético 10% para precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm; por 5 minutos; Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) e o sobrenadante retirado. Foi adicionado ao sobrenadante ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% na proporção (1:1) e as amostras foram aquecidas por 15 minutos a 100°C. O MDA reagiu com o TBA na proporção 1:2 MDA-TBA e após resfriamento, foi realizada a leitura a 535 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA). A concentração de MDA foi obtida através do coeficiente de extinção molar ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e das absorbâncias das amostras e o resultado final foi expresso em nmol/g de proteína.³² A carbonilação foi quantificada em 100 μL de homogêneo para 100 μL 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM em HCl 2 M). As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, foi adicionado 50 μL de NaOH (6 M) e incubadas novamente por 10 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA) e o resultado obtido da absorbância das amostras e do coeficiente de extinção molar ($22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O resultado final foi expresso em nmol/mg de proteínas.³²

Análise histopatológica. O restante do cérebro foi fixado em formol tamponado a 10% (Cinética Indústria Química, São Paulo, Brasil) durante 24 horas. Um fragmento do lobo frontal, fixado em formol, foi submetido a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil). Cortes seriados de 5 μ foram obtidos por micrótomo LEICA RM2265 (Leica Biosystems Nussoch GmbH, Alemanha) e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil). A análise histopatológica das lâminas foi cega, utilizando-se microscópio óptico comum (NIKON Labophot, Japão) e foram avaliados os parâmetros, com seus respectivos escores: congestão tecidual; infiltrado inflamatório e o tipo de célula inflamatória presente (polimorfonuclear e/ou mononuclear); necrose tecidual; necrose vascular; e gliose; e número de neurônios apoptóticos contados em 10 campos de grande aumento (CGA), o que corresponde a 1mm² de área.³⁶ Uma imagem original corada por hematoxilina-eosina de cada animal foi capturada no aumento de 200x pelo fotomicroscópio Leica (Leica

Microssystems, Suíça). As medidas da espessura do córtex cerebral foram realizadas em duas áreas para cada animal, utilizando-se o software ImageJ[®], do *National Institute of Health* (NIH) dos Estados Unidos, disponível gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).³⁶

Análise imuno-histoquímica. Cortes adicionais do lobo frontal cerebral foram feitos para realização da imuno-histoquímica. De acordo com as características de cada antígeno, a recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6,0) na panela de pressão (Electrolux Chef, AB Electrolux, Curitiba, Paraná, Brasil). Para o bloqueio da peroxidase endógena os cortes foram submetidos a solução de peróxido de hidrogênio e metanol (metanol 3%) durante 15 minutos. Posteriormente, o bloqueio proteico foi realizado pela incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (BSA 3%) durante 1 hora em temperatura ambiente, diluído em tampão TBS-T. Na etapa seguinte, as secções foram submetidas à reação com os anticorpos primários específicos BAX (P-19, Santa Cruz sc-526, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, EUA) na diluição 1:100 e BCL-2 (N-19, Santa Cruz sc-492, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, EUA) na diluição 1:100 e incubadas em câmara úmida durante a noite a 4°C em geladeira. Posteriormente, após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário *goat anti-rabbit HRP* (Santa Cruz sc-2030, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, EUA), revelados com diaminobenzidina (DAB) por 2 minutos, contra-corados com Hematoxilina de Harris durante 4 minutos e avaliados no fotomicroscópio Zeiss Axiophoto (Zeiss, Munique, Alemanha). Os cortes do cérebro de cinco animais de cada grupo experimental foram avaliados através do precipitado acastanhado de DAB que indica a imunorreatividade dos anticorpos.³⁶ Dez imagens originais coradas por imuno-histoquímica de cada antígeno e de cada animal foram capturadas no aumento de 400x pelo fotomicroscópio Leica (Leica Microssystems, Suíça) e a intensidade da imunorreatividade dos antígenos foi avaliada utilizando o software Image J (NIH, EUA). Foi utilizada a ferramenta de análise de imagem "*IHC profiler- cytoplasmic stained image*" e foi computada a porcentagem de área marcada.³⁸

Análise estatística. Para comparar as médias entre os grupos, foi utilizada a Análise de Variância se os pressupostos de normalidade (teste de Kolmogorov-

Smirnov) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) foram atendidos. Caso contrário, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis não paramétrico para a comparação dos postos, seguido do teste de comparações múltiplas de postos de Student-Newman-Keuls. Para a variável congestão foi utilizado o teste da Razão de Verossimilhança. Os dados foram processados com o SPSS v. 23. Todos os testes utilizaram 5% de significância ($p < 0,05$).

Resultados

Peso dos animais e consumo de ração. Não houve diferença entre os grupos para o consumo da ração, assim como não houve diferença de ganho de peso ($p > 0,05$) (Tabela 1).

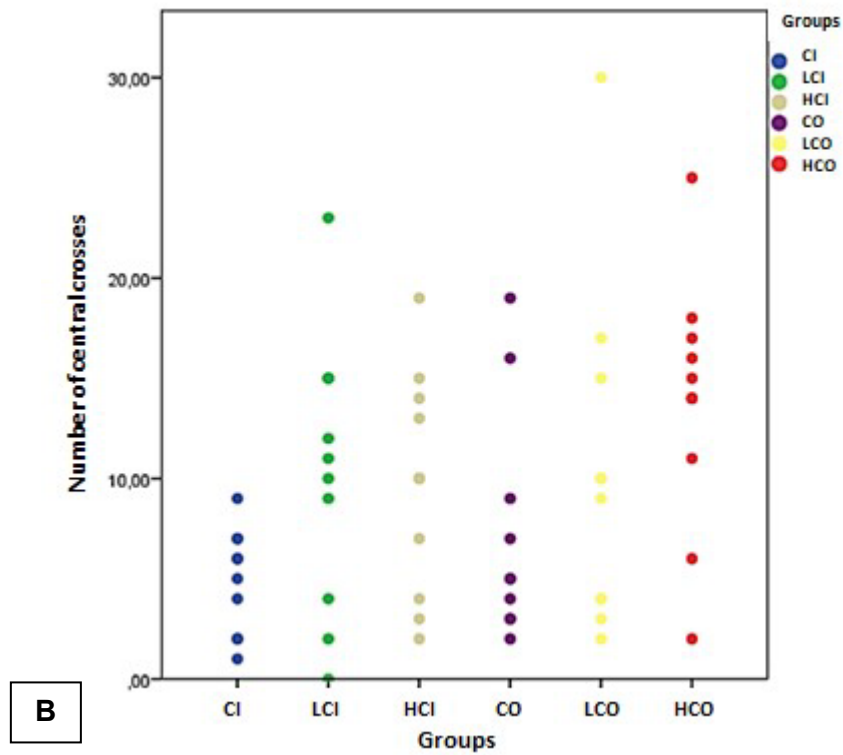
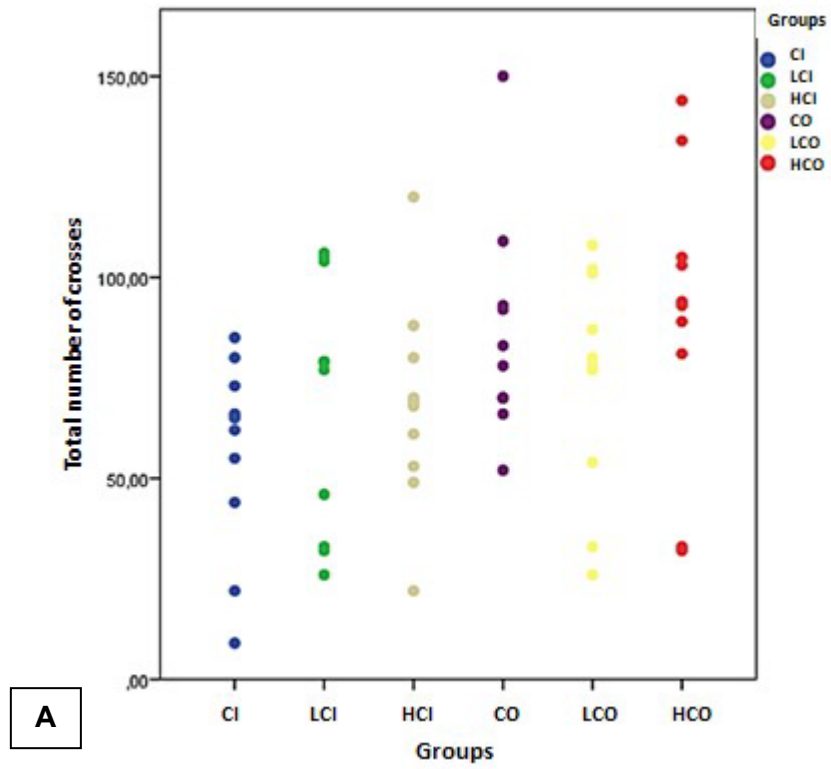
Tabela 1. Média (\pm desvio padrão) do consumo de ração e ganho de peso de acordo com o grupo experimental.

Grupos	Consumo da ração*	Ganho de peso**
CI	257,02 ($\pm 3,57$)	86,27 ($\pm 46,21$)
CO	259,83 ($\pm 12,63$)	103,19 ($\pm 21,19$)
LCI	259,70 ($\pm 7,89$)	92,85 ($\pm 20,18$)
LCO	254,22 ($\pm 12,63$)	90,84 ($\pm 11,10$)
HCI	255,26 ($\pm 12,97$)	103,48 ($\pm 38,96$)
HCO	253,78 ($\pm 9,30$)	80,78 ($\pm 32,11$)

Grupos: CI: controle inalatório; CO: controle oral; LCI: baixa concentração inalatório; LCO: baixa concentração oral; HCI: alta concentração inalatório; HCO: alta concentração oral. *: $p = 0,156$; **: $p = 0,349$ (one-way ANOVA).

Avaliação comportamental

Teste de campo aberto. Não houve diferença em relação ao número de cruzamentos totais nem ao número cruzamentos na área central entre os grupos avaliados ($p > 0,05$) (Figuras 2A e 2B). Os animais do grupo CI apresentaram menor tempo de permanência na área central do que os animais dos grupos LCI, LCO, HCI e HCO ($p < 0,05$) (Figura 2C).



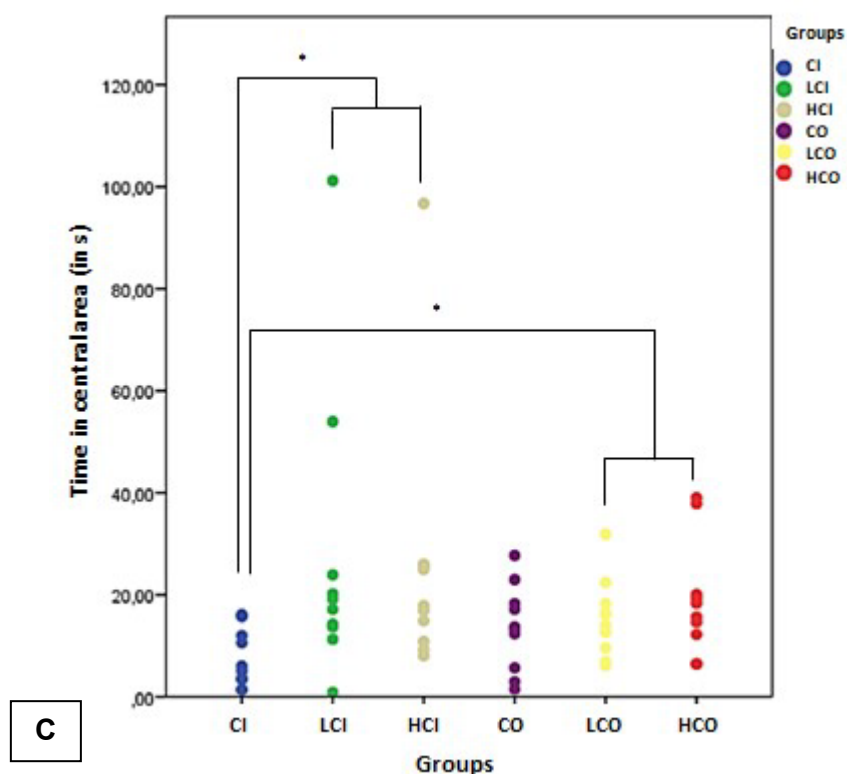
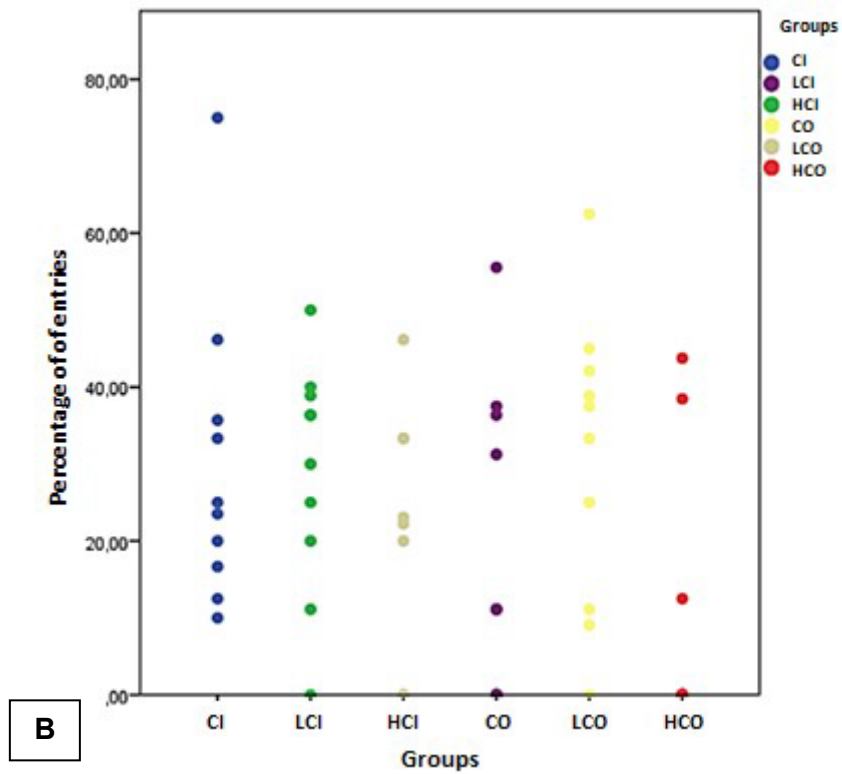
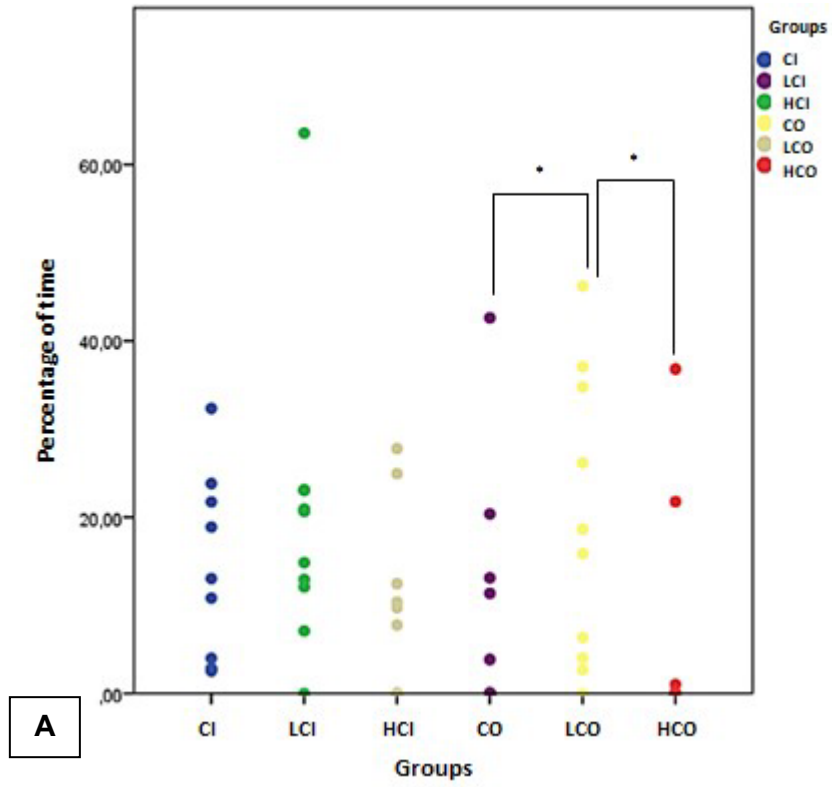


Figura 2. Teste do campo aberto: A – Número total de cruzamentos por grupo experimental (n=60) (p=0,91) (teste de Kruskal-Wallis). B – Número de cruzamentos na área central por grupo experimental (n=60) (p=0,062) (teste de Kruskal-Wallis). C – Tempo de permanência na área central [em segundos (s)] por grupo experimental (n=60) (p=0,024) (teste de Kruskal-Wallis). Grupos: CI: controle inalatório; CO: controle oral; LCI: baixa concentração inalatório; LCO: baixa concentração oral; HCI: alta concentração inalatório; HCO: alta concentração oral. *: p < 0,05.

Teste do labirinto em cruz elevado. Os animais do grupo LCO apresentaram maior tempo de permanência nos braços abertos do que os animais dos grupos CO e HCO (p=0,036) (Figura 3A). Não houve diferença entre os grupos para os parâmetros porcentagem de entradas nos braços abertos (p=0,063) (Figura 3B) e para número de entradas nos braços fechados (p=0,303) (Figura 3C).



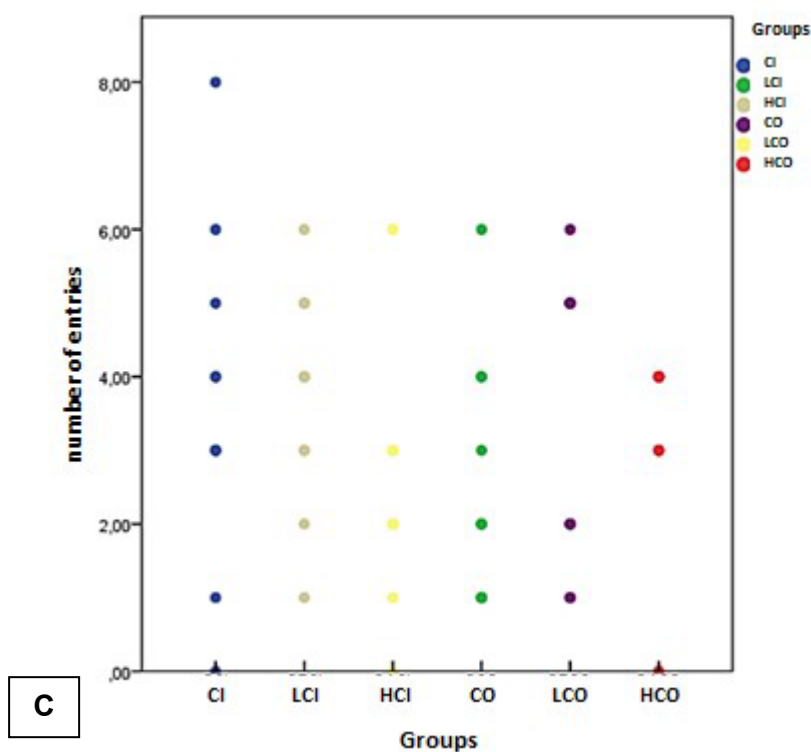


Figura 3. Labirinto em cruz elevado: A – Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos por grupo experimental (n=60) ($p=0,036$) (teste de Kruskal-Wallis). B – Porcentagem de entradas nos braços abertos por grupo experimental (n=60) ($p=0,063$) (teste de Kruskal-Wallis). C – Número de entradas nos braços fechados por grupo experimental (n=60) ($p=0,303$) (teste de Kruskal-Wallis). Grupos: CI: controle inalatório; CO: controle oral; LCI: baixa concentração inalatório; LCO: baixa concentração oral; HCI: alta concentração inalatório; HCO: alta concentração oral. *: $p < 0,05$.

Teste de reconhecimento de objetos. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais para os seguintes parâmetros: tempo de exploração do objeto novo ($p=0,630$) (Figura 4A) e para o índice de reconhecimento ($p=0,473$) (Figura 4B).

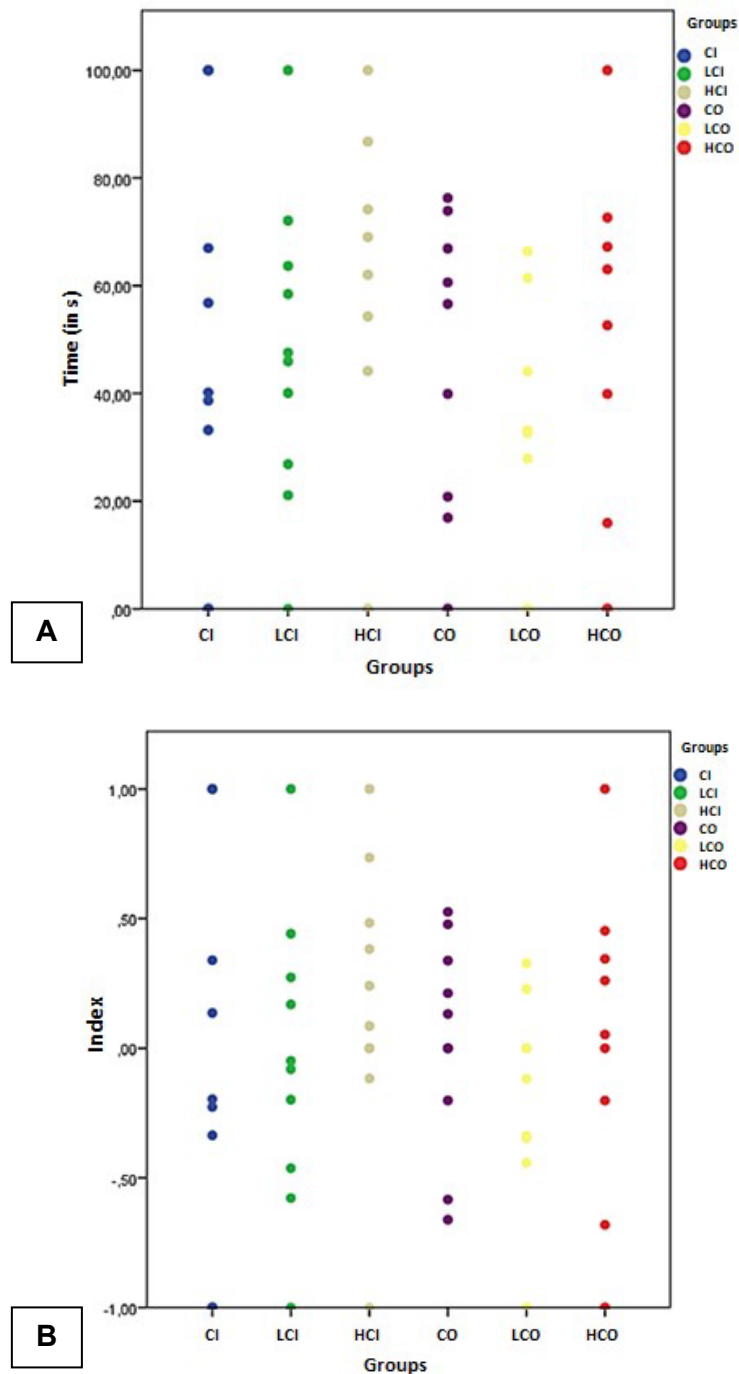


Figura 4. Reconhecimento de objetos: A – Tempo de exploração do objeto novo por grupo experimental [em segundo(s)] (n=60) ($p=0,630$) (teste de Kruskal-Wallis). B – Escores do índice de reconhecimento por grupo experimental (n=60) ($p=0,473$) (teste de Kruskal-Wallis). Grupos: CI: controle inalatório; CO: controle oral; LCI: baixa concentração inalatório; LCO: baixa concentração oral; HCI: alta concentração inalatório; HCO: alta concentração oral.

Análise histopatológica do cérebro. Os animais expostos à alta concentração de GBH, independente da via de exposição, apresentaram congestão do parênquima cerebral, sendo que congestão moderada só ocorreu nos animais expostos à alta concentração por via oral ($p < 0,05$) (Tabela 2, Figura 5). Não foram observados infiltrado inflamatório, necrose tecidual, necrose vascular, gliose e neurônios apoptóticos em nenhum dos grupos experimentais.

Tabela 2. Incidência de congestão leve e moderada no parênquima cerebral segundo o grupo experimental (n=60).

Congestão leve			
Grupos	Incidência	Grupos	Incidência
CI	0/10 (0%) ^{Aa}	CO	0/10 (0%) ^{Aa}
LCI	0/10 (0%) ^{Aa}	LCO	0/10 (0%) ^{Aa}
HCI	10/10 (100%) ^{Bb}	HCO	5/10 (50%) ^{Ab}
Congestão moderada			
Grupos	Incidência	Grupos	Incidência
CI	0/10 (0%) ^{Aa}	CO	0/10 (0%) ^{Aa}
LCI	0/10 (0%) ^{Aa}	LCO	0/10 (0%) ^{Aa}
HCI	0/10 (0%) ^{Ba}	HCO	5/10 (50%) ^{Ab}

Grupos: CI: controle inalatório; CO: controle oral; LCI: baixa concentração inalatório; LCO: baixa concentração oral; HCI: alta concentração inalatório; HCO: alta concentração oral. Letras maiúsculas comparam grupos na mesma linha. Letras minúsculas comparam grupos ao mesmo tempo e na mesma coluna. Letras diferentes significam $p < 0,05$ (Likelihood ratio test), onde $A \neq B$ e $a \neq b$.

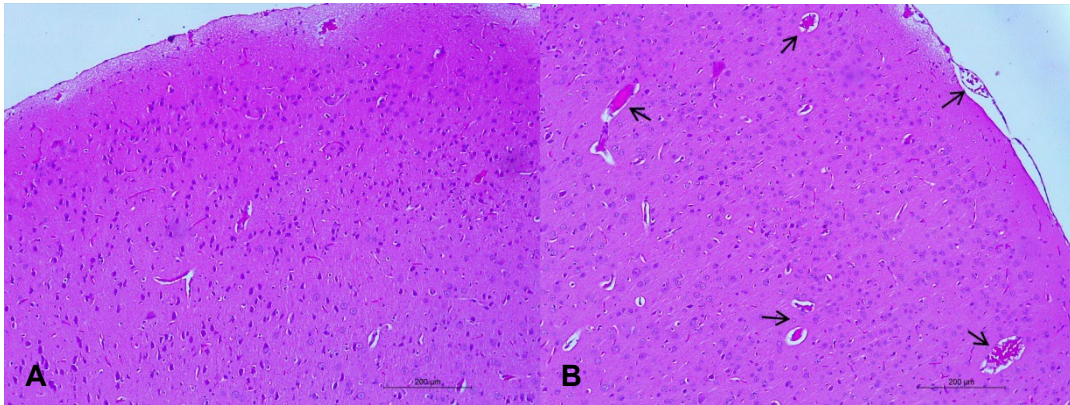


Figura 5. Fotomicroscopia do cérebro. A – Parênquima cerebral sem alterações (animal do grupo controle inalatório). B - Parênquima cerebral com vasos dilatados e cheios de hemácias (setas) (animal do grupo exposição à alta concentração oral de GBH). Hematoxilina-eosina – aumento de 100x. Barra de escala: 200µm.

Medida da espessura do córtex. Os animais dos grupos LCI, LCO, HCI e HCO apresentaram espessura do córtex maior que os animais do grupo CI ($p = 0,045$) (Figura 6).

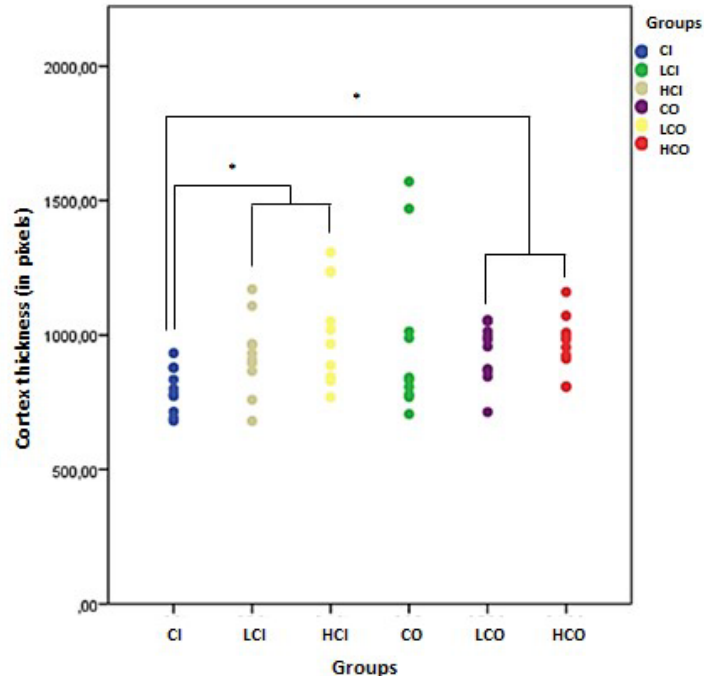


Figura 6. Espessura do córtex cerebral (em pixel) segundo o grupo experimental (n=60). Grupos: CI: controle inalatório; CO: controle oral; LCI: baixa concentração inalatório; LCO: baixa concentração oral; HCI: alta concentração inalatório; HCO: alta concentração oral. *: $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis).

Análise imuno-histoquímica. A expressão de BAX foi significativamente menor em LCO em relação à LCI ($p < 0,05$). A expressão de BCL-2 foi significativamente maior nos grupos LCI, LCO, HCI e HCO comparado ao grupo CI ($p < 0,05$). A relação BAX/BCL-2 foi significativamente maior em CI comparada ao grupo CO e a todos os grupos expostos ao GBH (Figura 7).

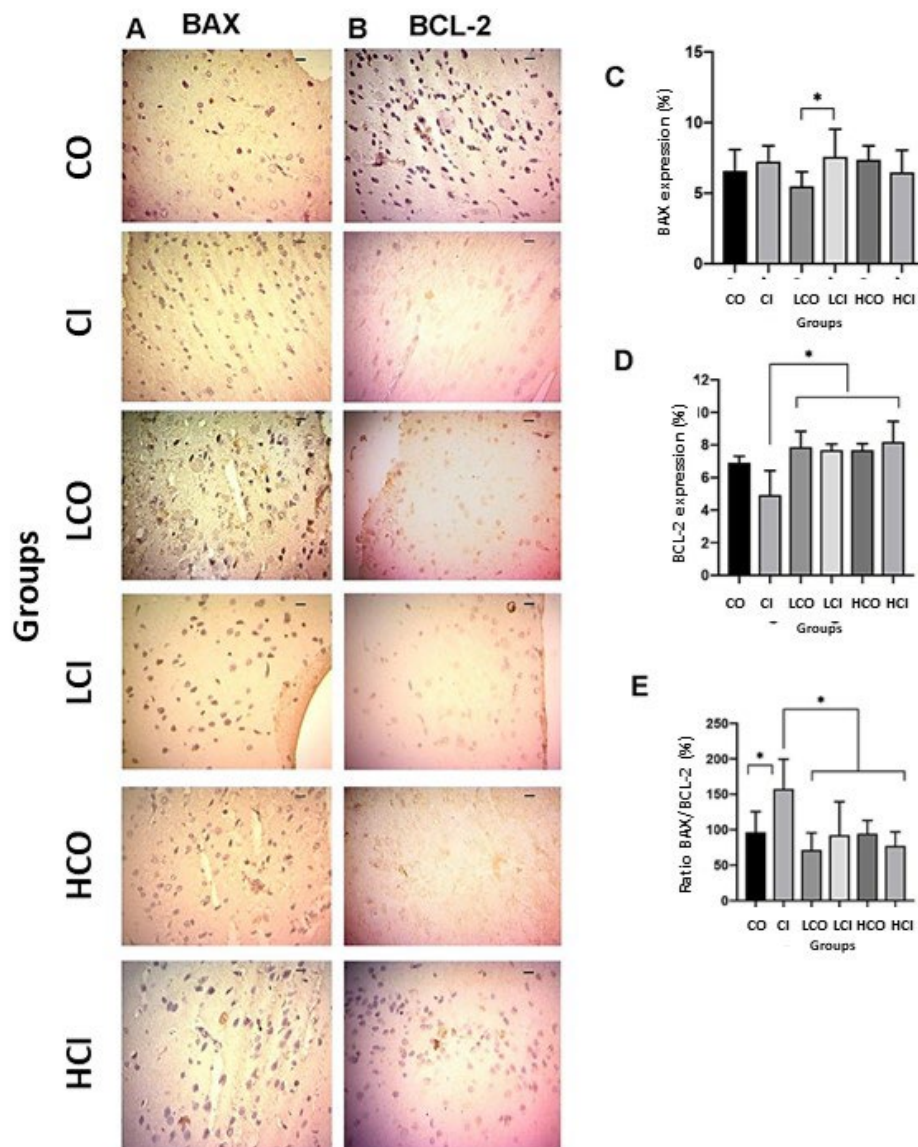


Figura 7. Análise imuno-histoquímica: A – Imunomarcção com anticorpo anti-BAX no parênquima cerebral dos animais segundo o grupo experimental (aumento de 400x). B – Imunomarcção com anticorpo anti-BCL-2 no parênquima cerebral dos animais segundo o grupo experimental (aumento de 400x). C – Porcentagem de expressão de BAX segundo o grupo experimental (média e erro padrão) (n=60). D – Porcentagem de expressão de BCL-2 segundo o grupo experimental (n=60) (média e erro padrão). E – Relação BAX/ BCL-2 (em %) segundo o grupo experimental

(n=60) (média e erro padrão). Grupos: CI: controle inalatório; CO: controle oral; LCI: baixa concentração inalatório; LCO: baixa concentração oral; HCI: alta concentração inalatório; HCO: alta concentração oral. *: $p < 0,05$ (one-way ANOVA).

Análise dos produtos do estresse oxidativo. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de MDA ($p=0,062$) (Figura 8A) nem de carbonilação de proteínas ($p=0,843$) nos grupos avaliados (Figura 8B).

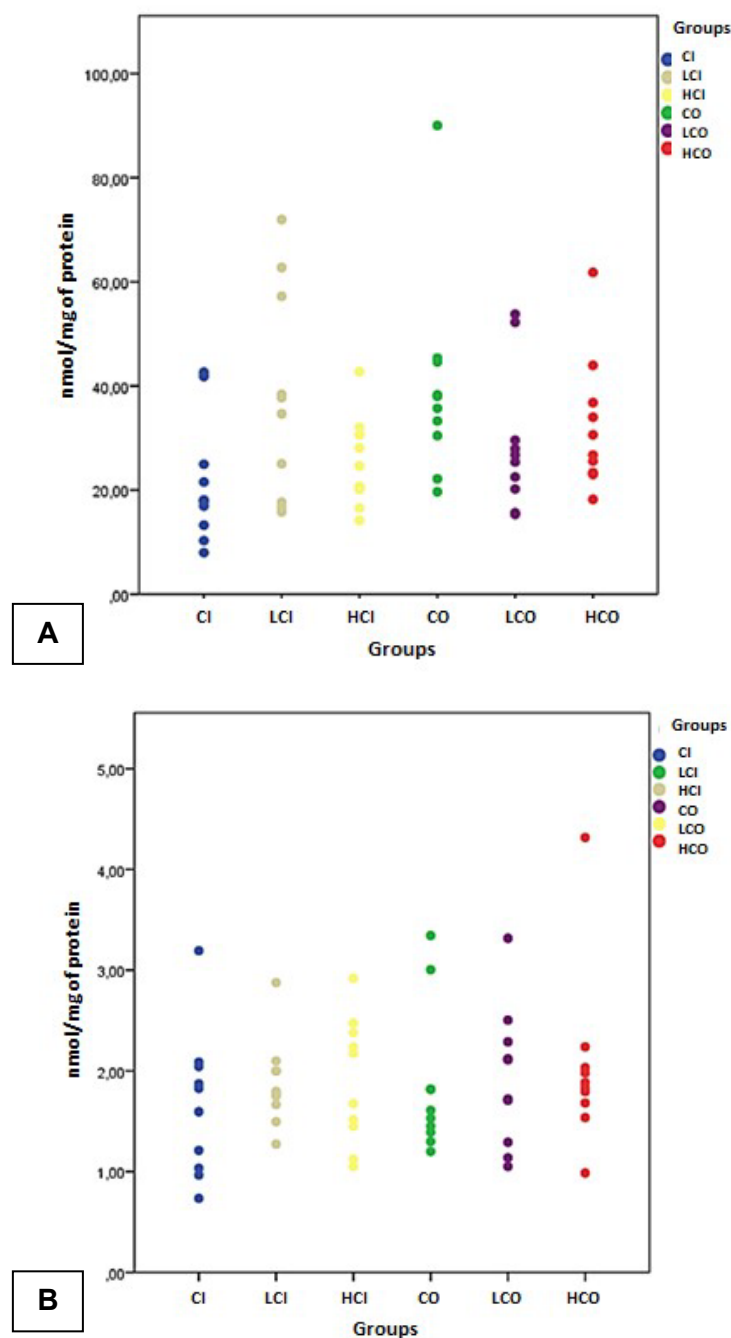


Figura 8. Análise de produtos do estresse oxidativo: A – Dosagem de MDA (nmol/g de proteínas) por grupo experimental (n=60) ($p=0,902$) (teste de Kruskal-Wallis). B –

Dosagem de carbonilação (nmol/g de proteínas) por grupo experimental (n=60) (p=0,843) (teste de Kruskal-Wallis). Grupos: CI: controle inalatório; CO: controle oral; LCI: baixa concentração inalatório; LCO: baixa concentração oral; HCI: alta concentração inalatório; HCO: alta concentração oral.

Discussão

Neste estudo, observamos uma maior permanência dos animais expostos ao GBH na área central ao teste de campo, menor tempo nos braços abertos do labirinto em cruz pelos animais expostos a alta concentração oral, congestão tecidual somente nos animais expostos a alta concentração (oral e inalatória) e maior espessura do córtex cerebral e aumento da expressão da proteína BCL-2 nos animais expostos ao GBH.

A exposição a agrotóxicos pode ocorrer por via direta, durante a aplicação destas substâncias, o que leva a uma exposição a níveis mais altos, ou pode ocorrer por via indireta, por meio de água potável, ar e alimentos contaminados, a qual geralmente é a níveis mais baixos e de longa duração.² Com isso, vários países estabeleceram níveis de ingestão diária “aceitável” (IDA) ou dose crônica de referência (cRfD) para exposições a GBH, a qual é variável entre Europa (IDA: 0,3 mg/kg/dia) e Estados Unidos (cRfD: 1,75 mg/kg/dia).²⁵ Além disso, já foram realizadas avaliações de amostras de alimentos para determinar a concentração residual de glifosato neste. As maiores taxas de detecção de glifosato foram encontradas em sementes de girassol, lentilhas secas, sementes de mostarda, ervilha seca, linhaça e soja, e entre os cereais, no trigo, aveia e centeio, porém dentro dos limites permitidos (2 mg/kg). Esta análise é importante para estimar não só a exposição dietética humana, mas também para saúde animal, para que possa ser estimada a possível contaminação da carne de consumo.¹⁴ Devido ao risco de contaminação via alimentar por resíduos de GBH, realizamos exposição oral dos animais via pulverização com este herbicida da ração a ser consumida para avaliar seu potencial de dano.

Embora, em geral, as exposições (diretas ou indiretas) são a níveis inferiores às doses de referência e à ingestão diária aceitável propostas pelas agências reguladoras,³⁴ a exposição a pesticidas está associada há vários sintomas inespecíficos, muitos deles neurológicos, tais como, dor de cabeça, tontura, fadiga,

fraqueza, náusea, aperto no peito, dificuldade para respirar, insônia, confusão e dificuldade de concentração.²

Em 2015, Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority* - EFSA) considerou que o glifosato não causava nenhum efeito crítico à saúde em termos de vigilância de saúde ocupacional e não apresentava nenhuma evidência convincente de carcinogenicidade, neurotoxicidade ou efeitos na fertilidade e desenvolvimento em estudos epidemiológicos.¹³ Porém, alguns estudos feitos após esta data tem mostrado efeito neurotóxico do glifosato. Um dos problemas é que estes estudos utilizaram doses altas de glifosato, ou foram estudos *in vitro*, ou por vias não comuns à exposição humana, estudos do princípio ativo glifosato e não de GBH e grande parte deles avaliou apenas o impacto do glifosato ao desenvolvimento cerebral e não ao cérebro adulto já formado. Este é o diferencial do nosso estudo que avaliou um GBH (comumente utilizado no Brasil), em concentrações utilizadas para pulverização de lavouras, por vias compatíveis com a exposição humana (inalatória e por alimento contaminado) e em animais adultos.

Disfunções motoras, disfunções no humor e na cognição são sintomas comuns e muito frequentes em doenças neurodegenerativas, por isso precisam ser avaliados em estudos toxicológicos, inclusive para tentativa de elucidação das suas possíveis causas.^{6,41} Neste estudo, utilizamos o teste de campo aberto para avaliação da função motora,³³ o teste de labirinto em cruz elevado para função emocional (ansiedade)³⁹ e o teste de reconhecimento de objeto para função cognitiva,¹⁹ pois a memória de curto prazo e memória episódica, são suscetíveis à neurodegeneração.¹⁷

No teste de campo aberto, os animais expostos ao GBH não apresentam prejuízo locomotor, assim como não houve prejuízo de memória de reconhecimento ao teste de reconhecimentos de objetos. Os animais do grupo controle inalatório ficaram um menor tempo na área central no teste do campo aberto comparado aos grupos expostos ao GBH. No teste do labirinto em cruz elevado, os animais do grupo exposto à alta concentração oral e aqueles do grupo controle oral permaneceram um menor tempo nos braços abertos, quando comparados aos expostos à baixa concentração oral, demonstrando um maior grau de ansiedade. Em um estudo em camundongos, houve diminuição da atividade locomotora, aumento de tigmotaxia, comportamento ansiogênico e prejuízo significativo da memória de reconhecimento dos animais expostos por via intranasal a um GBH.⁴ O estudo de

Bali et al,⁵ com exposição de camundongos jovens a altas doses de GBH na água de beber por 6 e doze semanas, mostrou deficiências de memória de reconhecimento e retenção nos expostos. As alterações encontradas nos dois estudos provavelmente diferem do nosso, devido às concentrações utilizadas, mais altas nos dois anteriores do que aquelas utilizadas em nosso estudo ou devido à idade dos animais (mais jovens do que em nosso estudo).

No estudo de Tizhe et al,³⁵ observou-se que os ratos expostos por gavagem a alta dosagem de GBH mostraram degeneração das células neuronais, porém os expostos a baixa concentração não apresentaram lesão a microscopia óptica. Em nosso estudo, a única alteração histopatológica foi presença de congestão em todos os animais expostos a alta concentração de GBH. Mais uma vez as concentrações utilizadas em nosso estudo podem ter influenciado no não aparecimento de lesões cerebrais. O fato de 50% dos animais expostos à alta concentração oral ter apresentado congestão de grau moderado, embora sem associação com edema cerebral, pode ser um fator que impactou no maior grau de ansiedade destes ao teste comportamental do labirinto em cruz elevado.

Em relação à espessura do córtex, os animais dos grupos expostos ao GBH (independente da concentração ou via de exposição) apresentaram espessura maior o que os animais do grupo controle inalatório. Dado este que corrobora com a ausência de necrose individual de neurônios nos animais expostos e com os resultados da imuno-histoquímica, onde a proteína pró-apoptótica BAX não diferiu entre os grupos expostos e não expostos ao GBH; e a proteína anti-apoptótica BCL-2 estava aumentada nos grupos expostos ao GBH em relação a controle inalatório. Em estudo anterior do nosso grupo com exposição similar de ratos ao herbicida 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), em concentrações simulando a exposição ambiental humana, observamos dano cerebral associado a aumento da expressão da proteína BAX e diminuição da expressão da proteína BCL-2.³⁶ Nosso grupo é o primeiro a avaliar as vias apoptóticas na gênese da lesão cerebral a um GBH. O aumento da proteína BCL-2 nos animais expostos ao GBH pode representar um estímulo compensatório a um possível dano cerebral.

O dano oxidativo em biomoléculas tem sido associado a diversas patologias, principalmente as degenerativas e associadas ao envelhecimento.¹⁰ Os efeitos tóxicos de muitos xenobióticos também têm sido associados à produção de radicais livres. O estresse oxidativo tem sido associado à neurotoxicidade induzida por vários

agrotóxicos.²¹ Embora estudos *in vitro*²² e *in vivo*^{9,35} tenham mostrado dano oxidativo associado a exposição a GBHs, em nosso estudo as dosagens de MDA e de carbonilação de proteínas não foram alteradas. Mais uma vez, as diferenças entre o nosso estudo e os outros foram nossas concentrações que são inferiores a dos outros estudos e a avaliação de cérebros adultos e não em desenvolvimento⁹ ou de animais jovens,³⁵ os quais são mais susceptíveis a neurotoxicidade, ou em cultura celular,²² onde a ação do agente tóxico é direta sobre a célula.

A avaliação constante dos diferentes GBHs com exposição experimental baseada em concentrações e vias similares a da exposição humana poderão esclarecer melhor se há potencial neurotóxico associado ao uso destes herbicidas.

Baseado em nossos dados, sob as condições de exposição estudadas e nas concentrações avaliadas, podemos concluir que o GBH avaliado não apresenta efeito neurotóxico. Assim, parece que o uso dos GBHs, restrito as concentrações indicadas na bula do produto, não causa neurotoxicidade.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado por fundos de pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). G. D. Binotti foi bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC / CNPq). K. P. Bruneri foi bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica da UNOESTE (PROBIC / UNOESTE). Os autores agradecem aos técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia da UNOESTE, Carlos Alexandre Santana de Oliveira, Mariana Fonseca Motta Borges e Talita Rizo Pereira, pelo processamento histológico dos espécimes.

Referências

1. **Ait-Bali Y, Ba-M'hamed S, Gambarotta G, Sassoè-Pognetto M, Giustetto M, Bennis M.** 2020. Pre- and postnatal exposure to glyphosate-based herbicide causes behavioral and cognitive impairments in adult mice: evidence of cortical and hippocampal dysfunction. *Arch Toxicol* **94**:1703-1723. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02677-7>.

2. **Alavanja MC, Hoppin JA, Kamel F.** 2004. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu Rev Public Health* **25**:155-97. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.25.101802.123020>.
3. **Antunes M, Biala G.** 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* **13**:93-110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>.
4. **Baier CJ, Gallegos CE, Raisman-Vozari R, Minetti A.** 2017. Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. *Neurotoxicol Teratol* **64**:63-72. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.10.004>.
5. **Bali YA, Kaikai NE, Ba-M'hamed S, Bennis M.** 2019. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology* **415**:18-25. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.01.010>.
6. **Baquero M, Martín N.** 2015. Depressive symptoms in neurodegenerative diseases. *World J Clin Cases* **3**:682-693. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i8.682>.
7. **Barbosa ER, Leiros da Costa MD, Bacheschi LA, Scaff M, Leite CC.** 2001. Parkinsonism after glycine-derivate exposure. *Mov Disord* **16**:565-568. <https://doi.org/10.1002/mds.1105>.
8. **Benbrook CM.** 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur* **8**:3. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>.
9. **Cattani D, de Liz Oliveira Cavalli VL, Heinz Rieg CE, Domingues JT, Dal-Cim T, Tasca CI, Mena Barreto Silva FR, Zamoner A.** 2014. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology* **320**:34-45. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.001>.
10. **Chondrogianni N, Petropoulos I, Grimm S, Georgila K, Catalgol B, Friguet B, Grune T, Gonos ES.** 2014. Protein damage, repair and proteolysis. *Mol Aspects Med* **35**:1-71. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.09.001>.
11. **Conrad A, Schröter-Kermani C, Hoppe HW, Rüter M, Pieper S, Kolossa-Gehring M.** 2017. Glyphosate in German adults - Time trend (2001 to 2015) of

- human exposure to a widely used herbicide. *Int J Hyg Environ Health* **220**:8-16. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.09.016>.
12. **Dill GM, Sammons RD, Feng PCC, Kohn F, Kretzmer K, Mehrsheikh A, Bleeke M, Honegger JL, Farmer D, Wright D, Hauptfear EA.** 2010. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. Chapter 1. In: Nandula VK (ed) *Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management*. Wiley, New York, pp 1–33. ISBN978-0470410318
 13. **EFSA (European Food Safety Authority).** 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* **13**:4302. 107 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302>
 14. **EFSA (European Food Safety Authority).** 2016. The 2014 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* **14**:4611. 139 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4611>
 15. **Henderson AM, Gervais JA, Luukinen B, Buhl K, Stone D.** 2010. Glyphosate General Fact Sheet. National Pesticide Information Center. Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/glyphogen.html>.
 16. **Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG.** 2010. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology* **8**:1-5. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>
 17. **Kirova AM, Bays RB, Lagalwar S.** 2015. Working memory and executive function decline across normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* **2015**:748212. <https://doi.org/10.1155/2015/748212>.
 18. **Landrigan PJ, Belpoggi F.** 2018. The need for independent research on the health effects of glyphosate-based herbicides. *Environ Health* **17**:51. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0392-z>.
 19. **Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, Freret T.** 2013. Object recognition test in mice. *Nat Protoc* **8**:2531-2537. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>.
 20. **Mack JM, Moura TM, Lanznaster D, Bobinsk F, Massari CM, Sampaio TB, Schmitz AE, Souza LF, Walz R, Tasca CI, Poli A, Doty RL, Dafre AL,**

- Prediger RD.** 2018. Intranasal administration of sodium dimethyldithiocarbamate induces motor deficits and dopaminergic dysfunction in mice. *NeuroToxicol* **66**: 107-120. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.03.011>
21. **Mansour SA, Mossa A-TH.** 2010. Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pestic Biochem Physiol* **96**:14-23. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.08.008>.
22. **Martínez MA, Rodríguez JL, Lopez-Torres B, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Maximiliano JE, Anadón A, Ares I.** 2020. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. *Environ Int* **135**:105414. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105414>.
23. **Mello F A, Quinallia G, Marion AC, Jorge FC, Marinelli LM, Salge AKM, Fagiani M AB, Mareco EA, Favareto APA, Rossi-Silva RC.** 2018. Evaluation of the nasal cavity mice submitted to the inhalation exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Medicina (Ribeirão Preto, Online.)* **51**: 247-253. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v51i4p00-00>
24. **Mesnage R, Benbrook C, Antoniou MN.** 2019. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food Chem Toxicol. Jun* **128**:137-145. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053>.
25. **Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, Hansen M, Landrigan PJ, Lanphear BP, Mesnage R, Vandenberg LN, Vom Saal FS, Welshons WV, Benbrook CM.** 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health* **15**:19. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>.
26. **Nagy K, Tessema RA, Budnik LT, Ádám B.** 2019. Comparative cyto- and genotoxicity assessment of glyphosate and glyphosate-based herbicides in human peripheral white blood cells. *Environ Res* **179**:108851. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108851>.
27. **Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS.** 2005. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo

- Muniz. Available at:
http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf.
 Accessed 22 Ago, 2015.
28. **Pandolfo P, Pamplona FA, Prediger RDS, Takahashi RN.** 2007. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55, 212-2. *Eur J Pharmacol* **563**: 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.02.013>
 29. **Parizi JLS, Odorizzi GASM, Sato GMRH, Patrão IB, Nai GA.** 2020. Oral mucosa changes associated with chronic oral and inhalation exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in Wistar rats. *Toxicol Res* **9**: 746-757. <http://dx.doi.org/10.1093/toxres/tfaa085>.
 30. **Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M.** 1985. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* **14**: 149-167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
 31. **Prediger RD, Fernandes MS, Rial D, Wopereis S, Pereira VS, Bosse TS, Da Silva CB, Carradore RS, Machado MS, Cechinel-Filho V, Costa-Campos L.** 2008. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J Ethnopharmacol* **120**: 465-473. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.018>
 32. **Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F, Borji A.** 2016. Protective effects of carvacrol against oxidative stress induced by chronic stress in rat's brain, liver, and kidney. *Biochem Res Int* **2016**:2645237. <https://doi.org/10.1155/2016/2645237>.
 33. **Seibenhener ML, Wooten MC.** 2015. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* **96**:e52434. <https://doi.org/10.3791/52434>.
 34. **Solomon KR.** 2016. Glyphosate in the general population and in applicators: a critical review of studies on exposures. *Crit Rev Toxicol* **46**:21-27. <https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1214678>.
 35. **Tizhe EV, Ibrahim ND, Fatihu MY, Onyebuchi II, George BD, Ambali SF, Shallangwa JM.** 2014. Influence of zinc supplementation on histopathological changes in the stomach, liver, kidney, brain, pancreas and spleen during

- subchronic exposure of Wistar rats to glyphosate. *Comp Clin Path* **23**:1535-1543. <https://doi.org/10.1007/s00580-013-1818-1>.
36. **Ueda RMR, Souza VM, Magalhães LR., Chagas PHN, Veras ASC, Teixeira GR, Nai GA.** 2021. Neurotoxicity associated with chronic exposure to dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) – a simulation of environmental exposure in adult rats. *J Environ Sci Health Part B* **8**: 695-705. <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1939622>
37. **Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, Morris JG Jr.** 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ* **616-617**:255-268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>.
38. **Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A.** 2014. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. *PLoS ONE* **9**: e96801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096801>
39. **Walf AA, Frye CA.** 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* **2**:322-328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.
40. **Wang G, Fan XN, Tan YY, Cheng Q, Chen SD.** 2011. Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate. *Parkinsonism Relat Disord* **17**:486-487. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.02.003>.
41. **You R, Liu Y, Chang RC.** 2019. A behavioral test battery for the repeated assessment of motor skills, mood, and cognition in mice. *J Vis Exp* **145**: e58973. <https://doi.org/10.3791/58973>.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)

06/05/2020

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEBC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final


Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE DO HERBICIDA GLIFOSATO MEDIANTE EXPOSIÇÃO CRÔNICA INALATÓRIA E ORAL", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6995 e tendo como participante(s) RENATA MANO SCATAMBURLO BIFARONI (discente), GIOVANNA DUARTE BONDOTTI (discente), VERENA MIRANDA DE SOUZA (discente), CAMILA RENATA CORRÊA (participante externo), GIOVANA RAMPAZZO TEIXEIRA (participante externo), RENATA CALCIOLARI ROSSI (discente), ROSE MEIRE RIÇATO UEDA (discente), GISELE ALBORGHETTI NAI (orientador responsável), foi avaliado e APR. COM RECOMENDAÇÃO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas adotadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APR. COM RECOMENDAÇÃO em reunião realizada em 06/05/2020.

MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
5684	15/11/2019	UNOESTE	SIM	Histórico de Experimentação Animal Campus II

Presidente Prudente, 8 de Maio de 2020.


Prof. Dr. Ana Rodriguez Garcia de
Coordenadora Científica de CPDI


Prof. Ms. Adriana Fátima de Brito
Coordenadora de CEUA - UNOESTE

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPDI - 18.223-2078 - cpdi@unoeste.br
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18.223-2078 - cep@unoeste.br
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA - 18.223-2078 - ceua@unoeste.br

Verifique este documento em www.unoeste.br/logo informando o código de segurança: 6826f1a226e94d4110c087

ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA COMPARATIVE MEDICINE



Comparative Medicine (CM)

Comparative Medicine (CM), an international journal of comparative and experimental medicine, is the leading English-language publication in the field and is ranked by the Science Citation Index in the upper third of all scientific journals. The mission of CM is to disseminate high-quality, peer-reviewed information that expands biomedical knowledge and promotes human and animal health through the study of laboratory animal disease, animal models of disease, and basic biologic mechanisms related to disease in people and animals. The journal is published six times a year: February, April, June, August, October, and December. A winner of three national awards, *Comparative Medicine* is indexed in *Index Medicus*. Dr. Linda Toth is the editor in chief over CM and JAALAS; Dr. Ravi Tolwani of The Rockefeller University is the associate editor for CM. The production office for the journal is located at the AALAS national office in Memphis, TN. For more information about the journal, **contact us**.

The American Association for Laboratory Animal Science (AALAS) currently publishes two journals containing data-driven, peer-reviewed articles.

The types of articles accepted are **Case Studies, Research Reports, Overviews, and Letters to the Editor**.

The editorial style of AALAS journals is based on that described in *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers* (seventh edition). Consult previous issues of the relevant journal for information not addressed in *Scientific Style and Format* or the following material.

Manuscript Preparation

Authors are encouraged to consult the **ARRIVE guidelines** in preparing their manuscript for review.

Access this **template** for an example manuscript.

Authorship

According to the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) four criteria must be met to be designated as an author. These are:


- Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; and
- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; and
- Final approval of the version to be published; and
- Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Additionally, all authors should be able to identify which co-authors are responsible for other portions of the work. If the contributor is unable to meet all four criteria, they should be recognized (with their permission) in the acknowledgment section.

For additional information regarding the roles of authors and contributors, please visit www.icmje.org.

Title page

Manuscript should be single spaced, with no page or line numbers On the first page of the manuscript, include the:

- Full Title—a concise informative description of the presented work including the common name of the animals used (add genus and species in parentheses for nonhuman primates and species whose common name may be unfamiliar to readers)
 - The title should succinctly describe the study that was done or, for overviews, the topic that was reviewed. To be consistent with journal style, titles must adhere to the following guidelines:
 1. cannot include a subtitle (that is, a phrase followed by a colon and another phrase)
 2. cannot include abbreviations or define abbreviations
 3. cannot be a question
 4. cannot state the results or conclusions
- List of authors—the first name, middle initial (or first initial and middle name), and last name of each author
- Institutional affiliation of each author—the Department (or Program), Institution (or Company), City, State (or province), and Country (if not USA) at which the described work was done
 - Use superscripted Arabic numerals to indicate respective institutions
 - Spell out all locations in full
- Corresponding author—the person who readers can contact regarding information or reagents
- Indicate with * in the list of authors and provide that author's email address
- Running title—a descriptive phrase of no more than 72 characters (including spaces) to be used as a running head on each printed page
- Abbreviations and acronyms—a list of all nonstandard acronyms and abbreviations used throughout the manuscript and their definitions
 - **Standard Abbreviations**  file need not be included on the title page
 - Do not abbreviate terms used fewer than five times in a manuscript

Abstract

Provide a single paragraph (no subheadings) of 300 words or fewer that sequentially summarizes the background, rationale, methods, results, and conclusions of the work.

Body

Use coded or nonproprietary language throughout the manuscript. Cite the proprietary, brand, or vendor name associated with an assay, instrument, machine, service, or compound only in Materials and Methods.

Please do not include website links within the body of the manuscript. Online resources should be cited and added to the reference section. For specific details, refer to previous issues of JAALAS or CM for examples of citation formats.

Define all nonstandard abbreviations and acronyms at first use. Limit the number of novel abbreviations used. Refer to the list of Standard Abbreviations for abbreviations that can be used without definition.

The length of and subsections comprising the body of the manuscript will vary depending on the type of article submitted. The manuscript may include some or all of the following sections:

Introduction

Provide the rationale and supporting background for the presented work and its importance and relevance.

Extensive reviews of the existing literature are inappropriate for research reports and case studies/reports.


Materials and Methods

Describe the animals, husbandry, tests, equipment, procedures, reagents, and services used in sufficient detail to permit replication of the work, with citation of published references as consistent with brevity and clarity.

- Clearly define use of the term 'specific pathogen-free' by including specific criteria (for example, tests, organisms surveilled, housing, husbandry conditions) or citing publications providing that information
- Include statistical methods where relevant and attribute (name of software program used and name and location of vendor) or reference them appropriately. In addition, provide the P value used to define statistical significance

Case studies involve multiple occurrences affecting 1 or more animals, with a follow-up investigation and characterization. The body of a case study contains the following sections: a brief introduction, a description of the case under the heading case report, materials and methods, results, and discussion. Methods and results sections should relate to the follow-up work (that is, the study that was conducted).


Include a statement regarding Institutional Animal Care and Use Committee approval (or equivalent) for procedures and protocols involving animals.

Provide assurances regarding **humane care and use of animals** , citing AALAS Position Statements and national standards as appropriate to the country in which the work was performed.

For research involving human subjects, identify the committee that approved the experiments and include a statement that informed consent was obtained from all subjects, that measures are in place to protect the identity of all subjects, and that no coercion was used to solicit subjects.

Provide the vendor's name and location for any sole-source item or service.

Insert callouts (in parentheses) for all Figures and Tables, which are numbered in order of their mention in the text.

Follow **correct nomenclature** , for laboratory animals, genes, genetic markers, alleles, mutations, and microbes.

Wherever possible, use International System of Units base and derived units for numerical data.

Results

Use headings as needed to guide readers.

Accompany statements of differences between groups with appropriate statistics.

Summarize selected data from Figures and Tables in the Results section; do not merely repeat all information presented in graphics.

Save interpretation of data for the Discussion section.

Discussion

Begin the Discussion with a brief summary of the key findings.

Limit discussion of study findings to those that have been presented in the Results.


Address any limitations of the study and directions for potential future research.

Acknowledgments

Recognize (with their permission) people and institutions whose contributions of funding, technical assistance, reagents, data collection and analysis, and other services do not meet the criteria for authorship.

References

Provide complete and accurate bibliographic information for all cited materials. Only information that is published or is already accepted for publication (that is, "in press") can be used as references. We will not accept citations of unpublished information or materials (for example, personal communications, unpublished data, manuscripts still undergoing review) in a reference list or parenthetically in the text.

Journals published by AALAS follow a modified version of the citation style found in Scientific Style and Format. Refer to previous issues of JAALAS or CM or the **Example References Word file**  for specific types of referenced material.

Organize references numerically in strict ("letter-by-letter") alphabetical order. List references by the same author(s) chronologically.

Journal style template files are available for EndNote.

- EndNote template file: download from the **EndNote website** (enter Comparative Medicine in the box titled Publication Name and click on Find Style)

Figure Legends

Provide complete, concise descriptions of all figures in order of their mention in the text. Define additional abbreviations or acronyms.

Indicate the original magnification of images by citing the magnification factor in the legend or by using scale bars within images themselves.

Use of previously published material (in whole or part) must be cited in the legend and accompanied by a signed **Permission for Use form** .

Appropriate manipulation of digital images  must be made explicit in the accompanying legend.

Supplementary Materials

All articles published in the AALAS journals must be self-contained and presented in a manner adequate for comprehensive review. Every effort should be made to avoid the use of supplementary material and to incorporate all relevant material into the main text.


Article-relevant material that is valuable to the manuscript but difficult or impossible to include in the typeset manuscript can be made available online as Supplemental Materials.

- Candidates for inclusion in Supplemental Material are videos or other multimedia objects and large data sets or tables.

- Supplemental materials may not include text or information that is essential to either completeness of the article or the validity of the conclusions.
 - Supplementary material is subject to the same editorial standards and peer-review procedures as the print publication
- Supplemental material must be submitted concurrently with the article itself.

- The article cover letter should present a justification for the inclusion of supplementary material.
- All supplementary material must be appropriately called out from the main text (for example, Figure S1).
- References cited only in supplementary material should be incorporated into the main reference section with the designation “supplementary” at the end of the entry.

Tables

Tables must be generated by using the Table function of Microsoft Word. Tables generated by using other programs (for example, Microsoft Excel) will be returned to the authors for reformatting, potentially delaying publication of the article. Please see **example** . Number tables in order of their mention in the text and provide a brief title describing the information presented. Footnotes to tables are indicated by using superscript lowercase letters.


Tables are used to present numerical data and are not wholly narrative. According to AALAS journal style, narrative information in a **tabular format**  (for example, descriptions of scoring systems, experimental protocols) is submitted as a figure.

Figure Preparation

Figures are submitted electronically, separately from the manuscript. Do not embed any images within the manuscript file. Also, all submitted micrographs must be in color; black and white micrographs will not be accepted for publication.

File formats accepted are TIFF (preferred), EPS, high-resolution JPG, and high-quality PDF (no image compression). PowerPoint slides, Excel graphs, and images embedded in Word are not acceptable.

Minimal resolution: 600 dpi for line art (for example, graphs in black and white); 300 dpi for color (save as CMYK; not RGB or indexed) or grayscale images (save black and white images as grayscale); 1200 dpi for scanned line art (save as TIFF). Photos taken with a digital camera must have a resolution of at least 4 megapixels.

Create figures with a width of 93.47 mm (single column) or 177.8 mm (double column); do not enlarge created figure to meet these dimensions.

Designate panels of figures by using uppercase letters (no periods) in the upper left corner of the image; keep size of lettering and other labels (at least 3 mm in height as submitted) consistent between panels of a figure and between figures. Embed fonts within digital images.

Indicate the magnification factor of an image by including an appropriate size bar in its lower right corner.

Minimize the use of color in charts, graphs, and drawings to that necessary for clarity of communication and ease of understanding. Use solid fill or percentage screens (not pattern or textured fills) and a minimum line weight of 0.5 pt throughout.

Below are items to consider when generating figures for publication purposes:

- 2 column figures need to be created with a width of 177.8 mm and a minimum resolution of 300 DPI. Single column figures need to be created with a width of 93.47 mm and a minimum resolution of 300 DPI.
 - Photos taken with a digital camera must have a resolution of at least 4 megapixels.
 - Export files from PowerPoint as a PDF only.
 - Export files from SigmaPlot as a PDF only.
 - Export files from GraphPad Prism as PDF only.
 - Export files from Excel as PDF only.
 - Save figures created in Word as PDFs.
 - Figures need to be originally sized with the correct resolution. Figures cannot be resized or resolution increased after they have been created. This causes pixilation/resampling which will result in lower quality image.
 - Do not paste images into Word/PowerPoint/Excel. Send the original source file.
 - Word files are not acceptable formats for figures. Please provide the figures as individual files (Figure 1, Figure 2) in TIFF, JPEG, or PDF format.
 - Remove background lines and titles from all graphs/
- Additional information regarding generating and formatting figures is available by emailing **Brenda Johnson**.

Manuscript Review and Status

The Editor-in-Chief reviews all submissions and makes an initial determination regarding suitability for publication. If an Associate Editor transfers a submitted manuscript from CM to JAALAS (or vice versa), the contact author will be notified by email and may opt to withdraw the manuscript from consideration.

Before being sent for peer review, newly submitted manuscripts are screened to ensure that the text, figures (charts, graphs, images), and tables comply with the criteria described in the Information for Authors.

All manuscripts undergo thorough peer review (including digital assessment for plagiarism prior to acceptance), typically by three reviewers with relevant experience. Selection of the panel of reviewers ultimately is the prerogative of the Associate Editor.

AALAS gives timely review the highest priority. Once all reviewers for a manuscript have been assigned, authors can check the status of their submission through Manuscript Central. Whether a manuscript is accepted, requires revisions, or is rejected for publication typically is decided within 4 weeks of being sent for review. To avoid publication delays, regularly verify and update authors' contact information (<http://mc.manuscriptcentral.com/aalas-cm> for CM manuscripts; <http://mc.manuscriptcentral.com/aalas-jaalas> for JAALAS manuscripts). Changes requested by reviewers must be completed within 2 months or an extension requested (email journals@aalas.org or call the journals office at 901-754-8620). Without timely return of revisions or a request for extension, the manuscript will be withdrawn from the publication process.

Approximately 5 weeks before the slated publication date, the contact author receives a copyedited version of the manuscript, which will have undergone a final review by the Editor-in-Chief.

After any additional queries that arise during copyediting and final review are addressed satisfactorily, the contact author receives a PDF of the page proofs of the article. At this late stage in the publication process, only minor revisions can be accommodated.

Approved page proofs must be emailed to journals@aalas.org within 48 hours of receipt. After publication, the manuscript will be submitted to PubMed Central for indexing. Articles will become available to the general public 6 months after publication.