



Evento: XXXIV Seminário de Iniciação Científica

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO GLIFOSATO NO COMPORTAMENTO E MEMÓRIA DE RATOS WISTAR MACHOS E FÊMEAS¹

Luã Henrique Urrutigaray², Anna Karolina Kretschmann Florencio de Souza Bagetti³, Welerson Roberto dos Reis⁴, Diovana Gelati de Batista⁵, Maria Eduarda Todendi⁶, Laura Schleder Corrêa⁷, Samara Cristine Knebel⁸, Thiago Gomes Heck⁹

¹ Projeto de pesquisa desenvolvido na Unijuí; com financiamento da agência CNPq-FINEP-FAPERGS.

² Bolsista; estudante do curso Psicologia; Bolsista do programa de fomento: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - PIBIC/CNPq. Grupo de pesquisa em Fisiologia (GPeF).

³ Médica, Mestranda do PPGAIS, GPeF.

⁴ Médico, Mestrando do PPGAIS, GPeF.

⁵ Pós-doutoranda do INCT (In)atividade Física e Saúde, CNPq, Brasil, GPeF.

⁶ Bolsista; estudante do curso Biomedicina; Bolsista PIBIC/CNPq, GPeF.

⁷ Biomédica, Doutoranda do PPGAIS vinculada projeto, GPeF.

⁸ Biomédica, Mestranda do PPGAIS vinculada ao projeto, GPeF.

⁹ Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIUI, Docente no Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde e Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em (In)Atividade Física e Saúde (INCT-CNPq). thiago.heck@unijui.edu.br

INTRODUÇÃO

O uso global de pesticidas na agricultura moderna cresceu nas últimas décadas. Estima-se que milhões de toneladas de agroquímicos como os Herbicidas à Base de Glifosato (HBG) sejam aplicadas anualmente, resultando em uma contaminação onipresente do solo, da água e de organismos não-alvo, o que levanta preocupações sobre a biomagnificação dessas substâncias e seus impactos na saúde humana (SHARMA et al., 2019).

Estudos demonstram que os HBG e seus metabólitos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e induzir neurotoxicidade através de múltiplos mecanismos, incluindo a desregulação da homeostase do cálcio intracelular, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (CHÁVEZ-REYES et al., 2024). Além dos efeitos diretos no Sistema Nervoso Central (SNC), a exposição aos HBG altera a permeabilidade intestinal e induz disbiose na microbiota, provocando uma neuroinflamação periférica mediada pelo eixo intestino-cérebro, o que agrava o dano tecidual cerebral (DEL CASTILO et al., 2022; MADANI; CARPENTER, 2022).



Contudo, uma lacuna crítica persiste na literatura: a grande maioria dos modelos pré-clínicos utiliza doses altas de HBGs em exposições agudas ou subcrônicas. Contudo, a exposição humana, fora das situações de exposição laboral de agricultores, ocorre geralmente de forma crônica por meio da ingestão de resíduos na dieta e/ou na água. Para regulamentar essa exposição, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece a Ingestão Diária Aceitável (IDA), de 0,5 mg/kg/dia como um limite supostamente seguro. No entanto, questiona-se se a exposição contínua à IDA é capaz de induzir uma disfunção metabólica subclínica que, a longo prazo, comprometa funções neurológicas superiores.

Nesse contexto, o Teste de Campo Aberto (Open Field) permite descartar vieses de locomoção e avaliar alterações na reatividade a ambientes novos (ansiedade-símile), enquanto o Teste de Reconhecimento de Objetos Novos (NOR) é o padrão-ouro para mensurar a integridade da plasticidade sináptica e a consolidação das memórias de curto e longo prazo, processos dependentes das vias de sinalização glutamatérgica frequentemente afetadas pelo glifosato (DEL CASTILO et al., 2022; CHÁVEZ-REYES et al., 2024).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar se a exposição crônica ao HBG, em dose equivalente à IDA, altera os parâmetros comportamentais e cognitivos de ratos Wistar machos e fêmeas, avaliando potenciais vulnerabilidades dimórficas ligadas ao sexo. Esta pesquisa vai ao encontro do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 3 da ONU, que visa “assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades” (ONU, 2015).

METODOLOGIA

O estudo utilizou 24 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos e fêmeas, com três meses de idade, mantidos em biotério sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=6/grupo): Controle Fêmea, Glifosato Fêmea, Controle Macho e Glifosato Macho. Os grupos expostos receberam ininterruptamente durante 12 semanas, um HBG (Roundup Original Mais, 48% i.a.) diluído na água de beber (*ad libitum*) na dose de IDA (ANVISA, 2020). A concentração do herbicida nos bebedouros foi ajustada semanalmente com base no peso corporal e no consumo hídrico de cada caixa. Os grupos



controle receberam apenas água potável, e todos os animais tiveram acesso livre à ração padronizada. O projeto foi conduzido em conformidade com as diretrizes éticas para o uso de animais em pesquisa (CEUA, protocolo nº 028/24).

Ao final da exposição, aplicou-se o Teste de Campo Aberto, no qual os animais exploraram livremente uma arena por 5 minutos, sendo quantificados o tempo total de movimento (função motora) e o tempo de permanência nas zonas central e lateral (parâmetros de ansiedade exploratória e tigmotaxia). Na sequência, a memória foi mensurada pelo NOR, estruturado em três fases: familiarização (exploração de dois objetos idênticos por 5 minutos) e testes de retenção de memória de curto prazo (2 horas após o treino, substituindo um objeto por um novo) e longo prazo (24 horas após o treino, utilizando um terceiro objeto inédito). O desempenho cognitivo foi expresso pelo Índice de Discriminação (ID), calculado pela diferença de tempo de exploração entre o objeto novo e o familiar, dividida pelo tempo total de exploração. Os dados de todas as variáveis foram analisados por vídeos e estatisticamente por ANOVA de duas vias (sexo x exposição), sendo $P < 0,05$ considerado como diferença significativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da Memória de Curto Prazo, houve uma interação significativa entre os fatores sexo e exposição ($p = 0,030$). As fêmeas expostas ao HBG apresentaram declínio na capacidade discriminativa, evidenciado por ID negativo em relação ao respectivo controle. Os machos expostos ao HBG apresentaram ID positivo, superior ao do grupo controle (Figura 1A). Na Memória de Longo Prazo, o cenário cognitivo se alterou. A análise não detectou efeitos significativos decorrentes da exposição ao HBG ou relacionados ao sexo dos animais. Os ID de todos os grupos experimentais concentraram-se próximos à linha de base zero ou ligeiramente negativos (Figura 1B), o que indica um decaimento natural da retenção mnêmica para este protocolo temporal específico (24 horas) na linhagem estudada. Consequentemente, esse perfil de consolidação tardia, presente em todos os grupos, pode ter mascarado a detecção de potenciais prejuízos relacionados à exposição.



Figura 1A. Efeito do glifosato na Memória de Curto Prazo (retenção de 2 horas). O gráfico expressa o Índice de Discriminação no Teste de Reconhecimento de Objetos. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão (SD), com pontos indicando valores individuais. Foi observada uma interação estatisticamente significativa entre sexo e tratamento ($p = 0,030$, ANOVA Two-way), indicando respostas distintas à exposição. Os valores do Índice (Média $\pm$ SD) obtidos foram: Controle Macho ($-0,15 \pm 0,43$); Glifosato Macho ($0,37 \pm 0,50$); Controle Fêmea ($-0,06 \pm 0,61$) e Glifosato Fêmea ($-0,44 \pm 0,33$).

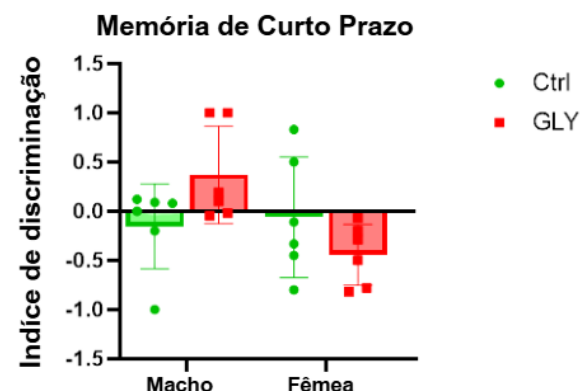
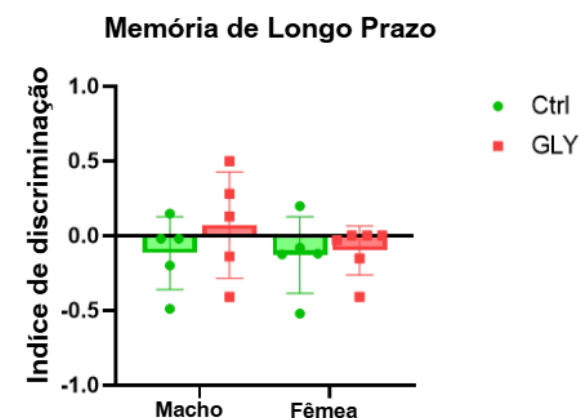


Figura 1B. Efeito do glifosato na Memória de Longo Prazo (retenção de 24 horas). O gráfico expressa o Índice de Discriminação no Teste de Reconhecimento de Objetos após um dia de intervalo de retenção. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão (SD), com pontos indicando valores individuais. Índices próximos a zero indicam ausência de discriminação entre objeto familiar e novo. Os valores do Índice (Média $\pm$ SD) foram: Controle Macho ($-0,12 \pm 0,22$); Glifosato Macho ($0,07 \pm 0,35$); Controle Fêmea ($-0,13 \pm 0,26$) e Glifosato Fêmea ($-0,10 \pm 0,16$). Não houve efeito significativo da exposição ao glifosato ($p = 0,192$) ou do fator sexo ($p = 0,237$).



No Teste de Campo Aberto, a análise do Tempo Total de Movimento na arena demonstrou que a integridade locomotora não foi afetada pela exposição ao glifosato (Figura 2A), atestando que a capacidade motora estava preservada e não atuou como um viés limitante para a avaliação cognitiva subsequente no teste de Reconhecimento de Objetos.

Figura 2A. Tempo de Movimento no Teste de Campo Aberto. O gráfico representa a atividade locomotora global dos animais, quantificada em segundos (seg) de movimento. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão (SD), com pontos indicando valores individuais. Os valores (Média $\pm$ SD) foram: Controle Fêmea ($156,6 \pm 39,6$); Glifosato Fêmea ($155,1 \pm 28,3$); Controle Macho ($136,8 \pm 96,5$) e Glifosato Macho ($163,3 \pm 70,8$). A análise estatística não indicou alterações motoras significativas decorrentes da exposição ao glifosato ($p = 0,817$).

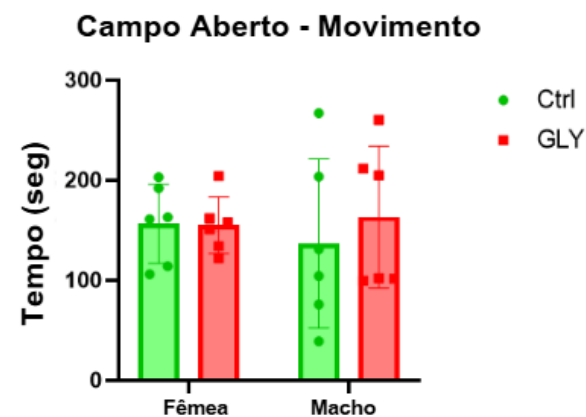
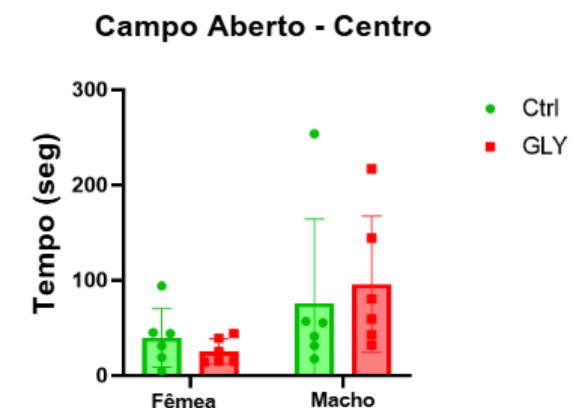


Figura 2B. Tempo na Zona Central no Teste de Campo Aberto. O gráfico representa o tempo exploratório (em segundos) no centro da arena, parâmetro inversamente proporcional aos níveis de ansiedade. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão (SD), com pontos indicando valores individuais. Os valores (Média $\pm$ SD) foram: Controle Fêmea ($39,6 \pm 30,6$); Glifosato Fêmea ($25,3 \pm 13,2$); Controle Macho ($76,08 \pm 88,3$) e Glifosato Macho ($96,0 \pm 71,3$). A exposição ao glifosato não alterou este parâmetro ($p = 0,908$), porém, notou-se um efeito significativo do sexo ($p = 0,038$), indicando menor exploração central basal pelas fêmeas em comparação aos machos.





Em relação à ansiedade exploratória, mensurada pelo Tempo de Permanência na Zona Central (parâmetro inversamente proporcional aos níveis de ansiedade), não se observou efeito significativo induzido pelo HBG. Contudo, independentemente da exposição ao glifosato, as fêmeas apresentaram uma exploração central basal menor em comparação aos machos (Figura 2B). Estes dados evidenciam um dimorfismo sexual inato na reatividade a ambientes novos, mas indicam que a exposição crônica a baixas doses de glifosato não induziu um fenótipo ansioso (*anxiety-like*) nos roedores.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição crônica à IDA de HBG é capaz de induzir alterações neurocognitivas sutis e dependentes do sexo em roedores. A ausência de prejuízos motores no Open Field garante que as falhas observadas no NOR refletem déficits centrais de memória, e que a neurotoxicidade do glifosato é complexa e atua de maneira dimórfica.

Palavras-chave: Glifosato, Memória, Comportamento.

Financiamento: CAPES - PPGAIS-UNIJUI - FAPERGS - (CNPq, #307926/2022-2, #405546/2023-8, #444286/2024-1, #403136/2024-5 to TGH) - FINEP (0729/04 to TGH).

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica (PIBIC) do CNPq pela concessão de bolsas, e aos colegas e professores do Grupo de Pesquisa em Fisiologia pelo auxílio e colaboração em todo o processo de formação científica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC no 441, de 2 de dezembro de 2020. **Dispõe sobre a manutenção do ingrediente ativo Glifosato.** [s. l.], 2020.
- CHÁVEZ-REYES, J. et al. Neurotoxicity of glyphosate: Focus on molecular mechanisms probably associated with alterations in cognition and behavior. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 106, p. 104381, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104381>.
- DEL CASTILLO, I. et al. Lifelong Exposure to a Low-Dose of the Glyphosate-Based Herbicide RoundUp® Causes Intestinal Damage, Gut Dysbiosis, and Behavioral Changes in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 9, p. 5583, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23095583>.
- MADANI, N. A.; CARPENTER, D. O. Effects of glyphosate and glyphosate-based herbicides like Roundup™ on the mammalian nervous system: A review. *Environmental Research*, v. 214, p. 113933, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113933>.
- SHARMA, A. et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, v. 1, n. 11, p. 1446, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>.