

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

DIOGO FERREIRA BICCA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA QUERCETINA EM
CAMUNDONGOS EXPOSTOS A UM HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO**

**Uruguiana
2020**

DIOGO FERREIRA BICCA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA QUERCETINA EM
CAMUNDONGOS EXPOSTOS A UM HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Francielli Weber Santos Cibirin

**Uruguaiiana
2020**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

B583a Bicca, Diogo Ferreira

Avaliação do efeito neuroprotetor da quercetina em
camundongos expostos a um herbicida à base de glifosato /
Diogo Ferreira Bicca.

74 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2020.

"Orientação: Francielli Weber Santos Cibir".

1. Quercetina. 2. Glifosato. 3. Depressão. 4.
Comportamento. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

DIOGO FERREIRA BICCA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA QUERCETINA EM
CAMUNDONGOS EXPOSTOS A UM HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

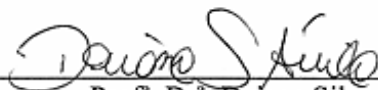
Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 13 de março de 2020.

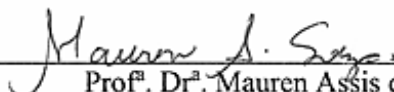
Banca examinadora:



Prof^ª. Dr^ª. Francieli Weber Santos Cebin
Orientadora
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)



Prof^ª. Dr^ª. Daiana Silva de Ávila
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)



Prof^ª. Dr^ª. Mauren Assis de Souza
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

Dedico este trabalho aos meus avós, Athos e Inah, meus maiores exemplos de amor, dedicação e humanidade.

AGRADECIMENTOS

À minha família, agradeço pelo exemplo dado, a referência como pessoa, a valorização dos estudos e a importância do conhecimento para dignificação do ser humano. Com vocês, e por vocês, me dedico e aperfeiçoo a cada dia.

À minha namorada e companheira Luana, obrigado por todos os momentos em que fostes meu alicerce para seguir em frente e superar as dificuldades e dúvidas nesta jornada. Tua presença ao meu lado foi indispensável para vencer essa etapa em minha vida. Muito obrigado meu amor!!

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a. Francielli Cibin, agradeço pela acolhida, pelo carinho, pelas “chamadas à realidade” e principalmente por acreditar em mim. Obrigado por todas as orientações e o apoio que me permitiram crescer como profissional e como indivíduo. És um exemplo de pessoa, o qual tive o privilégio e alegria de conviver durante esse período, e espero que por muito tempo mais.

Aos meus manos do Biotech, Me, Cris, Ju e a caçulinha Jéssica, obrigado por todos os momentos que passamos juntos, pela parceria nos protocolos de laboratório e na vida. Agradeço muito por ter tido a oportunidade de viver com vocês todos os dias. Sem vocês, tudo seria mais difícil. Obrigado por tornar a Pós-Graduação muito mais fácil à base de muitas risadas e café.

À toda equipe ACVet, obrigado pelo apoio nesse período de curso, sempre dispostos a me ajudar quando tive que me ausentar do laboratório e por sempre me incentivar nesse caminho que escolhi.

Aos meus amigos e colegas Márcio Costa, Camila Krüger, Renata Giacomelli e Mirela Noro, agradeço por todas as conversas e os momentos de desabafo, que vocês nem perceberam, mas que foram muito importantes para continuar. Obrigado pelo exemplo de vocês.

A todos os setores, em especial ao Sr. Antônio Guimarães e ao Prof. Rafael Roehrs e a Bruna Ramborger, que contribuíram para que este trabalho fosse possível, muito obrigado!

Enfim, agradeço a todos os professores com os quais tive oportunidade de aprender ao longo desse período, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBioq) e a Universidade Federal do Pampa. Da mesma forma, agradeço a CAPES cujo suporte também foi fundamental para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!!

*“Au-delà des orages, je pars en voyage
Mon âme au vent, le cœur elephant
Je suis part d'ici pour rencontrer la vie
Être vivant...”*

Fréro Delavega

RESUMO

As similaridades das condições fisiopatológicas encontradas no sistema nervoso central em patologias neurológicas como a depressão, e decorrentes da exposição a pesticidas como o glifosato, tem gerado interesse quanto a possíveis associações entre ambas condições. Ao mesmo tempo, compostos naturais como a quercetina vem adquirindo maior destaque na literatura devido ao seu potencial para a promoção da defesa do organismo contra insultos exógenos e no tratamento de doenças, atribuídos a sua capacidade antioxidante e moduladora de processos fisiológicos importantes. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade da exposição subcrônica a uma subdose de um herbicida à base de glifosato (HBG) de provocar alterações a nível de sistema nervoso central de camundongos e da quercetina em promover neuroproteção quando suplementada concomitantemente, por meio da análise de ocorrência de comportamento tipo ansioso/depressivo, e de marcadores bioquímicos, neuroquímicos e histológicos nos diferentes grupos de tratamento. Para isto, quarenta camundongos machos Swiss adultos, foram divididos em quatro grupos, recebendo por gavagem no período de 30 dias as doses de 50 mg/kg de um HBG, 30 mg/kg de quercetina e/ou veículos (H₂O_D/carboximetilcelulose 0,3%-CMC) assim sendo: Controle (H₂O_D/CMC), Glifosato (HGB/CMC), Quercetina (H₂O_D/Quer) e Gli+Quer (HGB/Quer). Ao final do período, os animais foram submetidos a testes comportamentais de Campo Aberto (OF), Labirinto em Cruz Elevado (EPM), Nado Forçado (FST) e Preferência da Sacarose (SPT). Em sequência, os camundongos foram eutanasiados e os hipocampus removidos para análises bioquímicas de marcadores de estresse oxidativo como espécies reativas (ER's), capacidade antioxidante total (FRAP), glutatona reduzida (GSH) e atividade da acetilcolinesterase (AChE), sendo alguns selecionados para análise histológica. Ainda, foram coletados tecidos da região dorsal do núcleo da rafe para determinação dos neurotransmissores serotonina, dopamina e noradrenalina. Os resultados demonstraram que apesar de não ocorrerem diferenças significativas entre os grupos no teste OF, os animais do grupo Glifosato e, surpreendentemente, do grupo Quercetina, apresentaram comportamento tipo ansioso no teste EPM e tipo depressivo no FST, quando comparados ao grupo Controle. O grupo Glifosato obteve níveis aumentados de ER's e diminuídos de GSH em relação ao grupo Controle, não ocorrendo diferenças significativas na atividade da AChE e na capacidade antioxidante total. Apesar do efeito *per se* da quercetina no comportamento, o grupo Gli+Quer apresentou melhora parcial ou total nos testes comportamentais (EPM e FST) e parâmetros de estresse oxidativo do hipocampo (ER's e GSH). Como conclusão, os resultados demonstram o potencial do herbicida de causar alterações no

sistema nervoso central mesmo com uma dose considerada baixa, quando administrada de forma subcrônica. Ainda, foi possível observar a existência de um aparente paradoxo da quercetina, cujos benefícios podem estar associados a mecanismos horméticos.

Palavras chave: glifosato, depressão, quercetina, pesticidas, comportamento, estresse oxidativo.

ABSTRACT

As symptoms following exposure to pesticides such as glyphosate based herbicides (GBH's) and those of neurological diseases such as depression are similar, it has been hypothesized that pesticide exposure has an association with neurological diseases. The aim of this study was to investigate whether quercetin use would protect against neurological changes following exposure to a subchronic low dose of a GBH. Forty adult male Swiss mice were divided into four treatment groups: Control, Glyphosate, Quercetin and Gly+Quer groups. According to the group, mice received 50 mg/kg of a GBH solution, 30 mg/kg of quercetin, and/or vehicles via gavage, for 30 days. The animals were subjected to behavioral tests, including open field (OF), elevated plus maze (EPM), forced swim test (FST) and sucrose preference test (PST). After euthanasia, hippocampal tissues were collected to measure oxidative stress markers such as reactive species (REs), total antioxidant capacity (FRAP), reduced glutathione (GSH), acetylcholinesterase activity (AChE) and for histological evaluation. The dorsal raphe nucleus was collected for neurotransmitter analysis of serotonin, dopamine and noradrenaline. The Glyphosate group showed anxious and depressive-like behavior in the EPM and FST tests, as well as expressed increased RE levels and decreased GSH levels in the hippocampus. The Quercetin group showed similar behavior as the Glyphosate group after treatment, with no alterations in the other parameters evaluated. However, the Gly+Quer group showed partial or total improvement in behavioral tests (EPM, FST) and reduced oxidative stress markers (REs and GSH). The results reveal that exposure to a subchronic low dose of glyphosate herbicide was capable of promoting alterations in the central nervous system. Furthermore, this study demonstrated the existence of an apparent quercetin paradox, the benefits of which could be enhanced by hormesis mechanisms.

Key words: glyphosate; depression; quercetin; pesticides; behavior; oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas moleculares do glifosato em sua forma ácida e sal de isopropilamina (IPA).....	15
Figura 2 - Via do Ácido Chiquímico (síntese de aminoácidos aromáticos).....	16
Figura 3 - Uso global dos HBG's (1000 kg) ao longo dos anos em atividades agrícolas (em números) e não agrícolas.....	18
Figura 4 – Percentuais de casos de depressão divididos por regiões definidas pela WHO.....	23
Figura 5 - Estrutura molecular da quercetina.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites de resíduos de glifosato (<i>maximum residue levels</i> /MRL's, mg/kg) em grãos, estipulados por diferentes entidades reguladoras.....	19
Tabela 2: Concentrações de quercetina em diferentes fontes alimentícias.....	25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AChE – Acetilcolinesterase

ERO – Espécie reativa de oxigênio

EPSPS – 5 enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

GSH – Glutathiona Reduzida

HBG – Herbicida à base de glifosato

IARC – *International Agency of Research in Cancer* (Agência Internacional de Pesquisas em Câncer)

IPA – Sal de isopropilamina

NMDA – N-Metil-D-Aspartato

NOAEL - No Observed Adverse Effect Level (Nível de Efeito Adverso Não Observável)

OGM – Organismo geneticamente modificado

PON – Paraoxonase

SNC – Sistema Nervoso Central

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Herbicidas à base de glifosato (HBG'S)	15
2.1.1 Mecanismo de ação.....	16
2.1.2 Uso dos HBG's.....	17
2.1.3 Limites de exposição	18
2.1.4 Estudos toxicológicos	20
2.1.5 Efeitos sobre o SNC.....	21
2.2 Depressão.....	23
2.3 Quercetina	25
2.3.1 Conceitos gerais.....	25
2.3.2 Propriedades benéficas.....	27
2.3.3 Neuroproteção	28
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivos Gerais.....	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MANUSCRITO.....	31
1. Introduction.....	34
2. Materials and Methods	35
2.1 Animals	35
2.2 Chemicals	35
2.3 Experimental Design	36
2.4 Behavioral Tests	36
2.4.1 Open Field Test (OF)	36
2.4.2 Elevated Plus Maze Test (EPM)	37
2.4.3 Forced Swim Test (FST)	37
2.4.4 Sucrose Preference Test (SPT)	37
2.5 Biochemicals Assays	38
2.5.1- Tissue preparation.....	38
2.5.2 Reactive Species (RSs).....	38
2.5.3 Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP).....	38

2.5.4 Reduced Glutathione (GSH).....	39
2.5.5 Acetylcholinesterase (AChE)	39
2.6 Neurotransmitter levels in the dorsal raphe nucleus.....	39
2.7 Histology	40
2.8 Statistical analysis	40
3. Results	40
3.1 Behavior tests	40
3.1.1 Open field	40
3.1.2 EPM.....	40
3.1.3 FST	41
3.1.4 SPT	41
3.2 Oxidative stress markers	41
3.2.1 RSs	41
3.2.2 FRAP	42
3.2.3 Reduced GSH	42
3.2.4 AChE activity	42
3.3 Determination of neurotransmitter levels	42
3.4 Histological findings.....	42
4. Discussion	43
5. Conclusions.....	46
5 CONCLUSÕES.....	63
6 PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO A - Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA	72

1 INTRODUÇÃO

O glifosato (N-fosfometil glicina) é o ingrediente ativo da categoria de herbicida mais utilizada no mundo nos dias atuais, os chamados herbicidas à base de glifosato (HBG's). Sua eficiência como herbicida se deve a capacidade inibitória da via do ácido chiquímico, imprescindível para o metabolismo vegetal, e ausente em mamíferos (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000). Apesar disso, o crescimento na última década da utilização dos HBG's, tem gerado preocupação quanto aos efeitos sobre a saúde humana e preservação do meio ambiente, decorrente do aumento da exposição ao herbicida (VAN BRUGGEN et al., 2018).

Além da própria exposição ocupacional, o volume de resíduos de HBG's presentes nos alimentos destinados ao consumo da população também está associada ao uso crescente do herbicida. A presença de resíduos em uma grande variedade de alimentos, mesmo que em concentrações baixas, gera um status de exposição crônica e de difícil mensuração quanto aos limites de exposição (MYERS et al., 2016).

Nesse contexto, diversos estudos científicos têm sido realizados com o intuito de avaliar os efeitos da exposição aos HBG's, entre os quais podem ser destacados aqueles voltados as possíveis consequências sobre o sistema nervoso central (SNC). Dentre estes estudos, destaque-se o de MARTINEZ et al., (2018) que demonstraram capacidade do glifosato de atravessar a barreira hematoencefálica. O estresse oxidativo decorrente de seus efeitos sobre o neurotransmissor glutamato (CATTANI et al., 2014), a inibição da proliferação celular (LI et al., 2013) e a influência sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE) (AITBALI, Y. et al., 2019) e a síntese da serotonina (AITBALI et al., 2017) foram descritos em diversos estudos toxicológicos utilizando o glifosato.

Devido à similaridade das alterações provocadas no SNC pela exposição aos HBG's com as mudanças estruturais presentes em algumas patologias neurológicas como a depressão, doenças de Parkinson, Alzheimer, autismo, entre outras (HARRISON; MACKENZIE ROSS, 2016; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2018), torna-se necessário avaliar a relação desses compostos com a ocorrência de doenças desta natureza.

De incidência crescente, a depressão é considerada uma doença multifatorial, caracterizada pela mudança comportamental incapacitante do indivíduo para o convívio social pleno (FERRARI et al., 2013), cujas alterações cerebrais podem ser expressas pelo aumento do estresse oxidativo e da neuroinflamação (AL-HAKEIM; AL-RAMMAHI; AL-DUJAILI, 2015; BALMUS et al., 2016). Sendo assim, a seleção de alternativas terapêuticas não deve

apenas restringir-se a restauração de níveis de monoaminas, mas deve considerar essa natureza multifatorial da depressão, tendo em vista melhores resultados nos tratamentos da doença (BEHR; MOREIRA; FREY, 2012; PANDYA; HOWELL; PILLAI, 2013).

A busca por terapias alternativas que conciliem alívio dos sintomas e menor número de efeitos colaterais, é estimulada pela diversidade de compostos de origem natural. Amplamente estudada no meio científico, a quercetina é um flavonóide derivado do metabolismo vegetal, cujos benefícios estão associados ao seu potencial antioxidante e anti-inflamatório (D'ANDREA, 2015).

Os efeitos antidepressivos da quercetina puderam ser verificados através de experimentação com modelos animais de estresse crônico (MEHTA; PARASHAR; UDAYABANU, 2017) e bulbectomia olfatória (HOLZMANN et al., 2015), nos quais puderam ser observados a melhora na condição comportamental associada a depressão, e em parâmetros oxidativos e inflamatórios.

Entre os mecanismos benéficos descritos em estudos dessa natureza, cita-se a capacidade da quercetina de neutralização de espécies reativas, exercendo também papel modulador a partir do aumento das defesas antioxidantes como a glutatona reduzida (GSH), estímulo de fatores de transcrição Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), e aumento da atividade de enzimas como as da família das paraoxonases (PON's) (GIORDANO et al., 2011; COSTA et al., 2016). Estudos também atribuem a quercetina, a capacidade de atuar de forma positiva sobre o sistema serotoninérgico (SAMAD et al., 2018; KHAN; NAJMI; AKHTAR, 2019) e colinérgico (SAMAD et al., 2018), tornando-se assim um composto neuroprotetor com características multifacetadas.

Neste contexto, o trabalho procurou avaliar as consequências da exposição subcrônica a doses relativamente baixas de um HBG, considerando seus efeitos no SNC em camundongos. Ainda, analisar o potencial da quercetina em reduzir estes efeitos, a fim de esclarecer quanto ao seu papel na prevenção e tratamento de doenças neurológicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

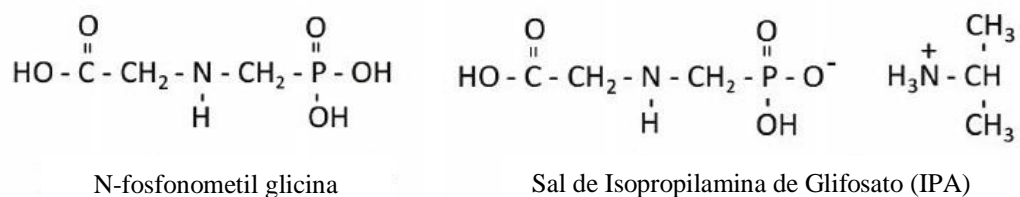
2.1 Herbicidas à base de glifosato (HBG'S)

O composto N-fosfometil glicina conhecido como glifosato, compreende ao princípio ativo de formulações com finalidade herbicida, elaboradas pelo químico John E. Franz, nos Estados Unidos, nos anos de 1970, e comercializadas a partir dos anos 1974 pela empresa Monsanto (DILL et al., 2010) Os herbicidas à base de glifosato (em inglês, *glyphosate based herbicides* ou GBH's) vêm sendo utilizados em atividades agrícolas no controle de espécies vegetais indesejáveis do ponto de vista produtivo, mas também no ambiente doméstico com a mesma finalidade, em menor escala (GIESY; DOBSON; SOLOMON, 2000).

O glifosato é um composto da categoria dos organofosforados, com estrutura molecular semelhante ao aminoácido glicina (Figura 1), sob a fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (m.m. = 169,1 g/mol) (AMARANTE JR.; SANTOS, 2002). Pode se apresentar na forma de ácido ou em formulação com diferentes sais, entre os quais, o sal de isopropilamina é a mais frequentemente utilizada (Figura 1). Em condições ambientais tanto o glifosato quanto os seus sais são sólidos cristalinos muito solúveis em água (12 g/L a 25 °C) e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol (GIESY; DOBSON; SOLOMON, 2000).

A formulação comercial dos HBG's normalmente segue a mesma composição: sal de isopropilamina de glifosato (IPA), um surfactante e água. A concentração de glifosato nestas formulações pode variar, sendo frequentemente utilizadas 360 g/L de glifosato na forma de ácido, ou 480 g/L do sal (48% m.v.), podendo ocorrer apresentações mais diluídas pela adição de água. O surfactante mais comumente utilizado é a polioxietilenoamina (POEA), tendo a função principal de aumentar a capacidade de absorção do produto pela superfície das folhas (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Figura 1 – Estruturas moleculares do glifosato em sua forma ácida e sal de isopropilamina (IPA).



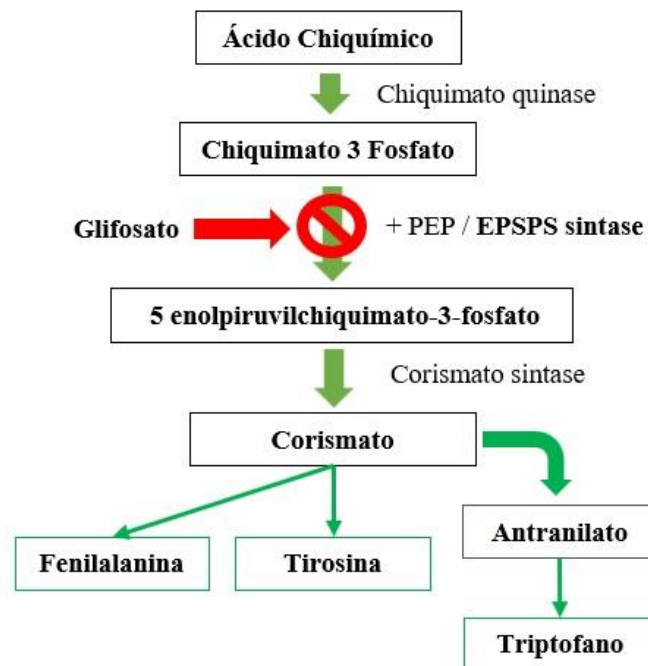
Fonte: Pérez et al., (2011)

2.1.1 Mecanismo de ação

O glifosato possui uma ação herbicida não seletiva (amplo espectro), sistêmica eficiente. A fitotoxicidade do glifosato se deve a sua alta polaridade e baixo peso molecular, as quais permitem uma translocação rápida pelos tecidos vegetais (ANADON et al., 2009).

No entanto, o sucesso do glifosato se justifica em sua capacidade de interferir em uma importante etapa do metabolismo vegetal, denominada via do chiquimato ou via do ácido chiquímico (Figura 2). A partir do efeito inibitório da enzima 5 enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), essencial para biossíntese de aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano), os HBG's promovem uma diminuição importante da síntese proteica, comprometendo o crescimento vegetal, a produção de energia pela fotossíntese e a defesa contra patógenos (VAN BRUGGEN et al., 2018).

Figura 2 – Via do Ácido Chiquímico (síntese de aminoácidos aromáticos).



Fonte: Adaptado de Dill (2005).

Pelo fato desta via estar ausente em vertebrados, o glifosato foi considerado por cientistas e representantes de órgãos reguladores como um composto de baixo risco para mamíferos. Entretanto, na última década, vários estudos tem demonstrado o potencial dos

HBG's em produzir efeitos adversos a biologia dos mamíferos e ao meio ambiente como um todo, por meio de múltiplos mecanismos (MYERS et al., 2016).

2.1.2 Uso dos HBG's

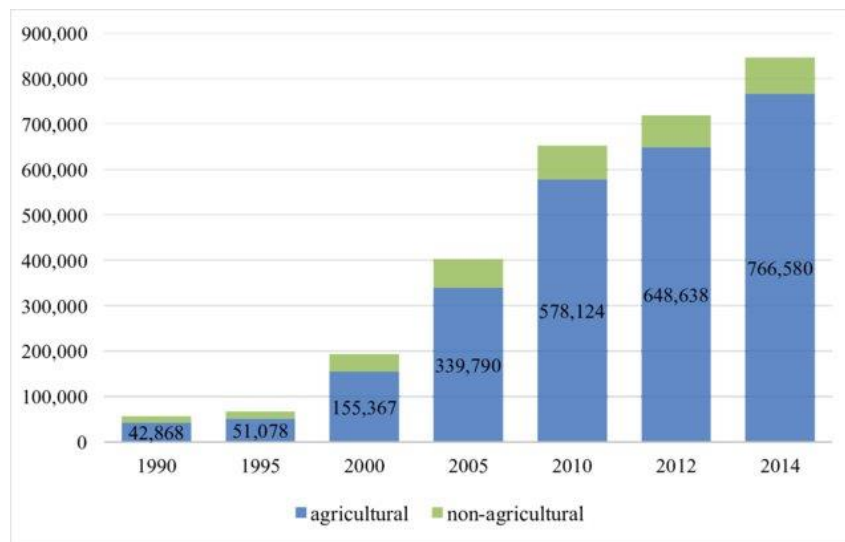
A partir da comercialização do glifosato nos anos 1970 pela empresa Monsanto, a utilização dos HBG's, na época representados pelo produto Roundup[®], vem apresentando crescimento vertiginoso até os dias atuais (DILL, 2005).

Entretanto pelo período de duas décadas, o uso do Roundup[®] permaneceu mais restrito as atividades que demandavam a necessidade de eliminação do estrato vegetal como um todo, devido a sua natureza não seletiva. O surgimento das variantes geneticamente modificadas de soja, milho e algodão no ano de 1996, criadas com o objetivo de resistir aos efeitos da aplicação do Roundup[®], denominadas Roundup Ready[®], permitiram o uso do herbicida por maior período de tempo e escala (BENBROOK, 2016). Desde então, a criação e diversificação de organismos geneticamente modificados (OGM's) de finalidade agrícola, permitiu o aumento da utilização de compostos à base glifosato, os quais constituem hoje a categoria de herbicida mais utilizada no mundo.

Um outro fato importante ocorreu nos anos 2000, quando a Monsanto perde a patente que garantia a exclusividade no uso do composto glifosato. Isto permitiu que outras empresas lançassem suas próprias marcas, com formulações diferentes, desencadeando um uso cada vez mais difundido do composto (DUKE, 2018).

Dessa forma, a utilização de HBG's tem um crescimento de 67 milhões de kg no ano de 1995 para 826 milhões de kg em 2014 em atividades agrícolas e não agrícolas (Figura 3).

Figura 3 – Uso global dos HBG's (1000 kg) ao longo dos anos em atividades agrícolas (em números) e não agrícolas



Fonte: Clapp (2017), adaptada de Benbrook (2016) .

Entretanto, a introdução de OGM's resistentes aos HBG's não só possibilitaram o uso mais intensificado de compostos desta natureza, como também permitiram uma mudança na forma da utilização. O uso dos HBG's no processo de produção passou a não restringir-se apenas às etapas de pré plantio e pós colheita, como também passaram a ser utilizados em uma fase pré colheita (*harvest aid*), com o intuito de promover a secagem da produto e acelerar o processo de colheita (ZHANG et al., 2017b).

Além disso, um fator que tem contribuído para o aumento da utilização de HBG's é a ocorrência de espécies vegetais adaptadas e resistentes a estes compostos. Após anos de utilização de HBG's e OGM's, o aumento da tolerância de ervas daninhas a esses herbicidas, incentiva aos produtores a fazerem uso gradativamente maior desses produtos, sendo frequente a associação com outros compostos mais tóxicos como o 2,4 D (ácido diclorofenoxiacético) e o dicamba (DILL et al., 2010).

2.1.3 Limites de exposição

Tendo em vista o aumento da exposição decorrente do uso crescente de HBG's na produção alimentícia, órgãos como a Agência Proteção do Meio Ambiente dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency – US EPA) e a Alemanha, como país integrante da União Européia e relator para liberação de compostos dessa natureza, emitiram seus respectivos documentos contendo os limites de resíduos de HBG's nos alimentos (MYERS et al., 2016).

A partir de estudos toxicológicos, foram definidos em suas últimas publicações os consumos diários aceitáveis (*Reference Dose/RfD* ou *Acceptable Diary Intake* – ADI) de 1,75 mg/kg (US-EPA, 2009a) nos Estados Unidos e de 0,5 mg/kg na União Européia (STATE, 2013). Ambos relatórios basearam-se em estudos onde as menores doses com nível de efeito adverso não observável (NOAEL - *No Observed Adverse Effect Level*), as quais foram selecionadas a partir de experimentos com coelhos (MESNAGE et al., 2015).

Apesar da literatura expor que a intoxicação aguda ou por concentrações acima dos limites de exposição não condizem com a realidade (STEPHENSON; HARRIS, 2016) persistem as lacunas de informação e a necessidade de estudos que avaliem a capacidade dos HBG's de provocar efeitos adversos à saúde, considerando a exposição crônica, mesmo que em doses consideradas relativamente seguras (SERALINI et al., 2014).

Ao mesmo tempo, a concentração de resíduos nos alimentos produzidos é variável conforme o tipo de produção (FAO, 2005) como exposto na Tabela 1, assim como o consumo de cada população, o que tornam difícil a mensuração quanto ao grau de exposição de cada indivíduo (GILLEZEAU et al., 2019). Conforme ANADON et al. (2009) mesmo com uma taxa de absorção intestinal baixa, o glifosato possui uma meia vida biológica de 14 horas, podendo assim permanecer no organismo continuamente conforme o tipo de alimento consumido, sendo assim passível de provocar efeitos em diversos sistemas, como demonstra a literatura.

Tabela 1: Limites de resíduos de glifosato (*maximum residue levels/MRL's*, mg/kg) em grãos, estipulados por diferentes entidades reguladoras.

Grãos	FAO/WHO	US-EPA	Comissão Européia	Health Canada
Cereais				
Cevada	30	30	20	10
Milho	5	5	1	3
Painço	30	30	0,1	-
Aveia	30	30	20	15
Arroz	-	0,1	0,1	-
Centeio	30	30	10	-
Sorgo	30	30	10	-
Tefe	30	5		-
Legumes				
Feijão	2	5	2	4
Lentilha	5	5	10	-
Ervilha	5	8	10	5
Pseudocereais				
Trigo sarraceno	30	30	0,1	-
Quinoa	30	5	-	-
Sementes oleaginosas				
Algodão	40	40	10	40

Grãos	FAO/WHO	US-EPA	Comissão Européia	Health Canada
Sementes oleaginosas				
<i>Cannabis</i>	-	40	0,1	-
Linhaça	-	40	10	3
Mostarda	-	40	10	10
Amendoim	-	0,1	0,1	-
Abóbora	-	40	0,1	-
Colza	30	20	10	20
Açafrão	-	40	0,1	-
Gergelim	-	40	0,1	10
Soja	20	20	20	20
Girassol	7	40	20	-

Fonte: Adaptado de Xu et al., (2019).

2.1.4 Estudos toxicológicos

Embora seu mecanismo de ação tenha como foco o metabolismo vegetal, estudos toxicológicos têm demonstrado associação entre a exposição dos HBG's com alterações visíveis tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo*. Ensaios de cultura celular verificaram as consequências dos HBG's sobre diferentes tipos celulares desde células sanguíneas (KWIATKOWSKA; HURAS; BUKOWSKA, 2014) até modelos de células tumorais, verificando efeitos como a apoptose (GUI et al., 2012) e prejuízos sobre desenvolvimento de células nervosas (COULLERY; FERRARI; ROSSO, 2016).

São diversos os trabalhos que demonstram a capacidade do HBG's em causar danos hepáticos e desencadear estresse oxidativo (BENEDETTI et al., 2004; EL-SHENAWY, 2009; CAVUSOGLU et al., 2011; MILIC et al., 2018). Consequências sobre o sistema reprodutor puderam ser constatadas por danos a nível celular, afetando componentes celulares importantes como as células de Sertoli e de Leydig, e a síntese de hormônios como a testosterona (CLAIR et al., 2012; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013). Efeitos dos HBG's também foram descritos como extensivos aos descendentes em modelos de exposição maternal promovendo consequências no desenvolvimento e comportamento da prole (CATTANI et al., 2017; GALLEGOS et al., 2018).

Os estudos realizados com HBG's, mesmo com as controvérsias em relação aos modelos experimentais utilizados e resultados obtidos, contribuíram para sua classificação no relatório da IARC (*International Agency for Research on Cancer* – Agência Internacional de Pesquisa do Câncer) como “possivelmente carcinogênico” (IARC, 2015).

No entanto, tendo em vista a temática do presente trabalho, a atenção será voltada aos estudos relacionados a exposição a HBG's e suas consequências no SNC.

2.1.5 Efeitos sobre o SNC

Estudos comprovam a capacidade do glifosato de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir diferentes regiões do SNC como córtex pré frontal, hipocampo, hipotálamo, estriado e mesencéfalo, provocando alterações significativas nos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico, numa relação dose dependente (MARTINEZ et al., 2018).

Em relação ao sistema dopaminérgico, HERNANDEZ-PLATA et al. (2015) descrevem a atuação do glifosato sobre receptores específicos da dopamina (D1-DA), concluindo que a exposição repetida a dosagens agudas do herbicida pode conduzir a prejuízos na capacidade locomotora, como observado no modelo animal estudado.

A semelhança estrutural do glifosato com a glicina, como anteriormente exposto, inibe a atuação das serinas hidroximetiltransferases, promovendo a diminuição da biossíntese deste aminoácido, necessário para proliferação celular (LI et al., 2013). O fato de glicina também atuar como um neurotransmissor, coloca em questionamento a possibilidade de o glifosato exercer outros efeitos neurológicos.

Aitbali et al., (2019) avaliaram os efeitos da exposição aguda, subcrônica e crônica ao glifosato, constatando nestas duas últimas seu potencial para inibir a enzima acetilcolinesterase, primordial para a regulação da acetilcolina, no tecido cerebral inteiro e nas regiões do córtex pré frontal e do hipocampo de camundongos, verificando prejuízos nos processos de aprendizagem e memória através de testes comportamentais.

Em outros trabalhos, os autores analisaram o efeito da exposição ao glifosato sobre o sistema serotoninérgico, tendo em vista a sua importância na regulação do humor e influência nas condutas comportamentais. Aitbali et al., (2017) verificaram alterações nos níveis de serotonina, reduzida significativamente no córtex pré frontal, amígdala e núcleo da rafe dorsal, representado pela diminuição nos níveis de 5-HT, condição que pode estar associada aos comportamentos tipo ansioso e depressivo, apresentados pelos animais no estudo e comumente associada a patologia da depressão. A relação negativa do glifosato sobre a microbiota intestinal, também foi analisada por estes autores, os quais sugerem como consequência, a diminuição da disponibilidade de aminoácidos como o triptofano decorrente da atividade microbiana e necessário para síntese da serotonina (AITBALI, Y. et al., 2018), contribuindo dessa forma para as alterações tipo ansiosa e depressiva dos camundongos.

A fim de verificar os efeitos da exposição maternal aos HBG's, Gallegos et al., (2016) avaliaram o comportamento de ratos jovens submetidos a um protocolo de exposição das fêmeas durante as etapas gestacional e de lactação. Os autores puderam assim verificar que os

animais juvenis do grupo exposto ao HGB apresentaram alterações comportamentais tipo ansiosa e déficit na atividade locomotora, quando avaliados por testes específicos. A capacidade de indução de comportamento análogo a ansiedade e alteração em testes de atividade locomotora e de memória, também foram verificados por Baier et al., (2017), em um modelo de exposição intranasal a um HGB. Em ambos estudos, os autores atribuem ao potencial do glifosato em influenciar os sistemas de neurotransmissores dopaminérgicos, serotoninérgicos e colinérgicos.

A neurotoxicidade provocada por pesticidas organofosforados é tema recorrente na literatura, cujos danos estão associados ao aumento do estresse oxidativo, déficits no transporte axonal, neuroinflamação e autoimunidade (NAUGHTON; TERRY, 2018). No caso dos HGB's, trabalhos como os de Rebai et al., (2017) demonstram a capacidade do herbicida em promover neurotoxicidade em ratos, verificada a partir de aumento da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, aumento da atividade da catalase (CAT) e peroxidase (POD), diminuição da superóxido dismutase (SOD), além de elevação dos níveis íons de Fe e Ca, e de espécies reativas como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Conforme os estudos de Cattani et al., (2014) o mecanismo de neurotoxicidade do glifosato se dá através da excitotoxicidade mediada pelo neurotransmissor glutamato, como observaram em hipocampos de ratos jovens. A partir da estimulação exacerbada de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), o glifosato contribui para o acúmulo de glutamato na fenda sináptica, aumento do influxo de Ca²⁺ e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), causando estresse oxidativo, além de afetar o significativamente o sistema colinérgico (diminuição da atividade da AChE), culminando na morte da célula nervosa. Em outro estudo, os autores demonstraram que a exposição a HGB's materno e a após ao nascimento da prole, tornam persistentes os efeitos da excitotoxicidade glutamatérgica e do estresse oxidativo no hipocampo dos animais, e que estas condições podem estar relacionadas com o desenvolvimento do comportamento depressivo apresentado pelos ratos adultos jovens (CATTANI et al., 2017).

O estresse oxidativo, assim como a neuroinflamação, são consequências cada vez mais associadas com a exposição a pesticidas, entre eles os HGB's, sendo um fator que permite associa-los com a incidência de doenças neurológicas (EL-SHENAWY, 2009; ASTIZ; DE ALANIZ; MARRA, 2012). A associação do estresse oxidativo e as doenças neurológicas tem ganhado espaço, muito embora não possa ser considerado como causa principal ou mesmo estar presente de forma generalizada. No entanto, estudos tem demonstrado que a ocorrência de estresse oxidativo no SNC está associada a disfunções celulares, danos no DNA e proteínas, e

ativação de vias inflamatórias, formando um cenário em comum em doenças neurológicas, mesmo com sintomatologias diferentes (BALMUS et al., 2016).

Por tratar-se de região com alto teor lipídico, elevado consumo de oxigênio e baixa produção de espécies antioxidantes, o SNC apresenta maior sensibilidade ao estresse provocado pela ação de formas oxidantes (HOVATTA; JUHILA; DONNER, 2010). No caso dos pesticidas, ASTIZ et al., (2009) descreveram o estresse oxidativo como o mecanismo de ação de alguns compostos dessa categoria no SNC, ressaltando a importância do papel dos agrotóxicos na etiologia de doenças neurológicas.

Dessa forma, evidências científicas contribuem para a associação entre o uso exponencial de pesticidas como os HBG's e a ocorrência de um número crescente de casos de indivíduos com doenças neurológicas na atualidade, como o Parkinson, Alzheimer e transtornos afetivos como a depressão (HARRISON; MACKENZIE ROSS, 2016; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2018).

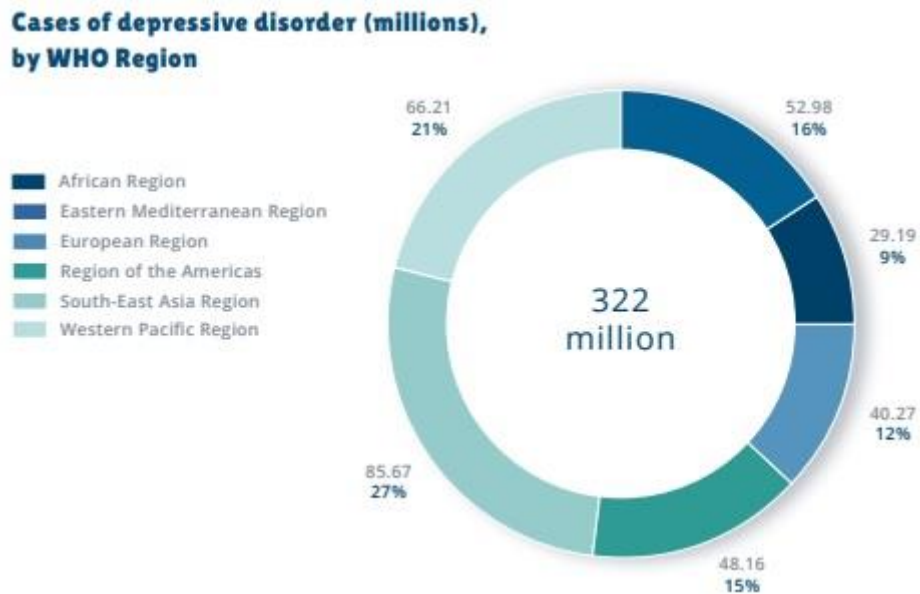
2.2 Depressão

A depressão, também denominada depressão maior (*Major Depressive Disorder/MDD*) ou depressão unipolar, consiste em um dos mais comuns transtornos mentais humanos, associada de forma negativa com a qualidade de vida, morbidade e mortalidade e funções cognitivas (BEHR; MOREIRA; FREY, 2012).

A sintomatologia da depressão é clinicamente heterogênea (CHUNG et al., 2013). No entanto, as mudanças comportamentais mais clássicas refletem no humor depressivo (tristeza), desmotivação, alteração (aumento/diminuição) no apetite e sono, atividades motoras (agitação/letargia), fadiga, perda da autoestima, perda da cognição (raciocínio, indecisão) e perspectiva (*hopeless*) (ABELAIRA; REUS; QUEVEDO, 2013).

Dessa forma, a depressão torna-se uma doença incapacitante do indivíduo para o convívio social pleno, cuja incidência crescente de casos é preocupante para a saúde pública (FERRARI et al., 2013) em âmbito global (Figura 4). Conforme Liu et al., (Article in press), a depressão apresentou no período dos 1990 a 2017 um aumento de incidência de 49,86%, sendo 93,7% dos casos, na forma de depressão maior. De acordo com recente estimativa, a WHO (2017) categorizou a depressão como o principal causador de incapacidade humana global em 2015, e como sendo a responsável por cerca de 800.000 mortes por suicídio por ano.

Figura 4 – Percentuais de casos de depressão divididos por regiões definidas pela WHO.



Fonte: WHO (2017)

A depressão é considerada uma doença multifatorial pois sua patogênese pode envolver condições diversas como a predisposição genética, alteração no padrão fisiológico das monoaminas, disfunção do eixo HPA (hipotálamo/pituitária/adrenal), diminuição de fatores neurotróficos (exemplo: *Brain Derived Neurotrophic Factor/BDNF*), aumento de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo (BELMAKER; AGAM, 2008; FAGUNDES et al., 2013; BALMUS et al., 2016)

Do ponto de vista fisiológico, indivíduos com a depressão apresentam alterações estruturais cerebrais mediadas por desequilíbrios em neurotransmissores e danos decorrentes do ambiente oxidativo e inflamatório (AL-HAKEIM; AL-RAMMAHI; AL-DUJAILI, 2015; BALMUS et al., 2016). A disfunção mitocondrial no CNS é um evento importante para geração de ERO's e tem sido associada a etiologia da depressão, desencadeando efeitos sobre a sinalização neuronal, integridade celular e neurogênese (HOVATTA; JUHILA; DONNER, 2010). Por essas razões, a mitocôndria tem adquirido um papel relevante para literatura voltada aos distúrbios de humor, nos temas relacionados as causas da depressão e possíveis tratamentos (ALLEN et al., 2018).

A constatação do aumento de marcadores relacionados ao estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica, alteração das defesas antioxidantes e presença de indicadores de inflamação como as citocinas, tem contribuído para caracterização da depressão como uma

doença inflamatória (BALMUS et al., 2016). Dessa forma, as abordagens terapêuticas devem considerar não apenas o restabelecimento dos níveis das monoaminas, mas também no equilíbrio do status oxidante e da redução dos efeitos e causas da neuroinflamação (BEHR; MOREIRA; FREY, 2012; PANDYA; HOWELL; PILLAI, 2013).

A propriedade antioxidante de alguns medicamentos voltados ao tratamento da depressão, como a fluoxetina, é descrita pela literatura, no entanto os efeitos colaterais decorrentes da utilização de compostos dessa natureza, tornam importante a seleção de novas substâncias com essa finalidade (CAIAFFO et al., 2016). Somado a esse fato, está a condição de que mesmo as terapias mais utilizadas na atualidade ainda apresentam um percentual baixo de eficácia e altos níveis de recidiva da condição enferma (HOLZMANN et al., 2015).

Tendo em vista a relevância da depressão como uma epidemia mundial, se torna imprescindível a busca por alternativas terapêuticas que auxiliem ou suplementem as terapias usuais. Este contexto, gera um campo da pesquisa em expansão, principalmente de compostos derivados de fontes naturais (PATHAK; AGRAWAL; DHIR, 2013).

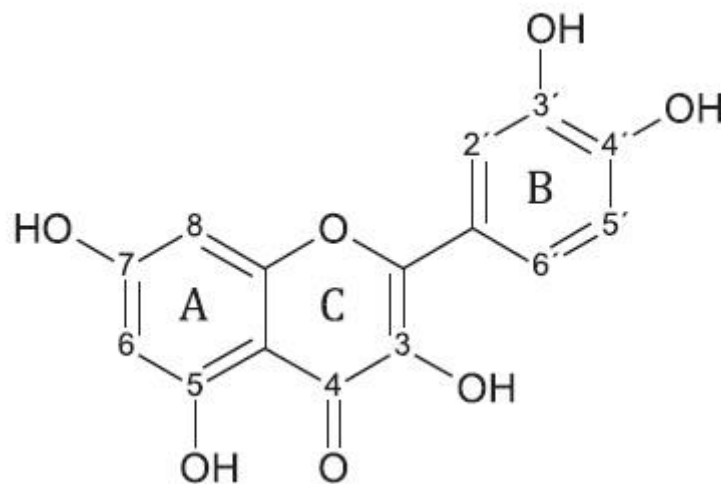
2.3 Quercetina

2.3.1 Conceitos gerais

Entre os compostos naturais, a quercetina tem sido tema frequente da literatura devido aos seus potenciais terapêuticos. A quercetina (*quercetum*, carvalho, *Quercus*) é um composto do grupo dos flavonoides, polifenóis derivados do metabolismo vegetal (D'ANDREA, 2015), presente em uma grande variedade de fontes alimentícias, podendo também ser encontrada na forma de suplemento nutricional (ANDRES et al., 2018).

De nomenclatura 2-(3,4-d-hidroxifenil)-3,5,7-tri-hidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona ou 3,30,40,5,7-pentahidroxiflavona, fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$ (mm = 302,24 g/mol) a quercetina apresenta-se como uma substância de cor amarela (T.F. 316 °C) na forma sólida, em condições ambiente (SUGANTHY et al., 2016). Sua estrutura química típica dos flavonoides consiste em dois anéis benzeno, um anel pirano contendo oxigênio e cinco grupos hidroxila (Figura 5), ocorrendo comumente na forma glicosilada, sendo a quercetina-O-glicosídeo a mais frequentemente encontrada em fontes vegetais (WANG et al., 2016). A quercetina aglicônica é encontrada em poucas quantidades nas fontes alimentares, consistindo na forma utilizada em suplementos (ANDRES et al., 2018).

Figura 5 – Estrutura molecular da quercetina



Fonte: Dajas et al., (2015)

A quercetina consiste no flavonoide naturalmente mais abundante nas fontes vegetais. De acordo com o tipo de dieta adotada, o consumo de quercetina nos alimentos pode variar de >5 mg a 40 mg por dia. No entanto, concentrações entre 200 e 500 mg podem ser alcançadas em consumidores de grande quantidade de frutas e vegetais (Tabela 2), assim como a forma de consumo também pode influenciar para o aumento da ingestão, por exemplo, com o consumo de vegetais com casca (D'ANDREA, 2015).

Tabela 2: Concentrações de quercetina em diferentes fontes alimentícias.

Fonte alimentícia	Conteúdo de Quercetina (mg/100g)
Frutas	
Maça (com casca)	4,42
Acerola	4,74
Damasco	2,55
Mirtilo (<i>blueberry</i>)	9,10
Mirica (<i>bayberry</i>)	4,36
Amora	3,58
Cereja	2,29
Oxicoco (<i>cramberry</i>)	14,84
Tâmara	0,93
<i>Elderberry</i>	26,77
Figo	5,47
Ameixa	12,45
<i>Rowanberry</i>	7,40
Groselha	1,23
<i>Gogi berry</i>	13,60
Uva	2,08
Caju	1,27

Fonte alimentícia	Conteúdo de Quercetina (mg/100g)
Vegetais e produtos	
Sementes de alfafa	1,70
Rúcula	7,92
Aspargo	13,98
Folha de louro	3,19
Feijão	2,73
Pólen de abelha	20,95
Brócolis	3,26
Acelga	7,50
Chicória	6,49
Coentro	52,90
Papoula	26,30
Funcho	48,80
Couve de folhas	7,71
Alface	7,61
Mostarda castanha	8,80
Quiabo	20,57
Cebola	20,30
Espinafre	3,97
Pimenta verde	15
Folhas de batata doce	16,94
Temperos e ervas	
Alcaparra	180,77
Endro	55,17
Orégano	7,30
Estragão	11
Açafrão	4,92
Cereais	
Trigo sarraceno	15,38
Farinha de trigo	3,47

Fonte: Adaptado de Suganthy et al., (2016)

Apesar disso, a biodisponibilidade da quercetina é considerada baixa, razão pela qual a estratégia para elevação da concentração do flavonóide tendo em vista os seus benefícios para a saúde é um campo de estudo da ciência (MORENO et al., 2017). Todavia, a forma química (aglicônica ou glicosilada) e a concentração adequada a finalidade terapêutica, ainda carecem esclarecimento científico (DAJAS et al., 2015).

2.3.2 Propriedades benéficas

A literatura tem associado a quercetina a uma grande diversidade de benefícios a saúde. Entre as propriedades da quercetina, cita-se sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer e preventiva de doenças cardiovasculares (WANG et al., 2016). Benefícios em tratamentos para obesidade, diabetes, artrites e transtornos afetivos podem ser mencionados, tornando a quercetina um composto terapêutico multifacetado (D'ANDREA, 2015).

Conforme Dajas et al., (2015), a estrutura química da quercetina contribui para o seu desempenho excepcional como antioxidante, possuindo a propriedade de atuar tanto como doadora quanto receptora de elétrons. Seu potencial como antioxidante e como quelante de metais estaria relacionado com a substituição orto dihidroxi (catecol) do anel B, a insaturação 2,3 e o grupo carbonil na posição 4 do anel C, além dos grupos OH nas posições 3 e 5 do anel heterocíclico (Figura 4).

Dessa forma, a quercetina apresenta uma ótima atividade *scavenger*, sendo o representante do grupo dos flavonoides mais potente em neutralizar ROS como O_2^- , $ONOO^-$ e NO^- , inibindo danos causados pela peroxidação lipídica, evento oxidativo associado ao desenvolvimento de diversas doenças como as de natureza cardiovascular e neurodegenerativas (ADEMOSUN et al., 2016).

A capacidade *scavenger* da quercetina também é um dos meios pelos quais ela apresenta propriedades anti-inflamatórias, tendo em vista que ao prevenir o estresse oxidativo, também evita sinalizações que desencadeiam a inflamação por fatores de transcrição como NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*), além de inibir citocinas pró inflamatórias como a IL6 (interleucina 6) e o TNF α (fator de necrose tumoral alfa) (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008).

No entanto, a propriedade antioxidante da quercetina não se restringe a sua atuação direta, mas também na sua contribuição como moduladora de agentes antioxidantes. A quercetina pode ter ação prooxidante, gerando quantidades moderadas de ROS a partir da ação de metabólitos denominados quercetina quinona (QQ), que são neutralizados às expensas de GSH (SUGANTHY et al., 2016). O estresse oxidativo leve estimula a síntese de mais GSH a partir da ativação do fator de transcrição Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), assim como de enzimas da família das paraoxonases (PON's) com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (COSTA et al., 2016).

2.3.3 Neuroproteção

Conforme a literatura, as propriedades benéficas da quercetina têm sido extensivas ao SNC, tornando-a uma potencial alternativa terapêutica no tratamento de enfermidades nesse sistema. A capacidade da quercetina em contrapor a neurotoxicidade mediada pelo estresse oxidativo e de modulação de fatores associados a neuroinflamação tem sido demonstrada a partir de testes *in vivo*, em modelos animais de doenças neurológicas (COSTA et al., 2016).

Mehta; Parashar; Udayabanu (2017) verificaram a partir de um modelo de estresse crônico em roedores, a ocorrência do comportamento tipo ansioso e depressivo, além de

alterações cognitivas as quais os autores atribuíram a elevação de marcadores de estresse oxidativo como peroxidação lipídica, aumentos nos níveis de ROS, assim como a expressão de citocinas e ciclooxigenase 2 (COX2) no hipocampo dos animais. A utilização de quercetina foi capaz de prevenir a mudança comportamental nos animais, por meio da redução dos marcadores de estresse oxidativo e inflamação, e aumento das defesas antioxidantes.

Em estudo semelhante, mas utilizando o modelo de privação do sono em roedores, no intuito de obtenção do comportamento maníaco, o estresse oxidativo foi prevenido pela quercetina, nas regiões do estriado e córtex pré frontal (KANAZAWA et al., 2016).

Holzmann et al., (2015), a fim de verificar os efeitos antidepressivos da quercetina, utilizou o modelo de bulbectomia olfatória em roedores, resultando em alterações comportamentais compatíveis com a enfermidade, representados pelo maior tempo de imobilidade dos animais nos testes de nado forçado, suspensão da cauda e menor tempo dedicado a higiene no *splash test*. A diminuição de GSH, aumento da superóxido dismutase (SOD) e dos níveis do radical hidropéroxido lipídico (LOOH) também foram verificados no hipocampo. O tratamento subsequente com quercetina por 14 dias, permitiu a reversão das alterações comportamentais e a diminuição da concentração de LOOH nos animais tratados, revelando o potencial antidepressivo da quercetina, como auxiliar no tratamento da depressão.

A capacidade neuroprotetora da quercetina também pôde ser evidenciada no estudo de Gharemani; Soodi; Atashi (2018) ao adotar um modelo de exposição animal ao clorpirifós, um inseticida organofosforado e indutor de estresse oxidativo no SNC. Conforme os autores, o mecanismo capaz de amenizar o estresse oxidativo provocado pelo inseticida foi a modulação da enzima PON2, através da administração da quercetina.

Os mecanismos antidepressivos da quercetina também puderam ser descritos em trabalhos como os de Khan et al., (2019) e Singh et al., (2019) em que foi verificado através de modelos animais de estresse crônico leve, que além de atuar de forma significativa na diminuição do estresse oxidativo e marcadores inflamatórios, o flavonoide possibilitou a elevação dos níveis de 5-HT, contribuindo assim para o metabolismo da serotonina e melhora da condição comportamental tipo depressiva. Condição semelhante foi descrita por Samad et al., (2018) a partir de um modelo animal, em que além das ações antioxidantes, anti-inflamatórias e de aumento dos níveis de serotonina, verificaram efeito inibitório da quercetina sobre a atividade da AChE, desencadeando assim uma melhora significativa nos testes comportamentais de depressão, ansiedade e memória.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

- Avaliar a capacidade de uma subdose de um herbicida à base de glifosato em promover alterações comportamentais dos tipos ansiosa e depressiva, e efeitos sobre parâmetros bioquímicos no sistema nervoso central de camundongos, a partir de um modelo de exposição subcrônica a este agente tóxico.
- Analisar o potencial terapêutico da quercetina em contrapor os efeitos decorrentes da exposição ao herbicida à base de glifosato, através dos seus mecanismos antioxidantes.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar por meio de testes comportamentais, a ocorrência de alterações de natureza tipo ansiosa e tipo depressiva, nos diferentes grupos experimentais;
- Mensurar marcadores de estresse oxidativo na região do hipocampo dos camundongos;
- Quantificar os efeitos dos tratamentos adotados sobre a síntese de neurotransmissores na região dorsal do núcleo da rafe (serotonina, dopamina e noradrenalina);
- Avaliar estruturalmente no hipocampo as consequências dos diferentes tratamentos através da histologia.

4 MANUSCRITO

Os resultados obtidos neste trabalho, serão apresentados na forma de manuscrito. Dessa forma, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências estão incluídas no corpo do texto, o qual seguirá as normas exigidas pelo periódico *Toxicology* para subsequente submissão.

**NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF QUERCETIN IN MICE EXPOSED TO A
SUBCHRONIC LOW DOSE OF A GLYPHOSATE BASED HERBICIDE**

Diogo Ferreira Bicca^a, Cristiano Chiapinotto Spiazzi^a, Juliana Bernera Ramalho^a, Melina Bucco Soares^a, Francielli Weber Santos Cibirin^{a*}

^a Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech), Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa, CEP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil.

*Corresponding author:

Francielli W. S. Cibirin

Present address: Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil.

Phone: 55 55 34134321

E-mail: francielliweber@yahoo.com.br

ABSTRACT

As symptoms following exposure to pesticides such as glyphosate based herbicides (GBH's) and those of neurological diseases such as depression are similar, it has been hypothesized that pesticide exposure has an association with neurological diseases. The aim of this study was to investigate whether quercetin use would protect against neurological changes following exposure to a subchronic low dose of a GBH. Forty adult male Swiss mice were divided into four treatment groups: Control, Glyphosate, Quercetin and Gly+Quer groups. According to the group, mice received 50 mg/kg a GBH solution, 30 mg/kg of quercetin and/or vehicles, via gavage for 30 days. The animals were subjected to behavioral tests, including open field (OF), elevated plus maze (EPM), forced swim test (FST) and sucrose preference test (PST). After euthanasia, hippocampal tissues were collected to measure oxidative stress markers such as reactive species (REs), total antioxidant capacity (FRAP), reduced glutathione (GSH), acetylcholinesterase activity (AChE) and for histological evaluation. The dorsal raphe nucleus was collected for neurotransmitter analysis. The glyphosate group showed anxious and depressive-like behavior in the EPM and FST tests, as well as expressed increased RE levels and decreased GSH levels in the hippocampus. The quercetin group showed similar behavior as the glyphosate group after treatment, with no alterations in the other parameters evaluated. However, the gly+quer group showed partial or total improvement in behavioral tests (EPM, FST) and reduced oxidative stress markers (REs and GSH). The results reveal that exposure to a subchronic low dose of a GBH was capable of promoting alterations in the central nervous system. Furthermore, this study demonstrated the existence of an apparent quercetin paradox, the benefits of which could be enhanced by hormesis mechanisms.

Key words: glyphosate; depression; quercetin; pesticides; behavior; oxidative stress

1. INTRODUCTION

Glyphosate-based herbicides (GBH's), where glyphosate (N-phosphonomethyl glycine) is the active ingredient, is the most widely used herbicide worldwide. The increased use of GBHs in food production such as for weed resistance, during planting, and post-harvest has contributed to the rising concern over abundance of GBH residues that remain in food intended for consumption (Myers et al. 2016).

Glyphosate has the ability to cause systemic effects and has been the focus of several toxicological studies, including those investigating consequences of exposure on nervous system integrity (Ait Bali et al. 2017). It has previously been shown that glyphosate is capable of crossing the blood-brain barrier (Martinez et al. 2018), promoting effects as increased markers of oxidative stress and glutamate excitotoxicity, factors that will contribute to ultimately cell death (Cattani et al. 2017).

Actions mediated by GBHs in the central nervous system allow the establishment of an association between increased exposure and the current increased occurrence of patients with neurological diseases (Harrison and Mackenzie Ross 2016; Mostafalou and Abdollahi 2018), such as depression.

Physiologically, individuals with depression present with brain structural changes mediated by neurotransmitter imbalances and damage due to the oxidative and inflammatory environment (Al-Hakeim et al. 2015; Balmus et al. 2016). Therefore, it is imperative that the development of new therapies for neurological diseases focus not only on restoring monoamine levels, but also on balancing oxidant status and reducing both the effects and causes of neuroinflammation (Behr et al. 2012; Pandya et al. 2013).

The search for alternative compounds that help or supplement usual therapies is a branch of expanding research. Quercetin, a flavonoid derived from plant metabolism, is present in a wide variety of food sources and is used as a nutritional supplement (Andres et al. 2018).

Quercetin has been reported to have antioxidant potential due to its chemical structure, which contributes for its exceptional scavenger activity (D'Andrea 2015). Furthermore, it plays also a modulating role in antioxidant and anti-inflammatory mechanisms (Suganthy et al. 2016).

In specific depression rodent models, such as olfactory bulbectomy (Holzmann et al. 2015) and chronic stress (Mehta et al. 2017a), quercetin has been shown to play a significant role in protecting against deleterious effects by decreasing biochemical markers of oxidative stress and inflammation.

This study aimed to evaluate the consequences of subchronic exposure to low doses of a GBH to verify its effects on the central nervous system of mice and to analyze the effects of supplementation with quercetin to determine the potential role of this compound in the prevention and treatment of neurological diseases.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Forty adult (60 days old) male Swiss mice, from the Federal University of Santa Maria vivarium, were used to carry out the experiment. During the experimental period, the animals were kept in cages with maximum capacity of five animals, with controlled temperature ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), 12-hour light/dark cycles, pelleted feed and water *ad libitum*, placed on Pampa Federal University vivarium, in Uruguaiiana Campus. The experimental procedures followed the rules established by the Animal Use Ethics Committee (CEUA), in accordance with the Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) under the Protocol n°029/2017.

2.2 Chemicals

GBH by the brand Zamba[®] (Atanor do Brasil LTDA), registered on the Ministry of Agriculture and Supply (MAPA) under n° 003707, containing N phosphonomethyl glycine isopropilamine salt at 48 % m/v- 480 g/L of the active ingredient was used, as it is a commercial

form with similar concentration of brands marketed. Quercetin was acquired from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). All others chemicals were of analytical grade and obtained from commercial suppliers.

2.3 Experimental Design

Animals were treated with GBH and/or quercetin, with vehicle used as a control, daily for 30 days, which corresponded to the subchronic exposure period (EPA) (1993). Treatments were administered by gavage with an interval of thirty minutes between each procedure. A GBH solution was diluted with distilled water to obtain a dose of 50 mg/kg, the lowest no observed adverse effect level (NOAEL) referenced in the European Union for the definition of acceptable daily consumption (State 2013), which corresponded to 10 % of NOAEL for mice. Quercetin was prepared according to Mehta et al. (2017a) studies, at a concentration of 30 mg/kg in 0.3 % carboxymethylcellulose solution (CMC). Both preparations were performed daily.

Four experimental groups with 10 animals in each group were defined as Control, Glyphosate, Quercetin and Gly+Quer, and received the solutions according to the group. On the 25th day, behavioral testing began, followed by euthanasia on the 31st day when samples were collected to perform subsequent analyses. Mouse hippocampus were selected for biochemicals and histological evaluations. For neurotransmitter analysis, regions of dorsal raphe nucleus were selected from animals of different groups. The experimental procedure is shown in Fig. 1.

2.4 Behavioral Tests

2.4.1 Open Field Test (OF)

In order to evaluate possible locomotor alterations and exploratory capacity of the animals, the method of Mello et al. (2009) was used. For the test, animals were placed one at a

time in an apparatus of 30x25x20 cm dimensions, with the floor divided into twelve rectangle areas delimited by lines. These lines were used to count the number of crossings performed by each animal, from one area to another. The rearing behavior, characterized by an animal standing on their hind legs, was also considered for analysis. Crossings and rearings were counted during a period of 5 minutes. Each test was registered with a digital camera for further evaluation.

2.4.2 Elevated Plus Maze Test (EPM)

To verify the occurrence of anxious behavior, the mice were subjected to the EPM test according to Pellow et al. (1985). Mice were placed individually in an apparatus containing four orthogonal arms, two closed (30 x 8 x 15 cm) and two open (30 x 8 cm) forming a cross, with a central platform (8 x 8 cm). Time in open and closed arms were evaluated in each mouse over a 5 minute period, as well as the number of crossings from one arm to another.

2.4.3 Forced Swim Test (FST)

The Porsolt et al. (1977) forced swim test aims to analyze the presence or absence of depressive-like behavior. The procedure involved individually placing the animal in cylinders with water, at an average temperature of 25 °C, for a period of 6 minutes. The last 4 minutes are used for behavioral analysis, recording the immobility and swimming times for each animal.

2.4.4 Sucrose Preference Test (SPT)

At the end of the experimental period, mice were subjected to a test to verify the degree of anhedonia, represented by the loss of pleasure characteristic illustrating depressive-like behavior through the adapted technique of Elizalde et al. (2010). Two containers were made available to mice, one containing water and the other a 1 % sucrose solution, removing the food

from animals during a 15-hour period (18:00 - 09:00). At the end of the period, the containers were weighed, and the volumes registered, and subjected to the following calculation:

$$\text{Sucrose Preference Test (\%)} = \frac{\text{Sucrose Consumption}}{\text{Total Consumption}} * 100$$

2.5 Biochemicals Assays

2.5.1- Tissue preparation

After euthanasia, the mouse hippocampus selected for biochemical analysis was homogenized in 50 mM TRIS HCl, pH 7.4 (1/10, w/v). Samples were then centrifuged at 2400 rpm for 10 minutes, and the supernatants used in the following analysis.

2.5.2 Reactive Species (RSs)

Determination of RSs levels in hippocampal samples was performed using the spectrofluorimetric method (Loetchutinat et al. 2005), by assessing the oxidation reaction of 2,7-dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA), whose intensity is associated with increased intracellular RSs. The reading is taken at 520 nm emission (with 488 nm extinction) 60 minutes after the addition of DCHF-DA. Results were expressed in units of fluorescence (UF).

2.5.3 Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP)

The antioxidant potential was analyzed in each hippocampus and it was verified by the ability of iron ion reduction to ferrous state at low pH (Benzie and Strain 1996). The formation of an intense blue colored product is quantified by spectrophotometry at 593 nm, using a standard curve made with the ascorbic acid antioxidant. Results were expressed as μg of ascorbic acid equivalents.

2.5.4 Reduced Glutathione (GSH)

Mouse hippocampus was subjected to Ellman (1959) technique for determination of non-protein thiols. Samples were diluted with 10 % trichloroacetic acid to remove precipitating protein components after centrifugation. The supernatant was used for the reaction with 5,5'-dithio-bis-nitrobenzoic acid promoting TNB release, measured at 412 nm, which was proportional to the concentration of GSH in the samples and expressed in nmol NPSH/g tissue.

2.5.5 Acetylcholinesterase (AChE)

To determine AChE activity in each hippocampus sample, the method of Ellman et al. (1961) was performed, using acetylthiocholine as a substrate. The reaction product was a yellow anion, 5,5'-dithio-bis-nitrobenzoic acid, measured at 412 nm. The AChE activity was expressed in $\mu\text{mol ASCh/hour/mg protein}$.

2.6 Neurotransmitter levels in the dorsal raphe nucleus

Dorsal raphe nucleus regions were selected for determination of serotonin levels because it consists in a brain region that presents several serotonergic neurons bodies, and whose dysfunction is associated with mood disorders (Michelsen et al. 2008). In order to complement the effects of treatments on neurotransmitters in this region, dopamine and norepinephrine levels were also measured. Concentrations were determined with High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD), Young Lin model (YL 9100) equipped with quaternary pump and auto sampler. The quantification method was isocratic, using a mobile phase ultrapure water + 12.5% methanol - pH 2.76 solution. An Inertsil ODS-3 analytical column. 5 μm ; 4.6 x 250 mm (GL Sciences) was used. Readings were taken at 192 nm.

2.7 Histology

The hippocampal sample selected for histological evaluation were prepared according to Jang et al. (2010). Tissue samples were fixed in formalin 10%, before progressive dehydration in varying percentages of ethanol baths. Samples were paraffin embedded, mounted in blocks and cut into 5 micron slices by a microtome. The microscopic slides were then stained with Hematoxylin and Eosin.

2.8 Statistical analysis

Normality distribution for the data was assessed, using Shapiro-Wilk test. Data were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Results with parametric distribution were analyzed by one-way ANOVA, with applied post hoc Tukey test when necessary. The Kruskal-Wallis test followed by Duns post hoc was used for non-parametric distribution data. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7.00 software. Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Behavior tests

3.1.1 Open field

The open field test showed that there were no significant changes in crossings (Control: 137; Glyphosate: 152; Quercetin: 119,5 e Gly+Quer: 123) as shown in Fig. 2, and in the number of rearings (data no shown) during the evaluation period. This suggested that there were no behavioral changes associated with treatment regarding the exploratory behavior of the animals.

3.1.2 EPM

In EPM test, anxious behavior is reported when the animal seeks protection from exposed places (open arms) by remaining in protected (closed arms) places and decreasing their exploratory behavior out these areas. Fig. 3a shows that the Glyphosate group, unlike the

Control group, avoided entry into open environments (mean values of entries of 5.37 times against 9.55 times). Furthermore, this was also observed in the Quercetin group (5.44 entries). However, the Gly+Quer group showed partial improvement in this criterion (8.5 entries). The behavioral difference in this test was also evident on the permanence time in open arms (Fig. 3b), where the Quercetin group also spent less time in open arms (mean of 71.86 seconds), while the Glyphosate and the Gly+Quer group obtained means equivalent with the Control (means of 82.9, 97.3 and 104.7 seconds, respectively).

3.1.3 FST

The immobility time is associated with depression-like behavior and demonstrates the initiative of the animal to ensure survival in an aquatic environment. Differences in this criterion were observed between individuals of the Control group (mean time of 103.6 seconds) and individuals of the Glyphosate and Quercetin groups (means of 163 and 153.8 seconds, respectively), which presented longer immobility time (Fig.4). However, the Gly+Quer group showed similar behavior to that of the Controls (mean 90.2 seconds), showing significant differences in relation to the Glyphosate and Quercetin groups.

3.1.4 SPT

SPT, to detect anhedonia-like behavior, showed no significant differences between treatment groups for equivalent consumption of sucrose solution volumes made available to animals, as shown in Fig. 5.

3.2 Oxidative stress markers

3.2.1 RSs

Animals exposed to glyphosate showed an increase in RS levels in the hippocampus (mean values of 204.1 UF) compared to those in the Control group (123.2 UF), which did not

differ significantly from the Quercetin and Gly+Quer groups (145.6 UF and 148.8 UF, respectively) (Fig. 6a).

3.2.2 FRAP

The effects on total antioxidant potential in the hippocampus were not observed by FRAP analysis in any of the treatments as shown in Fig. 6b.

3.2.3 Reduced GSH

The mean values of GSH in the hippocampus decreased in the Glyphosate group (223.9 nmol NPSH/g tissue) when compared to those of the Control (385.2 nmol NPSH/g tissue) and Quercetin (390.9 nmol NPSH/g tissue) groups which did not differ significantly (Fig. 6c). The Gly+Quer group (355.1 nmol NPSH/g tissue) presented a partial improvement in hippocampus GSH levels (Fig.6c).

3.2.4 AChE activity

No significant difference in AChE enzyme activity was observed each hippocampus of the different experimental groups as shown in Fig. 7.

3.3 Determination of neurotransmitter levels

There were no significant differences regarding neurotransmitter concentrations in the dorsal raphe nucleus portion in the different treatment groups of this study, as shown in Fig. 9.

3.4 Histological findings

Microscopic analysis of mouse hippocampus showed that no structural differences were found when comparing treatment groups (Fig.10). The degree of cellularity and morphology of cells at the pyramidal stratum was similar, in relation to the control group. Furthermore, the

occurrence of glial cells and the presentation of the layers (number of layers) of the hippocampal granular region was similar between groups. Vacuolization and the occurrence of blood vessels were discretely visualized in samples of different groups, but with no significative differences on structures.

4. DISCUSSION

Increasing human exposure to agricultural pesticides and the possible association with disease incidence is a growing concern in the scientific world today. Dietary exposure of glyphosate residues has turned necessary the emission of reports from government agencies as EPA and Germany Rapporteur Member State, on setting safe limits known as Acceptable Daily Consumption. However, the consumption of GBH residues becomes difficult to control due to the variability of concentrations found in the food consumed (Myers et al. 2016). Anadon et al. (2009) evaluated the pharmacokinetics of glyphosate and its metabolite AMPA (aminophosphonic acid) and found that even with low intestinal absorption, both compounds have an average biological half-life of 14 hours. Thus, body levels can increase significantly with diet, resulting in chronic exposure to small doses.

In fact, the highlight of our study is the depressive-like behavior in animals that received a low dose of the GBH. More studies have been carried out with higher doses of glyphosate to verify behavioral alterations in several animal models. However, few studies have investigated low doses and this would be beneficial as it would be more compatible for mimicking the exposure of the general population to this pesticide. Furthermore, our study identified potential mechanisms that could be involved in the development of depressive-like behavior.

In this context, Ait Bali et al. (2017) identified the presence of anxious and depressive-like behavior in animals exposed to an herbicide, working with doses ranging from 250 to 500 mg/kg, in both subchronic (6 weeks) and chronic (12 weeks) models. Similarly, Baier et al.

(2017) found the occurrence of behavioral changes, using 50 mg/kg of herbicide through intranasal administration. When studying the effects of maternal exposure in rats, Cattani et al. (2017) and Gallegos et al. (2016) found effects on their offspring, which showed significant changes in behaviors. Our study compliments these results, highlighting the potential of the herbicide to produce effects with a low and subchronic dose.

Though in our study the treatment with quercetin showed beneficial effects in restoring the glyphosate effects, animals that received quercetin without GBH presented a depressive-like and anxious-like behavior similar to animals that received GBH solution. This result was interesting as quercetin has been used in several studies with beneficial effects without side effects. To our knowledge, this effect of quercetin on the depressive or anxious-like behaviors had not been described in the literature. Our study was based on the different treatment times adopted by Mehta et al. (2017a), and used continuous daily supplementation as this compound is also marketed for human consumption for this purpose. Thus, while the experimental protocols worked at dosages of 10 mg/kg and 40 mg/kg (Kanazawa et al. 2016) by intraperitoneal route and orally at 25 mg/kg (Holzmann et al. 2015) and 30 mg/kg (Mehta et al. 2017b) for periods of 14 to 21 days, respectively, comparing with these studies, we used the higher concentration for a longer treatment period. The prooxidant effect of quercetin has been described in the literature to induce apoptosis in cell cultures, with its effects being dose dependent (Robaszekiewicz et al. 2007). Furthermore, the chronic use of quercetin has been shown to alter the functionality of thyroid cells in a cell culture model. This raises questions regarding its effects on thyroid function, an important regulatory gland for body metabolism (Giuliani et al. 2014), and suggests that quercetin has the potential to alter this pathway when used chronically.

Nevertheless, the effect of quercetin resulted in benefits which presented as partial or total reversion of the anxious/depressive-like behavior that could be related the differences in

oxidative markers found in the mouse hippocampus of the Gly+Quer group. The ability of glyphosate to induce the formation of an oxidizing environment in the brain, via generation of reactive species, compared to controls was verified and a previous study confirmed glyphosate has the capacity to pass through the blood-brain barrier and produce local effects in the brain (Martinez et al. 2018). Oxidative stress provoked by glyphosate exposure is suggested to be one of the potential mechanisms behind the depressive-like symptoms (Cattani et al. 2014). Previous studies that aimed to diminish glyphosate effects used extracts from *Ginkgo biloba* (Cavusoglu et al. 2011) and specifically in the central nervous system from *Morus alba* (Rebai et al. 2017). These studies showed positive results by alleviating oxidative stress markers.

Besides the findings on behavior, quercetin did not change levels of reactive species demonstrating the absence of the effect for this parameter. The ability of quercetin to reverse the symptoms caused by toxic agents in the nervous system has also been found by Ghahremani et al. (2018). This study used a model of chlorpyrifos exposure and showed that the flavonoid benefits were based on counteracting oxidative stress effects by modulating brain PON2 enzyme. In our study, the partial recovery of GSH levels in the Gly + Quer group allows the establishment of the negative relation of the herbicide with this parameter, which seems to be stimulated by the effects of quercetin. Costa et al. (2016) explains the beneficial ability of quercetin, based on hormesis mechanisms, as they promote the increase of antioxidant forms through prooxidant stimuli. The relationship of quercetin with GSH is described in the literature as beneficial when peptide levels are satisfactory to convert quercetin to quinone, an oxidative form derived from the flavonoid metabolism, promoting increased GSH concentrations (Suganthi et al. 2016).

Despite the increase in reactive species observed in the hippocampus of the Glyphosate group, there was no significant differences in total antioxidant capacity between treatment groups. The same findings could be shown in the activity of the enzyme AChE. The inhibitory

capacity of organophosphates and the characteristic of these compounds is well known. However, glyphosate requires larger concentrations to cause effects on enzyme activity. According to Larsen et al. (2016), glyphosate is a weak AChE inhibitor compared to other organophosphates, and environmental levels would be a low risk in this regard. In Bali et al. (2019), there was a significant decrease of the AChE enzyme activity in brain in mice treated with higher concentrations (250 and 500 mg/kg) of glyphosate.

Neurotransmitter analysis revealed unchanged neurotransmitter levels following treatments. Martinez et al. (2018) evaluated the effects of increasing glyphosate doses in rats. This study showed a significant decrease in serotonin, dopamine and norepinephrine concentrations in different brain regions with treatment of glyphosate at concentrations greater than 75 mg/kg, unlike our study with 50 mg/kg. However, due to changes in oxidative stress markers and the tendency of the herbicide to accumulate in the central nervous system, the possibility of different results in long term studies is not ruled out.

Similarly, from the histological analysis of mouse hippocampus, it was found that despite the effects of glyphosate exposure previously mentioned, they were not visualized in the organ structure. Other studies have shown effects on hippocampal structure in animals exposed to herbicides such as dioxins (Rosinczuk et al. 2015). Although, subchronic exposure to the insecticide compound permethrin showed oxidative stress and behavioral changes however, with no histological changes (Gasmi et al. 2017).

5. CONCLUSIONS

This study highlights the need to review the use of compounds such as GBH's, based on new studies aiming for greater safety for the population and regarding the effects of long-term exposure at lower pesticide doses. Furthermore, the effects of antioxidants in the treatment of neurological diseases, such as depression, must be considered. However, the use of these

compounds for supplementary purposes needs to be investigated in future studies, especially regarding dosage and the point of view of constant use.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The National Council for Scientific and Technological Development – CNPQ is acknowledged for financial support to F.W.S.C., and FAPERGS are acknowledged for financial support to J.B.R. (Dr. Fellowships).

REFERENCES

- (EPA), U.E.P.A. 1993. Reregistration eligibility decision (RED): glyphosate. U.S. environmental protection agency (US EPA), office of prevention, pesticides, and toxic substances.
- Ait Bali, Y., Ba-Mhamed, S. and Bennis, M. 2017. Behavioral and Immunohistochemical Study of the Effects of Subchronic and Chronic Exposure to Glyphosate in Mice. *Front Behav Neurosci* 11, 146.
- Al-Hakeim, H.K., Al-Rammahi, D.A. and Al-Dujaili, A.H. 2015. IL-6, IL-18, sIL-2R, and TNFalpha proinflammatory markers in depression and schizophrenia patients who are free of overt inflammation. *J Affect Disord* 182, 106-114.
- Anadon, A., Martinez-Larranaga, M.R., Martinez, M.A., Castellano, V.J., Martinez, M., Martin, M.T., Nozal, M.J. and Bernal, J.L. 2009. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicol Lett* 190, 91-95.
- Andres, S., Pevny, S., Ziegenhagen, R., Bakhiya, N., Schafer, B., Hirsch-Ernst, K.I. and Lampen, A. 2018. Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. *Mol Nutr Food Res* 62.
- Baier, C.J., Gallegos, C.E., Raisman-Vozari, R. and Minetti, A. 2017. Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. *Neurotoxicol Teratol* 64, 63-72.
- Bali, Y.A., Kaikai, N.E., Ba-M'hamed, S. and Bennis, M. 2019. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology* 415, 18-25.

Balmus, I.M., Ciobica, A., Antioch, I., Dobrin, R. and Timofte, D. 2016. Oxidative Stress Implications in the Affective Disorders: Main Biomarkers, Animal Models Relevance, Genetic Perspectives, and Antioxidant Approaches. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 3975101.

Behr, G.A., Moreira, J.C. and Frey, B.N. 2012. Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: implications for the pathophysiology of major depressive disorder. *Oxid Med Cell Longev* 2012, 609421.

Benzie, I.F. and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239, 70-76.

Cattani, D., Cesconetto, P.A., Tavares, M.K., Parisotto, E.B., De Oliveira, P.A., Rieg, C.E.H., Leite, M.C., Prediger, R.D.S., Wendt, N.C., Razzera, G., Filho, D.W. and Zamoner, A. 2017. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Toxicology* 387, 67-80.

Cattani, D., de Liz Oliveira Cavalli, V.L., Heinz Rieg, C.E., Domingues, J.T., Dal-Cim, T., Tasca, C.I., Mena Barreto Silva, F.R. and Zamoner, A. 2014. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology* 320, 34-45.

Cavusoglu, K., Yapar, K., Oruc, E. and Yalcin, E. 2011. Protective effect of Ginkgo biloba L. leaf extract against glyphosate toxicity in Swiss albino mice. *J Med Food* 14, 1263-1272.

Costa, L.G., Garrick, J.M., Roque, P.J. and Pellacani, C. 2016. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 2986796.

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

Elizalde, N., Garcia-Garcia, A.L., Totterdell, S., Gendive, N., Venzala, E., Ramirez, M.J., Del Rio, J. and Tordera, R.M. 2010. Sustained stress-induced changes in mice as a model for chronic depression. *Psychopharmacology (Berl)* 210, 393-406.

Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr. and Feather-Stone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7, 88-95.

Gallegos, C.E., Bartos, M., Bras, C., Gumilar, F., Antonelli, M.C. and Minetti, A. 2016. Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring. *Neurotoxicology* 53, 20-28.

Gasmi, S., Rouabhi, R., Kebieche, M., Boussekine, S., Salmi, A., Toualbia, N., Taib, C., Bouteraa, Z., Chenikher, H., Henine, S. and Djabri, B. 2017. Effects of Deltamethrin on striatum and hippocampus mitochondrial integrity and the protective role of Quercetin in rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 24, 16440-16457.

- Ghahremani, S., Soodi, M. and Atashi, A. 2018. Quercetin ameliorates chlorpyrifos-induced oxidative stress in the rat brain: Possible involvement of PON2 pathway. *Journal of Food Biochemistry* 42, e12530.
- Giuliani, C., Bucci, I., Di Santo, S., Rossi, C., Grassadonia, A., Piantelli, M., Monaco, F. and Napolitano, G. 2014. The flavonoid quercetin inhibits thyroid-restricted genes expression and thyroid function. *Food Chem Toxicol* 66, 23-29.
- Harrison, V. and Mackenzie Ross, S. 2016. Anxiety and depression following cumulative low-level exposure to organophosphate pesticides. *Environ Res* 151, 528-536.
- Holzmann, I., da Silva, L.M., Correa da Silva, J.A., Steimbach, V.M. and de Souza, M.M. 2015. Antidepressant-like effect of quercetin in bullectomized mice and involvement of the antioxidant defenses, and the glutamatergic and oxidonitrgic pathways. *Pharmacol Biochem Behav* 136, 55-63.
- Jang, S., Dilger, R.N. and Johnson, R.W. 2010. Luteolin inhibits microglia and alters hippocampal-dependent spatial working memory in aged mice. *J Nutr* 140, 1892-1898.
- Kanazawa, L.K.S., Vecchia, D.D., Wendler, E.M., Hocayen, P.A.S., Dos Reis Livero, F.A., Stipp, M.C., Barcaro, I.M.R., Acco, A. and Andreatini, R. 2016. Quercetin reduces manic-like behavior and brain oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation in mice. *Free Radic Biol Med* 99, 79-86.
- Larsen, K.E., Lifschitz, A.L., Lanusse, C.E. and Virkel, G.L. 2016. The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 45, 41-44.
- Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J.-P. and Mankhetkorn, S. 2005. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry* 72, 323-331.
- Martinez, M.A., Ares, I., Rodriguez, J.L., Martinez, M., Martinez-Larranaga, M.R. and Anadon, A. 2018. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. *Environ Res* 161, 212-219.
- Mehta, V., Parashar, A. and Udayabanu, M. 2017a. Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and inflammatory stress. *Physiol Behav* 171, 69-78.
- Mehta, V., Singh, T.R. and Udayabanu, M. 2017b. Quercetin ameliorates chronic unpredicted stress-induced behavioral dysfunction in male Swiss albino mice by modulating hippocampal insulin signaling pathway. *Physiol Behav* 182, 10-16.
- Mello, P.B., Benetti, F., Cammarota, M. and Izquierdo, I. 2009. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiol Learn Mem* 92, 364-369.

- Michelsen, K. A., Prickaerts, J., Steinbusch, H. W. 2008. The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 172, 233-64.
- Mostafalou, S. and Abdollahi, M. 2018. The link of organophosphorus pesticides with neurodegenerative and neurodevelopmental diseases based on evidence and mechanisms. *Toxicology* 409, 44-52.
- Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G., Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnage, R., Vandenberg, L.N., Vom Saal, F.S., Welshons, W.V. and Benbrook, C.M. 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health* 15, 19.
- Pandya, C.D., Howell, K.R. and Pillai, A. 2013. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46, 214-223.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. and Briley, M. 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14, 149-167.
- Porsolt, R.D., Bertin, A. and Jalfre, M. 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229, 327-336.
- Rebai, O., Belkhir, M., Boujelben, A., Fattouch, S. and Amri, M. 2017. *Morus alba* leaf extract mediates neuroprotection against glyphosate-induced toxicity and biochemical alterations in the brain. *Environ Sci Pollut Res Int* 24, 9605-9613.
- Robaszkiewicz, A., Balcerczyk, A. and Bartosz, G. 2007. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int* 31, 1245-1250.
- Rosinczuk, J., Dymarek, R. and Calkosinski, I. 2015. Histopathological, ultrastructural, and immunohistochemical assessment of hippocampus structures of rats exposed to TCDD and high doses of tocopherol and acetylsalicylic acid. *Biomed Res Int* 2015, 645603.
- State, G.R.M. 2013. Glyphosate Renewal Assessment Report.
- Suganthy, N., Devi, K.P., Nabavi, S.F., Braidy, N. and Nabavi, S.M. 2016. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. *Biomed Pharmacother* 84, 892-908.

Legends

Figure 1. Schematic drawing of the experimental procedure.

Figure 2. Number of crossings on the Open Field Test. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 8). Different lowercase letters represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

Figure 3. a) Number of entries on open arms of EPM. b) The average time of permanence in open arms. Data are reported as mean \pm SEM (n = 8). Different lowercase letters represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

Figure 4. Time of immobility on FST in seconds. Data are reported as mean \pm SEM (n = 8 - 10). Different lowercase letters represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

Figure 5. Percentage consumption of sucrose solution by treatment groups. Data are reported as mean \pm SEM (n = 8). Different lowercase letters represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

Figure 6. Oxidative stress markers in mice's hippocampus. a) Levels of reactive species (RS) from different groups of treatment. Data are reported as mean \pm SEM (n = 6) as UF. b) Effect of different treatment on the total antioxidant potential. Data are reported as mean \pm SEM (n = 6). Results were expressed as μg ascorbic acid equivalent. c) Fig 9. Levels of GSH in mice hippocampus. Data are reported as mean \pm SEM (n = 6) and expressed as nmol NPSH/g tissue. Different lowercase letters represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

Figure 7. Activity of AChE in mice hippocampus. Data are reported as mean \pm SEM (n = 6) and expressed as $\mu\text{molAcSCh}/\text{hour}/\text{mg}$ protein. Different lowercase letters represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

Figure 8. Levels of neurotransmitters in dorsal raphe nucleus of mice's brains. a) Serotonin levels. b) Dopamine levels. c) Noradrenaline levels. Data are reported as mean \pm SEM (n = 4) and expressed as ng/mg. Different lowercase letters represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

Figure 9. General view of a Control animal hippocampus. a) Layers of hippocampus (* pyramidal layer, + molecular layer, -> granular layer). Enlargement 100x. b) Cellularity of pyramidal layer (* neurons, ->glial cels). Enlargement 400x.

Figure 1

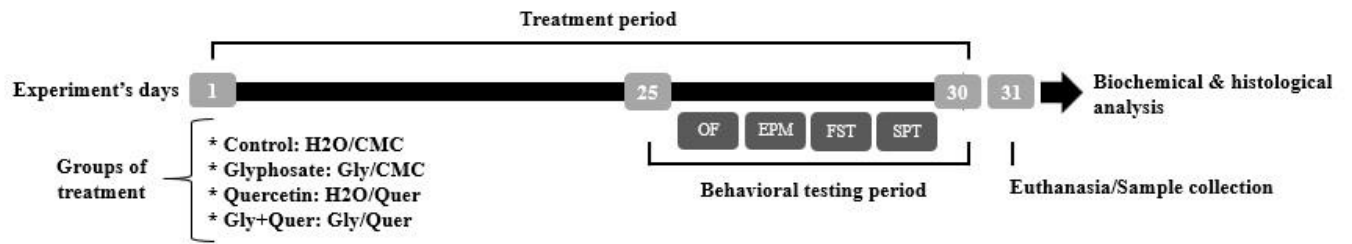


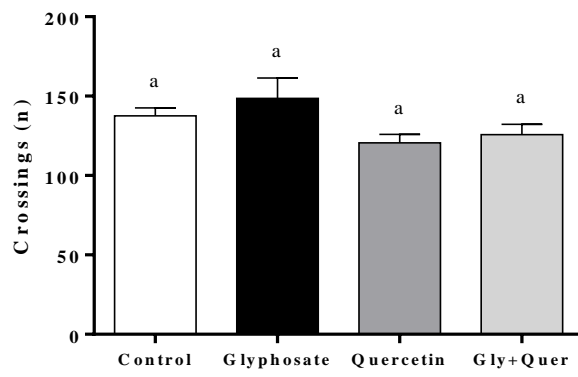
Figure 2

Figure 3

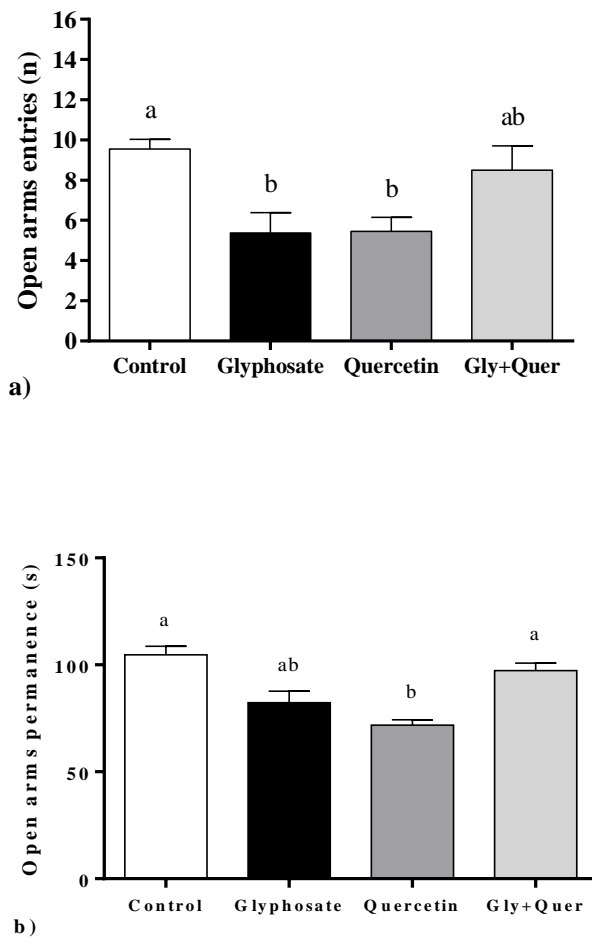


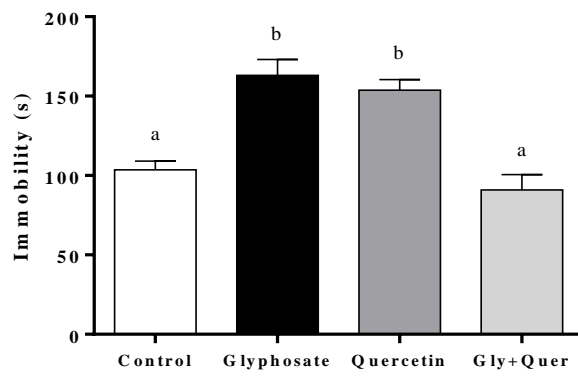
Figure 4

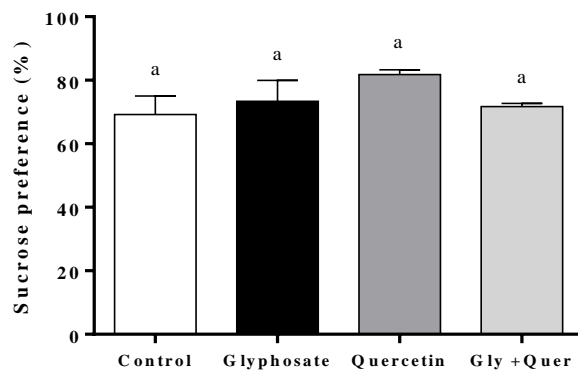
Figure 5

Figure 6

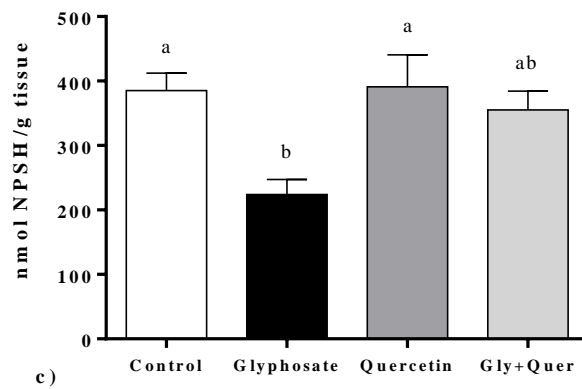
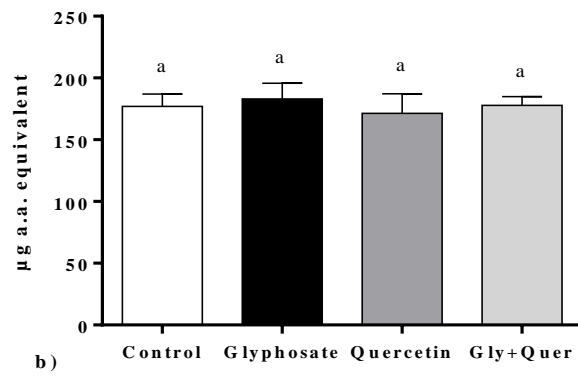
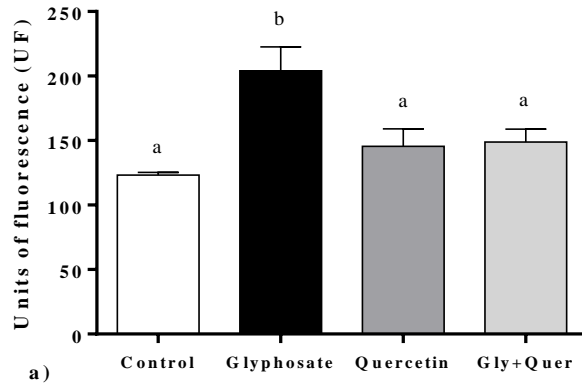


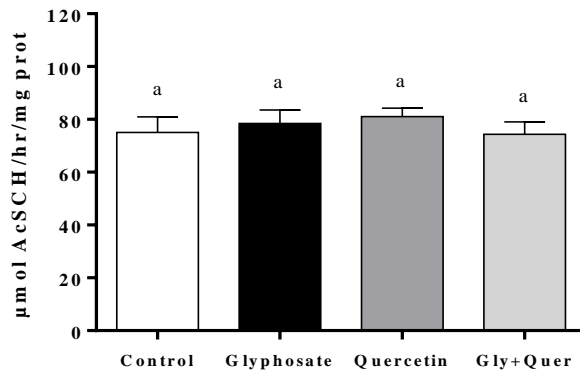
Figure 7

Figure 8

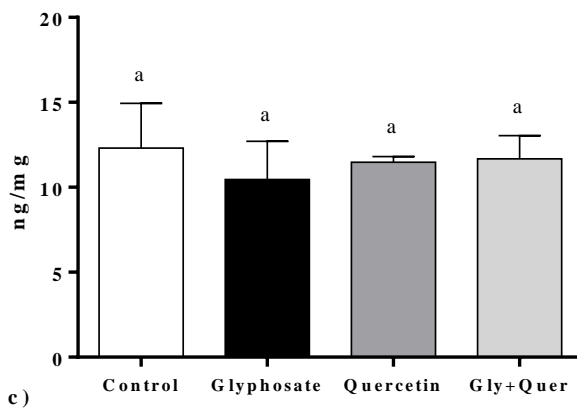
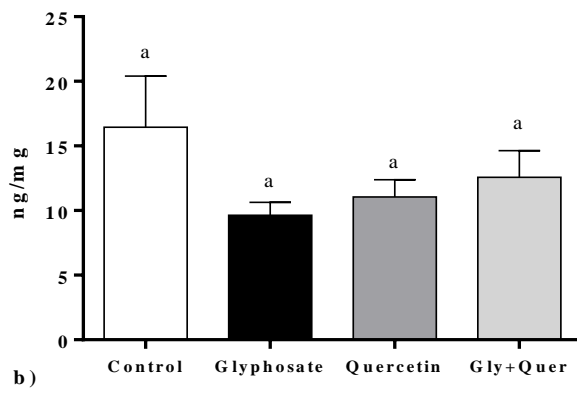
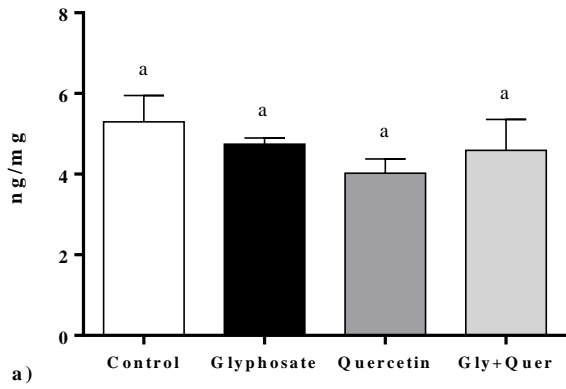
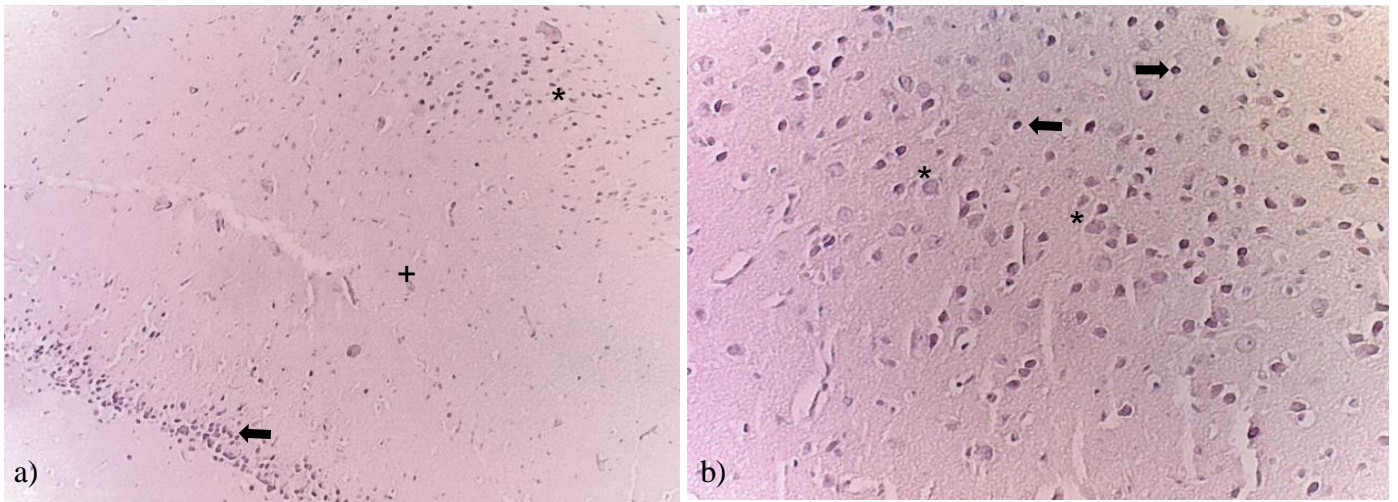


Figure 9



Highlights

- A subchronic low dose of glyphosate caused effects in behavior and oxidative stress markers in hippocampus of mice
- Quercetin reversed oxidative stress and behavioral impairments provoked by glyphosate
- Continuous use of quercetin showed a *per se* effect on animal behavior

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados descritos na presente dissertação, foi possível concluir que:

- A exposição humana contínua a herbicidas à base de glifosato é um fator preocupante, tendo em vista a sua capacidade de provocar efeitos a nível de sistema nervoso central, expressos em alterações comportamentais análogas ao comportamento tipo depressivo e ansioso e em indicadores de estresse oxidativo, mesmo quando utilizadas doses relativamente baixas do composto.
- A quercetina possui um potencial promissor em contrabalancear os efeitos decorrentes da exposição a pesticidas como os HBG's, tendo em vista sua capacidade de modular defesas antioxidantes como a GSH e amenizar ou mesmo neutralizar os efeitos negativos sobre o comportamento dos animais tratados, demonstrando a capacidade antidepressiva da quercetina.
- No entanto, o efeito *per se* da quercetina sobre o comportamento dos animais, gera a necessidade de cautela na recomendação desse composto para consumo contínuo, tendo em vista a falta de conhecimento dos seus efeitos a longo prazo.

6 PERSPECTIVAS

Em razão das conclusões acima expostas, ficam evidentes as necessidades de estudos futuros que contribuam para esclarecimentos como:

- A utilização crônica a doses diminutas de HBG's, a fim de verificar a relação destes herbicidas com outras doenças emergentes e, em conjunto com outros compostos pesticidas.
- A análise dos efeitos da utilização da quercetina, considerando diferentes dosagens e prazos a fim de esclarecer possíveis mecanismos *per se* envolvidos nos resultados deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABELAIRA, H. M.; REUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Braz J Psychiatry**, v. 35 Suppl 2, n., p. S112-120, 2013.
- ADEMOSUN, A. O.; OBOH, G.; BELLO, F.; AYENI, P. O. Antioxidative Properties and Effect of Quercetin and Its Glycosylated Form (Rutin) on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities. **J Evid Based Complementary Altern Med**, v. 21, n. 4, p. NP11-17, 2016.
- AITBALI, Y.; BA-MHAMED, S.; BENNIS, M. Behavioral and Immunohistochemical Study of the Effects of Subchronic and Chronic Exposure to Glyphosate in Mice. **Front Behav Neurosci**, v. 11, n., p. 146, 2017.
- AITBALI, Y.; BA-M'HAMED, S.; ELHIDAR, N.; NAFIS, A.; SORAA, N.; BENNIS, M. Glyphosate based- herbicide exposure affects gut microbiota, anxiety and depression-like behaviors in mice. **Neurotoxicol Teratol**, v. 67, n., p. 44-49, 2018.
- AITBALI, Y.; KAIKAI, N. E.; BA-M'HAMED, S.; BENNIS, M. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. **Toxicology**, v. 415, n., p. 18-25, 2019.
- AL-HAKEIM, H. K.; AL-RAMMAHI, D. A.; AL-DUJAILI, A. H. IL-6, IL-18, sIL-2R, and TNFalpha proinflammatory markers in depression and schizophrenia patients who are free of overt inflammation. **J Affect Disord**, v. 182, n., p. 106-114, 2015.
- ALLEN, J.; ROMAY-TALLON, R.; BRYMER, K. J.; CARUNCHO, H. J.; KALYNCHUK, L. E. Mitochondria and Mood: Mitochondrial Dysfunction as a Key Player in the Manifestation of Depression. **Front Neurosci**, v. 12, n., p. 386, 2018.
- AMARANTE JR., O. P.; SANTOS, T. C. R. Glifosato: Propriedade, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- ANADON, A.; MARTINEZ-LARRANAGA, M. R.; MARTINEZ, M. A.; CASTELLANO, V. J.; MARTINEZ, M.; MARTIN, M. T.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicol Lett**, v. 190, n. 1, p. 91-95, 2009.
- ANDRES, S.; PEVNY, S.; ZIEGENHAGEN, R.; BAKHIYA, N.; SCHAFER, B.; HIRSCH-ERNST, K. I.; LAMPEN, A. Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. **Mol Nutr Food Res**, v. 62, n. 1, p., 2018.
- ASTIZ, M.; DE ALANIZ, M. J.; MARRA, C. A. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 28, n. 3, p. 465-473, 2009.

ASTIZ, M.; DE ALANIZ, M. J.; MARRA, C. A. The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain. **Neurochem Int**, v. 61, n. 7, p. 1231-1241, 2012.

BAIER, C. J.; GALLEGOS, C. E.; RAISMAN-VOZARI, R.; MINETTI, A. Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. **Neurotoxicol Teratol**, v. 64, n., p. 63-72, 2017.

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**, v. 2016, n., p. 3975101, 2016.

BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C.; FREY, B. N. Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: implications for the pathophysiology of major depressive disorder. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, n., p. 609421, 2012.

BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Major depressive disorder. **N Engl J Med**, v. 358, n. 1, p. 55-68, 2008.

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environ Sci Eur**, v. 28, n. 1, p. 3, 2016.

BENEDETTI, A. L.; VITURI CDE, L.; TRENTIN, A. G.; DOMINGUES, M. A.; ALVAREZ-SILVA, M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. **Toxicol Lett**, v. 153, n. 2, p. 227-232, 2004.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **Eur J Pharmacol**, v. 585, n. 2-3, p. 325-337, 2008.

CAIAFFO, V.; OLIVEIRA, B. D.; DE SA, F. B.; EVENCIO NETO, J. Anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant activity of fluoxetine. **Pharmacol Res Perspect**, v. 4, n. 3, p. e00231, 2016.

CATTANI, D.; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V. L.; HEINZ RIEG, C. E.; DOMINGUES, J. T.; DAL-CIM, T.; TASCA, C. I.; MENA BARRETO SILVA, F. R.; ZAMONER, A. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320, n., p. 34-45, 2014.

CATTANI, D.; CESCINETTO, P. A.; TAVARES, M. K.; PARISOTTO, E. B.; DE OLIVEIRA, P. A.; RIEG, C. E. H.; LEITE, M. C.; PREDIGER, R. D. S.; WENDT, N. C.; RAZZERA, G.; FILHO, D. W.; ZAMONER, A. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, n., p. 67-80, 2017.

CAVUSOGLU, K.; YAPAR, K.; ORUC, E.; YALCIN, E. Protective effect of Ginkgo biloba L. leaf extract against glyphosate toxicity in Swiss albino mice. **J Med Food**, v. 14, n. 10, p. 1263-1272, 2011.

CHUNG, C. P.; SCHMIDT, D.; STEIN, C. M.; MORROW, J. D.; SALOMON, R. M. Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment. **Psychiatry Res**, v. 206, n. 2-3, p. 213-216, 2013.

CLAIR, E.; MESNAGE, R.; TRAVERT, C.; SERALINI, G. E. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. **Toxicol In Vitro**, v. 26, n. 2, p. 269-279, 2012.

CLAPP, J. **Bigger is Not Always Better: Drivers and Implications of the Recent Agribusiness Megamergers**, 2017

COSTA, L. G.; GARRICK, J. M.; ROQUE, P. J.; PELLACANI, C. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, n., p. 2986796, 2016.

COULLERY, R. P.; FERRARI, M. E.; ROSSO, S. B. Neuronal development and axon growth are altered by glyphosate through a WNT non-canonical signaling pathway. **Neurotoxicology**, v. 52, n., p. 150-161, 2016.

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

DAJAS, F.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; ARREDONDO, F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MARTINEZ, M.; RIVERA, F.; VAAMONDE, L. Quercetin in brain diseases: Potential and limits. **Neurochem Int**, v. 89, n., p. 140-148, 2015.

DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V. L.; CATTANI, D.; HEINZ RIEG, C. E.; PIEROZAN, P.; ZANATTA, L.; BENEDETTI PARISOTTO, E.; WILHELM FILHO, D.; MENA BARRETO SILVA, F. R.; PESSOA-PUREUR, R.; ZAMONER, A. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radic Biol Med**, v. 65, n., p. 335-346, 2013.

DILL, G. M. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. **Pest Manag Sci**, v. 61, n. 3, p. 219-224, 2005.

DILL, G. M.; SAMMONS, R. D.; FENG, P. C. C.; KOHN, F.; KRETZMER, K.; MEHRSHEIKH, A.; BLEEKE, M.; HONEGGER, J. L.; FARMER, D.; WRIGHT, D.; HAUPFEAR, E. A. Glyphosate: discovery, development, applications and properties. In: Nandula, V. (Ed.). **Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management**. USA: John Wiley & Sons, 2010,

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

EL-SHENAWY, N. S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 28, n. 3, p. 379-385, 2009.

FAGUNDES, C. P.; GLASER, R.; HWANG, B. S.; MALARKEY, W. B.; KIECOLT-GLASER, J. K. Depressive symptoms enhance stress-induced inflammatory responses. **Brain Behav Immun**, v. 31, n., p. 172-176, 2013.

FAO. **Pesticides Residues in Food**. Rome, Italy: FAO

FERRARI, A. J.; CHARLSON, F. J.; NORMAN, R. E.; PATTEN, S. B.; FREEDMAN, G.; MURRAY, C. J.; VOS, T.; WHITEFORD, H. A. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. **PLoS Med**, v. 10, n. 11, p. e1001547, 2013.

GALLEGOS, C. E.; BAIER, C. J.; BARTOS, M.; BRAS, C.; DOMINGUEZ, S.; MONACO, N.; GUMILAR, F.; GIMENEZ, M. S.; MINETTI, A. Perinatal Glyphosate-Based Herbicide Exposure in Rats Alters Brain Antioxidant Status, Glutamate and Acetylcholine Metabolism and Affects Recognition Memory. **Neurotox Res**, v. 34, n. 3, p. 363-374, 2018.

GHAHREMANI, S.; SOODI, M.; ATASHI, A. Quercetin ameliorates chlorpyrifos-induced oxidative stress in the rat brain: Possible involvement of PON2 pathway. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. e12530, 2018.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. In: Ware, G. W. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. USA: Springer 2000. v.167,

GILLEZEAU, C.; VAN GERWEN, M.; SHAFFER, R. M.; RANA, I.; ZHANG, L.; SHEPPARD, L.; TAIOLI, E. The evidence of human exposure to glyphosate: a review. **Environ Health**, v. 18, n. 1, p. 2, 2019.

GIORDANO, G.; COLE, T. B.; FURLONG, C. E.; COSTA, L. G. Paraoxonase 2 (PON2) in the mouse central nervous system: a neuroprotective role? **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 256, n. 3, p. 369-378, 2011.

GUI, Y. X.; FAN, X. N.; WANG, H. M.; WANG, G.; CHEN, S. D. Glyphosate induced cell death through apoptotic and autophagic mechanisms. **Neurotoxicol Teratol**, v. 34, n. 3, p. 344-349, 2012.

HARRISON, V.; MACKENZIE ROSS, S. Anxiety and depression following cumulative low-level exposure to organophosphate pesticides. **Environ Res**, v. 151, n., p. 528-536, 2016.

HERNANDEZ-PLATA, I.; GIORDANO, M.; DIAZ-MUNOZ, M.; RODRIGUEZ, V. M. The herbicide glyphosate causes behavioral changes and alterations in dopaminergic markers in male Sprague-Dawley rat. **Neurotoxicology**, v. 46, n., p. 79-91, 2015.

HOLZMANN, I.; DA SILVA, L. M.; CORREA DA SILVA, J. A.; STEIMBACH, V. M.; DE SOUZA, M. M. Antidepressant-like effect of quercetin in bulbectomized mice and involvement of the antioxidant defenses, and the glutamatergic and oxidonitregic pathways. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 136, n., p. 55-63, 2015.

HOVATTA, I.; JUHILA, J.; DONNER, J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neurosci Res**, v. 68, n. 4, p. 261-275, 2010.

IARC, I. A. F. R. O. C. **Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides**. Lyon, France World Health Organization, International Agency for Research on Cancer,

KANAZAWA, L. K. S.; VECCHIA, D. D.; WENDLER, E. M.; HOCAYEN, P. A. S.; DOS REIS LIVERO, F. A.; STIPP, M. C.; BARCARO, I. M. R.; ACCO, A.; ANDREATINI, R.

Quercetin reduces manic-like behavior and brain oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation in mice. **Free Radic Biol Med**, v. 99, n., p. 79-86, 2016.

KHAN, K.; NAJMI, A. K.; AKHTAR, M. A Natural Phenolic Compound Quercetin Showed the Usefulness by Targeting Inflammatory, Oxidative Stress Markers and Augment 5-HT Levels in One of the Animal Models of Depression in Mice. **Drug Res (Stuttg)**, v. 69, n. 7, p. 392-400, 2019.

KWIATKOWSKA, M.; HURAS, B.; BUKOWSKA, B. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro). **Pestic Biochem Physiol**, v. 109, n., p. 34-43, 2014.

LI, Q.; LAMBRECHTS, M. J.; ZHANG, Q.; LIU, S.; GE, D.; YIN, R.; XI, M.; YOU, Z. Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis. **Drug Des Devel Ther**, v. 7, n., p. 635-643, 2013.

LIU, Q.; HE, H.; YANG, J.; FENG, X.; ZHAO, F.; LYU, J. Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017 Findings from the Global Burden of Disease study. **Journal of Psychiatric Research**, v., n., p., Article In press.

MARTINEZ, M. A.; ARES, I.; RODRIGUEZ, J. L.; MARTINEZ, M.; MARTINEZ-LARRANAGA, M. R.; ANADON, A. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. **Environ Res**, v. 161, n., p. 212-219, 2018.

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**, v. 171, n., p. 69-78, 2017.

MESNAGE, R.; DEFARGE, N.; SPIROUX DE VENDOMOIS, J.; SERALINI, G. E. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food Chem Toxicol**, v. 84, n., p. 133-153, 2015.

MILIC, M.; ZUNEC, S.; MICEK, V.; KASUBA, V.; MIKOLIC, A.; LOVAKOVIC, B. T.; SEMREN, T. Z.; PAVICIC, I.; CERMAK, A. M. M.; PIZENT, A.; VRDOLJAK, A. L.; VALENCIA-QUINTANA, R.; SANCHEZ-ALARCON, J.; ZELJEZIC, D. Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 69, n. 2, p. 154-168, 2018.

MORENO, L.; PUERTA, E.; SUAREZ-SANTIAGO, J. E.; SANTOS-MAGALHAES, N. S.; RAMIREZ, M. J.; IRACHE, J. M. Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. **Int J Pharm**, v. 517, n. 1-2, p. 50-57, 2017.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. The link of organophosphorus pesticides with neurodegenerative and neurodevelopmental diseases based on evidence and mechanisms. **Toxicology**, v. 409, n., p. 44-52, 2018.

MYERS, J. P.; ANTONIOU, M. N.; BLUMBERG, B.; CARROLL, L.; COLBORN, T.; EVERETT, L. G.; HANSEN, M.; LANDRIGAN, P. J.; LANPHEAR, B. P.; MESNAGE, R.;

VANDENBERG, L. N.; VOM SAAL, F. S.; WELSHONS, W. V.; BENBROOK, C. M. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. **Environ Health**, v. 15, n., p. 19, 2016.

NAUGHTON, S. X.; TERRY, A. V., JR. Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure. **Toxicology**, v. 408, n., p. 101-112, 2018.

PANDYA, C. D.; HOWELL, K. R.; PILLAI, A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, n., p. 214-223, 2013.

PATHAK, L.; AGRAWAL, Y.; DHIR, A. Natural polyphenols in the management of major depression. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 22, n. 7, p. 863-880, 2013.

PÉREZ, G. L.; VERA, M. S.; MIRANDA, L. A. Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. **Herbicides and Environment**, v., n., p., 2011.

REBAI, O.; BELKHIR, M.; BOUJELBEN, A.; FATTOUCH, S.; AMRI, M. Morus alba leaf extract mediates neuroprotection against glyphosate-induced toxicity and biochemical alterations in the brain. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 24, n. 10, p. 9605-9613, 2017.

SAMAD, N.; SALEEM, A.; YASMIN, F.; SHEHZAD, M. A. Quercetin protects against stress-induced anxiety- and depression-like behavior and improves memory in male mice. **Physiol Res**, v. 67, n. 5, p. 795-808, 2018.

SERALINI, G. E.; CLAIR, E.; MESNAGE, R.; GRESS, S.; DEFARGE, N.; MALATESTA, M.; HENNEQUIN, D.; DE VENDOMOIS, J. S. Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Environ Sci Eur**, v. 26, n. 1, p. 14, 2014.

SINGH, V.; CHAUHAN, G.; SHRI, R. Anti-depressant like effects of quercetin 4'-O-glucoside from *Allium cepa* via regulation of brain oxidative stress and monoamine levels in mice subjected to unpredictable chronic mild stress. **Nutr Neurosci**, v., n., p. 1-10, 2019.

STATE, G. R. M. **Glyphosate Renewal Assessment Report.**

STEPHENSON, C. L.; HARRIS, C. A. An assessment of dietary exposure to glyphosate using refined deterministic and probabilistic methods. **Food Chem Toxicol**, v. 95, n., p. 28-41, 2016.

SUGANTHY, N.; DEVI, K. P.; NABAVI, S. F.; BRAIDY, N.; NABAVI, S. M. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. **Biomed Pharmacother**, v. 84, n., p. 892-908, 2016.

US-EPA, U. E. P. A. **Glyphosate: Human Health Assessment Scoping Document in Support of Registration Review.**

VAN BRUGGEN, A. H. C.; HE, M. M.; SHIN, K.; MAI, V.; JEONG, K. C.; FINCKH, M. R.; MORRIS, J. G., JR. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Sci Total Environ**, v. 616-617, n., p. 255-268, 2018.

WANG, W.; SUN, C.; MAO, L.; MA, P.; LIU, F.; YANG, J.; GAO, Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, n., p. 21-38, 2016.

WHO, W. H. O. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. v., n., p., 2017.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 31, n. 2 Pt 1, p. 117-165, 2000.

XU, J.; SMITH, S.; SMITH, G.; WANG, W.; LI, Y. Glyphosate contamination in grains and foods: An overview. **Food Control**, v. 106, n., p., 2019.

ZHANG, T.; JOHNSON, E. N.; MUELLER, T. C.; WILLENBORG, C. J. Early application of harvest aid herbicides adversely impacts lentil. **Agron. J.**, v. 109, n., p. 239–248., 2017b.

ANEXO A - Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 029/2017

Título: Avaliação do efeito protetor da quercetina em camundongos expostos ao glifosato.

Data da aprovação: 25/07/2017

Período de vigência do projeto: 25/07/2019

Pesquisador(a): Francielli Weber Santos Cibir

Campus: Uruguaiana

Telefone: (55) 99968-8269

E-mail: francielliweber@yahoo.com.br

Finalidade	<input checked="" type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos Swiss
Nº de animais	80
Peso/Idade	25 – 50 g / 60 dias
Sexo	Comissão de Ética no Uso de Animais
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria

Manfredini

Profª. Drª. Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA