

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Christian Limberger

**MECANISMOS NEUROTÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO**

Porto Alegre

2022

Christian Limberger

## **MECANISMOS NEUROTÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Orientadora: Dra. Débora Guerini de Souza

Coorientador: Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

Porto Alegre

2022

### CIP - Catalogação na Publicação

Limberger, Christian  
Mecanismos neurotóxicos do glifosato / Christian  
Limberger. -- 2022.  
103 f.  
Orientadora: Débora Guerini de Souza.

Coorientador: Diogo Onofre Gomes de Souza.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. glifosato. 2. neurotoxicidade. 3. metabolismo  
hepático. I. Guerini de Souza, Débora, orient. II.  
Onofre Gomes de Souza, Diogo, coorient. III. Título.

Christian Limberger

## **MECANISMOS NEUROTÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Orientadora: Dra. Débora Guerini de Souza

Coorientador: Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

### **BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Guilhian Leipnitz – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Profa. Dra. Daiana Silva de Ávila – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa

---

Prof. Dr. Roberto Farina de Almeida - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, Silvana, Noely e Dalton, por serem a minha base e por todo o suporte e incentivo que vocês me dão nessa jornada que é seguir a carreira acadêmica.

À Débora, por ter sido mais que minha orientadora. Minha amiga, mentora, apoiadora de todas as conquistas, parceira das nossas ideias loucas e maratonas de experimentos. Tua valorização da saúde mental acima de tudo, fez esse processo ser o mais fluido e prazeroso possível, mesmo em meio ao caos. Além disso, contigo eu pude explorar e descobrir várias potencialidades que eu não fazia ideia. Obrigado por me fazer amar a ciência muito mais do que eu poderia imaginar.

Aos professores Diogo Souza e Eduardo Zimmer, que além de toda a contribuição científica, são os maiores incentivadores, grandes pessoas e inspirações.

A todos os colegas do Lab 28, que presencialmente ou virtualmente tornaram meus dias mais leves e alegres, fundamental nesse período pandêmico.

Aos demais colaboradores desse projeto, Ana Roginski, Mateus Grings, Pâmela Lukaszewicz e Roberto Almeida, obrigado por todas as discussões e contribuições científicas.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e contribuírem para a construção desse trabalho.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPERGS.

Essa dissertação é fruto da nossa resistência em fazer ciência de qualidade no Brasil em meio a redução drástica de investimento, desvalorização da profissão, evasão de cérebros e negacionismo científico. Agradeço a todos que nos incentivam e que contribuem para a nossa resiliência. Sigamos pesquisando e acreditando no futuro desse país através da ciência e educação.

*"A alegria não chega apenas no encontro do achado,  
mas faz parte do processo da busca".*

Paulo Freire

## RESUMO

As formulações de glifosato, o agrotóxico mais utilizado no mundo, são compostas por diversos adjuvantes que podem potencializar sua toxicidade. Dentre eles, a POEA é o principal surfactante utilizado; contudo, outras substâncias desconhecidas também podem constituir as formulações completas. Tendo em vista que os metabolismos hepático e cerebral estão interligados, surge a hipótese de que alterações periféricas decorrentes da exposição ao glifosato também podem estar envolvidas na progressão de alterações cerebrais. Além disso, a toxicidade individual e combinada dos vários compostos das formulações de herbicidas à base de glifosato precisa ser elucidada. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi investigar de forma exploratória os mecanismos neurotóxicos da exposição subcrônica ao glifosato, POEA, glifosato + POEA e uma formulação completa de herbicida à base de glifosato em ratos *Wistar*, a partir de uma abordagem central e periférica. Os resultados demonstram que existem efeitos tóxicos sinérgicos ou atribuídos a cada composto individualmente. Alterações no metabolismo astrocitário podem ser atribuídas a exposição ao glifosato apenas. Alterações no metabolismo da amônia podem ser destacadas como efeitos causados pela formulação completa do herbicida. Os resultados também sugerem que os compostos podem ter efeitos tóxicos sinérgicos, como prejuízo da memória de trabalho, alteração do perfil de aminoácidos no líquor e hipermetabolismo da glicose no estriado. O estudo desses mecanismos é fundamental para a translacionalidade dos achados, uma vez que a população em geral é exposta a doses baixas de formulações complexas de glifosato ao longo da vida. A partir de estudos mais translacionais, evidências consistentes de que a exposição aos agrotóxicos é prejudicial pode levar a medidas regulatórias de proteção à saúde pública mais apropriadas e rigorosas.

**Palavras-chave:** glifosato, neurotoxicidade, metabolismo hepático.

## ABSTRACT

The formulations of glyphosate, the most used pesticide in the world, are composed of several adjuvants that can potentiate its toxicity. POEA is the main surfactant used, besides other unknown chemical substances that constitute glyphosate-based herbicides. Considering the link between hepatic and cerebral metabolism, we hypothesize that peripheral alterations resulting from glyphosate exposure may also contribute to brain alterations. The individual and combined toxicity of glyphosate-based herbicides' compounds need to be elucidated. Thus, this work aimed to investigate in an exploratory manner the neurotoxic mechanisms of subchronic exposure to glyphosate, POEA, glyphosate + POEA, and a glyphosate-based herbicide whole formulation in Wistar rats with an approach considering central and peripheral metabolism. The results suggested that the compounds may have synergistic toxic effects, such as working memory impairment, CSF amino acid profile alterations, and striatal glucose hypermetabolism. Other effects were mediated by exposure to glyphosate per se, such as changes in astrocytic metabolism, or mediated by the whole herbicide formulation, such as changes in ammonia metabolism. The results show synergistic or individual toxic effects for each compound administered. The study of these mechanisms is fundamental for translational findings since the general population is exposed to low doses of complex glyphosate formulations throughout their lives. From more translational studies, consistent evidence that exposure to pesticides is harmful may lead to more appropriate and rigorous regulatory actions to protect public health.

**Keywords:** glyphosate, neurotoxicity, hepatic metabolism.

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT - serotonina

5-HIAA - ácido 5-hidroxiindolacético

BHE – barreira hematoencefálica

CCCP - carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona

CEH – célula estrelada hepática

CYP450 – citocromo P450

DOPA - dihidroxifenilalanina

DOPAC - ácido 3,4-dihidroxifenilacético

GFAP – proteína glial fibrilar ácida

GLT-1 – transportador de glutamato 1

GS – glutamina sintetase

HVA - ácido homovanílico

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

MAO-B – monoamina oxidase B

MHPG - 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

MSS – *Mean severity score*

PET-FDG - tomografia por emissão de pósitrons utilizando <sup>18</sup>F-fluorodesoxiglicose

POEA – polioxietileno amina

PPAR – receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

RT-qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

SNC – sistema nervoso central

SNpc – substância negra pars compacta

SREBP - proteína de ligação ao elemento regulador de esterol

SUIT - substrate-uncoupler inhibitor titration

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1 GLIFOSATO.....	15
2.2 EXPOSIÇÃO HUMANA.....	16
2.3 NEUROTOXICIDADE DO GLIFOSATO.....	17
2.4 MECANISMOS TÓXICOS DO GLIFOSATO EM DOSES BAIXAS .....	19
2.5 METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO E CEREBRAL.....	20
2.6 METABOLISMO MITOCONDRIAL .....	22
2.7 PROCESSOS DE DETOXIFICAÇÃO DA AMÔNIA .....	23
2.8 METABOLISMO ASTROCITÁRIO .....	25
2.9 SÍNTESE DE NEUROTRANSMISSORES A PARTIR DE AMINOÁCIDOS .....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 ANIMAIS .....	29
3.2 TRATAMENTO E DESENHO EXPERIMENTAL.....	29
3.3 BATERIA DE OBSERVAÇÕES FUNCIONAIS .....	32
3.4 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS .....	33
3.4.1 Open Field .....	34
3.4.2 Y-maze .....	34
3.4.3 Labirinto em cruz elevado.....	34
3.5 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO .....	35
3.6 RESPIROMETRIA .....	36
3.6.1 Homogeneização das amostras .....	36
3.6.2 SUIT1.....	36
3.6.2 SUIT2.....	37
3.7 MARCADORES BIOQUÍMICOS .....	37
3.8 TRIGLICERÍDEOS HEPÁTICOS .....	38
3.9 WESTERN BLOT .....	39
3.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR) .....	39
3.11 METABOLISMO CEREBRAL DA GLICOSE IN VIVO .....	40
3.12 DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	41
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4 RESULTADOS .....	43

4.1 ESTADO NUTRICIONAL E OBSERVAÇÕES CLÍNICAS.....	43
4.2 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS .....	44
4.3 PERFIL DE AMINOÁCIDOS SÉRICOS E LIQUÓRICOS .....	47
4.4 METABOLISMO ASTROCITÁRIO .....	49
4.5 METABOLISMO CEREBRAL DA GLICOSE.....	53
4.6 ALTERAÇÕES MITOCONDRIAS CEREBRAIS.....	54
4.7 ALTERAÇÕES HEPÁTICAS.....	56
4.8 METABOLISMO LIPÍDICO.....	59
5 DISCUSSÃO .....	64
6 CONCLUSÃO .....	79
7 PERSPECTIVAS .....	81
8 REFERÊNCIAS .....	82
ANEXO 1 - RESULTADOS .....	99
ANEXO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	102
ANEXO 3 – APROVAÇÃO DO CEUA.....	103

## 1 INTRODUÇÃO

O glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo (BENBROOK, 2016). Além do princípio ativo, as formulações dos herbicidas à base de glifosato contêm vários adjuvantes. Entre eles, surfactantes como a polioxietilenoamina (POEA) são adicionados para potencializar a ação do glifosato nas plantas. Contudo, a composição completa dos herbicidas é uma informação confidencial dos fabricantes (MESNAGE; ANTONIOU, 2018). Assim, o entendimento da toxicidade da exposição ao glifosato associada a seus adjuvantes ainda é uma grande lacuna, principalmente porque a real exposição é pouco caracterizada e os impactos da ingestão crônica são desconhecidos (MESNAGE et al., 2015a).

Até o momento, a capacidade neurotóxica do glifosato já foi demonstrada, porém esta permanece pouco compreendida uma vez que os estudos experimentais são heterogêneos em termos de metodologia, exposição a altas doses e administração apenas do princípio ativo ou de formulações comerciais completas, cuja composição química não é conhecida completamente (MESNAGE; ANTONIOU, 2018). Essa abordagem pode gerar controvérsias se concentrações ambientalmente relevantes podem induzir os mesmos mecanismos neurotóxicos evidenciados ou se existem outros mecanismos periféricos relacionados à exposição crônica que podem acabar mediando ou potencializando a neurotoxicidade do glifosato.

Modelos experimentais que investigaram os mecanismos de toxicidade da exposição crônica a doses baixas de glifosato relataram que as principais alterações a nível molecular estão relacionadas com o metabolismo hepático, principalmente com a alteração de biomarcadores relacionados à doença hepática gordurosa não-alcoólica (MESNAGE et al., 2015a, 2017).

Tendo em vista que o metabolismo hepático está intrinsecamente ligado ao metabolismo cerebral (FELIPO, 2013), há o estabelecimento da hipótese de que alterações periféricas decorrentes da exposição ao glifosato também podem estar envolvidas na progressão de alterações cerebrais. Além disso, a toxicidade individual dos vários compostos das formulações de herbicidas à base de glifosato e seus efeitos combinados precisam ser investigados para uma maior compreensão do que pode ocorrer em humanos.

Sendo assim, o objetivo desse estudo é investigar de forma exploratória os mecanismos neurotóxicos da exposição ao glifosato e seus adjuvantes em um modelo experimental a partir de uma abordagem central e periférica. Esse novo paradigma foi investigado a partir de um tratamento de 28 dias em ratos *Wistar* expostos por via oral ao glifosato, POEA, glifosato + POEA e uma formulação completa de um herbicida à base de glifosato. Parâmetros bioquímicos, comportamentais e de neuroimagem foram analisados experimentalmente com o objetivo de avaliar alterações no sangue, cérebro e fígado dos animais ao final do tratamento.

Hipotetiza-se que ao final do tratamento haverá o estabelecimento de um quadro de reatividade astrocitária, alterações no metabolismo lipídico e neurotoxicidade decorrente de alterações hepáticas. Ademais, hipotetiza-se que a toxicidade dos compostos isolados (glifosato ou POEA) será menor que a toxicidade dos compostos associados (glifosato+POEA), bem como da exposição à formulação completa (GBH).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

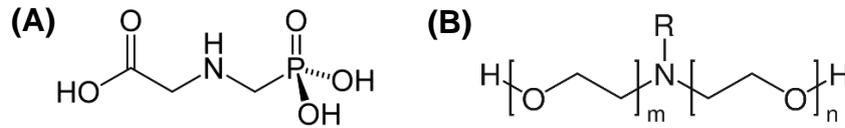
### 2.1 GLIFOSATO

O glifosato (N-(fosfonometil)glicina) é um composto fosforado análogo da glicina (Figura 1), sendo o princípio ativo dos agrotóxicos mais utilizados no mundo, principalmente associados às culturas geneticamente modificadas de soja e milho (GREEN, 2018). Por ser um herbicida sistêmico e não seletivo, também possui um amplo uso fora da agricultura. Tendo em vista que os herbicidas à base de glifosato têm potencial para contaminar o ar, o solo, os alimentos e as fontes de água, o potencial de exposição humana é elevado (BENBROOK, 2016).

Em adição ao princípio ativo, as formulações dos herbicidas à base de glifosato contêm vários adjuvantes, como surfactantes, que variam em natureza química e concentração entre os diferentes produtos comerciais (MESNAGE; ANTONIOU, 2018). Os surfactantes são adicionados para que o glifosato possa penetrar através da parede celular das plantas e exercer sua função, que é diminuir a produção de aminoácidos aromáticos essenciais (SCHÖNBRUNN et al., 2001).

Entre a composição dos adjuvantes, a POEA destaca-se por ser um dos surfactantes mais utilizados. Ela geralmente representa de 5% a 15% da composição das formulações, enquanto que o glifosato constitui de 40% a 60% dos produtos (EFSA 2015; MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013). A estrutura química geral das POEAs está representada na Figura 1, onde R-N é uma amina ligada a um ácido graxo e  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x$  é um polímero de óxido de etileno. Como a reação de síntese não ocorre na mesma velocidade para todas as moléculas, as POEAs são misturas de moléculas de diversos tamanhos (TUSH; LOFTIN; MEYER, 2013). A mais comumente utilizada em herbicidas à base de glifosato é a POE-15, com predominância de um polímero de 15 óxidos de etileno (MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013).

Figura 1 – Estrutura química do glifosato (A) e POEA (B).



Fonte: Autor, 2022.

A identidade e concentração dos adjuvantes são consideradas informações confidenciais pela indústria e aceitos como tal pelas instituições regulatórias e, portanto, raramente são divulgados nos rótulos dos produtos ou por meio de qualquer fonte acessível ao público (WEINHOLD, 2010). Esses ingredientes são considerados inertes e as instituições regulatórias geralmente ignoram a toxicidade dos adjuvantes na compreensão de como a exposição aos agrotóxicos podem ser danosas para organismos não-alvo, incluindo os humanos. Contudo, uma série de estudos tem relatado que as formulações dos herbicidas à base de glifosato podem ser mais tóxicas do que o princípio ativo apenas (MESNAGE; ANTONIOU, 2018).

## 2.2 EXPOSIÇÃO HUMANA

A exposição humana ao glifosato é descrita principalmente por exposição direta em ambientes ocupacionais ou exposição ambiental por meio de resíduos em alimentos (ACQUAVELLA et al., 2004; CONNOLLY et al., 2020; FANIBAND et al., 2021). Apesar de ser uma substância que é utilizada em grandes volumes há tanto tempo, existem poucos estudos que medem o glifosato como um biomarcador de exposição na população em geral. Quando reportados, os estudos são heterogêneos em termos de avaliação de populações específicas, sensibilidade dos métodos de detecção e maneiras de reportar os resultados. Connolly et al. (2020) revisaram e compararam os resultados de 21 estudos de monitoramento do glifosato na urina em humanos. Verificou-se que os níveis decorrentes da exposição ambiental variaram de 1 µg/L a 10 µg/L, com um aumento de até 10 vezes durante exposição ocupacional. A real exposição humana através dos alimentos é pouco caracterizada e os impactos de uma ingestão crônica ainda não são totalmente conhecidos (CONNOLLY;

COGGINS; KOCH, 2020; MESNAGE et al., 2015b; ZHAO et al., 2018). Em uma análise referente ao uso de glifosato e os riscos associados à sua exposição, Myers et al. (2016) analisaram um número considerável de estudos epidemiológicos e experimentais e concluíram que as exposições humanas ao glifosato estão aumentando nos últimos anos e os atuais padrões toxicológicos de segurança estão desatualizados, sem cumprir o seu papel na proteção da saúde pública e do meio ambiente (MYERS et al., 2016). Atualmente a ingestão diária aceitável de glifosato é 0,5 mg/kg/dia no Brasil e União Europeia (EFSA, 2015) e 1,75 mg/kg/dia nos EUA (EPA, 2016).

A partir da ingestão, a absorção oral do glifosato através do trato gastrointestinal foi estimada como sendo de 20% a 40% em ratos (ANADÓN et al., 2009; BREWSTER; WARREN; HOPKINS, 1991). Após a ingestão, o glifosato é lentamente absorvido e eliminado, com pico de concentração plasmática em 5 h após ingestão e tempo de meia-vida de aproximadamente 14 h (ANADÓN et al., 2009). Apesar das formulações comerciais serem misturas contendo surfactantes e outros adjuvantes, a absorção desses compostos através do trato gastrointestinal em associação com o glifosato ainda não foi investigada.

### 2.3 NEUROTOXICIDADE DO GLIFOSATO

O sistema nervoso é altamente vulnerável à toxicidade de um amplo espectro de contaminantes ambientais, o que pode estar associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. De fato, a exposição a agrotóxicos tem sido proposta como um fator de risco ambiental associado ao desenvolvimento de doenças como Parkinson e Alzheimer (GAUTHIER et al., 2001; HAYDEN et al., 2010; HUGH-JONES; PEELE; WILSON, 2020; LE COUTEUR et al., 1999; RICHARDSON et al., 2014). Sendo assim, o entendimento dos mecanismos de neurotoxicidade do glifosato e seus adjuvantes em modelos animais é fundamental para a extrapolação dos potenciais mecanismos em humanos.

Nesse contexto, é importante entender a capacidade do glifosato em ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE) para exercer os seus efeitos

neurotóxicos. A BHE é a fronteira que isola o parênquima cerebral das substâncias que se propagam no sistema circulatório periférico, responsável por manter a homeostase do cérebro, regulando o ambiente químico, o transporte de células imunes e a entrada de xenobióticos (BERNACKI et al., 2008). Em casos de envenenamento em humanos, o glifosato foi detectado no cérebro e no líquido após exposição a formulações comerciais (MENKES; TEMPLE; EDWARDS, 1991; SATO et al., 2011). Esses estudos sugerem que o glifosato pode ultrapassar a BHE; contudo, são condições agudas de intoxicação que não refletem o grau de exposição da população ambientalmente exposta a resíduos de glifosato. Em um modelo *in vitro* da BHE, Martínez & Al-Ahmad (2019) demonstraram que o glifosato pode causar dano aos principais componentes das junções de oclusão das células endoteliais (claudina-5 e ocludina) e ultrapassar a BHE através de um transporte mediado por carreadores. Entretanto, ainda resta entender se os adjuvantes das formulações dos herbicidas à base de glifosato podem exercer algum efeito sinérgico no transporte do glifosato para o cérebro, no caso dele realmente ocorrer *in vivo*.

Com relação a neurotoxicidade do glifosato, diversos efeitos são relatados em modelos experimentais, tais como excitotoxicidade glutamatérgica e estresse oxidativo (CATTANI et al., 2014, 2017), comportamento do tipo depressivo e ansioso (AIT-BALI et al., 2020; AIT BALI; BA-MHAMED; BENNIS, 2017; AITBALI et al., 2018; BAIER et al., 2017), danos ao sistema dopaminérgico (BALI et al., 2019; HERNÁNDEZ-PLATA et al., 2015; MARTÍNEZ et al., 2018; PU et al., 2020), comprometimento do desenvolvimento neuronal (COULLERY; PACCHIONI; ROSSO, 2020; MARTÍNEZ et al., 2020), entre outros. No entanto, a maioria desses efeitos neurotóxicos é relatada em modelos animais que utilizam concentrações altas de glifosato (em geral 50 a 500 mg/kg), o que pode gerar controvérsias se concentrações ambientalmente relevantes de fato podem induzir os mesmos mecanismos neurotóxicos evidenciados.

Os efeitos tóxicos dos herbicidas à base de glifosato não podem ser totalmente compreendidos sem que a toxicidade individual dos vários compostos das formulações e seus efeitos combinados sejam investigados. Tendo isso em consideração, deve-se ressaltar que a maioria dos estudos toxicológicos investiga os efeitos dos herbicidas testando apenas o princípio ativo ou formulações comerciais

completas, cuja composição química não é conhecida completamente (MESNAGE; ANTONIOU, 2018).

Um dos diferenciais do presente estudo é a investigação da toxicidade sinérgica entre o glifosato e o principal surfactante utilizado (POEA), bem como uma formulação de um herbicida à base de glifosato, que possui outros ingredientes desconhecidos adicionados. Essa abordagem vai além das estratégias clássicas de avaliação toxicológica de avaliar apenas o efeito adverso com menor nível de risco das substâncias individuais em altas doses. Uma vez que a população está exposta a misturas químicas complexas, esse tipo de avaliação não expressa um cenário real de exposição crônica e pode subestimar as questões de segurança (HERNÁNDEZ et al., 2013; TSATSAKIS et al., 2017).

#### 2.4 MECANISMOS TÓXICOS DO GLIFOSATO EM DOSES BAIXAS

Com o objetivo de investigar os mecanismos de toxicidade da exposição crônica a doses baixas de glifosato, menores que a ingestão diária aceitável em humanos (0,5 mg/kg/dia), Mesnage et al. realizaram dois relevantes estudos em ratos. Os animais foram tratados por 2 anos com um herbicida à base de glifosato em doses baixas (0,1 ppb, equivalente a 4 ng/kg/dia) na água de beber. A concentração equivalente de glifosato foi 0,05 µg/L e corresponde a uma concentração admissível de glifosato na água dentro da União Europeia (0,1 µg/L) e EUA (700 µg/L) (MESNAGE et al., 2015a, 2017).

Através de uma extensa caracterização a nível molecular através de técnicas de transcriptômica, proteômica e metabolômica, demonstrou-se que os animais desenvolveram alterações de biomarcadores relacionados à doença hepática gordurosa não alcoólica e sua progressão para esteatose hepática. Houve estabelecimento de um quadro de estresse oxidativo, proliferação de peroxissomos, aumento de apoptose via disfunção da membrana mitocondrial, alterações do metabolismo lipídico (aumento de triglicerídeos séricos, acúmulo de triglicerídeos hepáticos e diminuição da oxidação de ácidos graxos) (MESNAGE et al., 2015a, 2017). Esses dois estudos trazem evidências substanciais das consequências da

exposição crônica a doses ambientalmente relevantes de glifosato em um modelo animal.

Correlacionado com esses resultados, outros tratamentos com doses mais altas também apontam para importantes alterações hepáticas, principalmente no metabolismo lipídico. No estudo de Ford et al. (2017), foi demonstrado que a proteômica do fígado de camundongos tratados com glifosato (200 mg/kg i.p. 7 dias) apontou que o glifosato é metabolizado em glioxilato, o qual é capaz de inibir a oxidação de ácidos graxos. Liu et al. (2021) demonstraram em peixes tratados com glifosato (5 e 50 mg/L, 45 dias) que o estresse oxidativo é um evento adverso precoce, seguido pela resposta inflamatória hepática. Alterações do metabolismo lipídico foram tardias durante a exposição, evidenciado pelo aumento de ácidos graxos hepáticos, bem como expressão aumentada de fatores transcricionais relacionados à lipogênese e expressão reduzida de fatores relacionados à lipólise. Outros estudos também demonstram mecanismos semelhantes em peixes (ZHENG et al., 2021) e na prole de camundongos (REN et al., 2019).

O funcionamento normal do cérebro está intrinsecamente relacionado com o funcionamento normal do fígado. O fígado desempenha um papel crítico não apenas no fornecimento de nutrientes vitais ao cérebro, mas também na detoxificação de diversas substâncias do sangue. A função hepática comprometida leva a uma detoxificação insuficiente, permitindo que neurotoxinas entrem na circulação cerebral (FELIPO, 2013). Assim, levanta-se a hipótese de que os mecanismos neurotóxicos da exposição ao glifosato também podem ser atribuídos a danos hepáticos.

## 2.5 METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO E CEREBRAL

Os biomarcadores alterados nos dois estudos crônicos de Mesnage et al. estão relacionados à doença hepática gordurosa não alcoólica (MESNAGE et al., 2015b, 2017). A principal característica dessa doença é o acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos, causada por um desequilíbrio entre a geração de lipídios (isto é, a absorção de ácidos graxos e lipogênese) e remoção de lipídios (beta-oxidação mitocondrial e eliminação através de VLDL) (KAWANO; COHEN, 2013).

Embora sejam controlados em vários níveis, a regulação dominante dos genes lipogênicos é transcricional. As proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBPs) são ativadores essenciais da síntese de ácidos graxos e colesterol quando combinados com um promotor de síntese lipídica. SREBP1c, uma das suas isoformas, regula o processo de lipogênese através da regulação de genes envolvidos na síntese e armazenamento de ácidos graxos, como a ácido graxo sintase e a acetil-CoA carboxilase (SHIMANO; SATO, 2017). Outro fator de transcrição que está relacionado à processos lipogênicos no fígado é o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ). Além de estar envolvido no metabolismo lipídico, o PPAR $\gamma$  também modula a resposta inflamatória hepática, sendo altamente expresso em células estreladas hepáticas (CEHs) quiescentes, as quais apresentam redução da expressão de PPAR $\gamma$  durante a ativação (HAZRA et al., 2003). Com relação ao catabolismo lipídico, o PPAR $\alpha$  desempenha um papel crucial na regulação da oxidação de ácidos graxos mitocondrial e peroxissomal, as quais são importantes rotas bioquímicas da degradação de lipídios. A regulação da lipólise pelo PPAR $\alpha$  se dá através da regulação da expressão de carnitina palmitoiltransferase, lipoproteína lipase e lipase hormônio sensível (WANG et al., 2020).

As mitocôndrias não oxidam um único substrato de cada vez, mas uma mistura de substratos dependendo da situação metabólica, estado hormonal e tipo de célula. Os ácidos graxos são o principal substrato energético para o músculo cardíaco e alguns outros tecidos, enquanto o cérebro utiliza principalmente glicose e corpos cetônicos (HOUTEN et al., 2016). No sistema nervoso central (SNC), estima-se que a oxidação de ácidos graxos contribua pouco para a geração de ATP cerebral, satisfazendo cerca de 20% do requerimento de energia do cérebro adulto (EBERT; HALLER; WALTON, 2003). Os neurônios não utilizam ácidos graxos como substrato energético preferencial devido ao alto potencial de danos mediados por espécies reativas de oxigênio. No entanto, os astrócitos podem utilizar ácidos graxos para satisfazer a demanda energética ou para eliminar o excesso de ácidos graxos livres potencialmente danosos dentro do sistema nervoso. Ácidos graxos de todos os comprimentos de cadeia são capazes de atravessar a BHE (SPECTOR, 1988). Os ácidos graxos de cadeia longa requerem o sistema de transporte da carnitina para entrar na matriz mitocondrial, enquanto os ácidos graxos de cadeia curta e média podem se difundir diretamente na matriz mitocondrial para a beta-oxidação. Os genes

de transporte e oxidação da carnitina são expressos principalmente em astrócitos e células-tronco neurais em todo o cérebro (DAVLETOV; MONTECUCCO, 2010).

## 2.6 METABOLISMO MITOCONDRIAL

Todas as funções celulares em animais superiores requerem energia na forma de ATP, gerado direta ou indiretamente pelas mitocôndrias. As mitocôndrias são organelas que produzem energia útil a partir de precursores altamente energéticos obtidos pela metabolização de diversas fontes alimentares: carboidratos (glicose), gorduras (ácidos graxos) e proteínas (aminoácidos) (NICHOLLS; FERGUSON, 2002). As bombas de prótons do sistema de transporte de elétrons, juntamente com a ATP sintase, criam um circuito de prótons através da membrana interna mitocondrial, cujo funcionamento é central para a bioenergética e todas as funções fisiológicas que as mitocôndrias exercem (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

Abordagens experimentais são utilizadas para verificar a funcionalidade desses componentes. O transporte de elétrons e o bombeamento de prótons nas mitocôndrias são processos altamente acoplados; sendo assim, para um determinado substrato, a taxa de utilização de oxigênio mitocondrial é uma medida precisa da funcionalidade do circuito de prótons. Dessa forma, a medida experimental da respiração mitocondrial através da taxa de consumo de oxigênio é uma boa abordagem para verificar a função das mitocôndrias (BRAND; NICHOLLS, 2011). Para tanto, substratos são adicionados em uma incubação mitocondrial, seguido pela adição de ADP, permitindo que a ATP sintase funcione, a força próton-motriz caia e o transporte de elétrons aumente (BRAND; NICHOLLS, 2011). Além da reentrada de prótons através da ATP sintase, todas as mitocôndrias possuem um vazamento de prótons endógeno que acontece paralelamente. Esse vazamento é importante para limitar a força próton-motriz e uma possível alteração do potencial de membrana mitocondrial e geração excessiva de espécies reativas (ROLFE; BRAND, 1997). Sendo assim, a adição de um inibidor da ATP sintase durante o experimento permite o estudo do vazamento de prótons das mitocôndrias. Além disso, outros parâmetros podem ser estudados experimentalmente como a respiração máxima através da titulação de um

desacoplador e a respiração não-mitocondrial através da respiração residual na presença de inibidores do transporte de elétrons (BRAND; NICHOLLS, 2011).

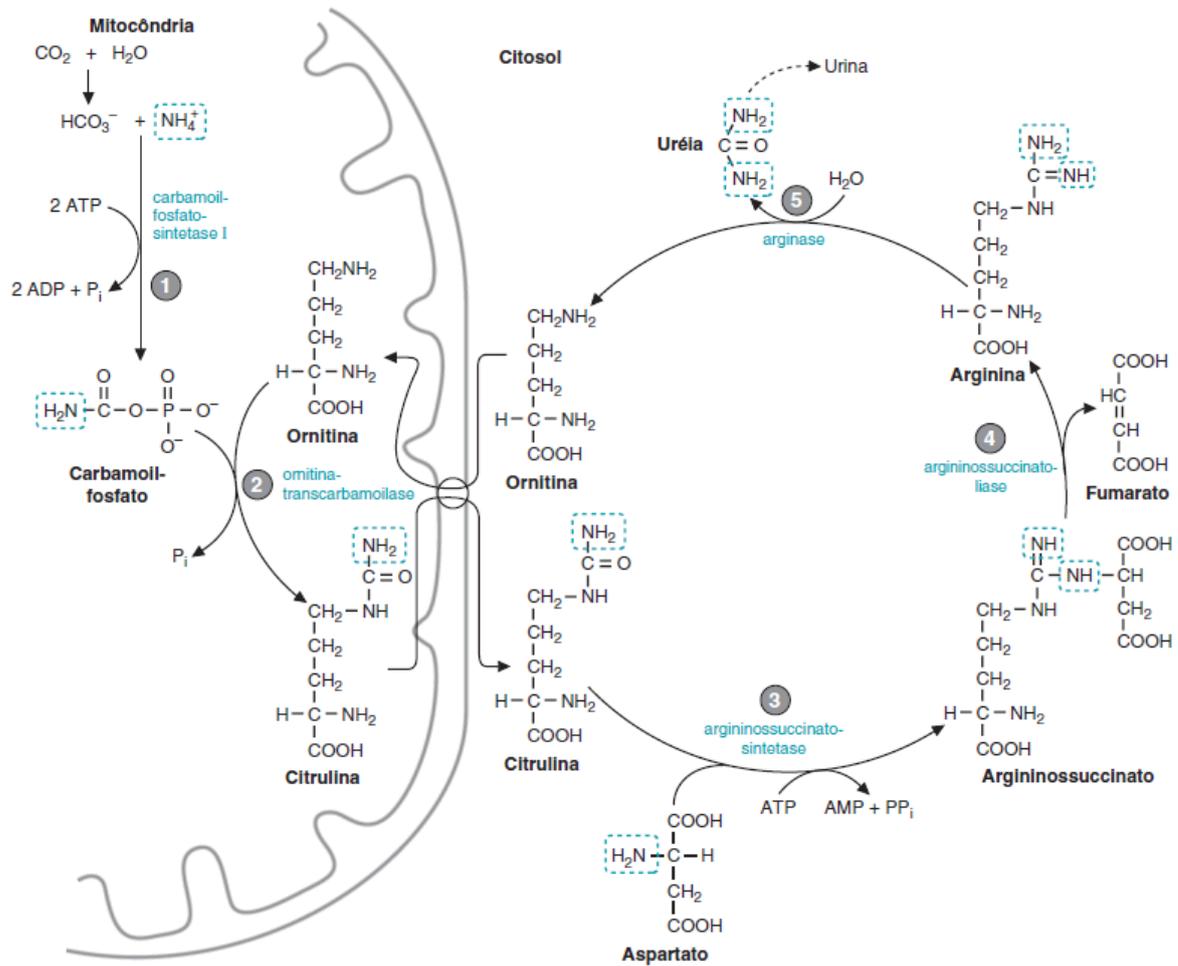
## 2.7 PROCESSOS DE DETOXIFICAÇÃO DA AMÔNIA

Além do metabolismo lipídico, o fígado também ocupa uma posição central no metabolismo do nitrogênio e, conseqüentemente, na regulação dos níveis de amônia no organismo. O balanço de nitrogênio é mantido por meio de processos como a síntese e degradação de proteínas, oxidação de aminoácidos e produção de ureia. A insuficiência das funções hepáticas pode resultar em um aumento exacerbado dos níveis de amônia circulante, que é tóxica em altos níveis principalmente ao SNC (OLDE DAMINK; JALAN; DEJONG, 2009).

A amônia e os aminoácidos produzidos pela microbiota intestinal são liberados no sistema porta hepático e transportados para o fígado. A detoxificação da amônia ocorre principalmente nos hepatócitos periportais através do ciclo da ureia, que após sintetizada é liberada nas veias hepáticas e excretada na urina (MEIJER; LAMERS; CHAMULEAU, 1990). A metabolização da amônia em ureia é um sistema de baixa afinidade e alta capacidade de síntese (OLDE DAMINK; JALAN; DEJONG, 2009). O ciclo da ureia começa nas mitocôndrias dos hepatócitos e termina no citoplasma. As reações dessa via estão demonstradas esquematicamente na Figura 2.

Outra parte da amônia circulante é detoxificada a partir da síntese de glutamina nos hepatócitos perivenosos, através da reação da glutamina sintetase (GS), um sistema de alta afinidade e baixa capacidade de síntese (LIMÓN et al., 2021; OLDE DAMINK; JALAN; DEJONG, 2009).

Figura 2 – Ciclo da ureia.



Fonte: SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2005.

Tendo em vista que o cérebro não expressa carbamoil-fosfato sintetase I e ornitina transcarbamoilase – enzimas chave do ciclo da ureia –, ele é incapaz de remover amônia por essa via. Conseqüentemente, a amônia cerebral é metabolizada quase exclusivamente em glutamina por meio da reação da GS cerebral (FELIPO; BUTTERWORTH, 2002). Essa enzima é altamente expressa em astrócitos e está envolvida no ciclo glutamato-glutamina, que desempenha um papel importante na homeostase dos níveis de glutamato, evitando o excesso desse aminoácido e, assim, a excitotoxicidade (SCHOUSBOE et al., 2014).

Em casos de disfunção hepática, a metabolização de compostos tóxicos endógenos e exógenos é prejudicada. Uma vez que esses processos não ocorrem adequadamente, substâncias neurotóxicas podem atingir o parênquima cerebral e

afetar a sua função. Essa é uma das principais alterações que ligam o metabolismo hepático ao metabolismo cerebral (FELIPO, 2013). As alterações neurológicas decorrentes de declínio da função hepática fazem parte da síndrome clínica da encefalopatia hepática. A hiperamonemia é considerada o principal fator que contribui para as alterações cerebrais e neurológicas causadas por doenças hepáticas agudas e crônicas (BRAISSANT et al., 2019; FELIPO; BUTTERWORTH, 2002).

## 2.8 METABOLISMO ASTROCITÁRIO

Os astrócitos são células fundamentais para a homeostasia do SNC, uma vez que estão envolvidos em diversas funções metabólicas e possuem a capacidade de responder a insultos e patologias cerebrais através de importantes alterações morfológicas, funcionais e moleculares (ESCARTIN; GUILLEMAUD; CARRILLO-DE SAUVAGE, 2019; SOUZA et al., 2019). Esse processo é denominado reatividade astrocitária e varia de acordo com a gravidade do insulto, ao longo de um processo gradual e heterogêneo de alterações na expressão de proteínas, captação e liberação de diversos fatores, hipertrofia celular, entre outros processos. Os astrócitos reativos podem ter ganho ou perda de suas funções, gerando um impacto benéfico ou prejudicial às células neuronais e demais células gliais (ALLEN; EROGLU, 2017; SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Um dos principais processos que marcam a reatividade é a hipertrofia celular astrocitária, com o aumento da expressão de proteínas de filamento intermediário, em particular a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (ESCARTIN; GUILLEMAUD; CARRILLO-DE SAUVAGE, 2019).

Uma das principais características da interação astrócito-neurônio é o fornecimento de substratos energéticos e a remoção de neurotransmissores da fenda sináptica por parte dos astrócitos (ALLEN; BARRES, 2009). O sistema glutamatérgico é o principal sistema neurotransmissor excitatório do cérebro; o glutamato é continuamente liberado pelos neurônios e continuamente removido do espaço extracelular pelos astrócitos (DANBOLT, 2001). Os processos astrocitários são carregados com transportadores de glutamato, que garantem que o neurotransmissor não se acumule nas fendas sinápticas, o que pode causar excitotoxicidade. O transportador de glutamato 1 (GLT-1) é responsável por 95% da atividade de captação

de glutamato no cérebro adulto (BJØRNSEN et al., 2014). Os astrócitos então metabolizam o excesso de glutamato em glutamina e o transportam de volta aos neurônios, que a convertem novamente a glutamato para manter a transmissão sináptica (VERKHRATSKY; NEDERGAARD; HERTZ, 2014).

Pellerin e Magistretti (1994) propuseram um importante mecanismo de cooperação metabólica entre astrócitos e neurônios, chamado de lançadeira de lactato astrócito-neurônio. Os astrócitos captam o excesso do neurotransmissor glutamato na fenda sináptica em um co-transporte com  $\text{Na}^+$ . O acúmulo de  $\text{Na}^+$  intracelular ativa a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, promovendo gasto de ATP, aumento da glicólise e da produção de lactato, que é transportado para os neurônios para ser usado como um importante substrato energético (PELLERIN; MAGISTRETTI, 2012). A partir do entendimento de que a captação de glutamato por astrócitos é um dos principais desencadeadores da captação de glicose no parênquima cerebral, Zimmer et al. (2017) propuseram uma reinterpretação dos exames de neuroimagem obtidos a partir da tomografia por emissão de pósitrons utilizando-se  $^{18}\text{F}$ -fluorodesoxiglicose (PET-FDG), considerando a importante contribuição do metabolismo astrocitário. De acordo com esse conceito, a captação cerebral de glicose aumenta à medida que as regiões do cérebro são ativadas, embora possa não ocorrer unicamente nos neurônios, mas também nos astrócitos (ZIMMER et al., 2017).

A investigação da resposta dos astrócitos frente à exposição a contaminantes ambientais é crucial para o entendimento do impacto em todo o SNC. Isso se deve à abundância relativa de astrócitos em comparação com outras células e sua proximidade tanto com as sinapses, quanto com a barreira hematoencefálica, onde constituem a primeira linha de defesa contra a entrada de xenobióticos no cérebro (MCCANN; MAGUIRE-ZEISS, 2021).

## 2.9 SÍNTESE DE NEUROTRANSMISSORES A PARTIR DE AMINOÁCIDOS

No SNC, os aminoácidos servem como fonte de esqueletos de carbono para o ciclo do ácido cítrico e como substratos para a síntese de proteínas e de neurotransmissores. Existem mecanismos especializados de transporte de

aminoácidos para fornecê-los ao cérebro e regular os níveis no espaço extracelular. Pelo menos três mecanismos de transporte ativo transportam aminoácidos através da BHE: aminoácidos neutros, básicos e ácidos (BETZ; GOLDSTEIN; KATZMAN, 1994).

Tendo em vista que alguns transportadores são específicos, compostos de uma mesma classe podem competir pelo mesmo mecanismo transportador. Esse é o caso do sistema L de transporte de aminoácidos, responsável pela passagem de aminoácidos neutros para o cérebro (fenilalanina, triptofano, leucina, isoleucina, valina, metionina, histidina, tirosina e treonina) através dos transportadores LAT1 e LAT2 (KIDO et al., 2001; ZARAGOZÁ, 2020). Esse sistema de transporte de aminoácidos possui alta afinidade por seus substratos e funciona próximo à saturação sob condições fisiológicas normais, com todos os substratos competindo pelo mesmo sítio de ligação (SMITH et al., 1987). Além disso, o transporte funciona a partir de um mecanismo “in and out”, em que ocorre o efluxo de um aminoácido para fora da célula na troca por outro aminoácido absorvido ao mesmo tempo (DEL AMO; URTTI; YLIPERTTULA, 2008).

Além de serem constituintes de proteínas, as outras funções clássicas dos aminoácidos aromáticos no cérebro são como precursores de neurotransmissores. Entre eles, pode-se destacar o triptofano, precursor de serotonina. O passo inicial na síntese de serotonina é o transporte facilitado do triptofano do sangue para o cérebro. A principal fonte de triptofano é a proteína dietética, pois este é um aminoácido essencial. Outros aminoácidos neutros, como fenilalanina, leucina e metionina, são transportados pelo mesmo transportador para o cérebro. Portanto, a entrada de triptofano no cérebro não está apenas relacionada à sua concentração no sangue, mas também depende da concentração de outros aminoácidos neutros (BRADY et al., 2012; FERNSTROM, 1994).

Outro aminoácido aromático precursor de neurotransmissores é a fenilalanina, que gera o aminoácido tirosina através da reação da fenilalanina hidroxilase. A partir da tirosina, as catecolaminas dopamina, epinefrina e norepinefrina são sintetizadas. A etapa inicial envolve a hidroxilação a dihidroxifenilalanina (DOPA), catalisada pela enzima tirosina hidroxilase. Uma vez formada, a DOPA é rapidamente descarboxilada em dopamina. Em neurônios que usam dopamina como neurotransmissor, nenhuma modificação enzimática adicional ocorre. Neurônios que utilizam norepinefrina como neurotransmissor contêm uma enzima adicional, a dopamina- $\beta$ -hidroxilase, que

converte dopamina em norepinefrina. Neurônios que utilizam epinefrina como neurotransmissor contêm uma enzima adicional, a feniletanolamina-N-metil transferase, que é responsável por catalisar a conversão de norepinefrina em epinefrina (FERNSTROM; FERNSTROM, 2007).

Tendo essas considerações em perspectiva, nesse estudo propusemos um modelo de exposição subcrônica ao glifosato, POEA, glifosato + POEA e GBH para investigar o potencial tóxico dessas substâncias no metabolismo central e periférico.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Ratos *Wistar* machos de 90 dias ( $n = 60$ ) foram obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os animais foram mantidos em ciclos de claro/escuro de 12 h, alocados em salas climatizadas ( $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ) com suprimento *ad libitum* de água potável e ração padrão para roedores (NUVILAB CR-1, Quimtia, Brasil). O consumo de água e ração foi mensurado por caixa com 3 animais, duas vezes por semana e calculado como consumo semanal por animal. O peso dos animais foi medido semanalmente.

Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais conforme a Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental. O projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS sob número 37876.

#### 3.2 TRATAMENTO E DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram tratados em duas coortes distintas de 30 animais cada, divididos em cinco grupos. O tratamento consistiu em uma administração diária via oral por gavagem durante 28 dias. O tempo de tratamento é o preconizado para testes de neurotoxicidade subcrônica em roedores (OECD, 1997).

Os grupos foram divididos em:

- (i) controle (**Control**), tratados com água destilada;
- (ii) glifosato (**Gly**), tratados com glifosato padrão analítico (N-(phosphonomethyl)glycine 96%, CAS 1071-83-6, Sigma);
- (iii) **POEA**, tratados com POEA padrão analítico (POE-15 tallow amine, CAS 61791-26-2, ChemService);

- (iv) glifosato + POEA (**Gly+POEA**), tratados com a associação dos dois compostos;
- (v) herbicida à base de glifosato (**GBH**, do inglês glyphosate-based herbicide), tratados com uma formulação comercial de glifosato na sua forma líquida (48 % p/v glifosato, 52 % p/v outros ingredientes; Glifomato, Insetimax, Brasil).

As soluções foram preparadas diariamente em água destilada. As administrações por gavagem não ultrapassaram o volume de 1 mL/kg e foram feitas no início da fase clara (7h – 19h).

A dose de glifosato administrada aos grupos Gly e Gly+POEA, bem como a dose de glifosato equivalente do grupo GBH foi 5 mg/kg, correspondente a 10 vezes o valor da ingestão diária aceitável de glifosato para humanos (0,5 mg/kg) (EFSA, 2015).

Para a dose de POEA administrada aos grupos POEA e Gly+POEA, foi considerado que esse surfactante constitui cerca de 15 % dos ingredientes das formulações comerciais de glifosato (EFSA, 2015; MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013). Sendo assim, a dose de POEA foi 0,25 mg/kg, proporcional à 15 % de POEA de uma administração de 5 mg/kg de glifosato, considerando uma formulação com 48 % glifosato.

A Tabela 1 apresenta um resumo da divisão do tratamento entre os grupos.

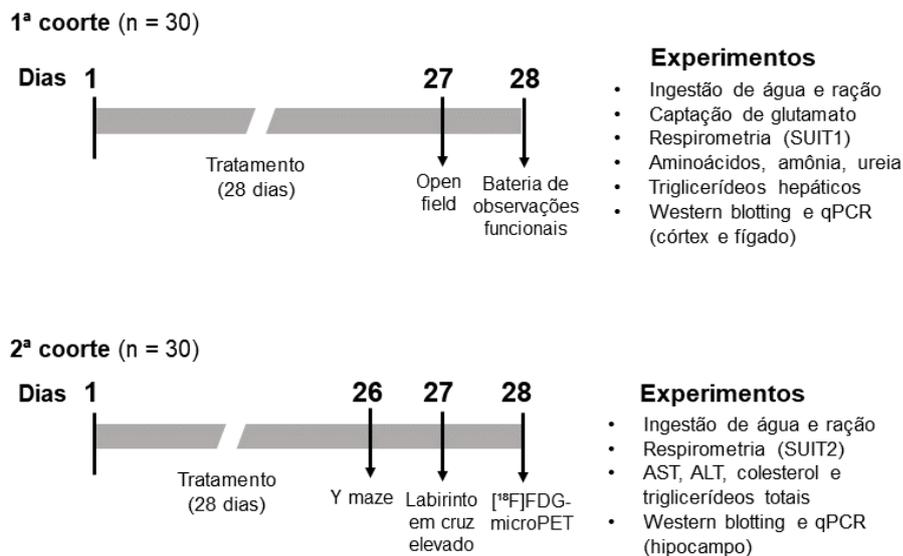
Tabela 1 – Grupos do tratamento.

<b>Administração</b>	<b>Sigla</b>	<b>Dose</b>
Água destilada	Control	-
Glifosato padrão	Gly	5 mg/kg
POEA padrão	POEA	0,25 mg/kg
Glifosato + POEA padrão	Gly+POEA	5 mg/kg glifosato + 0,25 mg/kg POEA
Formulação comercial de glifosato	GBH	5 mg/kg glifosato equivalente

Fonte: Autor, 2022.

O desenho experimental realizado para cada coorte está apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Desenho experimental.



Fonte: Autor, 2022.

Antes da eutanásia, os animais permaneceram em jejum no período da noite. No dia da eutanásia, fluidos biológicos foram coletados sob anestesia com isoflurano. Amostras de líquido foram coletadas via punção direta da cisterna magna com uso de seringa de insulina (27 G) e aparato estereotáxico. As amostras foram imediatamente centrifugadas após a coleta (3000 rpm, 1 min, 4 °C) em centrífuga para microtubos (CF15RXII Hitachi, Tóquio, Japão) e armazenadas à -20 °C. Amostras de sangue foram coletadas via punção cardíaca e centrifugadas após 30 min de repouso (5000 rpm, 10 min; Hettich Zentrifugen, Alemanha). O soro obtido foi coletado e armazenado à -20 °C.

Após coleta dos fluidos, os animais foram eutanasiados. Amostras de córtex, hipocampo e fígado foram coletadas e armazenadas à -20 °C para análises posteriores.

### 3.3 BATERIA DE OBSERVAÇÕES FUNCIONAIS

A bateria de observações funcionais, adaptada de Boucard et al. (2010), foi realizada por um pesquisador treinado ao fim do tratamento. A bateria incluiu observações gerais e a determinação da reatividade a diversos estímulos com o objetivo de identificar e quantificar o efeito do tratamento nas funções neurológicas, autônomas e comportamentais de cada animal. Os testes foram realizados no 28º dia, antes da última administração oral.

Inicialmente, observações clínicas foram feitas com cada animal fora da caixa. Em seguida, o animal foi colocado em uma arena de Open Field e o comportamento foi observado por 3 min. A Tabela 2 apresenta os parâmetros avaliados, bem como a ordem de realização, os graus de severidade atribuídos e os domínios correspondentes.

Tabela 2 - Parâmetros avaliados na bateria de observações funcionais, com adaptações de Boucard et al. (2010).

<b>Domínio</b>	<b>Função</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Local</b>
Neurológico	Tônus muscular	Força do membro anterior (0 a 2)	Fora da caixa
		Hipotonia (0 a 2)	Fora da caixa
	Marcha e equilíbrio	Marcha (0 ou 1)	Arena
		Ataxia (0 a 2)	Arena
		Postura (0 ou 1)	Arena
		Reflexo de agarramento (0 a 2)	Fora da caixa
	Excitação	Tremores (0 a 2)	Arena
		Contrações musculares (0 a 2)	Arena
		Convulsões clônicas (0 ou 1)	Arena
		Convulsões tônicas (0 ou 1)	Arena
Comportamento estereotipado (0 a 2)		Arena	
Autônomo	Lacrimação (0 ou 1)	Fora da caixa	
	Exoftalmia (0 ou 1)	Fora da caixa	
	Alterações na pupila (0 ou 1)	Fora da caixa	
	Fechamento palpebral (0 a 2)	Fora da caixa	
	Salivação (0 ou 1)	Fora da caixa	

		Piloereção (0 a 2)	Fora da caixa
		Respiração (0 a 2)	Fora da caixa
Comportamento	Atividade espontânea	Hipoatividade (0 a 2)	Arena
		Hiperatividade (0 a 2)	Arena
	Reatividade	Reatividade para pegar (0 a 2)	Fora da caixa
		Reatividade ao manuseio (0 a 2)	Fora da caixa
		Grooming (0 ou 1)	Arena
		Comportamento anormal (0 ou 1)	Arena
		Defecação (0 a 2)	Arena
		Urinação (0 a 2)	Arena
	Sensorial	Reflexo auditivo (0 a 2)	Fora da caixa
		Resposta ao toque (0 a 2)	Fora da caixa

Legenda: (0 ou 1): 0 = ausência, 1 = presença; (0 a 2): 0 = ausência, 1 = moderado, 2 = pronunciado.

Fonte: Autor, 2022.

A pontuação média de severidade (MSS, do inglês *Mean Severity Score*) foi calculada por grupo, como a soma das pontuações médias de cada parâmetro incluído em cada domínio (neurológico, autônomo ou comportamental), utilizando a Equação 1:

$$MSS = \sum(i \times n_i) / n \quad (1)$$

Onde:  $i$  representa o grau de severidade atribuído para o parâmetro;  $n_i$  representa o número de animais que atingiram o score  $i$ ; e  $n$  representa o tamanho do grupo.

Os valores de MSS para cada domínio são interpretados da seguinte forma:  $MSS \leq 2$  indica que o composto não apresentou efeito significativo;  $3 \leq MSS \leq 4$  indica efeito moderado;  $MSS > 4$  indica efeito pronunciado.

### 3.4 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes comportamentais foram realizados na fase escura (19h - 7h) em sala iluminada por luz vermelha (275 lux). Os animais foram ambientados na sala

6 horas antes dos testes. Os aparatos foram limpos com álcool 70% ao final de cada teste. Os vídeos foram analisados utilizando o software Anymaze (v. 7.09, Stoelting Co., EUA).

#### *3.4.1 Open Field*

O teste Open Field foi realizado conforme Gould, Dao & Kovacsics (2009), com o objetivo de investigar a atividade exploratória e locomotora dos animais, bem como a habituação à novidade e ansiedade. O teste foi realizado em uma sessão de 10 minutos. Cada animal foi colocado no centro do aparato (caixa preta quadrada, 50 x 50 x 50 cm) e foi gravado por uma câmera posicionada acima do aparato. Os parâmetros avaliados foram: distância total percorrida no aparato, porcentagem de distância percorrida no centro (distância no centro / distância total), tempo no centro do aparato.

#### *3.4.2 Y-maze*

O teste Y-maze foi realizado conforme Hughes (2004) e Miedel et al. (2017), para avaliação da memória de trabalho. O aparato consistiu em três braços pretos idênticos em forma de Y (50 × 10 × 20 cm, dispostos a 120°). Cada animal foi colocado no centro do aparato e o comportamento foi gravado por 8 min. Uma alternância correta entre os braços foi definida como um ciclo completo de entradas consecutivas em cada um dos três braços. A alternância percentual foi calculada da seguinte forma: número de alternâncias corretas / (número total de entradas - 2) × 100. Verificações de controle de qualidade foram realizadas para garantir que os dados representam uma avaliação não enviesada, tais como: número de entradas totais, número de entradas em cada braço do aparato (para identificação de possíveis pistas) e correlação de Pearson entre as alternâncias corretas e distância total percorrida (para verificar influência da locomoção).

### 3.4.3 Labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado foi realizado conforme Pellow et al. (1985), para avaliar o comportamento do tipo ansioso. O aparato consistiu em dois braços abertos (50 × 10 cm, comprimento × largura) e dois fechados (50 × 10 × 40 cm, comprimento × largura × altura), separados por uma plataforma central (5 × 5 cm); a altura do labirinto era de 70 cm. O animal foi posicionado no centro do aparato e seu comportamento foi gravado por 5 minutos. A porcentagem de tempo e distância total percorrida nos braços abertos, número de transições entre os braços e distância total percorrida foram determinados. Além disso, foi calculado um índice de ansiedade (IA; Equação 2), que reúne todos os parâmetros individuais. Os valores do IA variam de 0 a 1, em que um aumento no índice expressa um aumento do comportamento do tipo ansioso (COHEN; MATAR; JOSEPH, 2013).

$$IA = 1 - \left[ \frac{\left( \frac{\text{tempo nos braços abertos}}{\text{tempo total}} + \frac{\text{entradas nos braços abertos}}{\text{entradas totais}} \right)}{2} \right] \quad (2)$$

### 3.5 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO

Após coleta dos fluidos, ainda sob efeito da anestesia com isoflurano, os animais foram eutanasiados por decapitação. O ensaio de captação de glutamato foi realizado conforme Souza et al. (2021). Os cérebros foram imediatamente removidos e umidificados com solução salina balanceada de Hanks (HBSS, do inglês Hank's balanced salt solution) contendo (em mM): 137 NaCl, 5,36 KCl, 1,26 CaCl<sub>2</sub>, 0,41 MgSO<sub>4</sub>, 0,49 MgCl<sub>2</sub>, 0,63 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,17 NaHCO<sub>3</sub> e 5,6 glicose, com pH ajustado para 7,4. As regiões do córtex parietal e hipocampo foram dissecadas e fatias de 300 µm de espessura foram obtidas com o uso de um fatiador de tecidos (McIlwain Tissue Chopper, Brinkman, EUA). Quatro fatias de cada estrutura foram separadas e transferidas para uma placa de 24 poços com 300 µL de HBSS por poço, mantida à 37 °C por 15 min. Decorrido esse tempo, o ensaio de captação iniciou com a adição de 0,33 µCi/mL de L-[3,4-<sup>3</sup>H]glutamato (49,7 Ci/mmol, Perkin Elmer, EUA) e encerrou-se após 7 min com a remoção do meio de incubação e três lavagens sucessivas com HBSS gelado, seguida da adição de 0,5 M de NaOH. A radioatividade

incorporada foi medida utilizando um contador de cintilação líquida (300SL, Hidex, Finlândia) e os dados foram expressos em fmol/min. A captação de glutamato independente de sódio foi determinada utilizando HBSS preparado com N-metil-D-glucamina ao invés de cloreto de sódio. A captação específica de glutamato foi obtida subtraindo o valor da captação independente de sódio do valor da captação total.

### 3.6 RESPIROMETRIA

#### 3.6.1 Homogeneização das amostras

Após eutanásia, amostras de córtex parietal, hipocampo e fígado foram imediatamente coletadas e homogeneizadas em potter (10 strokes) com tampão MIR05 (mitochondrial respiration medium 05) gelado (0,5 mM EGTA; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 60 mM ácido lactobiônico, 20 mM taurina, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20 mM HEPES; 110 mM sacarose; 0,1% albumina; pH 7,4) na proporção 1:100 (p/v).

A análise da respiração mitocondrial foi realizada em um oxígrafo de alta resolução (Oxygraph O2K, Oroboros Instruments, Áustria) e analisada com o software Datlab (v 6.1.0.7, Oroboros Instruments, Áustria). As amostras dos homogenatos foram transferidas para as câmaras de análise do equipamento contendo 2 mL (q.s.p.) de tampão MIR05 à 37 °C e concentração inicial de oxigênio de aproximadamente 200 µM. Diferentes estados de respiração foram modulados através da realização de dois protocolos SUIT (substrate-uncoupler inhibitor titration).

#### 3.6.2 SUIT1

O primeiro protocolo utilizado (SUIT1) foi adaptado de Pesta & Gnaiger (2012). Amostras de 100 µL de homogenatos de hipocampo, córtex e fígado foram utilizadas. Os substratos adicionados foram 5 mM de piruvato (P; 107360, Sigma, EUA), 2 mM de malato (M; M1000, Sigma, EUA) e 10 mM de glutamato (G; G1626, Sigma, EUA). A fosforilação oxidativa foi verificada com a adição de 1 mM de ADP (117105, Merck, EUA) e 10 mM de succinato (S; 1589, Vetec, Brasil). O consumo de oxigênio associado à formação de ATP foi medido com a adição de 10 nM de oligomicina

(O4876, Sigma, EUA), um composto inibidor da ATP sintase. O consumo máximo de oxigênio foi verificado através de titulações de 0,25  $\mu\text{M}$  do desacoplador carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP; C2759, Sigma, EUA). O complexo I foi inibido com a adição de 0,5  $\mu\text{M}$  de rotenona (R8875, Sigma, EUA) e o consumo de oxigênio não-mitocondrial foi medido através da inibição do complexo III com 2,5  $\mu\text{M}$  de antimicina A (A8674, Sigma, EUA).

A respiração ligada à produção de ATP (ATP-linked) foi considerada como a diferença entre a respiração na presença de substratos (P, M, G, S) e ADP e a respiração na presença de oligomicina. O vazamento de prótons (Proton leak), verificado após adição de oligomicina, é entendido como sendo fosforilação oxidativa acoplada incompleta, sem conduzir a síntese de ATP. A razão de controle respiratório (RCR, do inglês *respiratory control ratio*) foi considerada como o estado de acoplamento das mitocôndrias, obtido pela divisão do fluxo de oxigênio na presença de substratos e ADP pelo fluxo após adição de oligomicina.

### 3.6.2 SUIT2

O segundo protocolo utilizado (SUIT2) foi adaptado do protocolo SUIT17 dos métodos da MitoPedia Oroboros ([https://www.bioblast.at/index.php/SUIT-017\\_O2\\_mt\\_D046](https://www.bioblast.at/index.php/SUIT-017_O2_mt_D046)). Amostras de 250  $\mu\text{L}$  de homogenato de fígado e 500  $\mu\text{L}$  de homogenato de hipocampo foram utilizadas. Para avaliação da oxidação de ácidos graxos, 0,4  $\mu\text{L}$  de palmitoilcarnitina (61251, Sigma, EUA) foi adicionado, na presença de 2 mM de malato, requerido como co-substrato uma vez que o acúmulo de acetil-CoA inibe a oxidação de ácidos graxos na ausência de malato. A respiração proveniente da oxidação de ácidos graxos (F) foi verificada com a adição de ADP (1 mM para fígado e 1,25 mM para hipocampo). Glutamato (10 mM) foi adicionado para estimular a respiração proveniente de substratos geradores de NADH para o complexo I (CI). Succinato (10 mM) foi adicionado para estimular a respiração a partir do complexo II (CII). Por fim, CCCP (0,25  $\mu\text{M}$  em titulação), rotenona (0,5  $\mu\text{M}$ ) e antimicina A (2,5  $\mu\text{M}$ ) foram adicionados.

### 3.7 MARCADORES BIOQUÍMICOS

Os níveis de ureia (K047-1, Bioclin, Brasil), amônia (AM1015, Randox, Reino Unido), colesterol total (76, Labtest, Brasil), triglicerídeos totais (87, Labtest, Brasil) e a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST; BT1100700, Biotécnica, Brasil) e alanina aminotransferase (ALT; BT1100800, Biotécnica, Brasil) foram medidos no soro com kits comerciais conforme as orientações dos fabricantes. Os níveis de amônia também foram quantificados no líquido seguindo o mesmo procedimento.

A quantificação de aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-FL) em amostras de soro e líquido (SCHMIDT et al., 2009). As amostras de soro foram adicionadas de metanol (1:5, v/v) e centrifugadas (3000 g, 10 min, 4 °C). Após, 20 µL do sobrenadante foi derivatizado (100,5 µL de ortoftaldeído 5.4 mg em 1 mL de 0.2 M borato de sódio pH 9.5+ 25,5 µL beta-mercaptoetanol 4%) e 40 µL foi injetado no sistema. As amostras de líquido foram filtradas (poro 0,22 µm), derivatizadas com ortoftaldeído (mesmas proporções e volume de injeção que o soro) e separadas em coluna de fase reversa (Supelcosil LC-18, 250 mm x 4,6 mm x 5 µm, Supelco, EUA) em sistema cromatográfico Shimadzu Class-VP (Quioto, Japão). A fase móvel foi mantida em um fluxo constante de 1,4 mL/min e a temperatura da coluna à 24 °C. A fase móvel foi composta por tampão fosfato de sódio 0,04 mol/L, pH 5,5, contendo 20 % de metanol (fase móvel A) e tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L, pH 5,5, contendo 80 % de metanol (fase móvel B). O gradiente de concentração foi modificado para o seguinte teor de B na fase móvel: 0 % (0 min), 100 % (55 min), 0 % (60 min). A detecção foi realizada utilizando os comprimentos de onda de 360 nm (excitação) e 455 nm (emissão), com detector de fluorescência Shimadzu. O tempo de retenção dos padrões analíticos dos aminoácidos alanina, aspartato, fenilalanina, glutamato, glutamina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, triptofano e valina foram utilizados para identificação e a quantificação realizada através de curva padrão (dados expressos em µM) através do software LC-Solution. Para a análise de glutamina, as amostras de líquido foram diluídas 1:10 em água e as amostras de soro 1:50 em metanol.

### 3.8 TRIGLICERÍDEOS HEPÁTICOS

O nível de triglicerídeos hepáticos foi quantificado através do método de Folch para extração de lipídeos de amostras biológicas (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957), seguido da quantificação dos triglicerídeos totais utilizando kit comercial (SOFTIC et al., 2017). Amostras de fígado foram homogeneizadas em potter na proporção 1:20 (p/v) com clorofórmio e metanol (2:1, v/v). Em seguida, foi adicionado água destilada na proporção de 20% do volume total de homogeneizado. A mistura foi centrifugada (1000 g, 10 min, 4 °C) e a fase orgânica (inferior) foi coletada. Uma alíquota de 2 µL foi evaporada em microtubo ao longo da noite e ressuspensa em 200 µL do reagente do kit. A quantificação dos triglicerídeos seguiu as orientações do fabricante.

### 3.9 WESTERN BLOT

Amostras de córtex, hipocampo e fígado foram homogeneizadas em solução de lise (2 % SDS, 5 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7,4) contendo inibidor de protease (1:10000, P8340, Sigma, EUA). As amostras foram centrifugadas (5000 g, 5 min, 4 °C), o sobrenadante foi coletado e a quantidade de proteínas foi dosada para padronização em tampão Laemmli 2x (1610737, Bio-Rad, EUA). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE (6 a 20 µg de proteína por amostra) e transferidas para membranas PVDF (1620177, Bio-Rad, EUA), as quais foram bloqueadas por 1 h (3% albumina e 1% leite desnatado em solução tamponada e Tris com 0,5% Tween). As membranas foram incubadas ao longo da noite (4 °C) com os anticorpos primários. A Tabela 1 no Anexo 2 apresenta a descrição detalhada dos anticorpos utilizados. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-mouse (1:5000; NXA931, GE) ou anti-rabbit (1:20000; A16110, Invitrogen) conjugado com peroxidase por 2 h à temperatura ambiente. A quimioluminescência foi detectada em sistema Image Quant (LAS4010, GE39 Healthcare, EUA) utilizando kit ECL (32106, Thermo Scientific, EUA). A quantidade de proteína foi analisada por densitometria

através do software Image J (v.1.53e, NIH, EUA). As proteínas  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina ou GAPDH foram utilizadas como controle endógeno de proteína.

### 3.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Amostras de RNA de córtex, hipocampo e fígado foram extraídas utilizando reagente TRIzol™ (15596026, Thermo Scientific, EUA), conforme orientações do fabricante. A concentração e pureza do RNA foi verificado utilizando espectrofotômetro (Biospectrometer, Eppendorf, Alemanha). Após, 1  $\mu$ g de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA com kit comercial (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, EUA), conforme orientações para 20  $\mu$ L de reação em termociclador.

A reação de RT-qPCR foi realizada com um volume total de 10  $\mu$ L, utilizando 5  $\mu$ L de SYBR Green Master Mix 2x (PowerUp, 4309155, Thermo Scientific, EUA), 0,2  $\mu$ M de cada primer, 3  $\mu$ L de cDNA (1:10) e 1,6  $\mu$ L de água para injetáveis. Os ciclos de amplificação seguiram orientações do fabricante do SYBR Green em equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA). A quantificação relativa da expressão dos genes de interesse foi realizada conforme o método  $\Delta\Delta$ CT (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando a  $\beta$ -actina como gene de referência. Os resultados foram demonstrados como expressão relativa ao grupo controle.

A informação dos genes de interesse foi obtida no banco de dados de sequências de referência (RefSeq) do NCBI. Os primers foram desenhados com a ferramenta Primer-BLAST e adquiridos da Thermo Scientific. A descrição completa dos primers está apresentada na Tabela 2 do Anexo 2.

### 3.11 METABOLISMO CEREBRAL DA GLICOSE IN VIVO

O metabolismo cerebral da glicose foi avaliado in vivo ao fim do tratamento por microPET-FDG. Antes do escaneamento, os animais foram anestesiados com

isoflurano e injetados com [<sup>18</sup>F]FDG (1 mCi, i.v.), após uma noite em jejum. Em seguida, foram colocados em suas caixas para captar o radiofármaco acordados por 40 min. Após o tempo de captação, os animais foram escaneados por 10 min sob anestesia e aquecimento (37 °C) com a região cerebral posicionada no centro do microPET (field-of-view: 3,75 cm; Triumph LabPET-4, TriFoil Imaging, EUA). Os dados foram reconstruídos utilizando o algoritmo do método de estimativa de máxima verossimilhança (MLEM-3D) com 20 iterações. Cada imagem de microPET foi reconstruída com um tamanho de voxel de 0,2 x 0,2 x 0,2 mm e espacialmente normalizada no software PMOD com a ferramenta Fuse It (v 3.8, PMOD Technologies, Suíça) utilizando uma imagem modelo de ressonância magnética de rato. Os valores de atividade (SUVr, do inglês *standardized uptake value ratio*) de 7 regiões cerebrais (córtex frontal, córtex têmporo-parietal, cerebelo, estriado, hipocampo, hipotálamo e tálamo) foram analisados nos dois hemisférios cerebrais e normalizados para cada animal de acordo com o valor de captação de uma pequena região da ponte cerebral. Para o processamento e análise das imagens a nível de voxel, o software MINC tools ([www.bic.mni.mcgill.ca/ServicesSoftware](http://www.bic.mni.mcgill.ca/ServicesSoftware)) foi utilizado.

### 3.12 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi realizada utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA; 23227, Thermo Scientific, EUA), exceto para as amostras dos homogenatos da respirometria, em que foi empregado o método de Lowry modificado (PETERSON, 1977). Albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e foram analisados através de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, quando apropriado, seguido de teste de Tukey a nível de 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares GraphPad Prism (v. 8, Graph Pad Software, EUA).

Foi utilizada uma simbologia de letras para demonstrar se as médias dos grupos são diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Grupos que não compartilham a mesma letra têm diferença estatística significativa entre médias. Exemplo: no conjunto de médias  $7,55 \pm 1,66^a$ ,  $6,68 \pm 0,70^{ab}$ ,  $5,49 \pm 0,82^b$ , o primeiro valor difere do terceiro, mas é igual ao segundo, pois os dois compartilham a letra A sobrescrita.

A bateria de observações funcionais gera dados de incidência e pontuações, ao invés de medições ou contagens. Dessa forma, não foi feita análise estatística para esses resultados.

## 5 DISCUSSÃO

Como parte de uma caracterização neurotoxicológica, medidas correlativas, como alterações do consumo de alimento e água e ganho ou perda de peso corporal, podem ser sinais de mudanças fisiológicas associadas à toxicidade sistêmica, as quais podem influenciar a interpretação de sinais específicos de neurotoxicidade (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 2001). Os animais não tiveram alteração de peso e consumo de água e ração durante o tratamento, bem como não apresentaram alterações significativas nos parâmetros avaliados durante a bateria de observações funcionais. Esses resultados estão de acordo com o fato de que o modelo experimental empregado é um tratamento subcrônico com doses baixas; dessa forma, os potenciais mecanismos decorrentes da exposição às substâncias podem ser distinguidos de efeitos relacionados a uma toxicidade aguda sistêmica.

Além disso, apesar desse estudo ser focado na investigação da potencial neurotoxicidade dos compostos administrados e esse efeito não ter sido detectado através da bateria de observações funcionais, cabe ressaltar que esse teste é uma avaliação de primeiro nível, que avalia uma ampla gama de funções neurológicas. Alguns parâmetros são mais quantitativos e alguns são mais sensíveis do que outros, e estes tendem a aparecer com mais frequência em termos de efeitos observados. Por consequência, os testes da bateria de observações funcionais não são definitivos para as variáveis que estão sendo avaliadas (REDFERN et al., 2005). Outros experimentos especificamente planejados e otimizados para avaliar os mecanismos desses efeitos potenciais devem ser utilizados, o que foi realizado nesse projeto.

A partir da análise do perfil bioquímico do líquor, observou-se uma diminuição dos aminoácidos alanina, triptofano, lisina, fenilalanina, leucina e metionina. Destes, apenas a alanina não é um aminoácido nutricionalmente essencial (FERNSTROM, 1994). Uma vez que os níveis de triptofano estão reduzidos no líquor dos animais Gly, POEA, Gly+POEA e GBH, bem como os níveis de fenilalanina dos grupos POEA, Gly+POEA e GBH, a disponibilidade desses aminoácidos no espaço extracelular para captação e síntese de neurotransmissores também pode estar reduzida (REIBER, 2003). Sendo assim, é possível que os animais apresentem sutis alterações nos

sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e adrenérgico, tendo em vista que o triptofano é precursor de serotonina e a fenilalanina é precursora de dopamina, epinefrina e norepinefrina (FERNSTROM, 1994).

Martínez et al. (2018) encontraram redução de neurotransmissores e seus metabólitos: dopamina, ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA); serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA); norepinefrina e 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), nas regiões cerebrais do estriado, hipocampo, córtex pré-frontal e hipotálamo, após administração oral de glifosato (35, 75, 150 e 800 mg/kg, 6 dias) em ratos. De forma similar, Hernandez-Plata et al. (2015) mostraram que ratos tratados agudamente com glifosato (150 mg/kg, i.p.) tem redução dos níveis de dopamina extracelular no estriado. Os níveis de DOPAC e HVA permaneceram inalterados, assim como o conteúdo de 5-HT e 5-HIAA. Além de alterações na concentração de neurotransmissores, estudos também demonstram alterações nas populações neuronais correspondentes. A exposição oral a um herbicida à base de glifosato (250 e 500 mg/kg, 12 semanas) em camundongos causou diminuição de neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos (AIT BALI; BAHAMED; BENNIS, 2017). A mesma redução de neurônios dopaminérgicos foi observada com o mesmo tratamento realizado desde a lactação até o período pós-natal, acompanhado de prejuízo cognitivo nos testes Y-maze e reconhecimento de objeto novo (AIT-BALI et al., 2020). Em conjunto, esses estudos apontam para a hipótese de que a exposição ao glifosato pode afetar vias relacionadas ao metabolismo e sinalização das monoaminas cerebrais.

Uma vez que o glifosato é um análogo da glicina (Figura 1), é possível que ele possa ser um substrato para as vias de absorção de glicina ou outros aminoácidos. Além dos transportadores específicos de glicina, os transportadores do sistema L também são capazes de transportar glicina para as células (DEL AMO; URTTI; YLIPERTTULA, 2008). Nesse sentido, Xu et al. (2016) investigaram os mecanismos de absorção do glifosato através de um modelo do epitélio gastrointestinal (linhagem celular Caco2) e do epitélio nasal de vacas. Os pesquisadores relataram o transporte de glifosato através dos transportadores LAT1 e LAT2, com significativa redução da captação de glifosato na presença de aminoácidos competitivos (leucina, alanina) ou inibidores específicos desses transportadores (fenilalanina e BCH).

Dessa forma, a ação do LAT1 e LAT2 pode contribuir para a absorção de glifosato nas células, principalmente nos tratos gastrointestinal e respiratório, o que foi confirmado por Xu et al. (2016), ou também para o cérebro, uma vez que esses transportadores são expressos na BHE (DEL AMO; URTTI; YLIPERTTULA, 2008). Essa absorção pode resultar em efeitos locais e sistêmicos mais significativos do que o previsto pela permeabilidade passiva do glifosato, que deve ser baixa devido à polaridade da molécula (NCBI, 2022). Se o glifosato é capaz de competir com outros aminoácidos pelo transporte através do LAT1 ou LAT2, é possível que os níveis reduzidos de triptofano no líquor dos grupos Gly, Gly+POEA e GBH seja resultado dessa inibição competitiva.

Contudo, essa hipótese não corrobora a redução dos aminoácidos alanina, fenilalanina, lisina, metionina e leucina no líquor dos animais POEA, Gly+POEA e GBH, uma vez que parece existir outro mecanismo adicional relacionado à presença do surfactante. De fato, é bem descrito que as formulações de herbicidas à base de glifosato são mais tóxicas para os organismos do que o princípio ativo sozinho (AVEDISSIAN et al., 2019; DEFARGE et al., 2016; DEFARGE; SPIROUX DE VENDÔMOIS; SÉRALINI, 2018; HAO et al., 2020; MESNAGE et al., 2015b; MESNAGE; BENBROOK; ANTONIOU, 2019; MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013; VANLAEYS et al., 2018). O surfactante adicionado à formulação comercial do agrotóxico pode contribuir para a permeabilização das membranas celulares. Sabe-se que os adjuvantes etoxilados, como é o caso da POEA, podem interagir com as membranas das células, causando danos à sua estrutura e funções (BENACHOUR; SÉRALINI, 2008; CSERHATI, 1995; GEHIN et al., 2005; TSUI; CHU, 2003; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Entre eles, a POE-15 (composto utilizado nesse estudo) mostra ser o surfactante mais utilizado e o mais tóxico contra as células humanas, com efeitos na respiração celular e integridade da membrana celular entre 1 e 3 ppm, doses ambientalmente e ocupacionalmente relevantes (MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013). Outros efeitos tóxicos da POEA descritos são desbalanço redox, peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial, indução de apoptose, entre outros (DEFARGE et al., 2016; HAO et al., 2020; MESNAGE et al., 2015b; VANLAEYS et al., 2018). Assim, é possível que um processo tóxico relacionado à presença do surfactante esteja relacionado à diminuição de alanina, fenilalanina, lisina, metionina e leucina no líquor

dos animais POEA, Gly+POEA e GBH. Em decorrência desse processo, esses aminoácidos podem estar diminuídos por estarem sendo incorporados em proteínas, convertidos em outras moléculas ou oxidados (YUDKOFF, 1999), o que será investigado futuramente a partir do estudo dos moduladores das suas respectivas vias bioquímicas.

Na maioria das aminoacidopatias, as concentrações de um ou mais aminoácidos se elevam significativamente no sangue. Esse processo é capaz de interferir diretamente o transporte de aminoácidos através da BHE, pois o excesso de um pode inibir a captação de outro (YUDKOFF, 1999). O sistema L de transporte de aminoácidos possui baixo Km e funciona próximo à saturação sob condições fisiológicas normais, com todos os substratos competindo pelo mesmo sítio de ligação (SMITH et al., 1987). Sendo assim, infere-se que a redução de aminoácidos neutros no líquido (leucina, fenilalanina, triptofano e metionina) não foi decorrente da inibição competitiva pelo aumento de outros aminoácidos no soro dos grupos Gly, POEA e Gly+POEA, pois o perfil de aminoácidos no soro se manteve homogêneo.

Além da absorção através da dieta, os aminoácidos nutricionalmente essenciais também são sintetizados a partir do metabolismo dos microrganismos da microbiota (GILL et al., 2006). Evidências apontam que a microbiota pode ser afetada pela exposição a contaminantes ambientais e que há associação da disbiose intestinal com o estabelecimento de doenças (TSIAOUSSIS et al., 2019). O mecanismo primário pelo qual o glifosato age matando as plantas é a partir da inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), da via do chiquimato nas plantas, responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos, como o triptofano, fenilalanina e tirosina (SCHÖNBRUNN et al., 2001). Apesar dessa via não ser expressa em células animais, alguns microrganismos podem expressá-la (KNAGGS, 2001). Dessa forma, a síntese de aminoácidos nutricionalmente essenciais pela microbiota pode ser inibida em algum grau pela ação do glifosato no trato gastrointestinal.

Mesnager et al. (2021a) demonstraram através de metabolômica do soro e da microbiota de ratos tratados com glifosato e um herbicida à base de glifosato (0,5, 50 e 175 mg/kg, oral, 90 dias) que a exposição às substâncias inibiu a via do chiquimato na microbiota dos animais. Conseqüentemente, a síntese de aminoácidos essenciais provenientes do precursor corismato, como a fenilalanina e o triptofano, pode ser prejudicada. Outros estudos também estabelecem alterações na microbiota a partir

da exposição ao glifosato (AITBALI et al., 2018; DECHARTRES et al., 2019; LOZANO et al., 2018; MESNAGE et al., 2021b; TANG et al., 2020).

Os metabólitos sanguíneos podem ser alterados por influência da microbiota; entre os compostos relacionados estão os níveis séricos de triptofano e fenilalanina (WIKOFF et al., 2008). A partir da análise desses aminoácidos no soro, observa-se que possivelmente o tratamento não afetou o metabolismo da microbiota de forma significativa. É possível que o tempo de tratamento empregado nesse estudo não tenha sido suficiente para observar redução desses metabólitos a partir da exposição ao glifosato e adjuvantes. Cabe ressaltar também que outros parâmetros relacionados ao metabolismo da microbiota deveriam ser analisados para maiores conclusões.

Com relação à avaliação comportamental realizada ao fim do tratamento, observou-se que todos os grupos tratados (Gly, POEA, Gly+POEA, GBH) apresentaram menor percentual de alternâncias espontâneas com relação ao grupo controle no teste Y-maze, com diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo POEA. O prejuízo da memória de trabalho já foi relatado em estudos com camundongos expostos à herbicidas à base de glifosato (AIT-BALI et al., 2020; BALI et al., 2019). O comportamento de alternância espontânea, que mede a memória de trabalho espacial, é avaliado permitindo que os ratos explorem os três braços do labirinto livremente; esse comportamento é incitado pela curiosidade inata dos roedores em explorar áreas previamente não visitadas. Um rato com uma boa memória de trabalho irá se lembrar dos braços do labirinto que já visitou e terá tendência para entrar em um braço menos visitado recentemente (DEMBER; FOWLER, 1958). A natureza da alternância espontânea depende de quatro processos fisiológicos: motivação, atenção, percepção e memória. Alterações neuroanatômicas e neuroquímicas do funcionamento normal do cérebro podem ter impacto considerável nesses processos e no padrão de alternância espontânea (RICHMAN; DEMBER; KIM, 1986).

Há evidências do papel de mecanismos dopaminérgicos na mediação desse comportamento, demonstrado por estudos utilizando intervenções farmacológicas com antagonistas ou com a depleção de dopamina. Outros sistemas neurotransmissores também desempenham papel importante. Receptores serotoninérgicos, adrenérgicos e sistemas neuropeptídicos também podem estar envolvidos na mediação do comportamento de alternância espontânea (LALONDE, 2002). Sendo assim, se os níveis reduzidos de aminoácidos precursores de

neurotransmissores no líquido resultarem no prejuízo de função dos seus respectivos sistemas, o déficit comportamental observado no teste Y-maze pode ser decorrência da desregulação dessas sinapses. Experimentos de imunohistoquímica podem auxiliar na elaboração dessa hipótese futuramente, bem como o aumento do tamanho amostral para o teste Y-maze.

Não foram observadas alterações na locomoção e presença de comportamento do tipo ansioso no teste Open Field. Esses resultados são contrários ao que foi relatado em outros tratamentos em que os roedores apresentaram hipolocomoção durante a exposição ao glifosato em animais adultos (HERNÁNDEZ-PLATA et al., 2015) e na exposição a herbicidas à base de glifosato no período pré-natal (AIT-BALI et al., 2020; GALLEGOS et al., 2016) ou pós-natal (AIT BALI; BA-MHAMED; BENNIS, 2017; AITBALI et al., 2018; GALLEGOS et al., 2020). Esses tratamentos utilizam doses de 10 a 100 vezes maiores que a dose administrada nesse estudo, o que pode ter contribuído para a verificação da hipolocomoção em tratamentos mais agudos.

Com relação ao teste do labirinto em cruz elevado, também não foram verificados comportamentos do tipo ansioso, como relatado em outros estudos (AIT-BALI et al., 2020; AIT BALI; BA-MHAMED; BENNIS, 2017; AITBALI et al., 2018; BAIER et al., 2017; GALLEGOS et al., 2016). A distância total percorrida e número total de transições foi homogêneo entre os grupos. Contudo, cabe ressaltar a heterogeneidade do grupo controle nesse experimento, o qual apresentou alta variabilidade com mais de 50% dos animais com tempo e distância reduzidos nos braços abertos. Dessa forma, a realização de um novo teste em uma nova coorte com maior tamanho amostral pode trazer evidências mais consistentes para esse comportamento, bem como para os testes Y-maze e Open Field.

O sistema glutamatérgico é o principal sistema neurotransmissor do SNC. Considerando as grandes quantidades de glutamato no cérebro e a importância da manutenção adequada da concentração extracelular desse neurotransmissor, o parênquima cerebral necessita uma atividade astrocitária de captação de glutamato muito alta para se proteger da excitotoxicidade glutamatérgica (DANBOLT, 2001). Os animais não apresentaram alterações na captação de glutamato nas regiões do córtex e hipocampo. Tendo em vista que o acúmulo de glutamato nas sinapses é prejudicial e que esta é uma função muito bem regulada através da interação metabólica astrócito-neurônio (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011), é possível que o

sistema tenha se adaptado funcionalmente à exposição aos agentes tóxicos para combater uma potencial excitotoxicidade glutamatérgica.

Contudo, a partir dos resultados de expressão gênica e imunocontéudo de GFAP no córtex e hipocampo, pode-se observar que os astrócitos de animais expostos ao glifosato (grupo Gly) responderam ao tratamento com aumento de GFAP no córtex. A regulação positiva de GFAP é um marcador clássico de astrócitos que estão respondendo a insultos. O estabelecimento de um quadro de reatividade astrocitária é complexo e heterogêneo, podendo ser definido como um *continuum* de alterações morfofuncionais visando a homeostase do SNC (BEN HAIM; ROWITCH, 2016; KHAKH; SOFRONIEW, 2015). Os processos de modificação da expressão gênica, estrutura, sinalização e função astrocitária podem estar alterados de forma distinta em diferentes regiões do cérebro. Recentemente, a heterogeneidade espacial dos astrócitos vem sendo extensivamente descrita e caracterizada a nível celular e molecular (BAYRAKTAR et al., 2020; CLARKE et al., 2020; HUANG et al., 2020; SOFRONIEW, 2020). Isso pode explicar o fato de que os astrócitos hipocampais de animais do grupo Gly não tenham respondido ao insulto de forma semelhante aos astrócitos corticais, os quais possivelmente apresentaram hipertrofia celular.

Um exemplo de heterogeneidade astrocitária entre as regiões do córtex e hipocampo é o perfil transcricional dessas células durante o envelhecimento. Em regiões cerebrais conhecidas por serem mais suscetíveis à neurodegeneração, como o hipocampo, os astrócitos apresentam alterações do transcriptoma mais pronunciadas do que os astrócitos corticais, com uma regulação positiva de genes associados à astrogliose reativa (CLARKE et al., 2018). Isso pode se dar pelo fato de que neurônios hipocampais possuem mais plasticidade frente a danos por estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, desbalanceamento iônico, entre outros processos (WANG; MICHAELIS, 2010). Sendo assim, por estarem mais envolvidos no suporte metabólico dos neurônios, os astrócitos hipocampais são mais efetivos na proteção neuronal e por isso podem ter se adaptado à exposição ao glifosato, diferente do córtex.

A heterogeneidade da resposta de astrócitos corticais e hipocampais à exposição ao glifosato também foi relatada por Ait-Bali et al. (2020), a partir de um modelo de exposição crônica pré e pós-natal a um herbicida à base de glifosato (250 e 500 mg/kg oral durante gestação e lactação). Através de imunohistoquímica, foi

demonstrado o aumento de células GFAP+ nas regiões do córtex pré-frontal e hipocampo dorsal. Entretanto, a nível molecular, as duas regiões apresentaram diferentes alterações com relação à neuroinflamação e excitotoxicidade glutamatérgica. Houve aumento da expressão de TNF $\alpha$  somente no hipocampo e aumento da subunidade NR1 do receptor NMDA somente no córtex, associado à diminuição de BDNF e aumento do seu receptor TrkB nessa mesma região. Assim, corrobora-se o fato de que diferentes regiões do cérebro podem responder de forma distinta à exposição ao glifosato.

Correlacionado com o aumento de GFAP no grupo Gly, houve um aumento do imunoconteúdo de iNOS nesse mesmo grupo. A expressão de iNOS é induzida por estímulos inflamatórios, como a presença de citocinas pró-inflamatórias (KNOWLES; MONCADA, 1994). Os astrócitos possuem um papel relevante na regulação da resposta neuroinflamatória através da liberação de uma ampla gama de mediadores imunes e inflamatórios durante o processo de reatividade astrocitária. A liberação de citocinas e quimiocinas pró ou anti-inflamatórias por astrócitos reativos podem modular efeitos neuroprotetores ou neurotóxicos durante o processo de neuroinflamação (SOFRONIEW, 2014). Além disso, a reatividade astrocitária também pode ser induzida por estímulos inflamatórios provenientes da microglia ativada (LIDDELOW et al., 2017). Sendo assim, correlacionando os dois resultados de aumento de iNOS e GFAP no grupo Gly, é possível que a neuroinflamação tenha um papel importante no desencadeamento da reatividade astrocitária decorrente da exposição ao glifosato. A confirmação dessa hipótese e os mecanismos neurotóxicos envolvidos poderão ser melhor investigados em experimentos futuros.

Uma hipótese que pode explicar a observação desses efeitos somente no grupo Gly é a partir da perspectiva do transporte do glifosato através da BHE. Martínez & Al-Ahmad (2019) demonstraram em um modelo da BHE in vitro que, por ser uma molécula polar, o glifosato pode ultrapassar a BHE em um transporte mediado por carreadores. Xu et al. (2016) relataram que esses transportadores podem ser os transportadores de aminoácidos LAT1 e LAT2. Tendo em vista que o transporte do glifosato para o cérebro pode ser um transporte especializado e que a POEA é capaz de permeabilizar as membranas celulares e prejudicar sua estrutura e função (BENACHOUR; SÉRALINI, 2008; CSERHATI, 1995; GEHIN et al., 2005; TSUI; CHU, 2003; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000), possivelmente nos grupos tratados com

adjuvantes além do glifosato (Gly+POEA e GBH) não ocorre o transporte de glifosato através da BHE para exercer os seus efeitos neurotóxicos. Essas hipóteses serão confirmadas futuramente através de um estudo da permeabilidade e toxicocinética cerebral do glifosato.

Além da proteína GFAP, outros biomarcadores astrocitários relacionados ao processo de astrogliose reativa têm sido caracterizados nos últimos anos (CARTER et al., 2019; ESCARTIN et al., 2021). A enzima MAO-B está localizada na membrana mitocondrial externa dos astrócitos e apresenta aumento da expressão em astrócitos reativos (EKBLUM et al., 1993). A MAO-B está envolvida principalmente na oxidação de dopamina e, em menor grau, norepinefrina e serotonina (GAWESKA; FITZPATRICK, 2011). Como os níveis da enzima não aumentaram entre os grupos tratados, pode-se sugerir que a diminuição dos aminoácidos precursores desses neurotransmissores no líquido também não foi decorrente do aumento da metabolização dos neurotransmissores pela MAO-B. Entretanto, seria necessário um experimento confirmatório da atividade da enzima para estabelecer uma conclusão definitiva.

Foi observado um aumento dos níveis de GLT-1 no córtex de animais do grupo GBH, o que não era esperado uma vez que esse grupo não apresentou aumento de GFAP e nem alterações na captação de glutamato. Em geral, o estabelecimento de um quadro de reatividade astrocitária leva ao aumento da regulação de GLT-1 (SOUZA et al., 2019). Esse resultado poderá ser melhor investigado posteriormente.

Com o objetivo de realizar uma investigação exploratória do impacto do tratamento no metabolismo cerebral da glicose, foram realizados escaneamentos de PET-FDG (n = 3-4). Foi observado uma tendência ao aumento da captação de <sup>18</sup>F-FDG na região do estriado nos grupos Gly (p = 0,0621), POEA (p = 0,0492) e Gly+POEA (p = 0,0621) em relação ao controle. O estriado é uma região onde se situam importantes núcleos de sinalização colinérgica e dopaminérgica. É a principal região cerebral relacionada com a doença de Parkinson, patologicamente caracterizada por uma degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta (SNpc) que se projetam para o estriado e desempenham um papel essencial na função motora (JELLINGER, 2012). Evidências experimentais e epidemiológicas apoiam a hipótese de que fatores ambientais, como

a exposição à pesticidas, contribuem para o desenvolvimento da doença de Parkinson (ALOIZOU et al., 2020; ZAGANAS et al., 2013).

Como descrito anteriormente, em modelos animais a exposição à herbicidas à base de glifosato pode causar redução de neurônios dopaminérgicos na SNpc (AIT BALI; BA-MHAMED; BENNIS, 2017; BALI et al., 2019). Em um modelo de Parkinson causado pela administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), a exposição ao glifosato demonstrou aumentar a perda de neurônios dopaminérgicos no estriado (PU et al., 2020). Além de evidências experimentais dos efeitos da exposição ao glifosato na via dopaminérgica, em humanos a intoxicação por glifosato pode causar sintomas relacionados ao parkinsonismo (BARBOSA et al., 2001; ERIGUCHI et al., 2019; WANG et al., 2011).

O circuito do estriado é composto principalmente de neurônios de projeção que recebem inervação dopaminérgica da SNpc, bem como aferências glutamatérgicas do córtex e do tálamo. Sendo assim, as interações glutamatérgicas e dopaminérgicas são críticas para manter a integridade funcional e estrutural dos neurônios estriatais (BLANDINI; PORTER; GREENAMYRE, 1996; KREITZER, 2009). Um desequilíbrio entre aferências excitatórias e inibitórias para o estriado pode levar a alterações fisiológicas e morfológicas como observado na doença de Parkinson, em que a perda de neurônios dopaminérgicos no estriado leva à excitotoxicidade glutamatérgica nessa região (BLANDINI; PORTER; GREENAMYRE, 1996; IOVINO; TREMBLAY; CIVIERO, 2020; ZHENG et al., 2019).

Assim, se o tratamento foi capaz de exercer efeitos neurotóxicos para os neurônios dopaminérgicos no estriado com consequente aumento da sinalização glutamatérgica, o aumento da captação de glicose nessa região pode ser uma tentativa dos astrócitos de exercer um efeito neuroprotetor, ao aumentar a produção de lactato e fornecer mais substrato energético para os neurônios (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994). A região cerebral do estriado não foi coletada para a realização de experimentos; contudo, os resultados exploratórios do PET-FDG mostram que essa região pode ser um alvo promissor para investigações futuras do metabolismo energético cerebral.

No protocolo de respirometria SUIT1 para o hipocampo, pode-se destacar o aumento da respiração ligada à produção de ATP nos grupos POEA, Gly+POEA e

GBH em relação ao controle. A respiração estimulada por ADP é controlada pela atividade de renovação do ATP (principalmente a atividade da ATP/ADP translocase, transportador de fosfato e ATP sintase) e pela oxidação dos substratos (incluindo absorção de substrato, enzimas de processamento, complexos relevantes do sistema de transporte de elétrons e pool de ubiquinona e citocromo c) (BRAND; NICHOLLS, 2011). Logo, é possível que processos metabólicos relacionados à presença dos adjuvantes tenham aumentado a demanda por ATP na região do hipocampo.

A reação da GS cerebral é a principal via de metabolização de amônia no cérebro (FELIPO; BUTTERWORTH, 2002). Sua expressão é altamente regulada, tendo em vista que a regulação astrocitária da homeostase do glutamato é um aspecto crítico da função cerebral (COULTER; EID, 2012; DE VELLIS; WU; KUMAR, 1986). O imunoconteúdo de GS não sofreu alterações entre os grupos nas duas regiões do cérebro analisadas (córtex e hipocampo), o que já era esperado, uma vez que os níveis circulantes de amônia não aumentaram. A expressão cerebral de GS não é significativamente aumentada nem mesmo em estados hiperamonêmicos, como no caso da encefalopatia hepática, em que ocorre o aumento de amônia no parênquima cerebral devido à reduzida capacidade enzimática da GS de converter amônia em glutamina (FELIPO; BUTTERWORTH, 2002; SUÁREZ; BODEGA; FERNÁNDEZ, 2002).

Sistemicamente, a GS hepática atua como um sistema de alta afinidade e baixa capacidade para a eliminação de amônia, independente do ciclo da ureia, o qual atua com baixa afinidade e alta capacidade de metabolização. Um desbalanço em qualquer um desses sistemas pode alterar o metabolismo da amônia no organismo (LIMÓN et al., 2021). O imunoconteúdo de GS no fígado e a concentração de glutamina no soro não sofreram alterações entre os grupos. No grupo GBH, pode ter ocorrido um aumento da regulação do ciclo da ureia, pois a concentração de amônia no soro diminuiu ( $p = 0,0059$ ). Contraditoriamente, os níveis de ureia sérica não aumentaram; entretanto, uma vez que os rins estejam funcionando normalmente, o sistema renal buscará o equilíbrio da excreção de nitrogênio (WEINER; MITCH; SANDS, 2015). Ademais, a diminuição dos níveis de amônia circulante também pode estar relacionada à síntese proteica aumentada no grupo GBH, o que poderá ser melhor investigado futuramente.

O conteúdo de amônia no líquido é derivado tanto do cérebro quanto do sangue. A reação da GS cerebral para remoção de amônia tem um rápido *turnover*, com tempo de meia-vida de aproximadamente 3 s. Sendo assim, a amônia no compartimento extracelular se difunde rapidamente para o cérebro, onde é convertida a glutamina (COOPER; PLUM, 1987). Dessa forma, os níveis reduzidos de amônia encontrados no líquido de animais GBH provavelmente são resultado da diminuição da concentração de amônia sérica e não do metabolismo cerebral. Outro resultado que corrobora essa hipótese é a não alteração dos níveis de glutamina no líquido.

Com relação aos parâmetros da respirometria (SUIT1) para o fígado, destaca-se a redução da respiração máxima ( $p < 0,0001$ ) em todos os grupos tratados. Esse resultado pode ser devido à vários fatores, entre eles uma disponibilidade de substrato diminuída ou o comprometimento da massa ou integridade mitocondrial (HILL et al., 2012).

Foi observado um desacoplamento do grupo GBH com relação aos grupos controle e Gly, expresso pelos valores reduzidos de RCR. Esse resultado se correlaciona com o estudo de Peixoto et al. (2005), em que foram analisados os efeitos do glifosato e de um herbicida à base de glifosato em mitocôndrias isoladas do fígado de ratos. Verificou-se que o glifosato sozinho não apresentou efeito significativo na bioenergética mitocondrial, ao contrário da formulação do herbicida, que reduziu a respiração estimulada por ADP e a respiração máxima, a qual foi mediada pela inibição parcial dos complexos mitocondriais II e III. Além disso, se demonstrou que o desacoplamento da fosforilação oxidativa também está relacionado à permeabilização não específica da membrana mitocondrial, induzida pelo herbicida. Sendo assim, as diferenças na toxicidade podem ser a um efeito sinérgico do glifosato e dos adjuvantes da formulação.

Através de técnicas de transcriptômica, metabolômica e proteômica, foi demonstrado que a exposição crônica a baixas doses de herbicidas à base de glifosato causa alterações hepáticas relacionadas à doença hepática gordurosa não alcoólica, cuja principal característica é o desequilíbrio do metabolismo lipídico com acúmulo de gordura no fígado (MESNAGE et al., 2015a, 2017). A expressão de SREBP1c no fígado - um dos principais reguladores transcricionais da síntese e armazenamento e ácidos graxos - não se alterou entre os grupos. Tendo em vista que este é um fator envolvido na sinalização biológica de diversos processos metabólicos,

não é surpreendente que sua expressão tenha se mantido homogênea entre os grupos. Contudo, a expressão de PPAR $\gamma$  diminuiu em todos os grupos tratados ( $p < 0,01$ ), enquanto o PPAR $\alpha$  aumentou nos grupos Gly e POEA quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Apesar desses três genes estarem envolvidos na regulação do metabolismo lipídico no fígado, infere-se que o perfil de expressão encontrado para SREBP1c, PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  pode não estar relacionado com alterações lipídicas nesse tratamento. Não houve alteração de colesterol total e triglicerídeos totais no soro dos animais tratados de todos os grupos. Além disso, também não houve acúmulo de triglicerídeos hepáticos, exceto por um aumento do grupo Gly comparado ao grupo POEA ( $p < 0,05$ ). Estudos apontam que a exposição ao glifosato e herbicidas à base de glifosato pode causar aumento de colesterol e triglicerídeos séricos, acompanhado de aumento da expressão de SREBP1c e PPAR $\gamma$ , além da diminuição de PPAR $\alpha$  (LIU et al., 2021; REN et al., 2019; ZHENG et al., 2021). Considerando que nesse trabalho, até o momento, investigamos a expressão gênica apenas, podemos estar observando um mecanismo compensatório frente ao aumento da atividade ou retardo na degradação dos fatores. A investigação dos níveis proteicos de PPAR $\alpha$  e  $\gamma$  será de grande auxílio para melhor compreensão dos efeitos do tratamento. Possivelmente, a dose e tempo de tratamento empregados não foram suficientes para observar o desencadeamento desse processo, o que pode ser decorrente de uma resposta adaptativa do fígado.

As CEHs são responsáveis por modular a reparação do tecido hepático. Após lesão hepática, as CEHs são ativadas e adquirem a capacidade de proliferar, migrar em direção às áreas danificadas e aumentar a produção de componentes da matriz extracelular. Quando ativadas excessivamente, há o desenvolvimento de fibrose hepática (MARRA et al., 2000). Fatores transcricionais estão envolvidos na diferenciação das CEHs, tais como o PPAR $\gamma$ , o qual é altamente expresso nas CEHs quiescentes. A expressão e atividade do PPAR $\gamma$  é drasticamente suprimida quando as CEHs possuem o fenótipo ativado (HAZRA et al., 2003). A indução da expressão de PPAR $\gamma$  ou adição de agonistas reverte as alterações bioquímicas e morfológicas características da ativação das CEHs, o que corrobora a importância do PPAR $\gamma$  nesse processo (HAZRA et al., 2004; JIN et al., 2016; NAN et al., 2009; SHARVIT et al., 2013). Considerando que todos os grupos tratados apresentaram redução da

expressão de PPAR $\gamma$ , possivelmente a exposição prolongada aos compostos químicos desencadeou um processo de recrutamento das CEHs para reversão de um dano hepático. Esse resultado se correlaciona com a redução da respiração máxima ( $p < 0,0001$ ) em todos os grupos tratados no SUI1. É possível que esse dano aos hepatócitos esteja relacionado à bioenergética mitocondrial, o que será melhor investigado posteriormente.

Como o fígado é um órgão que metaboliza xenobióticos, os hepatócitos podem responder à exposição aumentando sua atividade metabólica, resultado da indução da expressão de enzimas metabolizadoras, como a família CYP450. A hiperplasia das organelas é causada pelo aumento da síntese proteica, o que pode resultar em hipertrofia hepática. Esse processo, decorrente da exposição a substâncias químicas, é uma resposta adaptativa do fígado, que pode não ser considerado um efeito adverso uma vez que a homeostasia do órgão é mantida. A proliferação intracelular pode ser benéfica, uma vez que a célula aumenta sua capacidade metabólica, reduzindo a toxicidade do insulto (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2002). A avaliação da hipertrofia dos hepatócitos por imunohistoquímica é uma perspectiva futura desse estudo, que pode confirmar essa hipótese. Outra evidência que aponta para a manutenção da homeostase hepática a partir da hipertrofia hepatocelular é a não alteração da atividade sérica de AST e ALT, cujo aumento é um indicativo de disfunção hepática. Outros tratamentos com doses baixas de glifosato e herbicida à base de glifosato em ratos também não alteraram a atividade de AST e ALT no soro (DECHARTRES et al., 2019; TANG et al., 2017).

Considerando que, possivelmente, não ocorreram alterações do metabolismo lipídico, o aumento de PPAR $\alpha$  observado nos grupos Gly e POEA ( $p < 0,05$ ) é decorrente de outra alteração bioquímica. Além de estar envolvido em processos de lipólise como a regulação da beta-oxidação, o PPAR $\alpha$  também tem papel fundamental na regulação transcricional de enzimas da família CYP450 nos hepatócitos (CIZKOVA et al., 2012; THOMAS et al., 2015). Foi demonstrado que a exposição ao glifosato pode inibir algumas enzimas da família CYP450 in vitro em microsomas hepáticos humanos (ABASS; TURPEINEN; PELKONEN, 2009), bem como a exposição a herbicidas à base de glifosato em microsomas hepáticos de roedores (HIETANEN; LINNAINMAA; VAINIO, 1983; LARSEN et al., 2014) e no fígado do embrião de galinhas (FATHI et al., 2020). Dessa forma, a exposição ao glifosato e POEA pode ter

regulado positivamente o PPAR $\alpha$  na tentativa de aumentar os níveis de enzimas CYP450 para a detoxificação dessas substâncias. Ainda resta entender se de fato há diminuição da expressão dessas enzimas CYP450 nesses animais e por qual motivo a associação de glifosato e POEA (grupo Gly+POEA) ou a presença de outros adjuvantes (grupo GBH) não causou o aumento da expressão de PPAR $\alpha$ .

A análise da respirometria revelou um aumento da respiração não-mitocondrial no grupo GBH para substratos lipídicos (SUIT2) e no grupo Gly para substratos não lipídicos (SUIT1). O aumento da respiração não-mitocondrial pode estar relacionado com a elevação de espécies reativas de oxigênio e a atuação de oxidases (HILL et al., 2012). Ainda resta entender porque houve um aumento dependente do tipo de substrato fornecido à preparação mitocondrial e em grupos diferentes.

## 6 CONCLUSÃO

Esse estudo buscou avaliar, a partir de uma abordagem central e periférica, os efeitos neurotóxicos da exposição ao glifosato, na sua forma isolada, junto ao principal adjuvante e em uma formulação comercial. Adicionalmente, avaliamos os efeitos da POEA, principal adjuvante adicionado às formulações de herbicidas à base de glifosato. Até o momento, nenhum modelo experimental tinha investigado a possível contribuição do metabolismo hepático na neurotoxicidade do glifosato, bem como discriminado os efeitos neurotóxicos causados pelo princípio ativo, o principal surfactante do herbicida e os demais compostos químicos desconhecidos que constituem o restante das formulações.

Os resultados obtidos evidenciaram efeitos em todos os grupos experimentais. Os tratamentos foram capazes de induzir significativamente ou potencialmente prejuízo na memória de trabalho, mudanças no perfil de aminoácidos no líquor, hipermetabolismo da glicose no estriado e diminuição da respiração mitocondrial máxima no fígado.

Outros efeitos foram mediados pela exposição ao glifosato apenas, como o aumento de GFAP e iNOS no córtex e o aumento da respiração não-mitocondrial no fígado no SUI1. Destaca-se o fato de que, até o momento, não houve alterações significativas no hipocampo à nível de expressão gênica e de proteínas para nenhum composto administrado, o que pode ser atribuído à maior plasticidade dessa região cerebral.

A exposição à POEA apresentou um efeito tóxico sinérgico ao glifosato na respiração ligada à produção de ATP no SUI1 de hipocampo, assim como na respiração mediada pelos complexos I e II e respiração máxima no SUI2 de fígado.

Efeitos mediados apenas pela exposição ao GBH foram o aumento de GLT-1 no córtex, as alterações relacionadas ao metabolismo da amônia nos fluidos e no fígado e o aumento da respiração não-mitocondrial no fígado no SUI2.

A hipótese inicial de que o tratamento causaria alterações no metabolismo lipídico com diminuição da oxidação de ácidos graxos, acúmulo de lipídios no fígado, alteração da expressão de reguladores chave e aumento de lipídios circulantes não

se confirmou com a dose e tempo de exposição empregados. É possível que esse seja um efeito crônico tardio. Sinais de hepatotoxicidade não foram observados por análises bioquímicas clássicas, mas ainda serão confirmados por análise histológica. Tendo em vista que o tratamento empregado não foi agudo, a sensibilidade para verificar alguns efeitos pode ser limitada dependendo da técnica utilizada.

O estriado mostrou-se um alvo promissor para investigações futuras a partir do experimento exploratório de PET-FDG, o que não estava previsto inicialmente. Além disso, descobrir se o glifosato é capaz de atravessar a BHE, em que extensão e se os adjuvantes interferem nesse transporte será fundamental para entender se alguns efeitos neurotóxicos são decorrentes da interação do glifosato *in situ*.

Futuramente, investigar como algumas alterações são mediadas através do estudo da expressão e atividade de moduladores das vias bioquímicas alteradas trará novas perspectivas e um entendimento mais aprofundado. Até o momento, pode-se observar que o modelo experimental poderá trazer novas evidências sobre os mecanismos iniciais de toxicidade do glifosato. O estudo aprofundado dessas mudanças metabólicas sutis é fundamental na translacionalidade dos achados, uma vez que a população em geral é exposta a doses baixas de glifosato ao longo da vida. Assim, é possível que as alterações metabólicas causadas pela exposição ao glifosato possam contribuir como fator de risco ambiental para a progressão de doenças à longo prazo.

Nossos resultados demonstram que o estudo da neurotoxicidade do glifosato e seus adjuvantes a partir de uma abordagem central e sistêmica é capaz de elucidar mecanismos de forma mais abrangente e complexa, o que pode contribuir para o entendimento dos riscos a longo prazo decorrentes da exposição ao glifosato. A partir de estudos mais translacionais, evidências consistentes de que a exposição aos agrotóxicos é prejudicial pode levar a medidas regulatórias de proteção à saúde pública mais apropriadas e rigorosas.

## 7 PERSPECTIVAS

Pode-se sugerir os seguintes trabalhos associados à esta pesquisa, em decorrência dos resultados obtidos:

1. Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação de glifosato e seu principal metabólito (ácido aminometilfosfônico - AMPA) em líquido, soro e tecido cerebral. O método já foi desenvolvido e parcialmente validado para líquido.
2. Estudo da toxicocinética cerebral do glifosato, com o objetivo de entender se a substância é capaz de atravessar a BHE e em que extensão. Alguns animais (à parte desse tratamento) foram administrados com glifosato e tiveram seus fluidos e cérebros coletados. A quantificação de glifosato e AMPA será realizada quando o método bioanalítico estiver completamente validado para todas as matrizes biológicas a serem analisadas.
3. Tratamento de uma nova coorte de animais para aumento de tamanho amostral e verificação de algumas inconsistências experimentais (variabilidade dos resultados de respirometria, inconsistências comportamentais no grupo controle, valores de p quase significativos em algumas técnicas, entre outros).
4. Realização de experimentos com os fluidos e tecidos já coletados, como imunohistoquímica de cérebro (reatividade astrocitária) e fígado (sinais de hepatotoxicidade), investigação de parâmetros de estresse oxidativo, dinâmica mitocondrial, quantificação de glifosato e AMPA nos fluidos e tecido cerebral, entre outros experimentos.

## 8 REFERÊNCIAS

ABASS, K.; TURPEINEN, M.; PELKONEN, O. An evaluation of the cytochrome P450 inhibition potential of selected pesticides in human hepatic microsomes. **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, v. 44, n. 6, p. 553–563, ago. 2009.

ACQUAVELLA, J. F. et al. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: Results from the farm family exposure study. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 3, p. 321–326, 2004.

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.

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

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

ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. How do glia differ from neurons? v. 457, n. February, p. 675–677, 2009.

ALLEN, N. J.; EROGLU, C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. **Neuron**, v. 96, n. 3, p. 697–708, 2017.

ALOIZOU, A. M. et al. Pesticides, cognitive functions and dementia: A review. **Toxicology Letters**, v. 326, n. March, p. 31–51, 2020.

ANADÓN, A. et al. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology Letters**, v. 190, n. 1, p. 91–95, 2009.

AVEDISSIAN, S. N. et al. A Translational Pharmacokinetic Rat Model of Cerebral Spinal Fluid and Plasma Concentrations of Cefepime. **mSphere**, v. 4, n. 1, 2019.

BAIER, C. J. et al. Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-

based herbicide administration in mice. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 64, p. 63–72, 2017.

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

BARBOSA, E. R. et al. Parkinsonism after glycine-derivate exposure. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 16, n. 3, p. 565–568, maio 2001.

BAYRAKTAR, O. A. et al. Astrocyte layers in the mammalian cerebral cortex revealed by a single-cell in situ transcriptomic map. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 4, p. 500–509, 2020.

BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 724–738, 2011.

BEN HAIM, L.; ROWITCH, D. H. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 31–41, 2016.

BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G. E. Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 97–105, jan. 2008.

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 1–15, 2016.

BERNACKI, J. et al. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. **Pharmacological Reports**, v. 60, n. 5, p. 600–622, 2008.

BETZ, A.L., GOLDSTEIN, G.W., KATZMAN, R. 1994. Blood-brain-cerebrospinal fluid barriers. Pp. 681-698 in **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects**, 5th ed., G.J. Siegel, ed. New York: Raven Press

BJØRNSSEN, L. P. et al. The GLT-1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter is essential for glutamate homeostasis in the neocortex of the mouse. **Journal of Neurochemistry**, v. 128, n. 5, p. 641–649, 1 mar. 2014.

BLANDINI, F.; PORTER, R. H. P.; GREENAMYRE, J. T. Glutamate and Parkinson's Disease. 1996.

BOUCARD, A. et al. Evaluation of neurotoxicity potential in rats: The functional observational battery. **Current Protocols in Pharmacology**, n. SUPPL.51, p. 1–9, 2010.

BRADY, S. T. et al. Basic Neurochemistry. **Basic Neurochemistry**, 2012.

BRAISSANT, O. et al. Longitudinal neurometabolic changes in the hippocampus of a rat model of chronic hepatic encephalopathy. **Journal of Hepatology**, v. 71, n. 3, p. 505–515, 2019.

BRAND, M. D.; NICHOLLS, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 2, p. 297–312, 2011.

BREWSTER, D. W.; WARREN, J.; HOPKINS, W. E. Metabolism of glyphosate in sprague-dawley rats: Tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. **Toxicological Sciences**, v. 17, n. 1, p. 43–51, 1991.

CARTER, S. F. et al. Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n. 2, p. 77–95, 2019.

CATTANI, D. et al. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320, n. 1, p. 34–45, 2014.

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

CIZKOVA, K. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulation of Cytochromes P450: New Way to Overcome Multidrug Resistance? **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

CLARKE, B. E. et al. Regionally encoded functional heterogeneity of astrocytes in health and disease: A perspective. **Glia**, n. June, p. 1–8, 2020.

CLARKE, L. E. et al. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. **Proceedings**

of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 115, n. 8, p. E1896–E1905, 2018.

COHEN, H.; MATAR, M. A.; JOSEPH, Z. Animal models of post-traumatic stress disorder. **Current protocols in neuroscience**, v. Chapter 9, n. SUPPL.64, 2013.

CONNOLLY, A. et al. Sensitive and selective quantification of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in urine of the general population by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1158, n. July, p. 122348, 2020.

CONNOLLY, A.; COGGINS, M. A.; KOCH, H. M. Human biomonitoring of glyphosate exposures: State-of-the-art and future research challenges. **Toxics**, v. 8, n. 3, p. 1–18, 2020.

COOPER, A. J. L.; PLUM, F. Biochemistry and physiology of brain ammonia. **Physiological Reviews**, v. 67, n. 2, p. 440–519, 1987.

COULLERY, R.; PACCHIONI, A. M.; ROSSO, S. B. Exposure to glyphosate during pregnancy induces neurobehavioral alterations and downregulation of Wnt5a-CaMKII pathway. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 96, p. 390–398, ago. 2020.

COULTER, D. A.; EID, T. Astrocytic Regulation of Glutamate Homeostasis in Epilepsy. **Glia**, v. 60, n. 8, p. 1215, ago. 2012.

CSERHATI, T. Alkyl ethoxylated and alkylphenol ethoxylated nonionic surfactants: Interaction with bioactive compounds and biological effects. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 4, p. 358–364, 1995.

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

DAVLETOV, B.; MONTECUCCO, C. Lipid function at synapses. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 5, p. 543–549, out. 2010.

DECHARTRES, J. et al. Glyphosate and glyphosate-based herbicide exposure during the peripartum period affects maternal brain plasticity, maternal behaviour and microbiome. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 31, n. 9, 2019.

DEFARGE, N. et al. Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 3, 2016.

DEFARGE, N.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G. E. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. **Toxicology Reports**, v. 5, n. December 2017, p. 156–163, 2018.

DEL AMO, E. M.; URTTI, A.; YLIPERTTULA, M. Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 3, p. 161–174, 2008.

DEMBER, W. N.; FOWLER, H. Spontaneous alternation behavior. **Psychological Bulletin**, v. 55, n. 6, p. 412–428, nov. 1958.

DE VELLIS, J., WU, D., KUMAR, S., 1986. Enzyme induction and regulation of protein synthesis. In: Fedoroff, S., Vernadakis, A. (eds), *Astrocyte*, Vol. 2. Alan Liss, New York, pp. 209–248.

EBERT, D.; HALLER, R. G.; WALTON, M. E. Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 13, p. 5928–5935, 1 jul. 2003.

EFSA, 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 13, 4302.

EKBLOM, J. et al. Monoamine oxidase-B in astrocytes. **Glia**, v. 8, n. 2, p. 122–132, 1 jun. 1993.

ENDO, M.; MAIESE, K.; WAGNER, J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. **Brain Research**, v. 651, n. 1–2, p. 92–100, 18 jul. 1994.

EPA, U. Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential EPA's Office of Pesticide Programs. 2016.

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

ESCARTIN, C. et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nature Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 312–325, 2021.

ESCARTIN, C.; GUILLEMAUD, O.; CARRILLO-DE SAUVAGE, M. A. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. **Glia**, v. 67, n. 12, p. 2221–2247, 2019.

FANIBAND, M. H. et al. Human experimental exposure to glyphosate and biomonitoring of young Swedish adults. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 231, n. July 2020, p. 1–6, 2021.

FATHI, M. A. et al. Disruption of cytochrome P450 enzymes in the liver and small intestine in chicken embryos in ovo exposed to glyphosate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 14, p. 16865–16875, 1 maio 2020.

FELIPO, V. Hepatic encephalopathy: Effects of liver failure on brain function. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 12, p. 851–858, 2013.

FELIPO, V.; BUTTERWORTH, R. F. Neurobiology of ammonia. **Progress in Neurobiology**, v. 67, n. 4, p. 259–279, 2002.

FERNSTROM, J. D. Dietary amino acids and brain function. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 94, n. 1, p. 71–7, 1994.

FERNSTROM, J. D.; FERNSTROM, M. H. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 6 Suppl 1, 2007.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

FORD, B. et al. Mapping Proteome-wide Targets of Glyphosate in Mice. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 2, p. 133–140, 2017.

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

GALLEGOS, C. E. et al. Intranasal glyphosate-based herbicide administration alters the redox balance and the cholinergic system in the mouse brain.

**NEUROTOXICOLOGY**, v. 77, p. 205–215, 2020.

GAUTHIER, E. et al. Environmental pesticide exposure as a risk factor for Alzheimer's disease: A case-control study. **Environmental Research**, v. 86, n. 1, p. 37–45, 2001.

GAWESKA, H.; FITZPATRICK, P. F. Structures and mechanism of the monoamine oxidase family. **Biomolecular Concepts**, v. 2, n. 5, p. 365–377, 1 out. 2011.

GEHIN, A. et al. Vitamins C and E reverse effect of herbicide-induced toxicity on human epidermal cells HaCaT: a biochemometric approach. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, n. 2, p. 219–226, 20 jan. 2005.

GILL, S. R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355–1359, 2006.

GOULD, T. D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The open field test. **Neuromethods**, v. 42, p. 1–20, 2009.

GREEN, J. M. The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. **Pest Management Science**, v. 74, n. 5, p. 1035–1039, 1 maio 2018.

HAN, X. et al. Analysis of glucose metabolism by 18F-FDG-PET imaging and glucose transporter expression in a mouse model of intracerebral hemorrhage. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 25 maio 2021.

HAO, Y. et al. Adjuvant contributes Roundup's unexpected effects on A549 cells. **Environmental Research**, v. 184, n. February, p. 109306, 2020.

HAYDEN, K. M. et al. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: The Cache County Study. **Neurology**, v. 74, n. 19, p. 1524–1530, 2010.

HAZRA, S. et al. Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\hat{1}^3$  Induces a Phenotypic Switch from Activated to Quiescent Hepatic Stellate Cells\*. 2003.

HAZRA, S. et al. PPAR Gamma and Hepatic Stellate Cells. **Comparative Hepatology**, v. 3, n. Suppl 1, p. S7, 2004.

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

HERNÁNDEZ, A. F. et al. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. **Toxicology**, v. 307, p. 136–145, 10 maio 2013.

HIETANEN, E.; LINNAINMAA, K.; VAINIO, H. Effects of phenoxyherbicides and glyphosate on the hepatic and intestinal biotransformation activities in the rat. **Acta pharmacologica et toxicologica**, v. 53, n. 2, p. 103–112, 1983.

HILL, B. G. et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. **Biological Chemistry**, v. 393, n. 12, p. 1485–1512, 2012.

HOUTEN, S. M. et al. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation and Its Genetic Disorders. **Annual Review of Physiology**, v. 78, p. 23–44, 2016.

HUANG, A. Y. S. et al. Region-Specific Transcriptional Control of Astrocyte Function Oversees Local Circuit Activities. **Neuron**, v. 106, n. 6, p. 992- 1008.e9, 2020.

HUGH-JONES, M. E.; PEELE, R. H.; WILSON, V. L. Parkinson's disease in Louisiana, 1999–2012: Based on hospital primary discharge diagnoses, incidence, and risk in relation to local agricultural crops, pesticides, and aquifer recharge. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 5, p. 1999–2012, 2020.

HUGHES, R. N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 5, p. 497–505, 2004.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches**. [s.l: s.n.]. v. 223

IOVINO, L.; TREMBLAY, M. E.; CIVIERO, L. Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 144, n. 3, p. 151–164, 1 nov. 2020.

JELLINGER, K. A. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 27, n. 1, p. 8–30, jan. 2012.

JIN, H. et al. Activation of PPAR $\gamma$ /P53 signaling is required for curcumin to induce hepatic stellate cell senescence. **Cell Death & Disease 2016 7:4**, v. 7, n. 4, p.

e2189–e2189, 14 abr. 2016.

KAWANO, Y.; COHEN, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 4, p. 434–441, 2013.

KHAKH, B. S.; SOFRONIEW, M. V. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 942–952, 2015.

KIDO, Y. et al. Molecular and functional identification of large neutral amino acid transporters LAT1 and LAT2 and their pharmacological relevance at the blood-brain barrier. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 497–503, 2001.

KNAGGS, A. R. The biosynthesis of shikimate metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 3, p. 334–355, 1 jan. 2001.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J**, v. 298, p. 249–258, 1994.

KREITZER, A. C. Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons.

<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135422>, v. 32, p. 127–147, 25 jun. 2009.

LALONDE, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 1, p. 91–104, 2002.

LARSEN, K. et al. Effects of Sublethal Exposure to a Glyphosate-Based Herbicide Formulation on Metabolic Activities of Different Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rats. **International journal of toxicology**, v. 33, n. 4, p. 307–318, 2014.

LE COUTEUR, D. G. et al. Pesticides and Parkinson's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, n. 3, p. 122–130, 1 abr. 1999.

LIDDELOW, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 481–487, 2017.

LIMÓN, I. D. et al. Disturbance of the Glutamate-Glutamine Cycle, Secondary to Hepatic Damage, Compromises Memory Function. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, n. January, p. 1–16, 2021.

LIU, J. et al. Glyphosate-induced lipid metabolism disorder contributes to

hepatotoxicity in juvenile common carp. **Environmental Pollution**, v. 269, p. 116186, 2021.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOZANO, V. L. et al. Sex-dependent impact of Roundup on the rat gut microbiome. **Toxicology Reports**, v. 5, n. September 2017, p. 96–107, 2018.

MARRA, F. et al. Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Modulate Profibrogenic and Proinflammatory Actions in Hepatic Stellate Cells. 2000.

MARTINEZ, A.; AL-AHMAD, A. J. Effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid on an isogenic model of the human blood-brain barrier. **Toxicology letters**, v. 304, abr. 2019.

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.

MARTÍNEZ, M. A. et al. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. **Environmental Research**, v. 161, n. October 2017, p. 212–219, 2018.

MCCANN, M. S.; MAGUIRE-ZEISS, K. A. Environmental toxicants in the brain: A review of astrocytic metabolic dysfunction. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 84, p. 103608, 2021.

MEIJER, A. J.; LAMERS, W. H.; CHAMULEAU, R. A. F. M. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.3.701>, v. 70, n. 3, p. 701–748, 1990.

MENKES, D. B.; TEMPLE, W. A.; EDWARDS, I. R. Intentional self-poisoning with glyphosate-containing herbicides. **Human & experimental toxicology**, v. 10, n. 2, p. 103–107, 1991.

MESNAGE, R. et al. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2015a.

MESNAGE, R. et al. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 133–153, 2015b.

MESNAGE, R. et al. Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. **Scientific Reports**, v. 7, n. July 2016, p. 1–15, 2017.

MESNAGE, R. et al. Use of shotgun metagenomics and metabolomics to evaluate the impact of glyphosate or roundup mon 52276 on the gut microbiota and serum metabolome of sprague-dawley rats. **Environmental Health Perspectives**, v. 129, n. 1, p. 1–15, 2021a.

MESNAGE, R. et al. Alterations in human gut microbiome composition and metabolism after exposure to glyphosate and Roundup and / or a spore-based formulation using the SHIME ® technology. **bioRxiv**, 2021b.

MESNAGE, R.; ANTONIOU, M. N. Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. January, p. 1–8, 2018.

MESNAGE, R.; BENBROOK, C.; ANTONIOU, M. N. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, n. January, p. 137–145, 2019.

MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SÉRALINI, G. E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology**, v. 313, n. 2–3, p. 122–128, 2013.

MIEDEL, C. J. et al. Assessment of Spontaneous Alternation, Novel Object Recognition and Limb Clasping in Transgenic Mouse Models of Amyloid- $\beta$  and Tau Neuropathology. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, v. 2017, n. 123, p. 55523, 28 maio 2017.

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

NAN, Y. M. et al. Rosiglitazone prevents nutritional fibrosis and steatohepatitis in

mice. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 44, n. 3, p. 358–365, mar. 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Environmental Neurotoxicology**. National Academies Press. 1992.

NCBI NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2022). PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate. Retrieved January 29, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. (STUART J. Bioenergetics 3. p. 297, 2002.

OECD. Test no. 424 Neurotoxicity Study in Rodents. n. July, p. 1–15, 1997.

OLDE DAMINK, S. W. M.; JALAN, R.; DEJONG, C. H. C. Interorgan ammonia trafficking in liver disease. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 1, p. 169–181, 2009.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p. 1115–1122, 2005.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 22, p. 10625–10629, 1994.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Sweet sixteen for ANLS. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 1152–1166, 2012.

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, n. 3, p. 149–167, 1985.

PESTA, D.; GNAIGER, E. High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle. **Methods in Molecular Biology**, v. 810, p. 25–58, 2012.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346–356, 1977.

PU, Y. et al. Glyphosate exposure exacerbates the dopaminergic neurotoxicity in the

mouse brain after repeated administration of MPTP. **Neuroscience Letters**, v. 730, n. April, p. 135032, 2020.

REDFERN, W. S. et al. Spectrum of effects detected in the rat functional observational battery following oral administration of non-CNS targeted compounds. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 52, n. 1, p. 77–82, 2005.

REIBER, H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: Barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 21, n. 3–4, p. 79–96, 2003.

REN, X. et al. Effects of chronic glyphosate exposure to pregnant mice on hepatic lipid metabolism in offspring. **Environmental Pollution**, v. 254, p. 112906, 2019.

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

RICHMAN, C. L.; DEMBER, W. N.; KIM, P. Spontaneous alternation behavior in animals: A review. **Current Psychology**, v. 5, n. 4, p. 358–391, 1986.

ROLFE, D. F. S.; BRAND, M. D. The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. **Bioscience reports**, v. 17, n. 1, p. 9–16, 1997.

SATO, C. et al. Aseptic meningitis in association with glyphosate-surfactant herbicide poisoning. **Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)**, v. 49, n. 2, p. 118–120, fev. 2011.

SCHMIDT, A. P. et al. The NMDA antagonist MK-801 induces hyperalgesia and increases CSF excitatory amino acids in rats: Reversal by guanosine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 4, p. 549–553, 2009.

SCHÖNBRUNN, E. et al. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1376–1380, 13 fev. 2001.

SCHOUSBOE, A. et al. Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. p. 13–30, 2014.

- SHARVIT, E. et al. Amplified Inhibition of Stellate Cell Activation Pathways by PPAR- $\gamma$ , RAR and RXR Agonists. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–11, 2013.
- SHIMANO, H.; SATO, R. SREBP-regulated lipid metabolism: Convergent physiology-divergent pathophysiology. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 12, p. 710–730, 2017.
- SMITH, Q. R. et al. Kinetics of Neutral Amino Acid Transport Across the Blood-Brain Barrier. **Journal of Neurochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1651–1658, 1 nov. 1987.
- SOFRONIEW, M. V. Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. **Neuroscientist**, v. 20, n. 2, p. 160–172, 2014.
- SOFRONIEW, M. V. Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 9, p. 758–770, 2020.
- SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7–35, 2010.
- SOFTIC, S. et al. Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 11, p. 4059–4074, 19 dez. 2017.
- SOUZA, D. G. et al. The astrocyte biochemistry. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 95, n. March, p. 142–150, 2019.
- SOUZA, D. G. et al. Measurement of Glutamate Uptake using Radiolabeled L-[3H]-Glutamate in Acute Transverse Slices Obtained from Rodent Resected Hippocampus. **Journal of Visualized Experiments: Jove**, n. 176, 2021.
- SMITH, C. M.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. xii, 980 p. 2.ed
- SPECTOR, R. Fatty acid transport through the blood-brain barrier. **Journal of neurochemistry**, v. 50, n. 2, p. 639–643, 1988.
- SUÁREZ, I.; BODEGA, G.; FERNÁNDEZ, B. Glutamine synthetase in brain: Effect of ammonia. **Neurochemistry International**, v. 41, n. 2–3, p. 123–142, 2002.
- TANG, J. et al. Ion imbalance is involved in the mechanisms of liver oxidative damage in rats exposed to glyphosate. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017.

TANG, Q. et al. Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. **Environmental Pollution**, v. 261, p. 114129, 2020.

THOMAS, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR $\alpha$ , directly regulates transcription of cytochrome P450 CYP2C8. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. NOV, p. 261, 2015.

TSATSAKIS, A. M. et al. Simulating real-life exposures to uncover possible risks to human health: A proposed consensus for a novel methodological approach. **Human and Experimental Toxicology**, v. 36, n. 6, p. 554–564, 2017.

TSIAOUSSIS, J. et al. Effects of single and combined toxic exposures on the gut microbiome: Current knowledge and future directions. **Toxicology Letters**, v. 312, n. January, p. 72–97, 2019.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1189–1197, 1 ago. 2003.

TUSH, D.; LOFTIN, K. A.; MEYER, M. T. Characterization of polyoxyethylene tallow amine surfactants in technical mixtures and glyphosate formulations using ultra-high performance liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1319, p. 80–87, 2013.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2002. Hepatocellular hypertrophy. HED guidance document #G2002.01. p. 1-24, 2002. Disponível em: [https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference\\_id/625713](https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/625713). Acesso em: 8 jan. 2022.

VANLAEYS, A. et al. Formulants of glyphosate-based herbicides have more deleterious impact than glyphosate on TM4 Sertoli cells. **Toxicology in Vitro**, v. 52, n. December 2017, p. 14–22, 2018.

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M.; HERTZ, L. Why are Astrocytes Important? **Neurochemical Research**, v. 40, n. 2, p. 389–401, 2014.

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

WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 2, n. MAR, p. 12, 2010.

WANG, Y. et al. PPARs as metabolic regulators in the liver: Lessons from liver-specific PPAR-null mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, 2020.

WEINER, I. D.; MITCH, W. E.; SANDS, J. M. Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 10, n. 8, p. 1444, 7 ago. 2015.

WEINHOLD, B. Mystery in a bottle: will the EPA require public disclosure of inert pesticide ingredients? **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 4, 2010.

WHITE, C. J. et al. Determining the Bioenergetic Capacity for Fatty Acid Oxidation in the Mammalian Nervous System. **Molecular and Cellular Biology**, v. 40, n. 10, 2020.

WIKOFF, W. R. et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. 2008.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2 I, p. 117–165, 2000.

XU, J. et al. The role of L-type amino acid transporters in the uptake of glyphosate across mammalian epithelial tissues. **Chemosphere**, v. 145, p. 487–494, fev. 2016.

YUDKOFF, M. Diseases of amino acid metabolism. Basic Neurochemistry; Molecular, Cellular and Medical Aspects. **Lippincott Williams & Wilkins**, p. 887-915, 1999.

ZAGANAS, I. et al. Linking pesticide exposure and dementia: What is the evidence? **Toxicology**, v. 307, p. 3–11, 2013.

ZARAGOZÁ, R. Transport of Amino Acids Across the Blood-Brain Barrier. **Frontiers in Physiology**, v. 11, n. September, p. 1–11, 2020.

ZHAO, J. et al. Detection of glyphosate residues in companion animal feeds. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 1113–1118, 2018.

ZHENG, T. et al. Effects of chronic glyphosate exposure on antioxidant status,

metabolism and immune response in tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*).

**Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 239, n. June 2020, p. 108878, 2021.

ZHENG, X. et al. Increase in Glutamatergic Terminals in the Striatum Following Dopamine Depletion in a Rat Model of Parkinson's Disease. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 5, p. 1079–1089, 15 maio 2019.

ZHOU, Z. et al. Mitochondrial Metabolism in Major Neurological Diseases. **Cells** **2018, Vol. 7, Page 229**, v. 7, n. 12, p. 229, 23 nov. 2018.

ZIMMER, E. R. et al. [18F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 393–395, 2017.

## ANEXO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1 – Descrição dos anticorpos primários utilizados no Western Blot.

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Código</b>	<b>Fabricante</b>
$\beta$ -actina	1:10000	a5441	Sigma
$\beta$ -tubulina	1:10000	ab6046	Abcam
GAPDH	1:10000	G8795	Sigma
GFAP	1:1000	3670	Cell Signalling
GLT-1	1:1000	ab41621	Abcam
GS	1:10000	G2781	Sigma
MAO-B	1:1000	ab67297	Abcam
iNOS	1:1000	SAB4502011	Sigma

Fonte: Autor, 2022.

Tabela 2 – Descrição dos primers utilizados no RT-qPCR.

<b>Gene</b>	<b>Sequência do DNA (5'-3')</b>	<b>Produto (pares de base)</b>
$\beta$ -ACTINA	F – CTTCTTTGCAGCTCCTTCGT R - ATATCGTCATCCATGGCGAAC	63
GFAP	F – AACCGCATCACCATTCTGT R - CATCTCCACCGTCTTACCAC	123
PPAR $\alpha$	F – GGGTCATACTCGCAGGAAAG R - GTCTTCTCAGCCATGCACAA	82
PPARG1	F – CTCCTGTTGACCCAGAGCAT R - AGAGAGGTCCACAGAGCTGA	131
SREBPF1	F – TGACCGACATCGAAGACATGC R - CCAGCATAGGGGCATCAAA	82

Fonte: Autor, 2022.

## ANEXO 3 - APROVAÇÃO DO CEUA

	<b>UFRGS</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 37876

**Título:** EFEITOS DO GLIFOSATO NO METABOLISMO CEREBRAL E PERIFERICO DE RATOS WISTAR

**Vigência:** 21/08/2019 à 31/12/2021

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

Eduardo Rigon Zimmer - coordenador desde 21/08/2019  
 DIOGO ONOFRE GOMES DE SOUZA - pesquisador desde 21/08/2019  
 MARCO ANTONIO ZACHIA AYUB - pesquisador desde 21/08/2019  
 MIRNA BAINY LEAL - pesquisador desde 21/08/2019  
 Débora Guerini de Souza - pesquisador desde 21/08/2019  
 Pâmela Cristina Lukasewicz Ferreira - pesquisador desde 21/08/2019  
 CHRISTIAN LIMBERGER - zzz Outra Função zzz desde 21/08/2019  
 ANA CRISTINA LAYDNER JOLY DE OLIVEIRA - zzz Outra Função zzz desde 21/08/2019  
 ANDRÉIA SILVA DA ROCHA - Aluno de Doutorado desde 21/08/2019

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 25/11/2019 - Plenarinho - Andar Térreo do Prédio da Reitoria - Campus Centro/UFRGS - Bairro Farroupilha - Porto Alegre/RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 144 Ratos Wistar machos de 30 dias serão obtidos no CREAL - UFRGS. Também serão utilizados 12 ratos Wistar neonatos fornecidos sem as mães pelo biotério setorial do Departamento de Bioquímica do ICBS ou pelo CREAL; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Sexta-Feira, 6 de Dezembro de 2019



ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Coordenador da comissão de ética