ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO GLIFOSATO E TRATADOS COM QUERCETINA

Dieine Cassiélen Tavares Machado [1]

Juliana Bernera Ramalho [2]

Cristiano Chiapinotto Spiazzi [3]

Melina Bucco Soares [4]

Francielli Weber Santos Cibin [5]

Diogo Ferreira Bicca [6]

Resumo:

O glifosato é o ingrediente ativo da categoria de herbicida mais utilizada no Brasil e no mundo nos dias atuais. Como exposto por Mesnage et al. (2015) a exposição crônica a quantidades pequenas do herbicida vem sendo associadas com a um grande espectro de doenças entre as quais pode-se citar o câncer, doenças do sistema digestório e reprodutor, e as neuropatias. Entre estas enfermidades, classificadas como neurodegenerativas e as neuropsiquiátricas, a depressão é uma doença emergente, responsável pela incapacitação de um número crescente de pessoas na atualidade. As causas para o desenvolvimento do quadro depressivo são cada vez mais associadas a distúrbios a nível de sistema nervoso central, relacionados com estresse oxidativo (Balmus et al., 2016) e processos inflamatórios (Al-Hakeim et al., 2015) e as terapias voltadas para ao tratamento desta patologia tem tido foco nesses dois eventos. Nesse sentido, temos a quercetina, um produto do metabolismo vegetal, pertencente ao grupo dos flavonóides e presente em várias frutas e vegetais, sendo também comercializada na forma de cápsulas como suplemento alimentar. De acordo com D'Andrea (2015), a estrutura química da quercetina contribui para seu potencial antioxidante, tendo efeitos excepcionais na neutralização de espécies reativas de oxigênio, evitando a sequencia de eventos danosos decorrentes do estresse oxidativo. Devido a estas características, sua capacidade benéfica também é tema de estudos científicos voltados à terapia de doenças neurodegenerativas, com comprovada ação farmacológica no controle da inflamação e do estresse oxidativo locais, além de estimular a neurogênese (Suganthy et al., 2016). Desse modo, este estudo teve como objetivo verificar através de testes comportamentais específicos, a capacidade da quercetina em promover proteção contra os efeitos deletérios da exposição contínua do glifosato sobre o sistema nervoso central de camundongos, e assim fornecer subsídios para a melhor compreensão do papel do herbicida no desenvolvimentode neuropatias como a depressão, assim como dos antioxidantes em sua prevenção e tratamento.

Palavras-chave: glifosato, quercetina, camundongos, antioxidante, sistema nervoso, depressão

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO GLIFOSATO E TRATADOS COM QUERCETINA

[1] Aluno de graduação. machadodieine@gmail.com. Autor principal

[2] Estudante de doutorado do PPG de Bioquímica na Universidade Federal do Pampa campus Uruguaiana. . julianabramalho@gmail.com. Co-autor

[3]) Técnico Administrativo em Educação, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS . cris.spiazzi@gmail.com. Co-autor

[4] Técnico Administrativo em Educação, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS . melinabuccosoares@gmail.com. Co-autor

[5] Docente. francielliweber@yahoo.com.br. Orientador

[6] Estudante de mestrado do PPG de Bioquímica na Universidade . diogofbicca@gmail.com. Co-orientador

ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO GLIFOSATO E TRATADOS COM QUERCETINA

1 INTRODUÇÃO

O glifosato é o ingrediente ativo da categoria de herbicida mais utilizada no Brasil e no mundo nos dias atuais. Ao longo da década, estudos vem dando ênfase a capacidade do glifosato em produzir efeitos negativos à saúde humana decorrentes da exposição contínua, o que, de acordo com Mesnage *et al.,* (2015) está associada a um grande espectro de doenças atuais entre as quais pode-se citar o câncer, doenças do sistema digestório e reprodutor, e as neuropatias.

A capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica permite que o herbicida promova alterações nos sistemas noradrenérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos (Martinez *et al.,* 2018), desencadeando o aumento do estresse oxidativo e de processos inflamatórios, em níveis semelhantes aos encontrados por diversas patologias do sistema nervoso central entre elas, a depressão (Balmus *et al.,* 2016; Hakeim *et al.,* 2015), uma doença emergente e responsável pela incapacitação de uma parcela importante da população na atualidade.

Assim, a necessidade de terapias que propiciem ao organismo defesas antioxidantes e atenuem os eventos inflamatórios, incentiva a realização de estudos de compostos com estas propriedades e assim atuem na prevenção e tratamento destas enfermidades.

Nesse sentido, temos a quercetina, um flavonóide presente em várias frutas e vegetais, sendo também comercializada na forma de cápsulas como suplemento alimentar que, de acordo com D'Andrea (2015), é um potencial antioxidante, tendo efeitos excepcionais na neutralização de espécies reativas de oxigênio, evitando a sequencia de eventos danosos decorrentes do estresse oxidativo. Sua capacidade benéfica também é tema de estudo científicos voltados à terapia de doenças neurodegenerativas, com comprovada ação farmacológica no controle da inflamação e do estresse oxidativo locais, além de estimular a neurogênese (Suganthy *et al.,* 2016).

Desse modo, este estudo teve como objetivo verificar através de testes comportamentais específicos, a capacidade da quercetina em promover proteção contra os efeitos deletérios da exposição contínua do glifosato sobre o sistema nervoso central de camundongos, e assim fornecer subsídios para a melhor compreensão do papel do herbicida no desenvolvimento de neuropatias como a depressão, assim como dos antioxidantes em sua prevenção e tratamento.

2 METODOLOGIA

O experimento e as análises foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (BIOTECH) da Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana.

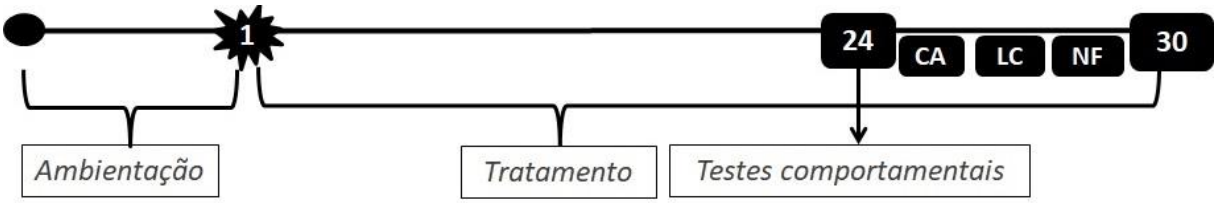
Parao o estudo, foram utilizados quarenta camundongos machos da raça Swiss, os quais foram divididos em quatro grupos com dez indivíduos e submetidos aos protocolos de tratamento durante 30 dias como descrito na literatura como o período de exposição subcrônica (EPA, 1993), sendo eles,o grupo Controle, grupo Quercetina, grupo Glifosato e grupo Glifosato + Quercetina. Os animais foram mantidos em gaiolas com lotação de cinco camundongos com água e alimento *ad libitum*, o ambiente com temperatura controlada em 22°C e ciclos claro/escuro de 12 horas. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa sob o número de protocolo 029/2017.

Os compostos utilizados e administrados no experimento foram a Quercetina na concentração de 30 mg/kg, conforme literatura (Mehta *et al.,* 2017) e o Glifosato na concentração de 50 mg/kg, correspondente a 10% da NOAEL para camundongos (Relatório Alemão, 2015). Ambos os compostos foram administrados diariamente pelo método de gavagem e substituídos por veiculo de acordo com seu grupo. As administrações eram realizadas com intervalo de 30 minutos, entre uma e outra.

Os animais foram submetidos a testes comportamentais na ultima semana de tratamento visando mensurar os efeitos sob os respectivos tratamentos sobre a capacidade locomotora (Open Field), ocorrência ou não de comportamento tipo ansioso (Labirinto em Cruz Elevado) e depressivo (Teste do Nado Forçado).

Todos os testes comportamentais foram realizados pela parte da manhã, sob as condições de luz fraca e ruídos baixos, todos os equipamentos utilizados foram higienizados entre cada sessão.

Figura 1 – Desenho Experimental

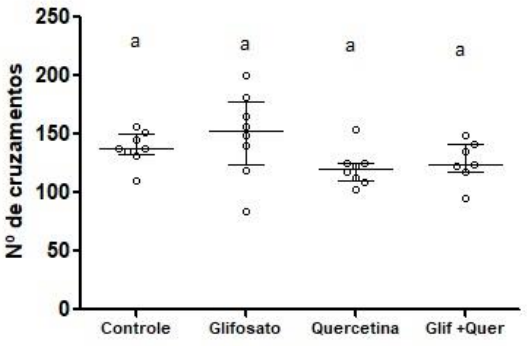


Os resultados dos testes comportamentais foram submetidos a analise estatística com o método de ANOVA, considerando significativo p = 0,05.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

A análise dos testes comportamentais permitiram verificar os seguintes resultados expressos nos gráficos abaixo.

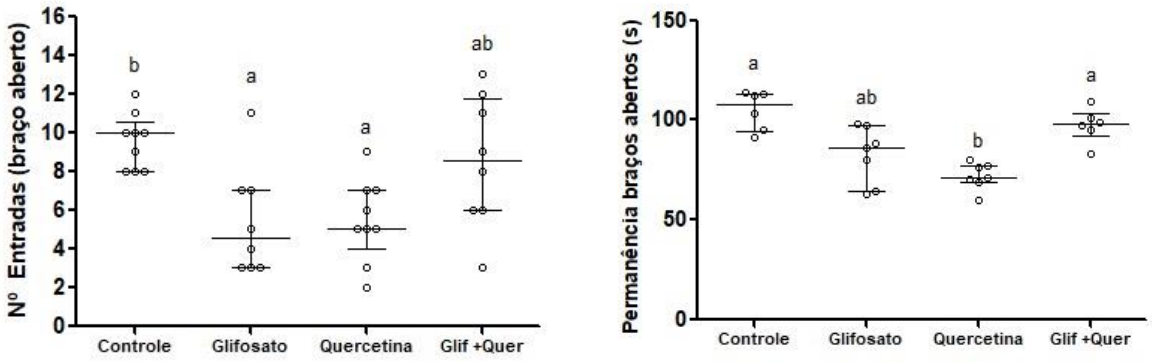
Figura 1 – Teste de Campo Aberto



Quando avaliados quanto a capacidade locomotora e exploratória no teste de Campo de Aberto, os animais não apresentaram diferenças significativas em relação aos tipos de tratamentos. Cattani *et al.* (2017), da mesma forma não verificaram alterações da exposição ao glifosato neste teste.

No entanto no teste do Labirinto em Cruz Elevado, com o intuito de avaliar o comportamento tipo ansioso, foram verificadas mudanças comportamentais de acordo com o grupo experimental, expressas pelo tempo de permanência e número de entradas nos braços do aparato.

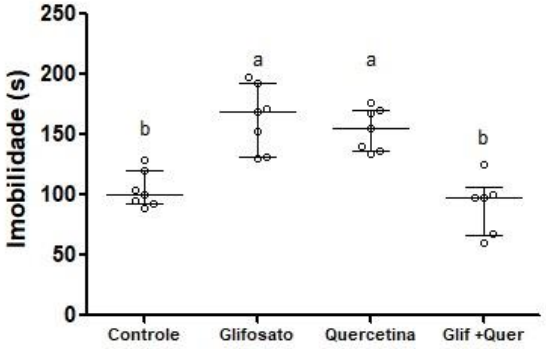
Figuras 2 e 3 – Teste do Labirinto em Cruz Elevado



Verifica-se a partir dos gráficos acima que os animais do grupo tratado apenas com quercetina realizaram um número de entradas nos braços abertos semelhante aos do grupo tratado com glifosato e permaneceram menor tempo nestes locais, característico do comportamento tipo ansioso. Mehta *et al.,*(2017), ao tratar camundongos submetidos ao estresse crônico verificou benefícios do uso da quercetina que apresentou efeito ansiolítico. Diferentemente, os grupos controle e glifosato + quercetina, apresentaram maior número de entradas e permanência nos espaços abertos.

O comportamento tipo depressivo, avaliado pelo Teste de Nado Forçado, foi demonstrado pelo grupo exposto ao glifosato que, da mesma forma que observado por Cattani *et al.* (2017), apresentou maior imobilidade em relação ao grupo controle. De forma semelhante também apresentou-se o grupo quercetina, o que difere dos resultados encontrados por Holzmann *et. al*, (2015), que verificaram seu potencial antidepressivo em camundongos submetidos a bulbectomia, modelo animal para o comportamento tipo depressivo. No entanto, observa-se que o grupo glifosato+quercetina apresentou comportamento semelhante ao do controle

Figuras 4 – Teste do Nado Forçado



A estas situações apresentadas pelos grupos nos diferentes testes, infere-se que apesar do potencial antioxidante, a quercetina pode estar apresentando comportamento prooxidante, como salientado por D'Andrea (2015) devido a ocorrência de metabólitos tóxicos formados a partir da sua oxidação. Estes efeitos indesejados, conforme Wang *et al.,* (2016) acabam por ser neutralizados as expensas da glutationa dimuindo assim seus níveis, da qual a quercetina também seria dependente para exercer seus benefícios (Li *et al.,* 2016).

Somando estas informações com os resultados encontrados por Astiz *et al.,* (2009) que verificaram o aumento dos níveis de glutationa em animais expostos a pesticidas, permite-se sugerir que os animais do grupo glifosato+quercetina, podem ter obtido melhor desempenho nos testes comportamentais em decorrência daquela associação. No entanto, novos estudos são necessários para verificar esta possibilidade.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho puderam evidenciar de forma preliminar que a exposição ao glifosato, mesmo que a doses consideradas baixas, de forma crônica, foi capaz de promover alterações comportamentais importantes no modelo animal de eleição.

A quercetina, proposta como tratamento a situação exposta anteriormente, apresentou benefícios quando administrada em conjunto com o agente tóxico, permitindo ao grupo específico atuar de forma semelhante ao grupo de controle.

No entanto, quando administrada isoladamente, na dosagem e tempo de tratamento deste trabalho, ocasionou efeitos comparáveis ao do glifosato, reforçando a necessidade de maiores estudos deste composto, apesar dos efeitos benéficos demostrados na literatura.

REFERÊNCIAS

ASTIZ , M.; ALANIZ, M. & MARRA, C. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. Environmental Toxicology and Pharmacology. 28: 465–473, 2009.

AL-HAKEIM HK, AL-RAMMAHI DA, AL-DUJAILI AH. IL-6, IL-18, sIL-2R, and TNFα proinflammatory markers in depression and schizophrenia patients who are free of overt inflammation. J. Affect. Disord, 182:106-114, 2015.

BALMUS, I.M., CIOBICA, A., ANTIOCH, I., DOBRIN, R., TIMOFTE, D. Oxidative Stress Implications in the Affective Disorders: Main Biomarkers, Animal Models Relevance, Genetic Perspectives, and Antioxidant Approaches. Oxid. Med. Cell. Longev. 2016.

CATTANI, D.; CESCONETTO, P; TAVARES, M.; PARISOTTO, E.; OLIVEIRA P.; RIEG, C.; LEITE, M.; PREDIGERC, R.; WENDT, N.; RAZZERA, G.; FILHO, D. & ZAMONER, A. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. Toxicology 387: 67–80, 2017.

D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? Fitoterapia, 106. p. 256-271, 2015.

HOLZMANN, I.; SILVA, L.; SILVA, J.; STEIMBACH, V.; SOUZA, M. Antidepressant-like effect of quercetin in bulbectomized mice and involvement of the antioxidant defenses, and the glutamatergic and oxidonitrergic pathways. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 136, p. 55-63, 2015.

LI, C; JIANZHANG, W.; CHOI, J. & FREI, B. Quercetin affects glutathione levels and redox ratio in human aortic endothelial cells not through oxidation but formation and cellular export of quercetin-glutathione conjugates and upregulation of glutamate-cysteine ligase. Redox Biology, 9: 220–228. 2016.

MESNAGE R, DEFARGE N, SPIROUX V. J, SÉRALINI GE. Potential toxic effects of glyphosate an its commercial formulations below regulatory limits. Food Chem Toxicol, 84: 133-153, 2015.

MEHTA V.; PARASHAR A.; UDAYABANU M. Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and inflammatory stress. Physiol Behav. 171: 69–78, 2017.

STEPHENSON CL, HARRIS CA. An assessment of dietary exposure to glyphosate using refined deterministic and probabilistic methods. Food and Chemical Toxicology, 95: 28-41, 2015.

SUGANTHY N, DEVI KP, NABAVI SF, BRAIDY N, NABAVI SM. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. Biomed. Pharmacother, 84: 892–08, 2016.

WANG W.; SUN C.; MAO L.; PEIHUA M.; FUGUO L.; YANG J. & YANXIAN G. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. Trends in Food Science & Technology. 56: 21-38, 2016.