

EFEITO NEUROPROTETOR DA MELATONINA NA REGIÃO HIPOCAMPAL DE RATAS PRENHES EXPOSTAS A DOSAGENS SUBLETAIS DE GLIFOSATO (ROUNDUP®)

José W. M. Viana^{1*}, Cristina R. S. Barbosa¹, Joaquim E. Neto², Lécio L. Almeida³

1. Estudantes de IC da Universidade Regional do Cariri - URCA

2. Pesquisador da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

3. Pesquisador do Departamento de Ciências Biológicas da URCA

Resumo:

Nos últimos anos, a melatonina (MLT) tem se mostrado eficaz no tratamento contra intoxicações por herbicidas, dentre eles o Glifosato-Roundup®. Assim, objetivou-se avaliar o efeito neuroprotetor da MLT no hipocampo de ratas expostas a doses subletais de herbicida Glifosato-Roundup®. Foram utilizadas 15 ratas Wistar, divididas em 3 grupos (G): GI, as que receberam placebo; GII, ratas expostas a dose subletal de Glifosato e GIII, ratas expostas ao herbicida e tratadas com MLT. O herbicida foi administrado por gavagem e a MLT, via intraperitoneal até o 14º dia de prenhez. Logo após os tratamentos, as ratas foram anestesiadas, eutanaziadas e o encéfalo coletado e submetido ao processamento histológico. Os resultados revelaram redução no número de células granulares do giro denteado, porém no grupo tratado com MLT os valores foram semelhantes aos do controle. Assim, concluímos que a MLT apresentou atividade neuroprotetora.

Palavras-chave:

Melatonina; hipocampo; herbicidas.

Autorização legal:

Aprovado pela CEUA/UFRPE, sob a licença 137/2015.

Apoio financeiro: PIBIC-URCA

Introdução:

A melatonina (MLT) (N-acetil-5-metoxitriptamina) é o principal neuro-hormônio, pertencente ao grupo químico das indolaminas, sintetizado principalmente pela glândula pineal dos vertebrados (NETO; CASTRO, 2008). Muitos estudos têm reportado que a MLT atua principalmente como antioxidante, além de outras propriedades funcionais (ALMEIDA et al., 2016), dentre as quais se destacam imunomodulatória, anti-inflamatória, antitumoral, cronobiológica e antiapoptótica

(FERREIRA et al., 2010).

Neste contexto, a MLT tem se mostrado eficaz no tratamento contra intoxicações por herbicidas, especialmente o Glifosato-Roundup® (ALMEIDA et al., 2016), sendo este danoso ao sistema nervoso podendo induzir a desordens neurodegenerativas, como aquelas relacionadas ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (SAMSEL; SENEFF, 2013) que se caracteriza pela maciça perda sináptica e pela morte neuronal observada nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o hipocampo (SELKOE, 2001).

O hipocampo é uma estrutura pertencente ao sistema límbico e que desempenha um papel importante na consolidação de informações de memória de curto e longo prazo, aprendizagem e orientação espacial (HOU; YANG; YUAN, 2013). Além disso, na região do giro denteado da formação hipocampal ocorre, ao longo da vida, a formação de novos neurônios em mamíferos (van PRAAG et al., 1999; ERIKSSON, 1998) podendo ser facilmente integrados ao hipocampo.

Com isso, o presente estudo objetivou avaliar o efeito neuroprotetor da MLT na região hipocampal de ratas prenhes expostas a doses subletais de herbicida à base de glifosato (Roundup®).

Metodologia:

Foram utilizadas 15 ratas da linhagem Wistar, subdivididas em 3 grupos: grupo I (GI), constituído por ratas que receberam placebo; grupo II (GII), ratas expostas a dose subletal de 500mg/kg de peso corporal de Glifosato-Roundup® dosagem definida a partir da NOEL-dose (1000mg/kg) (WILLIAMS et al., 2000) e o grupo III (GIII), ratas expostas ao herbicida Glifosato-Roundup® e tratadas com 10mg/kg de MLT (MELCHIORRI et al., 1995). O herbicida foi administrado por gavagem e a MLT por via intraperitoneal. Todos os procedimentos realizados com os animais

foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal da UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob a licença 137/2015.

Para análise quantitativa de células granulares do giro denteado, as ratas foram anestesiadas seguida por eutanásia com tiopental sódico por via intraperitoneal. Assim, ao 14º dia de prenhez os encéfalos foram coletados por craniotomia, preservados em formaldeído a 10% tamponado por 24 horas. Logo após, foram lavadas em solução tampão PBS, desidratados em álcool em série crescente de concentração e incluído em glicol metacrilato historesina (Historesina-Leica®). Os cortes de 4 µm submetidos a técnica de coloração pela Hematoxilina e Eosina (H&E) (ALMEIDA et al., 2017).

Para a estimativa da densidade por área dos perfis de corpos celulares de neurônios (células granulares do giro denteado) de regiões hipocampais foi utilizado a metodologia de contagem aleatória simples (WEST, 1996; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Todos os valores foram expressos como média ± erro padrão da média e analisadas pelo software SAS® for Windows versão 9.0. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo previamente testados para normalidade pelo Teste de Shapiro-Wilk. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão:

Os resultados do presente estudo revelaram redução no número de células granulares do giro denteado do grupo exposto ao herbicida a base de glifosato (Roundup®), porém no grupo tratado com MLT observamos valores semelhantes aos do grupo controle (Figura 1).

CATTANI et al. (2014) investigaram a neurotoxicidade do Glifosato-Roundup® no hipocampo de ratos imaturos após exposição aguda durante a gravidez e lactação. Os resultados revelaram que a exposição aguda durante 30 minutos aumentava o influxo de íons de cálcio, ativando os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e os canais de cálcio dependentes de voltagem, levando ao estresse oxidativo, desorganização e morte das células do hipocampo. O que poderia explicar a redução no número de células granulares do giro denteado. Em relação ao grupo tratado com MLT, alguns estudos corroboram com nossos resultados, quando observaram, que a MLT estimulava a neurogênese e a sobrevivência neuronal no giro denteado e zona hilar do hipocampo (RAMIREZ-RODRIGUEZ et al., 2011).

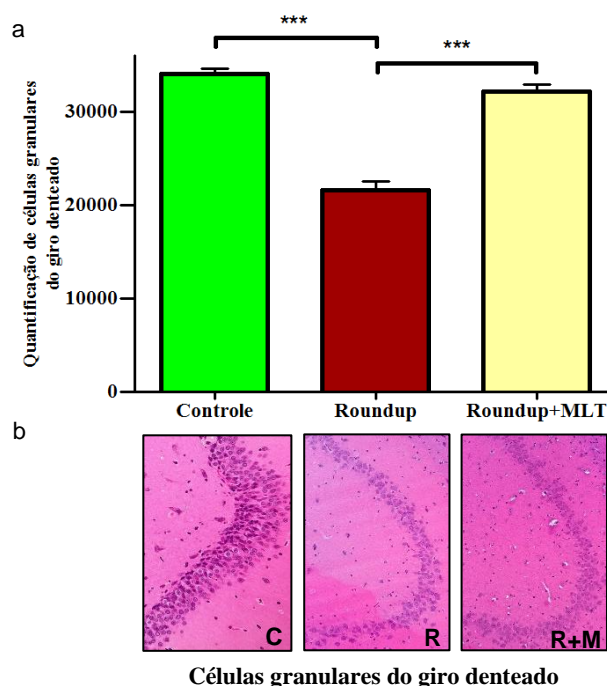


Figura 1. Em (a) quantificação de células granulares do giro denteado dos grupos experimentais. Notar que houve uma redução no número de células granulares do grupo Roundup quando comparado ao controle, porém no grupo Roundup+MLT os valores foram semelhantes aos do grupo controle. Entre os grupos Roundup e Roundup+MLT houve diferença também ($p < 0,001$). Grupos barras sobre asteriscos diferem significativamente do controle pelo teste de Tukey ($p < 0,001$). Em (b) fotomicrografias da área hipocampal estudada correspondente a cada grupo.

Conclusões:

Assim, com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, conclui-se que o tratamento com MLT atua de forma eficiente contra a neurotoxicidade hipocampal induzida pelo herbicida Glifosato-Roundup®.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, L. L. TEIXEIRA, A. A. C.; SOARES, A. F.; CUNHA, F. M.; SILVA JÚNIOR, V. A.; VIEIRA FILHO, L. D. Effects of melatonin in rats in the initial third stage of pregnancy exposed to sub-lethal doses of herbicides. *Acta Histochemica*. In Press. 2017.

ALMEIDA, L. L.; TEIXEIRA, A. A. C.; BEZERRA, N. S.; TEIXEIRA, V. W. Efeito protetor da melatonina sobre intoxicações por herbicidas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, n.3, p.174-180, 2016;

CATTANI, D.; CAVALLI, V. L. L. O.; RIEG, C. E. H.; DOMINGUES, J. T.; DAL-CIM, T.; TASCIA, C. I.; SILVA, F. R. M. B.; ZAMONET, A. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of

glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320. p. 34-45, 2014;

ERIKSSON, P. S. E. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**. v. 4, n. 11, p. 1313-1317, 1998.

FERREIRA, C. S.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; GIRÃO, M. J. B. C.; BARACAT, E. C.; SOARES, J. M. Jr. Melatonina: modulador de morte celular. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 6, p. 715-718, 2010;

HOU, G.; YANG, X.; YUAN, T. F. Hippocampal Asymmetry: Differences in Structures and Functions. **Neurochemical Research**, v. 5, n. 2, p. 32-45, 2013;

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003

MELCHIORRI, D.; REITER, R. J.; ATTIA, A. M.; HARA, M.; BURGOS, A.; NISTICO, G. Potent protective effect of melatonin on *in vitro* paraquat-induced oxidative damage in rats. **Life Sciences**, v. 56, n. 2, p. 83-89, 1995.

NETO, J. A. S.; CASTRO, B. F. Melatonina, ritmos biológicos e sono: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 44, n.1, p. 5-11, 2008;

RAMIREZ-RODRIGUEZ, G.; ORTIZ-LOPEZ, L.; DOMINGUEZ-ALONSO, A.; BENITEZ-KING, G. A.; KEMPERMANN, G. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 1, p. 29-37, 2011.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: Pathways to modern diseases. **Entropy**, v. 15, n. 4, p.1416-1463, 2013.

SELKOE, D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 741- 66, 2001.

van PRAAG, H. G. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature Neuroscience**. v. 2, n. 3, p. 266-270, 1999.

WEST, M. J. New stereological method for counting neurons. **Neurobiology of Aging**, v.

14, n. 4, p. 275-85, 1993.

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