



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Carla Elise Heinz Rieg

**EFEITOS METABÓLICOS, OXIDATIVOS E GENOTÓXICOS DE FORMULAÇÃO
À BASE DE GLIFOSATO EM TECIDO HEPÁTICO, INTESTINAL E SANGUÍNEO
DE RATOS**

Florianópolis

2021

Carla Elise Heinz Rieg

**EFEITOS METABÓLICOS, OXIDATIVOS E GENOTÓXICOS DE FORMULAÇÃO
À BASE DE GLIFOSATO EM TECIDO HEPÁTICO, INTESTINAL E SANGUÍNEO
DE RATOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutora em Farmácia.

Orientadora: Profª. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rieg, Carla Elise Heinz

Efeitos metabólicos, oxidativos e genotóxicos de
formulação à base de glifosato em tecido hepático,
intestinal e sanguíneo de ratos / Carla Elise Heinz Rieg ;
orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza,
coorientador, Eduardo Benedetti Parisotto, 2021.

144 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Agrotóxico. 3. Herbicida à base de
glifosato. 4. Estresse oxidativo. 5. Toxicidade. I.
Zamoner Pacheco de Souza, Ariane. II. Parisotto, Eduardo
Benedetti. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Carla Elise Heinz Rieg

**EFEITOS METABÓLICOS, OXIDATIVOS E GENOTÓXICOS DE FORMULAÇÃO
À BASE DE GLIFOSATO EM TECIDO HEPÁTICO, INTESTINAL E SANGUÍNEO
DE RATOS**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^ª. Dr^ª. Margarete Dulce Bagatini
Universidade Federal da Fronteira Sul

Prof. Dr. Edgar Julian Paredes Gamero
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof^ª. Dr^ª. Fátima Regina Mena Barreto Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Farmácia

Prof^ª. Dr^ª. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof^ª. Dr^ª. Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Orientadora

Florianópolis, 2021.

Dedico essa tese a minha mãe Hilma Heinz Rieg e ao meu pai Silvino Rieg pelo apoio aos estudos e pelo amor incondicional. Amo-os!

AGRADECIMENTOS

A Deus por colocar em meu caminho todas as pessoas contidas neste agradecimento, elas tornaram-se presentes em minha trajetória para me ensinar algo nessa jornada denominada vida.

Aos meus pais Hilma Heinz Rieg e Silvino Rieg pelo amor e carinho que vocês têm pelos seus filhos. Agradeço por me ensinarem desde cedo a importância dos estudos, e junto com ele a ter constância e disciplina. Sou grata pela excelente base familiar que vocês constituíram e na qual posso me firmar nos momentos menos fáceis.

Ao meu irmão Carlos Alexandre Rieg por me apoiar e incentivar em meus projetos, principalmente no desenvolvimento e finalização dessa tese. A parafrasear o que os nossos pais nos ensinaram: “Comece algo e termine, pois quem pára no meio do caminho não chega a lugar nenhum.”

À minha orientadora prof^a. Dr^a. Ariane Zamoner Pacheco de Souza por abrir as portas do seu laboratório desde a iniciação científica, por tornar capaz a execução e conclusão do meu mestrado e doutorado. Agradeço a sua amizade, os seus ensinamentos e a sua forma humanizada de orientar os seus alunos. Reconheço a sua paciência, confiança, amor, carinho, atenção e tempo dedicado a mim.

Ao meu coorientador prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto pelo auxílio em alguns experimentos e pela contribuição no desenvolvimento da tese.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar o trabalho e fornecer suas colaborações sobre o assunto.

Aos colegas que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular – LaBioSignal: Vitória H. Cenci, Nathália F. Naspolini, Daiane Cattani, Alessandra Hellbrugge, Vera L.L.O. Cavalli, Juliana T. Domingues e Patrícia A. Cesconetto. Obrigada por todo aprendizado profissional e pessoal compartilhado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia – PGFAR por ter oportunizado a realização desse trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro, em especial à CAPES pelos 13 meses de bolsa concedida.

Por fim, agradeço a todos aqui não mencionados e que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização dessa tese.

“A diferença entre o possível e o impossível
está na vontade humana.”

(Louis Pasteur)

RESUMO

No presente estudo investigou-se as consequências da exposição *in vitro* e *in vivo* (subcrônica) ao herbicida à base de glifosato (HBG) em diferentes tecidos de ratos com 15 dias de idade. A tese foi dividida em 3 partes: estudos I, II e III. No estudo I, fatias de fígado de ratos imaturos foram tratadas *in vitro* por 30 min com ou sem 0,36 mg/L do HBG. O agrotóxico aumentou o influxo de Ca^{2+} através da abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo-L (CCDV-L) e da liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, levando a sobrecarga de Ca^{2+} intracelular e morte celular. Esses eventos foram prevenidos pelos antioxidantes vitamina E, vitamina C, N-acetilcisteína (NAC) e glutathione reduzida (GSH). A ativação das rotas de sinalização da fosfolipase C (PLC) e do fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) estão envolvidas no aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular. O HBG promoveu estresse oxidativo por aumentar o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e modificar a atividade das enzimas antioxidantes, bem como o agrotóxico induziu alterações no metabolismo energético devido à diminuição da atividade da aspartato aminotransferase (AST) hepática. Nos demais estudos foram avaliados os efeitos da exposição *in vivo* a 1% do HBG (0,36% de glifosato) na água de beber de ratas Wistar prenhas, desde o 5º dia gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. No estudo II, os resultados obtidos demonstraram que o HBG desempenhou suas ações a partir da participação de estresse oxidativo ao oxidar proteínas, danificar DNA, depletar GSH e alterar o sistema de defesa antioxidante enzimático em sangue total da prole de ratos. Os efeitos tóxicos do HBG modificaram o perfil hematológico em sangue periférico de ratos imaturos ao induzir eritrocitose, macrocitose normocrômica e leucopenia. Além disso, a exposição subcrônica ao HBG promoveu distúrbios no sistema hematopoiético por causar hipocelularidade medular e deposição de ferro na medula óssea dos filhotes de ratos. No estudo III, os dados mostraram diminuição na captação de glicose e glutamato em duodeno de filhotes, bem como modificação em enzimas responsáveis pela síntese ou catabolismo de nutrientes, prejudicando as funções do intestino delgado e as reservas energéticas em fígado de ratos expostos ao agrotóxico, sugerindo que as ações tóxicas do HBG podem modular a absorção e a digestão de carboidratos e aminoácidos no organismo dos ratos imaturos. Em adição, o tratamento subcrônico com o HBG aumentou a produção de citocinas no fígado da prole, indicando inflamação no tecido hepático induzida pelo herbicida. O conjunto dos resultados dos estudos demonstraram que o HBG é potencialmente tóxico para diferentes tipos celulares.

Palavras-chave: Herbicida à base de glifosato. Cálcio. Estresse oxidativo. Parâmetros hematológicos. Sistema hematopoiético. Metabolismo energético.

ABSTRACT

The present study investigated the consequences of *in vitro* and *in vivo* (subchronic) exposure to glyphosate-based herbicide (GBH) in different tissues of 15-day-old rats. This thesis was divided into 3 parts: studies I, II and III. Study I: liver slices from immature rats were treated *in vitro* for 30 min with or without 0,36 mg/L GBH. The pesticide increased Ca^{2+} influx by opening L-type voltage-dependent calcium channels (L-VDCC) and releasing Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum, leading to an overload of Ca^{2+} within the cells and cell death. These events have been prevented by the antioxidants vitamin E, vitamin C, N-acetylcysteine (NAC) and reduced glutathione (GSH). Activation of the phospholipase C (PLC) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling pathways is involved in increasing intracellular Ca^{2+} concentration. GBH promoted oxidative stress by increasing the content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and modifying the activity of antioxidant enzymes, as well as pesticide induced changes in energy metabolism due to decreased hepatic aspartate aminotransferase activity (AST). In other studies, we evaluated the effects of *in vivo* exposure of the 1% GBH (0,36% glyphosate) in drinking water of pregnant Wistar rats from the 5th gestational day until the offspring completed 15 days of age. In study II, the results showed that GBH performed its actions from the participation of oxidative stress by oxidizing proteins, damaging DNA, depleting GSH and altering the enzymatic antioxidant defense system in whole blood of offspring. The toxic effects of GBH changed the hematological profile in peripheral blood of immature rats by inducing erythrosis, normochromic macrocytosis and leukopenia. In addition, subchronic exposure to GBH promoted hematopoietic system disorders by causing hypocellularity and bone marrow iron deposition in rat pups. In study III, data showed decreased glucose uptake and glutamate uptake in pup duodenum, as well as modification in enzymes responsible for synthesis or catabolism of nutrient, impairing small bowel functions and energy reserves in the liver of rats exposed to pesticide, suggesting that toxic actions of GBH can modulate carbohydrate and amino acid absorption and digestion in immature rat organism. Moreover, subchronic treatment with GBH increased cytokine production in offspring liver, indicating pesticide-induced liver tissue inflammation. Taken together, data showed that GBH is potentially toxic to different cell types.

Keywords: Glyphosate-based herbicide. Calcium. Oxidative stress. Hematological parameters. Hematopoietic system. Energetic metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo de agrotóxicos nas lavouras brasileiras, entre 2000 e 2019.....	22
Figura 2. Fórmula estrutural do glifosato.	25
Figura 3. Mecanismo de ação do herbicida glifosato em plantas.....	26
Figura 4. Quantidade comercializada do ingrediente ativo glifosato e seus sais no Brasil, no período de 2010 a 2019.	27
Figura 5. Representação esquemática do sistema de defesa antioxidante das células combatendo as EROs e as ERNs.....	45
Figura 6. Representação do delineamento experimental <i>in vivo</i>	56
Figura 7. Ilustração dos parâmetros biométricos realizados nos ratos imaturos.	57
Figura 8. Curva dose-resposta do tratamento <i>in vitro</i> com o HBG no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (A) e na viabilidade celular (B) em fígado de ratos imaturos.....	71
Figura 9. Envolvimento das vias de sinalização e a concentração de cálcio intracelular no mecanismo de ação do HBG no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fígado de ratos imaturos.	72
Figura 10. Participação do estresse oxidativo no mecanismo de ação do HBG no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fígado de ratos imaturos.....	74
Figura 11. Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com o HBG na concentração de peroxidação lipídica em tecido hepático de ratos imaturos.	75
Figura 12. Análise da exposição <i>in vitro</i> ao HBG no conteúdo de glutatona reduzida (GSH) em fígado de ratos imaturos.	75
Figura 13. Implicações do tratamento <i>in vitro</i> com o HBG na atividade das enzimas: (A) superóxido dismutase (SOD) e (B) catalase (CAT) em tecido hepático de ratos imaturos.....	76
Figura 14. Consequências do tratamento <i>in vitro</i> com o HBG na atividade das enzimas: (A) glutatona peroxidase (GPx), (B) glutatona redutase (GR), (C) glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e (D) glutatona-S-transferase (GST) em fígado de ratos imaturos.	77
Figura 15. Efeitos comparativos da toxicidade entre o HBG e o glifosato sozinho na atividade da γ -glutamil transferase (GGT) em fígado de ratos imaturos.	78
Figura 16. Estudos da exposição ao HBG na atividade das enzimas (A) aspartato aminotransferase (AST) e (B) alanina aminotransferase (ALT) em fígado de ratos imaturos.	78
Figura 17. Efeitos da exposição perinatal ao HBG (A) na concentração de proteína carbonilada e (B) no conteúdo de GSH em sangue periférico de ratos imaturos.	91
Figura 18. Efeitos da exposição perinatal ao HBG nas enzimas antioxidantes em sangue periférico de ratos imaturos.	92
Figura 19. Efeitos da exposição perinatal ao HBG no DNA a partir do sangue periférico de ratos imaturos.	93
Figura 20. Efeitos da exposição perinatal ao HBG na celularidade da medula óssea de ratos imaturos.	95
Figura 21. Efeitos da exposição perinatal ao HBG no depósito de ferro em medula óssea de ratos imaturos.	96
Figura 22. Efeitos da exposição materna ao HBG na (A) atividade das dissacaridases intestinais: sacarase, lactase e maltase e na (B) captação de ^{14}C -2-desoxi-D-glicose em região duodenal da prole de ratos.	105
Figura 23. Efeitos da exposição materna ao HBG na glicemia da prole de ratos.	106
Figura 24. Efeitos da exposição materna ao HBG na (A) quantificação da GSK-3 β total e fosforilada e no (B) conteúdo de glicogênio em fígado da prole de ratos.....	107
Figura 25. Efeitos da exposição materna ao HBG na (A) concentração de glicose e no (B) conteúdo de lactato em fígado da prole de ratos	108
Figura 26. Efeitos da exposição materna ao HBG na (A) captação de ^{14}C -glutamato e na (B) atividade da GGT em duodeno da prole de ratos	109

Figura 27. Efeitos da exposição materna ao HBG no conteúdo de ureia em fígado da prole de ratos	110
Figura 28. Efeitos da exposição materna ao HBG nas concentrações das citocinas (A) TNF- α e (B) IL-6 em fígado da prole de ratos.	110
Figura 29. Representação esquemática dos estudos desenvolvidos nessa tese e os mecanismos de toxicidade da formulação à base de glifosato	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da exposição perinatal ao HBG nos parâmetros biométricos de ratos imaturos.	90
Tabela 2. Perfil eritrocitário de filhotes de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal.	94
Tabela 3. Perfil leucocitário de filhotes de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal.	94
Tabela 4. Perfil plaquetário de filhotes de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal.	94

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Asc ^{•-}	Radical semideidroascorbato
AscH ⁻	Ascorbato
AST	Aspartato aminotransferase
C1	Células com danos mínimos
C2	Células com danos médios
C3	Células com danos intensos
C4	Células com danos máximos
CAT	Catalase
CCDV	Canal de cálcio dependente de voltagem
CDNB	Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CO ₃ ^{•-}	Radical trióxido de carbono
DAG	Diacilglicerol
DG	Dia gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPN	Dia pós-natal
DPTA	Ácido 2-etilenotriaminopentacético
DTNB	Ácido 2-nitrobenzoico
EAAT-1	Transportadores de aminoácidos excitatórios 1
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-ácetico
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	do inglês: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPM	Erro padrão da média
EPSPS	Enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina

GABA	Ácido γ -aminobutírico
GDH	Glutamato desidrogenase
GGT	γ -glutamil transferase
GLUT	Transportador de glicose
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GS	Glicogênio sintase
GSH	Glutaciona reduzida
GSK3	Cinase de glicogênio sintase 3
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona-S-transferase
HB	Hemoglobina
HBG	Herbicida à base de glifosato
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HNO	Nitroxil
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
HOO [•]	Radical hidroperoxil
HT	Hematócrito
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDA	Ingestão diária aceitável
IL-6	Interleucina 6
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IRS	Substrato do receptor de insulina
ITD	Índice total de dano
L [•]	Radical lipídico
LDH	Lactato desidrogenase
LMR	Limite máximo de resíduos
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LPO	Liperoxidação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MAPK	Proteína serina-treonina cinase ativada por mitógeno
MC	Massa corpórea
MDA	Malondialdeído
MS	Ministério da Saúde
NAC	N-acetilcisteína
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NK	<i>Natural killer</i>
NO [•]	Óxido nítrico
NO ₂ [•]	Radical dióxido de nitrogênio
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
[•] OH	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OMS	Organização mundial da saúde
p38	Proteína 38 serina-treonina cinase ativada por mitógeno
PA	Para análise
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína cinase A
PKB	Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
POEA	Polioxietilenoamina
PP1	Fosfoproteína fosfatase 1
Ras	Proteína GTPase monomérica
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Retículo endoplasmático
RL	Radical livre
RO [•]	Radical alcóxil
ROO [•]	Radical peróxil
SGLT	Proteína co-transportadora de sódio/glicose
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificações

SINDIVEG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal
SOD	Superóxido dismutase
SOD-CuZn	Superóxido dismutase-cobre-zinco
SOD-EC	Superóxido dismutase-extracelular
SOD-Mn	Superóxido dismutase-manganês
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
Toc \cdot	Radical tocoferoxil
TocH	Tocoferol
UE	União Europeia
VCM	Volume corpuscular médio
X	Xenobiótico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	USO DE AGROTÓXICOS	21
1.2	O HERBICIDA GLIFOSATO	24
1.2.1	Toxicidade do glifosato e os efeitos da exposição do herbicida à saúde	28
1.3	CÁLCIO COMO SEGUNDO MENSAGEIRO	31
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO	32
1.4.1	Radicais livres e espécies reativas	33
1.4.1.1	<i>A importância dos íons ferro e cobre na geração de espécies reativas</i>	33
1.5	DANO OXIDATIVO	34
1.5.1	Peroxidação lipídica	34
1.5.2	Oxidação de proteínas	35
1.5.3	Oxidação de DNA	35
1.6	SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE	36
1.6.1	Antioxidantes enzimáticos	37
1.6.1.1	<i>Superóxido dismutase</i>	37
1.6.1.2	<i>Catalase</i>	38
1.6.1.3	<i>Glutaciona peroxidase</i>	38
1.6.1.4	<i>Glutaciona redutase</i>	39
1.6.1.5	<i>Glicose-6-fosfato desidrogenase</i>	39
1.6.1.6	<i>Glutaciona-S-transferase</i>	40
1.6.1.7	<i>γ-glutamil transferase</i>	41
1.6.2	Antioxidantes não enzimáticos	41
1.6.2.1	<i>Glutaciona reduzida</i>	42
1.6.2.2	<i>Ácido ascórbico (Vitamina C)</i>	43
1.6.2.3	<i>Vitamina E</i>	43
1.6.2.4	<i>N-acetilcisteína</i>	44
1.7	HOMEOSTASE DO FERRO	45
1.8	ASPECTOS HEMATOLÓGICOS: SANGUE E SEUS ELEMENTOS CELULARES	46
1.9	METABOLISMO ENERGÉTICO	48
1.9.1	Metabolismo dos carboidratos: digestão, captação e armazenamento	48
1.9.2	Metabolismo do glutamato oriundo da dieta	49
2	OBJETIVOS	52
2.1	OBJETIVO GERAL	52
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
3	DIVISÃO DO ESTUDO	54
4	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1	REAGENTES	55
4.2	ANIMAIS	55
4.3	TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM O HBG	55
4.4	TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM O HBG	57
4.5	INFLUXO DE ⁴⁵ Ca ²⁺	58
4.6	VIABILIDADE CELULAR	58
4.7	CAPTAÇÃO DE ¹⁴ C-L-GLUTAMATO	58

4.8	CAPTAÇÃO DE ¹⁴ C-2-DESOXI-D-GLICOSE	59
4.9	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	59
4.9.1	Dissacaridases intestinais.....	59
4.9.2	γ-glutamil transferases (GGT).....	60
4.9.3	Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST).....	60
4.9.4	Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)	60
4.10	DOSAGEM DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	61
4.10.1	Superóxido dismutase (SOD)	61
4.10.2	Catalase (CAT)	62
4.10.3	Glutaciona peroxidase (GPx).....	62
4.10.4	Glutaciona redutase (GR)	62
4.10.5	Glutaciona-S-transferase (GST).....	63
4.11	CONTEÚDO DE GLUTATIONA REDUZIDA	63
4.12	DETERMINAÇÃO DE MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS	63
4.12.1	Lipoperoxidação-TBARS	63
4.12.2	Proteína carbonilada.....	64
4.13	HEMOGRAMA	64
4.13.1	Perfil eritrocitário.....	64
4.13.2	Perfil leucocitário	65
4.13.3	Perfil plaquetário.....	65
4.14	ENSAIO COMETA- DETECÇÃO DE DANOS AO DNA	65
4.15	ANÁLISE DA DEPOSIÇÃO DE FERRO MEDULAR.....	66
4.16	GLICOGÊNIO HEPÁTICO.....	67
4.17	DOSAGEM DE GLICOSE, LACTATO E UREIA.....	67
4.18	REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA	68
4.19	IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS.....	68
4.20	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	69
4.21	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1	ESTUDO I: HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO <i>IN VITRO</i> AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO MEDIADA PELO ACÚMULO DE CÁLCIO E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS IMATUROS.	70
5.1.1	Caracterização do modelo experimental <i>in vitro</i> ao analisar o mecanismo de toxicidade hepática a partir do influxo de cálcio e da viabilidade celular	70
5.1.2	Mecanismos de transdução de sinais envolvidos na ação do HBG no influxo de cálcio em fígado de ratos imaturos	72
5.1.3	Envolvimento de antioxidantes na ação do HBG no influxo de cálcio em fígado de ratos com 15 dias de idade.....	73
5.1.4	Consequências da exposição <i>in vitro</i> ao HBG sobre os parâmetros bioquímicos envolvidos no dano oxidativo em fígado de ratos imaturos.....	74
5.1.5	Efeitos do tratamento <i>in vitro</i> com o HBG em fatias de fígado de ratos com 15 dias de idade na atividade das aminotransferases.....	78
5.1.6	Discussão	79
5.1.7	Conclusões parciais	88
5.2	ESTUDO II: CONSEQUÊNCIAS DO TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM O HERBICIDA CONTENDO GLIFOSATO NO SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA DA PROLE DE RATOS.	90
5.2.1	Avaliação dos parâmetros biométricos em filhotes de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal.....	90

5.2.2	Efeitos da exposição subcrônica ao HBG nos parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo em sangue periférico de ratos imaturos	90
5.2.3	Avaliação de danos genéticos em ratos imaturos expostos ao HBG durante o período perinatal	92
5.2.4	Consequências da exposição subcrônica ao HBG nos parâmetros hematológicos de ratos imaturos	93
5.2.5	Avaliação da celularidade na medula óssea da prole de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal.....	94
5.2.6	Efeitos da exposição materna na deposição de ferro em medula óssea de ratos imaturos.....	95
5.2.7	Discussão	96
5.2.8	Conclusões parciais	104
5.3	ESTUDO III: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL À FORMULAÇÃO CONTENDO GLIFOSATO NO METABOLISMO ENERGÉTICO E NO SISTEMA IMUNE DOS FILHOTES DE RATOS.....	105
5.3.1	Consequências da exposição perinatal ao HBG no metabolismo de carboidratos de ratos imaturos	105
5.3.2	Efeitos da exposição <i>in vivo</i> ao HBG no metabolismo dos aminoácidos de filhotes de ratos	108
5.3.3	Avaliação de marcadores inflamatórios na prole de ratos exposta ao HBG durante o período perinatal.....	110
5.3.4	Discussão	111
5.3.5	Conclusões parciais	116
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
7	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 USO DE AGROTÓXICOS

A melhoria da produção agrícola no Brasil tornou o país um dos maiores produtores mundiais de alimentos, porém, também fez dele um dos líderes na utilização de agrotóxicos (IBAMA, 2020). Desde 2008, o Brasil assumiu a posição de um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos. O mercado global de agrotóxicos cresceu 93%, entre 2000 e 2010, enquanto as vendas nacionais alavancaram em 190% (ANVISA, 2012). Em 2010, o país faturou cerca de US\$ 7,3 bilhões com as vendas de agrotóxicos. Nos últimos anos, o Brasil obteve um crescimento na comercialização desses produtos e em 2014 atingiu a marca de US\$ 12,2 bilhões de faturamento líquido (SINDIVEG, 2016).

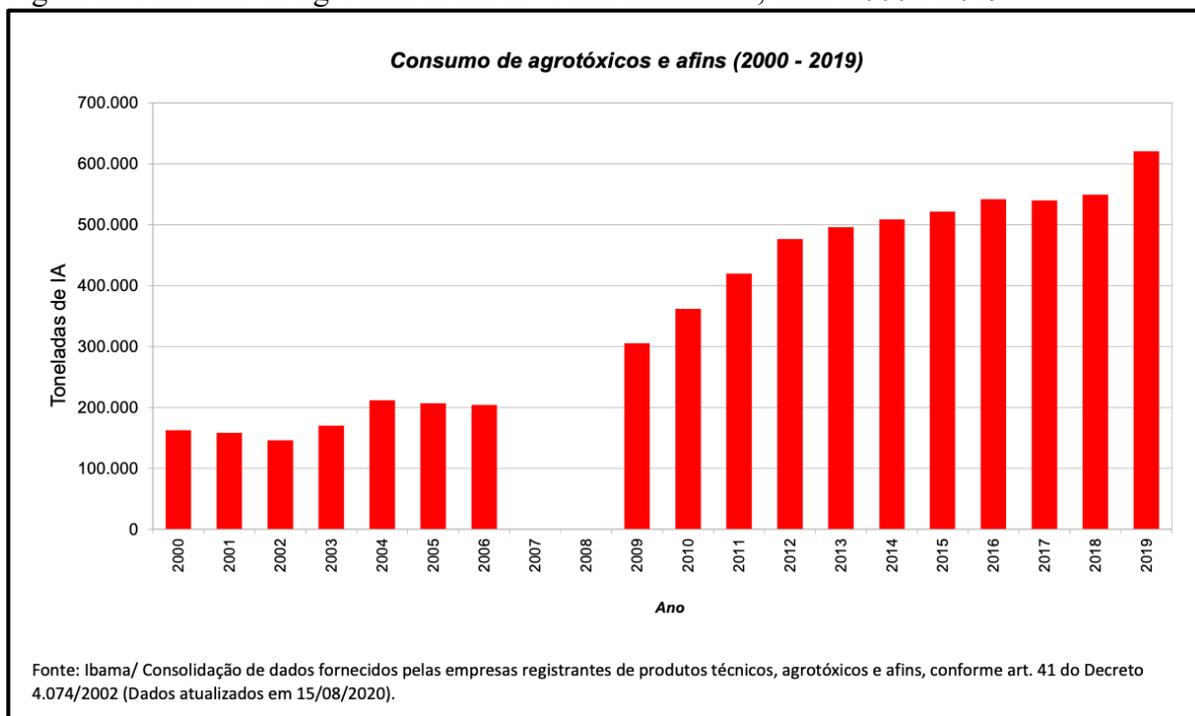
Contudo, em 2015, o setor de agrotóxicos apresentou queda nas negociações de 21% em relação a 2014, arrecadando US\$ 9,6 bilhões. Em 2016, também houve um leve recuo na comercialização (US\$ 9,56 bilhões) comparado ao ano anterior. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG), os principais motivos para a redução nas vendas dos agrotóxicos estão associados com a desvalorização do real em relação ao dólar, o uso de agrotóxicos ilegais, queda nos preços dos produtos e a dificuldade que os agricultores possuem em obter uma linha de crédito rural para a compra dos agrotóxicos (SINDIVEG, 2016, 2017).

Mesmo com um recuo na comercialização dos agrotóxicos, o consumo vem crescendo nos últimos anos. A utilização de agrotóxicos por ingredientes ativos no Brasil expandiu de 162.461,96 toneladas em 2000 para 620.537,98 toneladas em 2019, resultando em um aumento de 282% num período de apenas 19 anos (Figura 1) (IBAMA, 2020). O Brasil participa com apenas 4% do comércio mundial do agronegócio, porém consome cerca de 20% de todo agrotóxico comercializado no mercado global. Nesse sentido, o país tornou-se o maior importador de agrotóxicos do planeta desde 2012 (FIOCRUZ, 2014; BOMBARDI, 2017), de tal modo que em 2019, o Brasil adquiriu do exterior 27,7% (171.931,39 toneladas) dos ingredientes ativos utilizados em território nacional (IBAMA, 2020).

No Brasil, as maiores concentrações do uso de agrotóxicos acontecem nas regiões em que predominam o chamado agronegócio (municípios da região Centro-Oeste, Sul e Sudeste), regiões onde prevalece o plantio de monoculturas de soja, milho e cana (BOMBARDI, 2011). Vinculado a isso, os Estados que mais consumiram agroquímicos em 2019 foram Mato Grosso

(20%), São Paulo (15%), Rio Grande do Sul (12%) e Paraná (10%). Esses estados juntos somam mais da metade da comercialização dos agrotóxicos no país (IBAMA, 2020).

Figura 1. Consumo de agrotóxicos nas lavouras brasileiras, entre 2000 e 2019



Nos anos de 2007 e 2008 os dados não foram compilados pelo IBAMA. IA: ingredientes ativos.

Fonte: IBAMA, 2020.

O elevado uso dos agrotóxicos produz numerosos casos de intoxicação, tanto no campo quanto em áreas urbanas. De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN), o número de registros relacionados à intoxicação por agrotóxicos aumentou 139%, no período de 2007 (4.964 casos) a 2015 (11.863 casos), com um total acumulado durante esses 9 anos de 84.206 casos, com uma média 25 intoxicações por dia. Nesse mesmo período, o trabalhador agrícola e afins foi a ocupação que obteve a maior frequência de notificações de intoxicação pelos agrotóxicos, correspondendo a 28,8% (BRASIL, 2018).

Em 2015, as principais circunstâncias de exposição aos agrotóxicos foram tentativa de suicídio (51%) e o uso acidental (27,8%) (BRASIL, 2018). Nesse contexto, diversos estudos já mencionaram casos de suicídio em agricultores devido à intoxicação por agroquímicos (MENEGHEL *et al.*, 2004; PIRES; CALDAS; RECENA, 2005; MEYER; RESENDE; ABREU, 2007). Além disso, a exposição crônica a algumas classes de agrotóxicos pode induzir episódios de depressão e contribuir para o desfecho do suicídio (BRASIL, 2006).

Segundo a Organização mundial da Saúde (OMS), existe uma subnotificação das intoxicações por agrotóxicos na ordem de 1:50, ou seja, a cada intoxicação registrada, há outros

50 casos não mencionados (PARANÁ, 2018). Vinculado a isso, o Ministério da Saúde (MS) estima que anualmente, haja mais de 400 mil pessoas contaminadas por agrotóxicos em todo território nacional, com cerca de 4 mil mortes por ano (CARNEIRO *et al.*, 2015).

O uso exacerbado e descontrolado dos agrotóxicos nas lavouras tem sido considerado um importante agente de contaminação do solo e das águas superficiais e subterrâneas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Devido à toxicidade dos agrotóxicos, através da permanência e do crescente aumento dos teores encontrados em diversos compartimentos ambientais, o consumo dessas águas ou suas reutilizações na agricultura podem resultar em riscos à saúde humana e animal (SILVÉRIO *et al.*, 2012).

Conforme o Boletim Epidemiológico quanto ao Monitoramento de Agrotóxicos na Água para Consumo Humano no Brasil no ano de 2014, foram monitorados 741 municípios no país, realizando-se 57.299 análises, das quais 99,9% apresentaram resultado analítico dentro do padrão de potabilidade da água para consumo humano estabelecido pela Portaria GM/MS nº 2.914/2011 (BRASIL, 2016). Contudo, destaca-se que apenas 13,3% do total de municípios brasileiros foram monitorados nesse estudo, ou seja, 86,7% dos municípios não possuem acesso a informações sobre os resíduos de agrotóxicos na água de beber. Outro fator a ser considerado é que os valores da concentração máxima de agrotóxicos permitidos na água potável utilizados no Brasil são superiores aos limites máximos de resíduos de agrotóxicos recomendados em outras localidades como na União Europeia (BOMBARDI, 2017).

Além da contaminação dos recursos hídricos, os agrotóxicos podem persistir como resíduos remanescentes em alimento de origem vegetal e animal (CARNEIRO *et al.*, 2015). Nesse sentido, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no período de 2017 a 2018 mostrou que mais da metade dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado por agrotóxicos (ANVISA, 2019b).

O PARA avaliou 14 alimentos de origem vegetal representativos da dieta da população brasileira, correspondendo a 4.616 amostras analisadas, das quais 51% apresentaram contaminação por agrotóxicos. Dos alimentos contendo resíduos de agrotóxico, 23% ultrapassaram o limite máximo de resíduos considerados aceitáveis e/ou possuíam ingredientes ativos não autorizados para determinado cultivo (ANVISA, 2019b). Ressalta-se que a presença de resíduos de agrotóxicos não acontece somente nos alimentos *in natura*, mas também em alimentos processados pela indústria, tais como bolachas, pães e cereais. Em adição, podem estar presentes nas carnes de animais que se alimentam de ração contendo traços de agrotóxicos devido ao processo de bioacumulação.

Parte dos agrotóxicos utilizados são capazes de se dispersar no ambiente, e outra parte pode se acumular no organismo humano, inclusive no leite materno (CARNEIRO *et al.*, 2015). Nesse contexto, uma pesquisa feita pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), com o intuito de determinar resíduos de agrotóxicos em leite de mães residentes em Lucas do Rio Verde, constatou que todas as amostras de leite materno de um total de 62 nutrízes apresentaram contaminação com pelo menos um tipo de agrotóxico estudado (PALMA, 2011).

A incidência de diversos tipos de câncer, distúrbios endócrinos, bem como o desenvolvimento de doenças neurológicas, renais, respiratórias e hepáticas (LONDRES, 2011) é maior em agricultores do que na população geral, possivelmente devido à utilização crescente dos agroquímicos pelos mesmos. Vinculado a isso, as enfermidades causadas pela exposição aos agrotóxicos caracterizam um grande problema de saúde pública (RIO GRANDE DO SUL, 2008), demonstrando a necessidade de mais estudos acerca dos mecanismos de toxicidade dos pesticidas.

1.2 O HERBICIDA GLIFOSATO

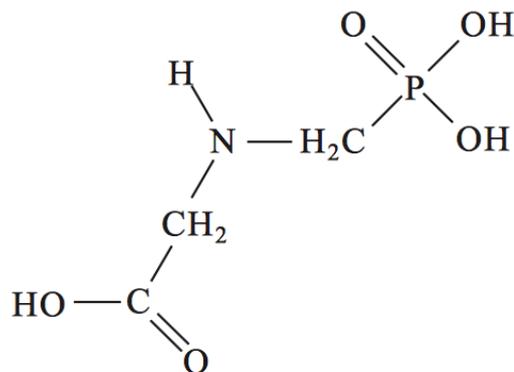
A molécula de glifosato foi reconhecida pela primeira vez em 1950 pelo químico Henri Martin, o qual trabalhava numa pequena empresa farmacêutica suíça denominada de Cilag. Porém, apenas em 1970 o químico John E. Franz, da companhia Monsanto, identificou a atividade herbicida do glifosato e em 1974, o glifosato foi lançado comercialmente nos Estados Unidos pela Monsanto com o nome de Roundup® (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; DUKE; POWLES, 2008; IARC, 2015).

O glifosato pertence à classe química dos organofosforados e ao grupo químico das glicinas substituídas, recebendo o nome químico de N-(fosfonometil)glicina e massa molecular relativa de 169,07 g/mol. Apresenta fórmula bruta $C_3H_8NO_5P$ e fórmula estrutural representada na Figura 2 (IARC, 2015; ANVISA, 2021).

O glifosato é um herbicida pós-emergente, sistêmico, não seletivo e possui amplo espectro de ação (IARC, 2015). No Brasil, o glifosato é largamente usado em ambiente agrícola na aplicação em pós-emergência das plantas infectantes em florestas de eucalipto e pinus e das plantas infectantes de culturas de algodão, ameixa, amendoim, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, cenoura, coco, feijão, maçã, mamão, mandioca, milho, nectarina, pêra, pêssego, soja, trigo, uva, dentre outras culturas; empregado como maturador de cana-de-açúcar; utilizado como dessecante nas culturas de aveia preta, azevém e soja. Em áreas urbanas, o agrotóxico é empregado no controle de ervas daninhas em margens de rodovias e ferrovias,

áreas sob a rede de transmissão elétrica, pátios industriais, oleodutos e aceiros e na jardinagem amadora (ANVISA, 2021).

Figura 2. Fórmula estrutural do glifosato.



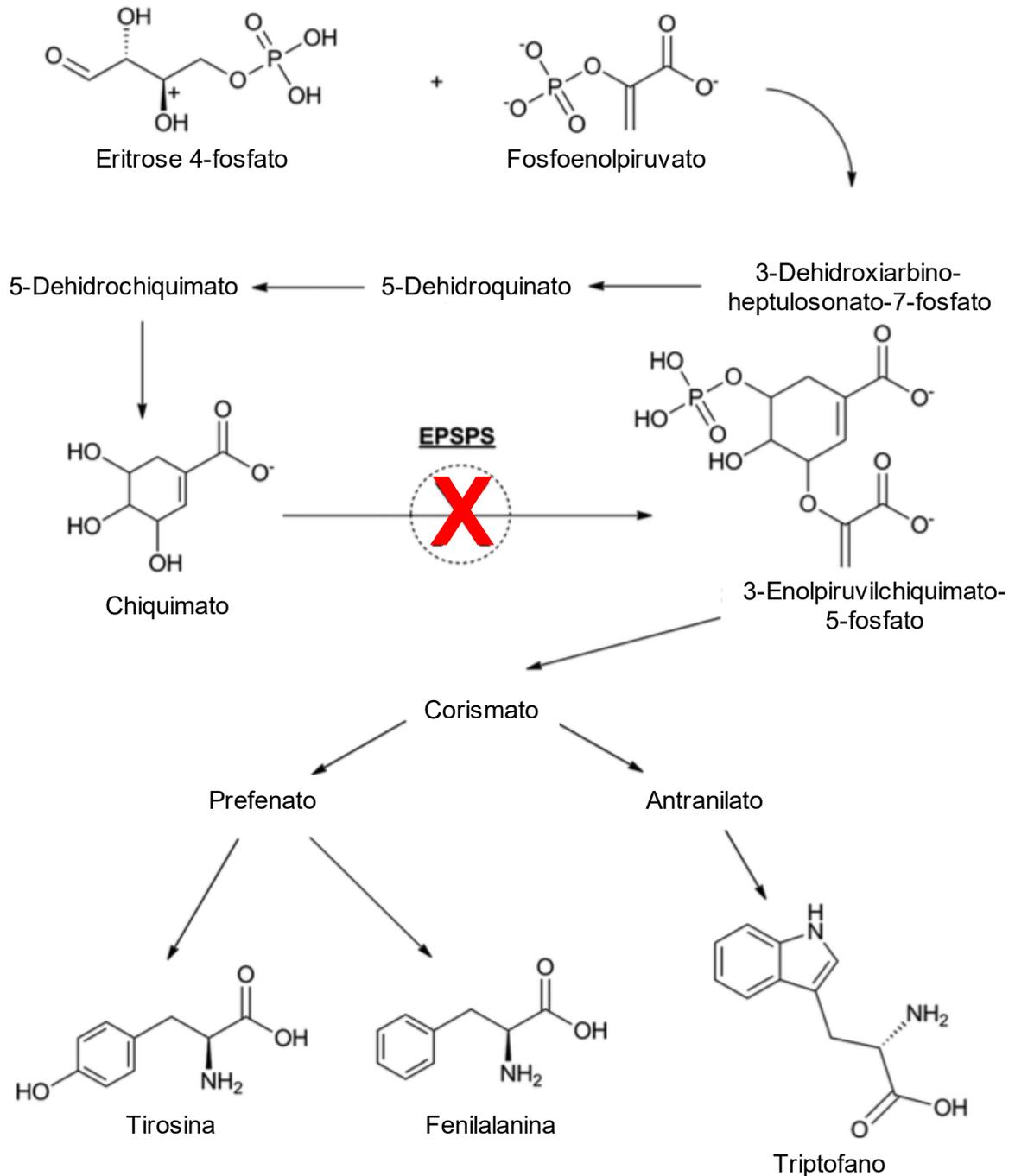
Fonte: ANVISA, 2021.

O modo de ação do glifosato é atribuído à sua capacidade de afetar a síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais por meio da inibição competitiva com a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS) presente na rota do chiquimato (Figura 3). Essa enzima apresenta papel essencial na geração do intermediário corismato, necessário para a biossíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (STEINRUCKEN; AMRHEIN, 1980; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; POLLEGIONI; SCHONBRUNN; SIEHL, 2011; ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014).

A interferência do glifosato na biossíntese dos aminoácidos essenciais resulta na alteração de diversos processos bioquímicos vitais as plantas, como a biossíntese de proteínas e enzimas, acarretando na morte das células vegetais. A via do chiquimato é encontrada apenas em plantas e alguns microrganismos, não sendo expressa no reino animal. Desse modo, alguns estudos demonstram que o uso de glifosato teria baixo risco à saúde dos seres humanos e de outros mamíferos (POLLEGIONI; SCHONBRUNN; SIEHL, 2011; WILLIAMS; WATSON; DESESSO, 2012).

O glifosato é formulado como um sal incluindo o ácido de glifosato desprotonado e diferentes cátions (IARC, 2015). De acordo com o banco de dados do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Brasil o glifosato apresenta-se na forma de ácido de glifosato ou na condição de sal de dimetilamina, amônio, di-amônio, isopropilamina ou potássio, podendo ter mais de um sal em algumas formulações, com um total de 124 produtos registrados (MAPA, 2021).

Figura 3. Mecanismo de ação do herbicida glifosato em plantas.



Fonte: Adaptado de Annett, Habibi e Hontela (2014).

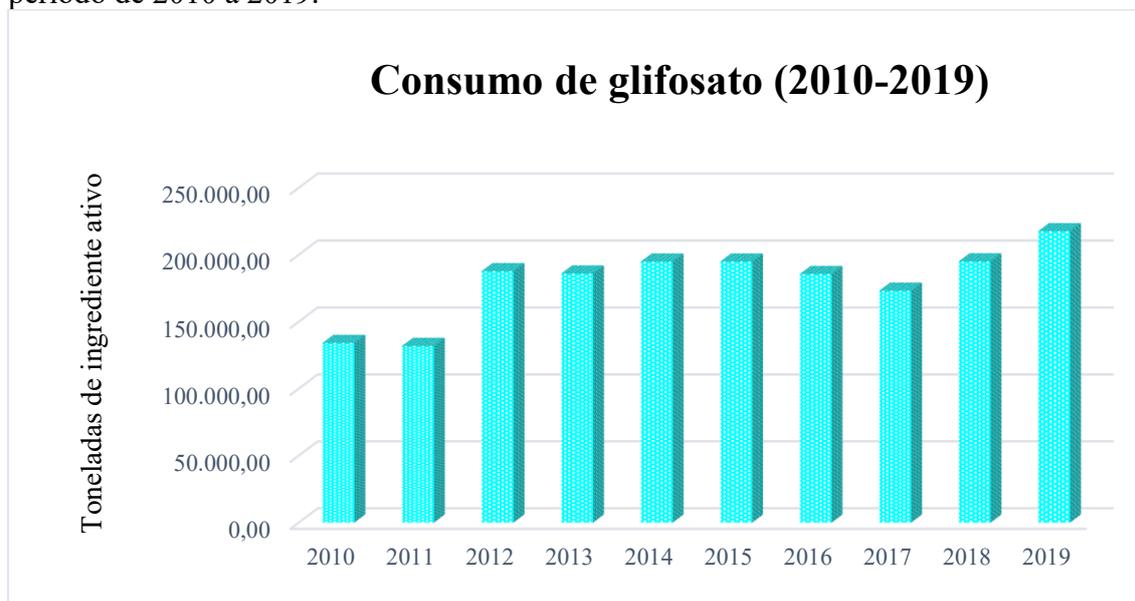
A primeira elaboração comercial de glifosato e a mais comercializada mundialmente é o Roundup® (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; MODESTO; MARTINEZ, 2010; IARC, 2015). O herbicida contém glifosato como ingrediente ativo (360 g/L do ácido de glifosato livre ou 480 g/L do sal de isopropilamina de glifosato), polioxietileno amina (POEA) como tensoativo e outras substâncias inertes utilizadas para favorecer a estabilidade e a

penetração do ingrediente ativo na célula (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; MONSANTO, 2015).

O POEA tem a capacidade de melhorar a absorção e a translocação do glifosato na cutícula da planta, de modo que alguns estudos mencionam que as preparações comerciais de glifosato formuladas com esse surfactante podem ser mais tóxicas do que o glifosato isolado (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI *et al.*, 2013; BENBROOK, 2016).

O glifosato está em 1º lugar no *ranking* dos 10 ingredientes ativos mais utilizados em território nacional. A Figura 4 demonstra a evolução do consumo de glifosato no Brasil. Nota-se que no período de 2010 a 2019, o uso de glifosato no país subiu de 134.117,29 toneladas para 217.592,24 toneladas, um aumento de 62%. É possível observar um grande incremento na quantidade comercializada do herbicida de 2011 para 2012. O recorde de consumo do glifosato foi alcançado em 2019 (IBAMA, 2020).

Figura 4. Quantidade comercializada do ingrediente ativo glifosato e seus sais no Brasil, no período de 2010 a 2019.



A Figura representa uma expressão gráfica dos dados compilados da utilização de glifosato em território nacional entre 2010 e 2019. Os valores foram obtidos do site do IBAMA, disponível em:

<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>

Fonte: do Autor.

O glifosato além de ser o agroquímico mais consumido, ao somar a quantidade dos demais ingredientes ativos que ocupam do 2º ao 10º lugar, o resultado é inferior ao volume do glifosato sozinho na maioria dos anos analisados (2010-2019). Em adição, o montante de

glifosato comercializado no Brasil corresponde a cerca de um terço do volume total de agrotóxicos negociados entre 2010 e 2019 (IBAMA, 2020).

Um dos principais motivos para o elevado volume de glifosato utilizado na agricultura está associado com o surgimento das sementes transgênicas. Inicialmente, mencionava-se que a transgenia seria uma tecnologia para diminuir o uso de agrotóxicos, contudo, com a tolerância das plantas transgênicas ao glifosato e a resistência das ervas daninhas ao mesmo, induziu ao maior uso de glifosato pelos agricultores nas plantações (LONDRES, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2015). As culturas geneticamente modificadas resistentes ao glifosato possuem a inserção do gene CP4, que codifica uma forma mutante da enzima EPSPS encontrada na bactéria *Agrobacterium sp*, no genoma de plantas normais. Dessa forma, as plantas transgênicas que expressam a enzima CP4 EPSPS são tolerantes ao glifosato e permitem a síntese de aminoácidos aromáticos mesmo após a exposição ao herbicida (BRAKE; EVERSON, 2004). Assim, é possível aplicar grandes quantidades de glifosato nas culturas transgênicas (pós-emergente) para remoção das ervas daninhas sem prejudicar os cultivos (POLLEGIONI; SCHONBRUNN; SIEHL, 2011).

Contudo, quanto mais agrotóxicos nas lavouras, mais resíduos desses produtos são encontrados nos alimentos e na água (LONDRES, 2011). Nesse sentido, o limite máximo de resíduos (LMR) de glifosato no café e na cana-de-açúcar produzidos no Brasil é de 10 mg/kg enquanto que na União Europeia (UE) é de 0,1 mg/kg, ou seja, o território nacional permite 10 vezes mais resíduos do herbicida nesses alimentos. Em relação à água os dados são ainda mais assustadores, o LMR de glifosato é 5000 vezes maior na água potável consumida no Brasil (500 µg/L) do que na UE (0,1 µg/L) (BOMBARDI, 2017).

1.2.1 Toxicidade do glifosato e os efeitos da exposição do herbicida à saúde

A OMS estabelece para a toxicidade oral aguda do glifosato de grau analítico uma DL₅₀ que varia de 800-5000 mg/kg de massa corporal (mc), concentrações relativamente baixas para as diferentes espécies de mamíferos e o classifica como medianamente tóxico (classe III) (OMS, 2009). O Roundup Original® é uma das formulações à base de glifosato mais vendidas no planeta, pertence à classificação de potencial de periculosidade ambiental III (produto perigoso ao meio ambiente) e categoria toxicológica 4 (pouco tóxico) (MAPA, 2021).

Diversos estudos têm demonstrado o potencial efeito tóxico dos herbicidas à base de glifosato em diferentes sistemas biológicos, incluindo culturas de células de humanas (BENACHOUR; SERÁLINI, 2009; MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013), embriões de

sapos e galinhas (PAGANELLI *et al.*, 2010), diversos tecidos de peixes (SINHORIN *et al.*, 2014; BRAZ-MOTA *et al.*, 2015; MA; LI, 2015), ratos (MESNAGE *et al.*, 2015; CATTANI *et al.*, 2017; DE MARIA SERRA *et al.*, 2021), camundongos (MANÃS *et al.*, 2013; REN *et al.*, 2018) e porcos (KRÜGER *et al.*, 2014a, 2014b).

As principais consequências agudas da exposição ao glifosato e suas elaborações comerciais nos diversos tipos de organismos e culturas celulares são neurotoxicidade (COULLERY; FERRARI; ROSSO, 2016; ROY; CARNEIRO; OCHS, 2016), imunotoxicidade (KREUTZ *et al.*, 2011; MA; LI, 2015), desregulador endócrino (CLAIR *et al.*, 2012; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI *et al.*, 2013; CASSAULT-MEYER *et al.*, 2014), genotoxicidade (PRASAD *et al.*, 2009; KWIATKOWSKA *et al.*, 2017) e toxicidade hepática e renal (ÇAVUŞOĞLU *et al.*, 2011; WUNNAPUK *et al.*, 2014).

Por mais que estudos analisando os efeitos agudos das formulações contendo glifosato sejam importantes, experimentos controlados são essenciais para determinar os efeitos crônicos do agrotóxico, uma vez que a exposição humana aos herbicidas à base de glifosato ocorre cronicamente durante e após a aplicação nas lavouras e a partir do consumo de água e alimentos contendo resíduos de glifosato (MYERS *et al.*, 2016). Vinculado a isso, duas abordagens de pesquisa são adotadas para investigar os efeitos crônicos: estudos experimentais realizados em animais que citam possíveis relações causais e pesquisas correlativas que são geralmente feitas em humanos (VAN BRUGGEN *et al.*, 2018).

Nesse contexto, pesquisadores mencionando os efeitos crônicos das formulações contendo glifosato, submeterem ratos Sprague Dawley ao tratamento com 0,1 ppb de Roundup® (equivalente a 50 ng/L de glifosato e correspondente a 4 ng/kg de massa corporal/dia) diluído na água de beber durante dois anos e observaram alterações bioquímicas e anatomofológicas no tecido hepático e renal dos animais expostos ao agrotóxico. Para confirmar os achados, os autores realizaram análises de transcriptomas nos órgãos e as modificações evidenciadas na expressão gênica foram consistentes com fibrose, necrose, fosfolipidose, disfunção da membrana mitocondrial e isquemia em fígado e rim dos ratos (MESNAGE *et al.*, 2015).

Em 2017, o grupo de pesquisa de Mesnage e colaboradores (2017) publicou um estudo avaliando o proteoma e metaboloma de tecidos hepáticos dos mesmos animais do trabalho anterior (MESNAGE *et al.*, 2015), já que foi o órgão mais afetado pela administração crônica de Roundup® e demonstraram que as proteínas alteradas refletiam estresse oxidativo e modificações no metabolismo dos ácidos graxos, e a análise metabolômica confirmou a indução de estresse oxidativo e mostrou características de hepatotoxicidade. Tais alterações revelaram

uma sobreposição substancial com biomarcadores da doença hepática gordurosa não alcoólica e sua progressão para esteatose hepática, confirmando assim a disfunção metabólica no fígado dos ratos expostos cronicamente a uma dose ultra baixa de Roundup®.

Em relação aos estudos em humanos, uma pesquisa realizada no Sri Lanka demonstrou uma forte associação entre o aumento da prevalência de doenças renais crônicas e o consumo de águas subterrâneas com alta dureza contaminadas por glifosato, refletindo no acúmulo de sais nos rins dos agricultores ocupacionalmente expostos aos herbicidas (JAYASUMANA *et al.*, 2015). Segundo Camacho e Mejía (2017) as pulverizações aéreas de glifosato para eliminar plantas de coca na Colômbia causaram vários problemas de saúde as pessoas que viviam naquela área. Dentre as questões de saúde, destacam-se o aumento do número de abortos, bem como aumento dos casos de doenças respiratórias e dermatológicas.

Fortes correlações já foram encontradas entre o aumento do uso de glifosato e uma variedade de doenças em humanos, incluindo danos aos rins; desordens gastrointestinais; condições mentais, tais como autismo, demência senil, doença de Alzheimer e doença de Parkinson; distúrbios metabólicos e diversos tipos de câncer (SAMSEL; SNEFF, 2013 SWANSON *et al.*, 2014).

Em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), vinculada à OMS, classificou o glifosato como provavelmente cancerígeno para os seres humanos (grupo 2A). Apresentando evidências limitadas de carcinogenicidade em humanos e indicativos suficientes de que o glifosato pode promover câncer em animais de laboratório (GUYTON *et al.*, 2015; IARC, 2015).

Desde 2008, os agrotóxicos contendo glifosato estavam em processo de reavaliação no Brasil, determinado pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10/2008. Em 2019, a Anvisa lançou a Nota Técnica nº 23/2018 com a proposta de manutenção do glifosato em produtos agrotóxicos no país (ANVISA, 2019a). Após a realização da Consulta Pública nº 613/2019, a Agência deliberou por meio da RDC nº 441/2020 em manter as formulações contendo glifosato no Brasil (ANVISA, 2020b).

A Nota Técnica prévia de 2018 foi atualizada em 2020 (Nota Técnica nº 12/2020), nesse documento a Anvisa conclui que há evidência inadequada de carcinogenicidade tanto em animais experimentais quanto em humanos e menciona que não existe evidência suficiente para classificar o glifosato quanto à carcinogenicidade. Além disso, a Agência descreve que o glifosato não possui características teratogênicas, mutagênicas, não é um desregulador endócrino e nem é tóxico para a reprodução humana (ANVISA, 2020a). No entanto, pesquisas têm demonstrado diversos efeitos tóxicos importantes nos seres humanos e nos vários tecidos

animais após exposição aguda e/ou crônica ao glifosato e suas preparações comerciais. Dessa forma, torna-se relevante o desenvolvimento de estudos adicionais para entender os mecanismos tóxicos de ação do herbicida à base de glifosato, bem como de pesquisas que correlacionem a exposição crônica a baixas concentrações do agrotóxico e o surgimento de doenças.

A exposição à formulação contendo glifosato em células de animais pode alterar a concentração de vários íons, dentre eles têm-se o Ca^{2+} , o qual pode ativar/inibir diferentes vias de sinalização e demonstrar os possíveis modos de ação do herbicida em diversos tecidos, inclusive no tecido hepático.

1.3 CÁLCIO COMO SEGUNDO MENSAGEIRO

O Ca^{2+} é um segundo mensageiro universal que regula uma ampla variedade de reações celulares e respostas adaptativas. De modo que a atividade do Ca^{2+} depende da sua concentração e localização na célula (PETERSEN; MICHALAK; VERKHRATSKY, 2005). Geralmente, as concentrações de Ca^{2+} livre no citosol são baixas (0,1-0,2 μM) e elevadas em outros compartimentos, como no fluido extracelular (1 mM), na mitocôndria e no retículo endoplasmático (RE) o Ca^{2+} está associado com proteínas de armazenamento (KRAUSS, 2014; ALBERTS *et al.*, 2015). Contudo, aumentos descontrolados nas concentrações de Ca^{2+} livre dentro da célula podem promover dano e morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Por essa razão, é fundamental que os níveis intracelulares desse íon sejam mantidos sob estrito controle (DAVILA, 1999).

Vinculado a isso, para manter o gradiente de Ca^{2+} relativamente baixo no citosol, existem pelo menos dois mecanismos que bombeiam o Ca^{2+} para fora da célula. O primeiro é a bomba de Ca^{2+} -ATPase, onde o Ca^{2+} é transportado contra um gradiente de concentração, envolvendo consumo de energia com gasto de ATP e é regulado por proteínas Ca^{2+} -calmodulinas, proteínas ligantes ao Ca^{2+} . O outro mecanismo é o sistema de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que utiliza um gradiente de Na^+ a partir da membrana, que é mantido pela atividade da bomba de Na^+ , para dirigir o efluxo de Ca^{2+} (PETERSEN; PETERSEN; KASAI, 1994; KRAUSS, 2014).

No entanto, a membrana celular contém uma variedade de canais de Ca^{2+} que permitem que o influxo de Ca^{2+} aconteça do meio extracelular para o citosol, de maneira que os canais podem ser agrupados de acordo com o mecanismo de abertura em: canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDV), ativados por despolarização ou alteração no potencial de membrana.

Esses canais são classificados em tipo L, T, P, Q e R, os quais diferem entre si no modo de regulação, cinética de ativação e inativação via Ca^{2+} ; canais operados por ligantes são modulados pela ligação de agonistas/antagonistas; canais operados por segundos mensageiros; canais controlados pela proteína G e os canais operados por esfingolipídios (DUNLAP; LUEBKE; TURNER, 1995; KRAUSS, 2014).

Além disso, o Ca^{2+} pode ser liberado das reservas intracelulares, esses canais de Ca^{2+} são operados por estoque, os quais são ativados em resposta ao esgotamento de Ca^{2+} intracelular. Para isso, a mobilização do Ca^{2+} ocorre a partir do receptor de 1,4,5-inositoltrifosfato (IP_3) que está localizado na membrana do RE, o qual é regulado por IP_3 , ATP e Ca^{2+} , e pelo receptor de rianodina que é ativado principalmente por Ca^{2+} e está presente no RE de alguns tipos celulares (KRAUSS, 2014).

O Ca^{2+} regula várias funções no fígado, dentre elas têm-se o metabolismo de lipídios e carboidratos; a secreção biliar; bem como o controle do ciclo celular, incluindo a modulação da transcrição proteica antiapoptótica e próapoptótica que regulam a proliferação e morte celular. Nesse contexto, a desregulação da sinalização de Ca^{2+} pode levar a doenças hepáticas agudas e crônicas (AMAYA; NATHANSON, 2013; OLIVA-VILARNAU *et al.*, 2018).

Considerando-se que o aumento nas concentrações de Ca^{2+} citoplasmático pode contribuir para a formação de radicais livres, bem como as espécies reativas induzem aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular (HEMPEL; TREBAK, 2017), o estresse oxidativo pode estar envolvido nos mecanismos de toxicidade do herbicida contendo glifosato sobre os tecidos de animais.

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesas antioxidantes, seja pelo excesso de produção dos compostos oxidantes e/ou por depleção dos agentes antioxidantes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BARBOSA *et al.*, 2010). Tal processo pode promover à oxidação de macromoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cujo resultado é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

1.4.1 Radicais livres e espécies reativas

Os radicais livres (RL) são átomos, moléculas ou íons que contêm um ou mais elétrons desemparelhados que são altamente instáveis e ativos quando em reações químicas com outras moléculas (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Os RL cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio são chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs) e quando centrados nos átomos de nitrogênio são denominadas de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (VISIOLI; BORSANI; GALLI, 2000).

As principais EROs distribuem-se em dois grupos, as radicalares: radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxil ($\text{HOO}\cdot$), radical peroxil ($\text{ROO}\cdot$) e radical alcóxil ($\text{RO}\cdot$); e as não radicalares: oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxidos orgânicos (ROOH), ozônio (O_3), ácido hipobromoso (HOBr) e ácido hipocloroso (HOCl) (SÁNCHEZ, 2012; SIES; JONES, 2020). Dentre as ERNs de maior interesse biológico radicalares incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e o radical dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\cdot$); e as não radicalares englobam-se os peroxinitritos ($\text{ONOO}\cdot$) (SÁNCHEZ, 2012).

As espécies reativas podem ser produzidas a partir de substâncias endógenas e exógenas. Fontes endógenas incluem-se: a mitocôndria, o metabolismo do citocromo P450, a ativação de células (tais como neutrófilos e macrófagos) em processos inflamatórios, reações bioquímicas de oxidação/redução dependentes de O_2 e reações com metais de transição (VALKO *et al.*, 2006; SÁNCHEZ, 2012). Dentre as fontes exógenas podemos citar o tabagismo, poluentes da atmosfera, xenobióticos, bem como os estressores físicos (radiação ultravioleta, raio-X e outras radiações ionizantes) e os estressores psicológicos (estilo de vida) (SIES; JONES, 2020).

1.4.1.1 A importância dos íons ferro e cobre na geração de espécies reativas

O ferro e o cobre são catalisadores das reações de geração de EROs devido à função ativa em reações de óxido-redução. Nesse sentido, o ciclo redox desses metais induz a reação de Fenton e Haber-Weiss. Na reação de Fenton ocorre a produção de $\cdot\text{OH}$, por meio da reação do H_2O_2 com esses íons. Na reação de Haber-Weiss, esses íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot-}$, a fim de gerar o $\cdot\text{OH}$ (BARBOSA *et al.*, 2010).

O $\cdot\text{OH}$ é o mais reativo e deletério dos RL, já que o organismo não dispõe de nenhum sistema antioxidante que o neutralize. Além disso, $\cdot\text{OH}$ é capaz de reagir com quase todas as

moléculas biológicas (SÁNCHEZ, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015) e é considerado um indicador de peroxidação lipídica (SIES; JONES, 2020). Desse modo, os íons ferro e cobre possuem importância no mecanismo de lesão celular. Embora o ferro esteja biologicamente mais disponível no organismo quando comparado com o cobre (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

1.5 DANO OXIDATIVO

No organismo, as EROs e ERNs encontram-se envolvidos na geração de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, imunidade, defesa celular e síntese de substâncias biológicas importantes. Contudo, quando em excesso apresentam efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e oxidação de proteínas, enzimas, carboidratos e ácidos nucleicos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

1.5.1 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) ocorre pelo ataque à bicamada lipídica de qualquer espécie reativa capaz de sequestrar um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos. Os RL reagem com os ácidos graxos poli-insaturados e os fosfolipídeos de membrana, de modo que as espécies que podem realizar essa oxidação são o $\cdot\text{OH}$, $\text{HOO}\cdot$, $\text{NO}_2\cdot$, $\text{RO}\cdot$ e o $\text{ROO}\cdot$. A peroxidação lipídica pode inativar enzimas e receptores associados à membrana celular e aumentar a permeabilidade do Ca^{2+} , além de conduzir um aumento na permeabilidade das membranas biológicas, o que promove alterações irreversíveis nas propriedades funcionais da célula e culminam em morte celular (LOUREIRO; DI MASCIO; MEDEIROS, 2002; SÁNCHEZ, 2012).

A cascata de peroxidação lipídica é evidenciada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação um radical de elevada reatividade como o $\cdot\text{OH}$ extrai um átomo de hidrogênio do ácido graxo da membrana lipídica e forma o $\text{L}\cdot$ (radical lipídico) e H_2O . Na fase de propagação, o $\text{L}\cdot$ reage rapidamente com o O_2 , produzindo o radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$), esse radical pode abstrair hidrogênio de outro ácido graxo, gerando novamente o $\text{L}\cdot$ e conduzindo a etapa de propagação. A reação do $\text{LOO}\cdot$ com o átomo de hidrogênio abstraído forma um hidroperóxido lipídico (LOOH). O término da reação acontece quando os radicais gerados pelas etapas anteriores originam produtos não radicalares. Dentre os compostos não radicalares formados, está o malondialdeído (MDA), considerado extremamente tóxico ao

organismo e um bom indicador de injúria à membrana celular (LIMA; SAES; ABDALLA, 2001; SÁNCHEZ, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons de ferro ou cobre via conversão do LOOH em radicais extremamente reativos, como o LOO[•] e o LO[•], os quais dão início a uma nova reação em cadeia propagando o dano por toda a célula (BARBOSA *et al.*, 2010).

1.5.2 Oxidação de proteínas

A química das lesões às proteínas é complexa, uma vez que há 20 ou mais aminoácidos, cada um capaz de gerar vários produtos oxidativos. Contudo, existem aminoácidos mais susceptíveis a oxidação, como a tirosina, triptofano, fenilalanina, metionina, cisteína, histidina, lisina, leucina, valina, prolina, arginina, treonina e isoleucina (SÁNCHEZ, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

O [•]OH exerce diversas ações nocivas às proteínas, no entanto, H₂O₂, NO[•] ou O₂^{•-} em concentrações fisiológicas têm poucos efeitos diretos sobre as proteínas, embora o H₂O₂ possa reagir com grupos facilmente oxidáveis, como os grupos sulfidrilas (-SH) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Um importante dano oxidativo às proteínas é a oxidação dos grupos amino dos aminoácidos a grupos carbonilas. Vinculado a isso, a carbonilação de proteínas é usada como um biomarcador de lesões oxidativas (SÁNCHEZ, 2012).

As alterações oxidativas às proteínas promovidas pelas espécies reativas podem resultar em perda da função de receptores, enzimas e proteínas de transporte; modificação do papel das enzimas reparadoras do DNA; perda da fidelidade das DNAs polimerases em replicar o DNA; aumento ou redução da susceptibilidade à proteólise; alteração nas vias de sinalização; aumento da imunogenicidade; agregação proteica e modificação na transcrição gênica (SÁNCHEZ, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

1.5.3 Oxidação de DNA

Os mecanismos propostos para explicar as lesões ao DNA devido ao ataque das EROs são a ativação de endonucleases e a reação de Fenton. A liberação de Ca²⁺ da mitocôndria induzida por EROs pode ativar endonucleases dependentes de Ca²⁺ e as mesmas causarem quebra do DNA. Outra reação envolvida no dano ao DNA é a geração do [•]OH a partir da reação de Fenton, esse radical tem a capacidade de reagir com todos os componentes da molécula de DNA (bases purina e pirimidina, bem como o esqueleto de desoxirribose) e promover quebras

de fitas simples ou duplas, modificações de bases e fragmentação da desoxirribose (VALKO *et al.*, 2006; SÁNCHEZ, 2012).

O H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot-}$ não oxidam diretamente o DNA, enquanto o ROO^{\cdot} , RO^{\cdot} e o ONOO^- são capazes de provocar modificações diretas no DNA. A guanina é a base mais sensível a reação oxidativa; contudo, todas as bases são passíveis de oxidação. Os danos que as espécies reativas promovem no DNA podem estar associadas com alterações estruturais diretas ou induzidas pela inativação das enzimas encarregadas do reconhecimento de anomalias no DNA. Vinculado a isso, as lesões oxidativas ao DNA *in vivo* podem causar alterações estruturais no DNA (perda de bases, inserção de bases ou mutações), modificações em vias de transdução de sinal, instabilidade genômica, perda ou síntese de uma proteína por dano ao gene específico e erros de replicação, processos associados ao envelhecimento, enfermidades e carcinogênese (CADET *et al.*, 2003; VALKO *et al.*, 2006; SÁNCHEZ, 2012).

A análise das possíveis ações deletérias no DNA pode ser determinada pelo teste cometa. Essa técnica é rápida e sensível em mensurar sítios sensíveis ao pH alcalino e rupturas no DNA de eucariontes. Os danos ao DNA observados no teste ainda podem ser reparados. Após as células serem colocadas em gel de agarose e submetidas à eletroforese é possível verificar uma espécie de cauda que se forma nas células danificadas. Essa cauda é composta pelo DNA solto no núcleo devido a quebras de cadeias simples ou duplas e apresenta o comprimento diretamente proporcional à quantidade de DNA danificado (SINGH *et al.*, 1988; TICE *et al.*, 2000).

1.6 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

O sistema de defesa antioxidante tem o papel de inibir e/ou diminuir os danos promovidos pela ação dos RL e/ou das espécies reativas. Tais efeitos podem ocorrer por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a geração dos RL ou espécies não radicalares (sistemas de prevenção), evitando a ação desses às células (sistemas varredores) ou favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo). Nesse contexto, os meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser divididos em dois grupos, enzimáticos e não enzimáticos (BARBOSA *et al.*, 2010).

1.6.1 Antioxidantes enzimáticos

Os antioxidantes enzimáticos são divididos em defesas enzimáticas primárias e secundárias. No que diz respeito à defesa primária, a mesma é constituída de três importantes enzimas que impedem a formação ou neutralizam as EROs/ERNs: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx). A defesa secundária é composta pela glutathiona redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Essas enzimas não agem diretamente na remoção de espécies radicalares e não-radicalares, porém possuem funções de auxiliarem os outros antioxidantes endógenos (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001; CAROCHO, FERREIRA, 2013).

1.6.1.1 Superóxido dismutase

A SOD é uma metaloenzima que catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 (SÁNCHEZ, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; SIES; JONES, 2020). A decomposição do $O_2^{\cdot-}$ ocorre naturalmente, contudo, para que isso aconteça, é preciso ocorrer a colisão entre duas moléculas do $O_2^{\cdot-}$, de maneira que existe a necessidade de maior concentração desse radical. Enquanto a SOD detoxifica o $O_2^{\cdot-}$ mesmo em baixas concentrações (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A SOD é amplamente distribuída pelos tecidos. Nos organismos eucariontes, a enzima possui três isoformas: SOD-cobre-zinco (SOD-CuZn) citosólica, SOD-manganês (SOD-Mn) mitocondrial e SOD extracelular (SOD-EC). Todas as isoformas da SOD catalisam a eliminação do $O_2^{\cdot-}$ com similar eficiência (VALKO *et al.*, 2006; RAHMAN, 2007; SÁNCHEZ, 2012; HE *et al.*, 2017).

A SOD-CuZn é a primeira linha de defesa antioxidante e apresenta duas subunidades idênticas, cada uma contém um átomo de Cu e um de Zn ligados por um resíduo de histidina. Ela catalisa especificadamente a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e oxigênio, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. No entanto, o H_2O_2 pode inativar a SOD-CuZn (MATÉS, 2000; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; RAHMAN, 2007; SÁNCHEZ, 2012).

A SOD-Mn é um homotetrâmero e possui um átomo de Mn por subunidade, o qual oscila de Mn^{3+} para Mn^{2+} e volta para Mn^{3+} durante a eliminação do $O_2^{\cdot-}$ que ocorre em duas etapas, de modo que sua atividade enzimática aumenta com o estresse oxidativo (MATÉS, 2000; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; RAHMAN, 2007; SÁNCHEZ, 2012).

A SOD-EC é uma glicoproteína tetramérica dependente de Cu e Zn. A enzima é secretada do espaço intersticial dos tecidos e dos fluídos extracelulares e é responsável pela atividade da SOD presente no plasma, linfa e fluído sinovial. Todavia, sua regulação é primariamente coordenada por citocinas e não como resposta ao estresse oxidativo. A SOD-EC é a única enzima extracelular que elimina o $O_2^{\cdot-}$ (MATÉS, 2000; RAHMAN, 2007; SÁNCHEZ, 2012).

1.6.1.2 *Catalase*

A CAT é uma metaloproteína tetramérica, onde cada subunidade contém um grupo heme em seu sítio ativo. Nos mamíferos, a enzima está presente em todos os órgãos, em especial no fígado. É encontrada na matriz dos peroxissomos e nas mitocôndrias, contudo, nos eritrócitos localiza-se no citoplasma (SÁNCHEZ, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

A CAT realiza diretamente a decomposição do H_2O_2 em O_2 e água (VALKO *et al.*, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). CAT também possui funções na detoxificação de diferentes substratos (p.ex. fenóis e álcoois) através da redução acoplada do H_2O_2 (MATÉS, 2000; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

A enzima apresenta uma das maiores taxas de rotatividade conhecidas pelo ser humano, de modo que uma única molécula de CAT tem a capacidade de converter cerca de 6 milhões de moléculas de H_2O_2 em água e O_2 por minuto (VALKO *et al.*, 2006; RAHMAN, 2007). O papel da CAT como antioxidante é reduzir o risco da produção do $\cdot OH$ a partir do H_2O_2 por meio da reação de Fenton (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

1.6.1.3 *Glutathione peroxidase*

As glutathionas peroxidases (GPxs) apresentam um átomo de Se unido a um resíduo de cisteína (selenocisteína) em cada uma das 4 subunidades idênticas. A enzima é encontrada em todas as células dos mamíferos, em maiores quantidades no fígado, sangue total e rins. Existem 5 isoformas de GPx: GPx1 presente no citosol e mitocôndria; GPx2 específica do trato gastrointestinal; GPx3 encontra-se nos rins; GPx4 atua sobre hidroperóxidos derivados de fosfolípidos das lipoproteínas e membranas da maioria dos tecidos e GPx5 identificada recentemente, expressa no epidídimo de ratos, e independente de Se (MATÉS, PÉREZ-GÓMES; NÚÑEZ DE CASTRO, 1999; SÁNCHEZ, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

A GPx é responsável pela conversão do H_2O_2 em água ao oxidar duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) e produzir glutathiona oxidada (GSSG). Significativamente, a GPx compete com a CAT pelo H_2O_2 como substrato e é a principal fonte de proteção contra baixas concentrações de estresse oxidativo (VALKO *et al.*, 2006; HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Essa enzima também pode reduzir outros peróxidos orgânicos (p. ex. peróxidos lipídicos) para os correspondentes álcoois, de modo que toda GPx utiliza o grupo sulfidríla ($-SH$) da GSH como doador de elétrons (NORDBERG; ARNÉR, 2001; VALKO *et al.*, 2006).

1.6.1.4 *Glutathiona redutase*

A GR é uma flavoproteína dependente de NADPH. É uma enzima homodimérica, onde cada uma das duas subunidades contém um FAD (dinucleótido de flavina e adenina) em seu sítio ativo. Dessa forma, NADPH reduz FAD, que passa seus elétrons para uma ponte dissulfeto presente no sítio ativo. Os dois grupos $-SH$ formados então interagem com GSSG e o reduzem para duas moléculas de GSH. Em suma, GR catalisa a redução da GSSG utilizando o NADPH como cofator, regenerando a GSH e mantendo íntegro o sistema de proteção celular. A GR apresenta uma distribuição celular muito semelhante a GPx (HUBER; ALMEIDA, FÁTIMA 2008; SÁNCHEZ, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

1.6.1.5 *Glicose-6-fosfato desidrogenase*

A G6PD é responsável pela geração de NADPH, além de ser a enzima passo-limitante da via das pentoses-fosfato. NADPH é o equivalente redutor fundamental para o fornecimento de elétrons para a manutenção da tiorredoxina, bem como para o sistema redox dependente de GSH (DAMMEYER; ARNÉR, 2011; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Nesse sentido, o fornecimento contínuo de NADPH é essencial para a regulação e manutenção do equilíbrio redox celular. De modo que a expressão da G6PD é de grande importância para os principais sistemas antioxidantes celulares, contudo a sua expressão varia muito entre os diferentes tipos de células (DAMMEYER; ARNÉR, 2011).

1.6.1.6 *Glutathione-S-transferase*

As glutathione S-transferases (GSTs) constituem uma família de isoenzimas que desempenham um importante papel na detoxificação celular e excreção de substâncias eletrofílicas, geradas intracelularmente ou encontradas na forma de xenobióticos (X), auxiliando na proteção celular contra estresse oxidativo (VOS; BLADEREN, 1990; WILCE; PARKER, 1994).

Em eucariontes, as GSTs são divididas em três grandes famílias: GSTs citosólicas, GSTs mitocondriais e GSTs microssomais. As GSTs citosólicas são divididas em várias classes principais, com base nas propriedades químicas, físicas e estruturais. As GSTs mitocondriais são enzimas solúveis que apresentam semelhanças estruturais com GSTs citosólicas. Já as GSTs microssomais são conhecidas como proteínas associadas à membrana envolvidas no metabolismo dos eicosanóides e da glutathione, são proteínas de membrana integrais que não são relacionadas com as outras classes principais (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; OAKLEY, 2011).

O fígado é o órgão com maior quantidade de GST total, por ser o principal compartimento envolvido em processos de metabolização e biotransformação de diversas substâncias, especialmente xenobióticos. Contudo, em outros tecidos como rim, intestino, cérebro e eritrócitos, a enzima também está presente (HAYES; MANTLE, 1986). As GSTs são encontradas no meio biológico como homo ou heterodímeros (podendo existir outros complexos), apresentando dois sítios ativos por dímero cujas atividades são independentes uma da outra. Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de ligação, um específico para a GSH e outro sítio de ligação com menor especificidade para os eletrófilos (DANIELSON; MANNERVIK, 1985).

As GSTs são enzimas que atuam na fase II da biotransformação e catalisam a adição nucleofílica do grupo -SH da GSH aos centros eletrofílicos de compostos orgânicos (compostos fisiológicos e xenobióticos), resultando em produtos menos reativos, mais hidrofílicos e, portanto, mais facilmente excretados das células (WILCE; PARKER, 1994). Todavia, em algumas situações os produtos podem ser mais tóxicos do que a substância inicial (HUBER; ALMEIDA, FÁTIMA, 2008).

As GSTs possuem uma função importante na defesa da célula contra os xenobióticos e seus metabólitos reativos. Os conjugados GSH/X após formados pela ação da GST são reconhecidos por transportadores específicos e levados para o meio extracelular. No meio extracelular, os conjugados GSH/X são clivados pela γ -glutamyl transferase (GGT) e por

dipeptidases encontradas na porção externa da membrana celular. Posteriormente, ocorre a clivagem do resíduo de glicina por dipeptidases, restando no resíduo de cisteína ligado ao xenobiótico. O glutamato e a glicina livres podem ser reabsorvidos pela célula e usados na síntese *de novo* da GSH. E o conjugado cisteína/X é conduzido à circulação ou à bile. Dependendo das características da porção derivada do xenobiótico, esse poderá ser diretamente excretado na urina ou passará por metabolização para ser eliminado do organismo (HUBER; ALMEIDA, FÁTIMA, 2008).

1.6.1.7 *γ*-glutamil transferase

A GGT é uma glicoproteína incorporada à superfície externa da célula (ZHANG *et al.*, 2005). A enzima está ancorada à membrana celular através de um único domínio transmembranar N-terminal (IKEDA *et al.*, 1995). A GGT é existente nos diferentes órgãos, especialmente no fígado e nos rins (WHITFIELD, 2001).

A GGT funciona como uma transportadora de aminoácidos do espaço extracelular para o intracelular. Nesse contexto, a GGT realiza a transferência da porção *γ*-glutamil da GSH ou de qualquer outra substância contendo *γ*-glutamil presente no meio extracelular para aceptores como aminoácidos livres e peptídeos que são reintroduzidos para o espaço intracelular (MEISTER, 1973; DROZDZ *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2005).

A GGT é a única enzima capaz de iniciar a degradação da GSH extracelular, aumentando a disponibilidade dos aminoácidos para a síntese proteica e em especial fornecendo cisteína, o aminoácido limitante, para a síntese *de novo* da GSH. Assim, a GGT é essencial para manter a homeostase da cisteína e da GSH, e proteger os tecidos contra os danos oxidativos (DROZDZ *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2005; ZHANG; FORMAN, 2009).

Em adição, a GGT também catalisa o metabolismo de compostos endógenos, como o leucotrieno C4 e xenobióticos depois da conjugação com GSH. Dessa forma, GGT desempenha funções importantes na defesa antioxidante, em processos inflamatórios e na biotransformação de xenobióticos (ZHANG *et al.*, 2005; ZHANG; FORMAN, 2009).

1.6.2 Antioxidantes não enzimáticos

Os sistemas de defesas antioxidantes não enzimáticos possuem a capacidade de evitar o dano oxidativo por interações diretas e indiretas com as espécies reativas (CAROCHO;

FERREIRA, 2013). O grupo desses antioxidantes pode ter origem biológica, incluído a GSH, o ácido úrico, a bilirrubina, os hormônios sexuais, a melatonina, o ácido lipoico, os α -cetoácidos e a coenzima Q ou fonte dietética, dentre eles destacam-se as vitaminas C, E e A, os carotenoides, os polifenóis e as substâncias sintéticas (como p. ex. N-acetilcisteína) (BARBOSA *et al.*, 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

1.6.2.1 *Glutathiona reduzida*

A GSH é o principal antioxidante não enzimático intracelular multifuncional. GSH (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, e é o mais abundante tiol não proteico de baixa massa molecular. Está presente na maioria das células em concentrações relativamente altas (0,4-12 mM) e a sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH presente na cisteína. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MASELLA *et al.*, 2005; SÁNCHEZ, 2012).

As principais funções protetoras da GSH contra o estresse oxidativo são: cofator de diversas enzimas desintoxicantes no combate aos danos oxidativos, tais como GST e GPx; participa no transporte de aminoácidos através da membrana plasmática e é considerada um reservatório de cisteína; modula processos celulares como a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas; protege os grupos -SH de proteínas contra a oxidação; elimina diretamente $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, NO^{\cdot} e $\text{ONOO}^{\cdot-}$, além de detoxificar H_2O_2 e peróxidos lipídicos pela ação catalítica da GPx; e por fim, regenera as vitaminas C e E novamente às suas formas ativas (PASTORE *et al.*, 2003; MASELLA *et al.*, 2005; AOYAMA; NAKAKI, 2012; SÁNCHEZ, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; GAUCHER *et al.*, 2018).

A capacidade da GSH em regenerar os antioxidantes está associada ao estado redox do par glutathiona reduzida e glutathiona oxidada (GSH/GSSG) (PASTORE *et al.*, 2003). A proporção GSH/GSSH é relativamente alta nos tecidos e menos de 1% se encontra como GSSG (AOYAMA; NAKAKI, 2012; SÁNCHEZ, 2012). Nesse contexto, GSSG pode ser secretada da célula e degradada extracelularmente ou GSSG pode ser reduzida a GSH pela ação da GR às custas de NADPH. Isso permite que a GSH esteja na forma reduzida e haja como redutora de outras moléculas biológicas (MASELLA *et al.*, 2005).

1.6.2.2 Ácido ascórbico (Vitamina C)

Ácido ascórbico tem dois grupos hidroxilas ionizáveis e, por conseguinte, é um diácido (AscH_2). Em pH fisiológico, 99,9% da vitamina C está na forma protonada como ascorbato (AscH^-), e somente proporções muito pequenas como AscH_2 (0,05%) e Asc^{2-} (0,004%). A química da vitamina C é, portanto, o AscH^- (VALKO *et al.*, 2006; SÁNCHEZ, 2012).

O ascorbato apresenta funções metabólicas fundamentais para o organismo ao atuar como agente redutor, de modo que o AscH^- age eficientemente sobre $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ e óxidos de nitrogênio reativo. Sua oxidação produz o radical semideidroascorbato ($\text{Asc}^{\cdot-}$), uma espécie radicalar menos reativa do que o radical captado. Nesse sentido, o ascorbato é considerado o mais potente antioxidante hidrossolúvel presente nos mamíferos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VALKO *et al.*, 2006; SÁNCHEZ, 2012; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Em determinadas situações a vitamina C pode ter efeitos pró-oxidantes, uma vez que na presença de metais de transição como ferro e cobre, o AscH^- os reduz e é oxidado a $\text{Asc}^{\cdot-}$. O H_2O_2 gerado na reação reage com os íons metálicos reduzidos, levando a produção do $\cdot\text{OH}$ através da reação de Fenton. Contudo, como os íons de ferro raramente estão na forma livre nos tecidos, as propriedades antioxidantes do AscH^- predominam sobre as propriedades pró-oxidantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; RAHAL *et al.*, 2014).

1.6.2.3 Vitamina E

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel existente em oito isoformas, quatro tocoferóis (α -, β -, γ - e δ -tocoferol) e quatro tocotrienóis (α -, β -, γ - e δ -tocotrienol). O α -tocoferol (α -TocH) é a forma mais ativa ao representar cerca de 90% de todos os tocoferóis presentes nos tecidos e é um poderoso antioxidante biológico, considerado o principal antioxidante ligado à membrana utilizado pela célula (VALKO *et al.*, 2006; RAHMAN, 2007; SÁNCHEZ, 2012).

A função antioxidante da vitamina E está associado ao grupo -OH presente no grupo fenólico contido no anel cromanol dos tocoferóis. A vitamina E doa o átomo de hidrogênio fenólico ao radical peroxil (LOO^{\cdot}) gerando hidroperóxido de lipídio (LOOH) e radical α -tocoferoxil (α -Toc $^{\cdot}$) que, apesar de também ser radical, é incapaz de continuar a reação em cadeia oxidativa. O α -Toc $^{\cdot}$ é capaz de reagir com outro radical lipídico livre para formar um

produto não-radicalar. Por esse processo, a vitamina E neutraliza os LOO^\bullet e bloqueia a peroxidação lipídica, em especial a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, que é essencial para a proteção das membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; HE *et al.*, 2017; LLORET *et al.*, 2019).

O $\alpha\text{-Toc}^\bullet$ pode ser regenerado a $\alpha\text{-TocH}$, sua forma ativa, fundamentalmente pela ação da vitamina C (ao converter Asc^\bullet em Asc^-). Ubiquinol (forma reduzida da coenzima Q) também possui a capacidade de reciclar o $\alpha\text{-Toc}^\bullet$, bem como alguns flavonoides e a GSH (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; SÁNCHEZ, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; LLORET *et al.*, 2019).

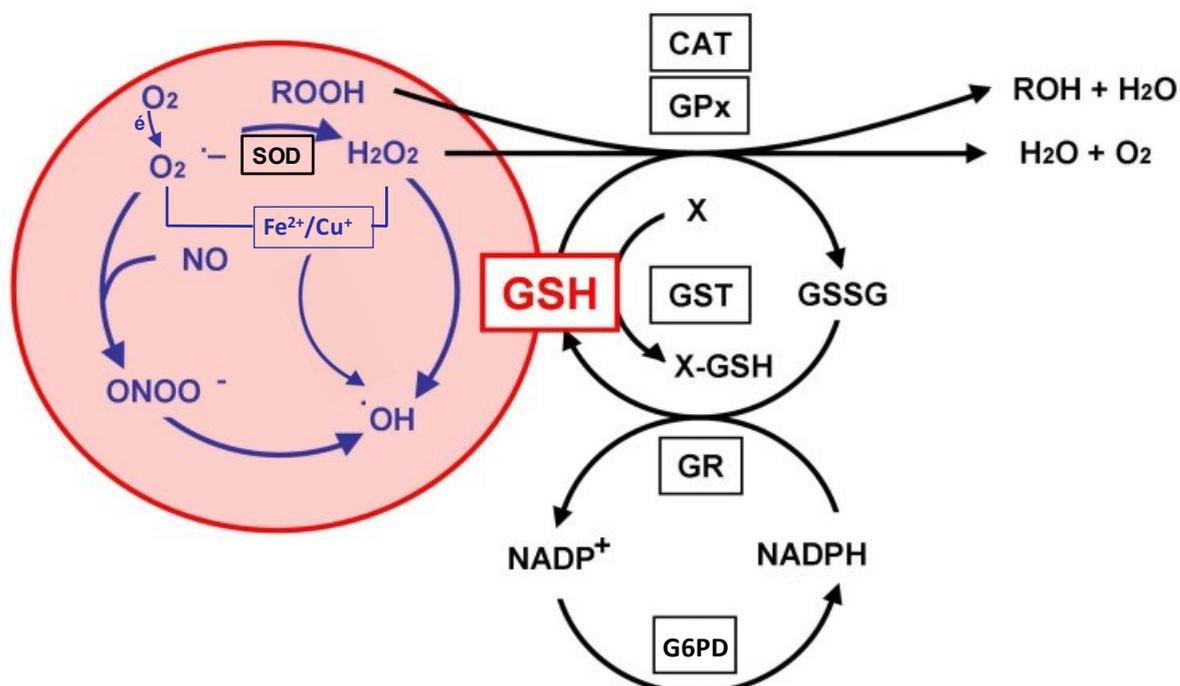
1.6.2.4 N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante sintético derivado dos tióis que contém o grupo $-\text{SH}$ em sua composição, sendo um precursor do aminoácido L-cisteína e consequentemente da GSH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ŠALAMON *et al.*, 2019).

NAC é um antioxidante direto que interage com grupos eletrofílicos dos RL através da sua cadeia lateral livre contendo tiol. NAC reage rapidamente com $^\bullet\text{OH}$, NO_2^\bullet e íon trióxido de carbono (CO_3^\bullet). Embora NAC não interaja diretamente com NO^\bullet , ela reage com sua forma reduzida e protonada, o nitroxil (HNO). Em adição, NAC tem a capacidade de quelar íons de metais de transição como Fe^{3+} e Cu^{2+} , além de íons de metais pesados como Cd^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+} . Esse processo de quelação facilita a remoção desses íons metálicos do organismo (PEI *et al.*, 2018; TARDIOLO; BRAMANTI; MAZZON, 2018).

NAC também exerce efeitos como um antioxidante indireto. As constantes de velocidade das reações de NAC com O_2^\bullet , H_2O_2 , ONOO^- são relativamente lentas em condições fisiológicas. Nesse sentido, a ação antioxidante indireta da NAC depende da reposição de GSH intracelular. Considerando que a síntese de GSH depende de substratos disponíveis nos quais a cisteína geralmente representa um precursor limitante e a NAC após entrar nas células é hidrolisada para permitir a liberação de cisteína, observa-se que a manutenção do conteúdo de GSH no ambiente intracelular é influenciada pela NAC (PEI *et al.*, 2018; TARDIOLO; BRAMANTI; MAZZON, 2018).

Figura 5. Representação esquemática do sistema de defesa antioxidante das células combatendo as EROs e as ERNs.



O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é formado espontaneamente em condições fisiológicas em quase todas as células aeróbicas, por meio da cadeia transportadora de elétrons. A superóxido dismutase (SOD) dismuta o $O_2^{\cdot-}$ e produz o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 e os hidroperóxidos (ROOH) são degradados pela glutatona peroxidase (GPx) em água e álcoois, respectivamente. A catalase (CAT) pode remover o H_2O_2 , mas não o ROOH, em condições normais. A glutatona reduzida (GSH) age como doadora de elétrons na redução do H_2O_2 catalisada pela GPx e produz o dissulfeto de glutatona (GSSG). A forma oxidada da glutatona (GSSG) é reduzida novamente a GSH pela glutatona redutase (GR) dependente de NADPH, oriundo do ciclo das pentoses através da ação da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). A GSH tem a capacidade de conjugação com diversos compostos endógenos e xenobióticos (X), mediados pela enzima glutatona-S-transferase (GST), para remover o X do organismo. A GSH também pode reagir diretamente com óxido nítrico (NO^{\cdot}), peroxinitrito ($ONOO^-$), $\cdot OH$ e $O_2^{\cdot-}$. O ferro livre (Fe^{2+}) tem a capacidade de reagir com H_2O_2 via reação de Fenton ou com H_2O_2 mais $O_2^{\cdot-}$ através da reação de Haber-Weiss e produzir $\cdot OH$, caso esse radical não seja rapidamente detoxificado, o mesmo pode reagir com moléculas biológicas importantes.

Fonte: Adaptado de Aoyama e Nakaki (2012).

1.7 HOMEOSTASE DO FERRO

O ferro é um elemento fundamental para numerosos processos biológicos. A maior parte do ferro no organismo está incorporada na hemoglobina das hemácias. Os hepatócitos do fígado são um importante local de acúmulo de ferro, esse íon é depositado no tecido ligado a uma proteína e o conjunto dessa associação forma a ferritina. Além do ferro ser armazenado nos macrófagos do sistema reticuloendotelial esplênico, os quais são os responsáveis pela reciclagem desse íon no corpo. As demais células contêm quantidades menores de ferro para os processos celulares essenciais (PANTOPOULOS *et al.*, 2012; GANZ, 2013).

O organismo precisa de 20-25 mg de ferro para atender às necessidades diárias do corpo. Cerca de 1 a 2 mg de ferro provém da dieta através da absorção de ferro pelos enterócitos

duodenais. Contudo, o organismo também possui uma perda de 1 a 2 mg de ferro, principalmente por descamação epitelial e perda sanguínea. Nesse contexto, a maior parte do ferro é reciclado no organismo, os 20 a 25 mg de ferro requeridos são oriundos da degradação dos eritrócitos pelos macrófagos reticuloendoteliais (presente no baço e em outros órgãos). Dessa forma, o ferro provindo da dieta ou procedente da destruição das hemácias é distribuído aos tecidos através do plasma ligado à proteína transportadora de ferro denominada transferrina (SÁNCHEZ, 2012; GANZ, 2013; DEV; BABITT, 2017).

Nos mamíferos, o ferro é incorporado às proteínas como um componente do heme (p. ex. hemoglobina, mioglobina, proteínas do citocromo, mieloperoxidase, óxido nítrico sintetases), aglomerados ferro-enxofre (tais como: complexos respiratórios I-III, coenzima Q10, aconitase mitocondrial, DNA primase), além de outros grupos funcionais. Estas proteínas contendo ferro são necessárias para funções vitais das células incluindo transporte de O₂, respiração mitocondrial, metabolismo intermediário e xenobiótico, replicação e reparo de DNA, defesa do hospedeiro e sinalização celular (WIJAYANTI; KATZ; IMMENSCHUH, 2004; EVSTATIEV; GASCHÉ, 2012).

O íon participa das reações redox devido à capacidade de perder ou ganhar elétrons. Paradoxalmente, as mesmas propriedades que permitem o ferro ter funções catalíticas nas reações de oxidação/redução são as responsáveis por convertê-lo em uma fonte altamente reativa. De modo que agentes redutores podem facilitar a redução de Fe³⁺ ligado a transferrina e gerar Fe²⁺, esse íon é capaz de participar de reações produtoras de RL, e caso não sejam rigorosamente controlados os RL reagem com macromoléculas e danificam os tecidos (JOMOVA; VALKO, 2011; SÁNCHEZ, 2012; TORTI; TORTI, 2013).

1.8 ASPECTOS HEMATOLÓGICOS: SANGUE E SEUS ELEMENTOS CELULARES

As células sanguíneas são formadas a partir das células-tronco pluripotentes presentes na medula óssea vermelha, a qual está localizada no interior dos ossos axiais e longos. A proliferação, diferenciação e manutenção das células-tronco hematopoiéticas são intermediadas por interleucinas e fatores estimulantes de colônias, que atuam diretamente em receptores de membrana estimulando ou inibindo o crescimento celular. A interação de fatores de crescimento ou interleucinas com as células-tronco hematopoiéticas promovem a divisão e diferenciação dessas células, as quais podem ser renovadas ou originar células progenitoras multipotentes que têm potencial para expressar genes tanto da linhagem mieloide quanto linfóide. A linhagem mieloide são as unidades formadoras dos eritrócitos, neutrófilos,

eosinófilos, basófilos, monócitos e plaquetas e a linhagem linfoide são as unidades formadoras dos linfócitos B e T e das células *natural killer* (NK) (TRAVLOS, 2006; KAUSHANSKY *et al.*, 2016).

O sangue apresenta três funções gerais: transporte, regulação e proteção. Esse fluido transporta nutrientes, produtos metabólicos, gases, hormônios e células (APPLEGATE, 2012). O sangue coopera no controle da temperatura corporal, na regulação do equilíbrio osmótico e na manutenção do equilíbrio ácido-base (GUYTON; HALL, 2017). Em relação ao papel de proteção, o sangue contém células de defesa que agem protegendo o organismo contra infecções e toxinas e também possui proteínas essenciais e plaquetas que protegem da perda sanguínea (MARTINI; TIMMONS; TALLITSCH, 2009; APPLEGATE, 2012).

O sangue total é constituído por elementos celulares (55%) e plasma (45%). Os elementos celulares são compostos por células e fragmentos celulares, como as hemácias ou eritrócitos (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas (APPLEGATE, 2012; YOUNG; O'DOWN; WOODFORD, 2014).

O plasma consiste de 92% em água, 7% em proteínas, tais como albumina, globulina e fibrinogênio e cerca de 1% em outros solutos, incluindo eletrólitos (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} Cl^- , HCO_3^- , HPO_4^-), gases (N_2 , O_2 e CO_2), nutrientes orgânicos (lipídios, aminoácidos, carboidratos, vitaminas e hormônios) e resíduos orgânicos (ureia, ácido úrico, creatinina, bilirrubina e amônia). O plasma tem o papel de transportar a água e os solutos necessários para todos os tecidos do organismo (MARTINI; TIMMONS; TALLITSCH, 2009).

Considerando-se que as células sanguíneas são uma das primeiras células do organismo a serem expostas a inúmeros xenobióticos (PANDEY; RIZVI, 2010), o sangue pode ser relativamente sensível aos efeitos do glifosato e ao possível dano oxidativo, sendo uma amostra biológica de fácil obtenção para investigar a exposição dos produtos contendo glifosato nos diversos organismos. Vinculado a isso, analisar as consequências do tratamento subcrônico com formulações à base de glifosato nos tecidos responsáveis pelo metabolismo energético pode auxiliar no entendimento das ações do herbicida como potencial indutor de distúrbios metabólicos.

1.9 METABOLISMO ENERGÉTICO

1.9.1 Metabolismo dos carboidratos: digestão, captação e armazenamento

Os carboidratos são um dos principais constituintes da dieta e apresentam uma fonte importante de glicose para o organismo, de modo que os hidratos de carbono possuem um papel fundamental no equilíbrio energético. Os carboidratos quando ingeridos estão na forma de polissacarídeos, os quais necessitam ser quebrados em moléculas mais simples para serem absorvidos pelo corpo (DROZDOWSKI; THOMSON, 2006; LETURQUE; BROT-LAROCHE; LE GALL, 2012).

Nesse sentido, a digestão dos carboidratos inicia-se na boca a partir da amilase salivar que começa a hidrolisar os polissacarídeos em oligossacarídeos durante a mastigação. No intestino, a enzima responsável por continuar o processo de quebra dos oligossacarídeos é a amilase pancreática. Contudo, para que aconteça a hidrólise dos dissacarídeos em monossacarídeos no intestino, é essencial a ação das dissacaridases (sacarase, maltase e lactase), as quais estão na membrana plasmática dos enterócitos intestinais. A hidrólise da sacarose pela enzima sacarase libera uma molécula de glicose e uma de frutose. A maltase atua sobre a maltose e libera duas unidades de glicose. E a lactose sofre ação da lactase liberando uma molécula de glicose e uma de galactose (KRASIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001; DROZDOWSKI; THOMSON, 2006; LETURQUE; BROT-LAROCHE; LE GALL, 2012).

Após os dissacarídeos serem digeridos em monossacarídeos, os mesmos podem ser captados no lúmen intestinal e levados para corrente sanguínea. Todavia, a glicose não consegue adentrar as células epiteliais dos enterócitos por difusão entre os poros, uma vez que possui uma massa molecular relativamente grande. Dessa forma, há dois mecanismos de transporte de glicose através da membrana celular dos enterócitos: o transporte facilitado, o qual é mediado por co-transporte de íons Na^+ (SGLTs); e os transportadores de glicose membrana específicos (DROZDOWSKI; THOMSON, 2006; LETURQUE; BROT-LAROCHE; LE GALL, 2009, 2012).

Quando a glicose entra na corrente sanguínea, ela pode ser captada pelos tecidos, os quais necessitam do carboidrato e/ou que metabolizam a glicose, a partir da família dos transportadores de glicose (GLUTs). De modo que a insulina está envolvida na manutenção da homeostasia da glicose, e conforme a classe de GLUT presente no órgão, o transportador depende ou não da ação da insulina para ser translocado para a membrana celular e captar

glicose para dentro do tecido (SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004; THORENS; MUEKLER, 2010).

O fígado tem acesso direto aos nutrientes oriundos da dieta devido ao seu contato com a veia porta (vaso que leva sangue dos órgãos do sistema digestório para o fígado). Vinculado a isso, a glicose é captada no tecido hepático a partir do transportador de glicose (principalmente GLUT2), o qual não tem sua atribuição modulada pela insulina. Assim, no interior dos hepatócitos a glicose realiza suas funções metabólicas, e quando o carboidrato está em excesso no organismo, a glicose é armazenada na forma de glicogênio (glicogênese) no órgão (ROACH, 2002; FERRER *et al.*, 2003; THORENS; MUEKLER, 2010; ROACH *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a insulina regula a síntese de glicogênio ao ligar-se no receptor de insulina presente na membrana do fígado, e conseqüentemente ativar a atividade tirosina cinase do mesmo. O receptor promove a fosforilação das proteínas substratos do receptor de insulina, as IRS-1/2. Através de uma cascata de ativação a partir de uma série de proteínas, ocorre a fosforilação e ativação da PKB/Akt. A PKB/Akt ativada então fosforila a cinase de glicogênio sintase 3 (GSK3), uma enzima mediadora chave no metabolismo do glicogênio, inativando-a. A GSK3 apresenta duas isoformas, a GSK-3 α e a GSK-3 β , sendo que a GSK-3 β é a isoenzima mais abundante no organismo. A inibição da GSK3 permite que a fosfoproteína fosfatase1 (PP1) desfosforila a glicogênio sintase (GS), a enzima passo-limitante da glicogênese, convertendo-a na sua forma ativa. Desse modo, ocorre a síntese de glicogênio no fígado (TAHA; KLIP, 1999; ROACH, 2002; FERRER *et al.*, 2003; ROACH *et al.*, 2012; BEUREL; GRIECO; JOPE, 2015; CERVELHO *et al.*, 2017; VILLAGARCÍA *et al.*, 2018).

O processo de glicogenólise ou degradação do glicogênio no fígado é realizado pela enzima glicogênio fosforilase, a qual é ativada pelo glucagon por meio de uma cascata de fosforilações e ativações de proteínas. A glicogênio fosforilase gera glicose 1-fosfato que é convertida em glicose 6-fosfato, essa é desfosforilada pela glicose 6-fosfatase originando moléculas de glicose livre, as quais deixam os hepatócitos através do GLUT2 e são liberadas no sangue para repor a normoglicemia do organismo (ROACH, 2002; FERRER *et al.*, 2003; ROACH *et al.*, 2012).

1.9.2 Metabolismo do glutamato oriundo da dieta

O glutamato é um aminoácido não essencial e um dos aminoácidos mais abundantes (cerca de 8-10%) encontrados nas proteínas oriundas da alimentação. A ingestão desse aminoácido proveniente da dieta compreende o glutamato associado à proteína e na forma livre

(RANGAN; BARCELOUX, 2009; TOMÉ, 2018). Além da fonte alimentar, glutamato livre é gerado pela microbiota no lúmen intestinal (MAZZOLI; PRESSIONE, 2016).

Diversos receptores e transportadores de glutamato foram encontrados no trato gastrointestinal e no sistema nervoso entérico. Nesse contexto, o primeiro passo no metabolismo do glutamato oriundo da dieta é o transporte do lúmen intestinal a partir da membrana apical dos enterócitos presentes no intestino delgado através dos transportadores de aminoácidos excitatórios 1 (EAAT-1) (IWANAGA; GOTO; WATANABE, 2005; BURRIN; STOLL, 2009), sendo que grande parte do glutamato é metabolizado pelas células intestinais para a manutenção da atividade da mucosa do intestino (HOU; WU, 2018; TOMÉ, 2018).

O glutamato é um nutriente fundamental para o tecido intestinal, uma vez que o mesmo desempenha um papel no metabolismo de aminoácidos intestinais, bem como é o precursor de importantes moléculas biologicamente ativas geradas na mucosa intestinal, como 2-oxoglutarato, L-alanina, ornitina, arginina, prolina, GSH e ácido γ -aminobutírico (GABA) (HOU; WU, 2018; TOMÉ, 2018).

Uma vez dentro do enterócito intestinal, o catabolismo do glutamato acontece no citosol e mitocôndria por transaminação através da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), aminotransferase de cadeia ramificada e glutamato desidrogenase (GDH) que estão presentes ao longo do intestino delgado (SURYAWAN *et al.*, 1998; BURRIN *et al.*, 2003; SWEATT *et al.*, 2004). Essas vias metabólicas envolvem a transaminação do glutamato em alanina e aspartato, bem como a formação de outros metabólitos, tais como α -cetoglutarato, γ -aminobutirato, ureia e GSH (TOMÉ, 2018).

O glutamato é um importante substrato energético no intestino e cerca de 35% do consumo total de energia das células da mucosa intestinal provém do glutamato da dieta que é oxidado em CO_2 (TOMÉ, 2018). De modo que o glutamato dietético quase não tem influência nas concentrações de glutamato plasmático devido à sua ampla utilização pelo trato gastrointestinal (STEGINK *et al.*, 1986; GRAHAM *et al.*, 2000).

Em adição, o glutamato age como um quimiossensor de nutrientes oral e pós-oral, que engloba os nervos gustativos e vias intestino-cérebro humoral e neural (vagal), impactando no comportamento alimentar e nas funções intestinais (SCLAFANI, ACKROFF; 2012; UNEYAMA; KOBAYASHI; TONOUCI, 2017). Dessa forma, o glutamato funciona como uma molécula sinalizadora no sistema nervoso entérico e modula os reflexos neuroendócrinos no trato gastrointestinal (NIIJIMA, 2000).

Somando as informações mencionadas e considerando-se que a exposição *in vitro* e/ou *in vivo* ao HBG pode induzir ações tóxicas em diferentes tipos celulares de diversos

animais, torna-se relevante o estudo dos efeitos do HBG sobre o tecido hepático, intestinal, medular e sanguíneo em ratos imaturos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos de toxicidade subjacente a exposição *in vitro* ao HBG em tecido hepático de ratos imaturos, bem como os efeitos da exposição perinatal ao herbicida em fígado, duodeno, medula óssea e sangue periférico da prole de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os efeitos da exposição *in vitro* do HBG no influxo de Ca^{2+} e na viabilidade celular em tecido hepático de ratos com 15 dias de idade;
- Investigar os mecanismos envolvidos no influxo de Ca^{2+} em fígado de ratos imaturos após tratamento *in vitro* com o HBG;
- Caracterizar mecanismos de proteção aos danos causados pela exposição *in vitro* ao HBG em células hepáticas;
- Analisar as consequências do tratamento *in vitro* com o HBG na atividade das aminotransferases (ALT e AST) em fígado de ratos imaturos;
- Verificar os efeitos *in vitro* do HBG e do glifosato isolado na atividade da GGT em células hepáticas;
- Investigar as ações do HBG sobre o balanço redox celular, após exposição tanto *in vitro* em fatias de fígado quanto *in vivo* no sangue periférico de ratos imaturos;
- Analisar os efeitos do tratamento *in vivo* com o HBG no DNA de filhotes de ratos;
- Estudar as consequências da exposição subcrônica ao HBG no perfil eritrocitário, leucocitário e plaquetário em sangue periférico de animais com 15 dias de idade;
- Avaliar a celularidade e a deposição de ferro em medula óssea da prole de ratos expostas ao HBG durante o período perinatal;
- Verificar as ações *in vivo* do HBG na captação de D-glicose, na captação de ^{14}C -glutamato, bem como na atividade das dissacaridases intestinais (maltase, lactase e sacarase) e na atividade da GGT em duodeno de ratos imaturos;
- Investigar os efeitos da exposição perinatal ao HBG na quantificação da GSK-3 β total e fosforilada e no conteúdo de glicogênio em fígado de animais com 15 dias de idade;
- Determinar a glicemia e a concentração de glicose, lactato e ureia em tecido hepático dos filhotes de ratos tratados com o HBG durante a prenhez e o aleitamento;

- Estudar as consequências da exposição materna ao HBG nas citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 em fígado da prole de ratos.

3 DIVISÃO DO ESTUDO

A exposição *in vitro* e/ou *in vivo* ao HBG, herbicida mais utilizado no Brasil e no mundo, pode ter efeitos tóxicos sobre vários tecidos dos ratos expostos ao agrotóxico interferindo em diferentes vias metabólicas e oxidativas, bem como em parâmetros bioquímicos, hematológicos, hematopoiéticos e imunológicos. Nesse contexto, o presente estudo tem a finalidade de elucidar as consequências e os mecanismos de ação do HBG em fígado, intestino delgado, medula óssea e sangue periférico de ratos em desenvolvimento.

Para isso, o nosso trabalho foi dividido em 3 estudos:

-Estudo I: Hepatotoxicidade induzida pela exposição *in vitro* ao herbicida à base de glifosato mediada pelo acúmulo de cálcio e estresse oxidativo em ratos imaturos;

-Estudo II: Consequências do tratamento *in vivo* com o herbicida contendo glifosato no sangue periférico e medula óssea da prole de ratos;

-Estudo III: Efeitos da exposição perinatal à formulação contendo glifosato no metabolismo energético e no sistema imune dos filhotes de ratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

O herbicida à base de glifosato utilizado neste estudo foi a formulação comercial Roundup Original® (sal de isopropilamina de glifosato 480 g/L – 360 g/L equivalente glifosato) (St Louis, MO, EUA), com o registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob o número 898793. As substâncias radioativas [$^{45}\text{Ca}^{2+}$]- CaCl_2 (sp. act. 321 KBq/mg Ca^{2+}), [^{14}C]-2-desoxi-D-glicose (^{14}C -DG) (sp act 9,25 GBq/mmol) foram obtidos da “Du Pont NEN Products” (Boston, EUA). O [^{14}C]-L-glutamato (sp. act. 9,62 GBq/mmol) foi adquirido da Amersham (Oakville, Ontario, Canadá) e o Optiphase Hisafe III líquido de cintilação biodegradável foi obtido da Perkin Elmer (Waltham, MA, EUA). O glifosato de grau analítico, os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo, os inibidores proteicos, bloqueadores de canais e as substâncias antioxidante foram adquiridos da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A.). Para leitura da ABS na medição das atividades enzimáticas foi utilizado o leitor de placas Tecan Infinito® 200 PRO.

4.2 ANIMAIS

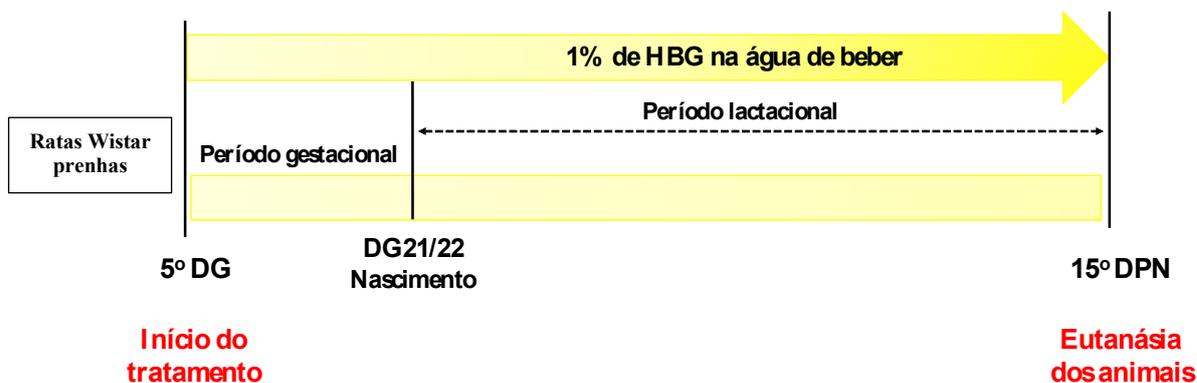
Utilizaram-se ratos machos (linhagem Wistar) com 15 dias de idade e ratas fêmeas (linhagem Wistar) prenhas com 5 dias de gestação provenientes do Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e expostos a um ciclo claro/escuro 12/12 h em sala climatizada com temperatura controlada em 21 ± 2 °C, com ração (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brasil) e água a vontade. Todos os animais foram monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta Universidade (CEUA/UFSC, Protocolo nº PP00820).

4.3 TRATAMENTO *IN VIVO* COM O HBG

Ratas Wistar fêmeas prenhas foram expostas a 1% de HBG (equivalente a 0,36% de glifosato) na água de beber. O tratamento iniciou no quinto dia gestacional (5º DG) e prosseguiu até os filhotes completarem 15 dias pós-natal (15 DPN), que representou o período imaturo de

desenvolvimento. A exposição materna ao HBG abrangeu o período gestacional (DG5 ao DG21-22) e lactacional (1º DPN ao 15º DPN), correspondendo ao período perinatal dos filhotes de ratos. Os animais controles receberam água durante o mesmo período (Figura 6).

Figura 6. Representação do delineamento experimental *in vivo*.



O tratamento das ratas prenhas com 1% de HBG na água de beber iniciou no 5º DG. No DG21/22 os filhotes nasceram e continuaram expostos ao HBG pelo leite materno (período lactacional) durante todo o tempo experimental. No décimo quinto dia pós-natal (15º DPN) os animais foram eutanasiados e foram coletados fígado, duodeno, medula óssea e sangue periférico para as avaliações bioquímicas.

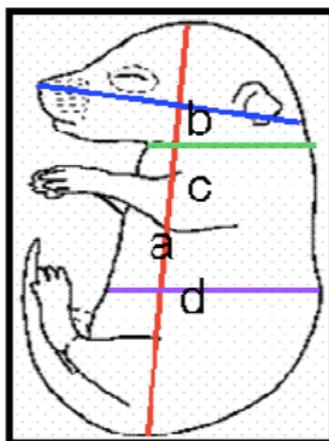
Fonte: do Autor.

Ratos com 15 DPN foram utilizados nos nossos experimentos, uma vez que o período de máxima sinaptogênese em ratos acontece entre 11DPN e 20 DPN, um período que está associado com o aumento da plasticidade sináptica a fim de estabelecer adequadas condições sinápticas (SUTOR; LUHMANN, 1995). Achados no nosso grupo de pesquisa publicado anteriormente, já demonstraram que a exposição perinatal a 1 % de HBG promoveu neurotoxicidade ao ativar receptores NMDA, alterar o sistema de neurotransmissão colinérgica, causar disfunções em astrócitos, bem como induzir estresse oxidativo e excitotoxicidade glutamatérgica em hipocampo de ratos com 15 dias de idade (CATTANI *et al.*, 2014, 2017). Nesse contexto, com o intuito de elucidar os possíveis efeitos *in vivo* do HBG no organismo, analisaremos diferentes tecidos da prole de ratos.

O número de animais utilizados em cada ensaio foi de pelo menos 6 por grupo experimental. A concentração materna de HBG foi equivalente a 70 mg de glifosato/kg/dia (CATTANI *et al.*, 2014, 2017). A dosagem escolhida para tratamento *in vivo* foi fundamentada num estudo de Williams, Kroes e Munro (2000), o qual demonstrou que 1000 mg de glifosato/kg de massa corporal/dia não causou efeitos adversos na toxicidade materna ao glifosato. No 15º DPN os ratos controles e tratados foram submetidos à medição de parâmetros biométricos, tais como: comprimento longitudinal na posição natural, comprimento occipito-nasal, diâmetro transcervical e diâmetro umbilical (D'GREGORIO; MILLER, 1988) com o

intuito de investigar se a exposição materna ao agrotóxico interfere no desenvolvimento dos filhotes (Figura 7). Em seguida os animais foram eutanasiados, com remoção do fígado (padronização do lobo hepático esquerdo), intestino delgado (região duodenal), fêmur (obtenção da medula óssea) e sangue periférico.

Figura 7. Ilustração dos parâmetros biométricos realizados nos ratos imaturos.



(A) Comprimento longitudinal na posição natural representado pela linha vermelha; (B) Comprimento occipito-nasal representado pela linha azul; (C) Diâmetro transcervical representado pela linha verde; (D) Diâmetro umbilical representado pela linha lilás.

Fonte: Adaptado de D'Gregorio e Miller (1988) e Nava (2010).

4.4 TRATAMENTO *IN VITRO* COM O HBG

O HBG foi utilizado em modelo experimental de exposição *in vitro* para analisar as ações desse agrotóxico sobre o tecido hepático. Desse modo, ratos machos com 15 dias de idades foram eutanasiados e o fígado foi coletado e fatiado. As fatias de fígado foram previamente pré-incubadas por 15 min a 37 °C em solução salina balanceada de Hanks, pH 7,4 (NaCl 136,9 mM; KCl 5,36 mM; CaCl₂ 1,29 mM; MgSO₄ 0,65 mM; KH₂PO₄ 0,441 mM; NaHCO₃ 0,417 mM; Na₂HPO₄ 0,27 mM; D-glicose 6,1 mM), em banho metabólico sob agitação, para estabilização dos tecidos, seguido por uma incubação de 30 min com ou sem o HBG em diferentes concentração ou 36 mg/L de glifosato PA. A seguir, o tecido foi homogeneizado em tampões específicos conforme a análise bioquímica a ser executada. Após a realização de uma curva dose-resposta com concentrações do HBG que variaram de 0,036 a 36 mg/L, utilizou-se a concentração de 0,36 mg/L do HBG nos demais experimentos. Todas as análises foram realizadas usando-se o lobo hepático esquerdo.

4.5 INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Fatias de fígado foram pré-incubadas em tampão HBSS por 15 min a 37 °C, pH 7,4. Após esse período, o meio foi trocado por HBSS fresco com 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e o tecido foi incubado durante 30 min na presença ou ausência do HBG. Em alguns experimentos, acrescentou-se na pré-incubação e foi mantido durante o período de incubação inibidores proteicos (H89 10 μM ; LY294002 10 μM ; U73122 10 μM ; PD98059 10 μM), bloqueadores de canais de cálcio (Nifedipina 10 μM), quelantes de cálcio intracelular (BAPTA-AM 50 μM) ou substâncias antioxidantes (Vitamina C 100 μM ; Trolox® 100 μM ; N-acetilcisteína 500 μM ; GSH 1 mM). O $^{45}\text{Ca}^{2+}$ extracelular foi totalmente lavado com solução de lantânio (NaCl 127,5 mM, KCl 4,6 mM, MgSO_4 1,2 mM, HEPES 10 mM, glicose 11 mM, LaCl_3 10 mM) pH 7,2 a 2 °C por 10 min. A presença de La^{3+} durante o estágio de lavagem foi utilizada para evitar a liberação do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ intracelular (BATRA; SJÖGREN, 1983; ZAMONER *et al.*, 2007). Após 10 min a solução de LaCl_3 foi removida e o tecido foi homogeneizado em solução de NaOH 500 mM. Alíquotas das amostras foram colocadas em líquido de cintilação e a radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). Os resultados foram expressos como % do controle ou pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína (ZAMONER *et al.*, 2007).

4.6 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade das células hepáticas tratadas *in vitro* com HBG foi analisada a partir da atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio extracelular. As fatias de fígado foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4 e a atividade da LDH foi determinada no tecido hepático. A quantificação da atividade da LDH foi baseada na oxidação de NADH a NAD^+ e os resultados foram expressos como % do controle.

4.7 CAPTAÇÃO DE ^{14}C -L-GLUTAMATO

As fatias intestinais (região duodenal) dos ratos expostos ao HBG durante o período gestacional e de aleitamento foram pré-incubadas por 15 min a 37°C, em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl_2 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO_4 0,65 mM, Na_2HPO_4 0,27 mM, KH_2PO_4 1,1 mM, D-glicose 2 mM e Hepes 5 mM, pH 7,4). A

captação teve início com a adição de 0,33 $\mu\text{Ci/mL}$ [^{14}C]-L-Glutamato. As fatias permaneceram por 10 min nesse meio de captação. A incubação foi interrompida com a retirada do meio de captação e seguida de lavagem por 2 vezes com HBSS gelado. Solução de NaOH 0,1 M/SDS 0,01% foi adicionada para solubilização das fatias. Após a completa solubilização foi determinado o conteúdo intracelular de glutamato pela avaliação da radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). A captação de glutamato foi corrigida através da captação independente de sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Aliquotas do homogeneizado intestinal foram utilizadas para a análise da concentração de proteínas. Os valores foram expressos como nmol ^{14}C -Glutamato/min/mg proteína.

4.8 CAPTAÇÃO DE ^{14}C -2-DESOXI-D-GLICOSE

Fatias de duodeno dos animais tratados *in vivo* com 1% de HBG foram pré-incubadas em tampão HBSS pH 7,4 por 15 min a 37°C para estabilização. Em seguida, o tecido foi incubado por 30 min em HBSS fresco contendo D-glicose 2 mM e ^{14}C -2-desoxi-D-glicose 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$. Posteriormente, o meio de incubação foi retirado, o tecido lavado com tampão HBSS fresco por 3 vezes e fatias intestinais foram digeridas com NaOH 0,5 M. Aliquotas do homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). Os resultados foram expressos em mg de glicose/mL/mg proteína.

4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.9.1 Dissacaridases intestinais

O segmento duodenal dos animais expostos ao HBG durante o período perinatal foi homogeneizado em NaCl 0,9% e posteriormente centrifugado. O sobrenadante foi incubado a 37 °C durante 5 min com o substrato (maltose, sacarose e lactose) em tampão maleato, pH 6,0. Atividades da maltase, sacarase e lactase foram analisadas através da glicose liberada no meio extracelular pelo método da glicose oxidase de acordo com as instruções do fabricante

(DAHLQVIST, 1984). A concentração de proteína foi verificada pelo método de Lowry *et al.* (1951) e os valores foram expressos em μg de glicose/mL/mg proteína.

4.9.2 γ -glutamyl transferases (GGT)

A GGT foi determinada em intestino de ratos tratados *in vivo* com HBG, bem como em fígado de animais tratados *in vitro* com HBG ou glifosato PA através da técnica modificada descrita por Orłowsky e Meister (1963), utilizando o L- γ -Glutamyl-p-Nitroanilida como substrato e a glicilglicina como molécula aceptora, com liberação de p-nitroanilina, a qual é diazotada, gerando um composto final de cor rósea. Os tecidos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,5 e verificou-se a concentração de proteína (LOWRY *et al.*, 1951). Alíquotas do homogeneizado foram incubadas com o substrato enzimático por 60 min a 37°C e a reação enzimática foi bloqueada pela adição de ácido acético. A absorbância do produto final foi mensurada em 530 nm. Os resultados foram expressos em U/ μg proteína.

4.9.3 Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST)

Fatias de fígado foram incubadas com ou sem 0,36 mg/L do HBG, posteriormente o tecido foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 200 mM, pH 7,4. Em seguida, foi avaliada a concentração de proteína em cada amostra e a atividade enzimática da ALT e AST foi mensurada através da utilização de kits colorimétricos (Gold Analisa®). Na reação, a ALT catalisa a transferência do grupo amina do substrato L-alanina para o α -cetogluturato com formação de glutamato e piruvato. A enzima AST catalisa a transferência do grupo amina do substrato L-aspartico para o α -cetogluturato com formação de glutamato e oxaloacetato. Tanto o piruvato quanto o oxaloacetato formado reagem com a 2-4-dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra e o produto é medido em 505 nm. As atividades enzimáticas foram expressas em U/ μg proteína.

4.9.4 Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

A G6PD foi determinada em sangue de animais tratados *in vivo* com HBG ou em fígado de ratos tratados *in vitro* com HBG. O sangue periférico foi diluído em reagente de

eluição (1:16 v/v) para obter o hemolisado e posterior quantificação da atividade enzimática. O tecido hepático após ser incubado na presença ou ausência de 0,36 mg/L do HBG foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 200 mM, pH 7,4, e então foi analisada a concentração de proteína (LOWRY *et al.*, 1951). Uma alíquota do homogeneizado tecidual ou sangue hemolisado foram incubadas na presença de NADP⁺ levando a oxidação de glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato. O NADPH produzido foi quantificado de modo cinético a 570 nm durante 10 min. Os resultados foram calculados pela avaliação do aumento da densidade óptica por minuto (declínio) da amostra contra o “declínio” da atividade enzimática do padrão da G6PD. Os valores foram expressos em U/ μ g proteína (fígado) ou U/g.Hb (hemolisado).

4.10 DOSAGEM DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para analisar a atividade de SOD, CAT, GPx, GR e GST em sangue periférico de ratos expostos *in vivo* a 1 % de HGB, o lisado sanguíneo foi produzido a partir de sangue total diluído em água destilada (1:5 v/v) e a lise completa foi obtida por congelamento e descongelamento. As dosagens das enzimas antioxidantes também foram determinadas no tecido hepático de animais imaturos após exposição *in vitro* com HBG, fatias de fígado foram homogeneizadas em solução contendo fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4; Triton X-100 0,1% e NaCl 150 mM (1:20 m/v). Aliquotas do homogeneizado hepático foram utilizadas para a análise da concentração de proteínas (LOWRY *et al.*, 1951). As determinações foram realizadas usando o sobrenadante após centrifugação do homogeneizado de fígado ou lisado sanguíneo (5.000 xg por 5 minutos).

4.10.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida baseada na oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que produz o ânion superóxido (O₂⁻), e um cromóforo rosa, o adrenocromo, o qual é mensurado em 480 nm (MISRA; FRIDOVICH, 1972; BOVERIS *et al.*, 1983). Aliquotas do sobrenadante foram utilizadas a fim de construir uma curva (5-40 μ L), então acrescentou-se q.s.p. para 200 μ L de tampão glicina 50 mM pH 10,2, seguido pela realização de uma leitura pontual. Posteriormente, foi adicionado uma solução com adrenalina 60 mM (pH em torno de 2,0), seguido por monitoramento da reação durante 10 min. Curvas de 3 a 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da velocidade de

formação do adrenocromo. A atividade enzimática foi expressa em USOD/ μ g proteína (fígado) ou USOD/min.mL (lisado sanguíneo).

4.10.2 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada conforme a técnica de Aebi (1954), a qual fundamenta-se na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. A uma alíquota do sobrenadante, foi adicionado uma solução de H_2O_2 a 30% (10 mM) preparada em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, em seguida realizou-se a leitura da queda da absorvância em 240 nm durante 5 min. Os resultados foram expressos em mmol/min. μ g proteína (fígado) ou mmol/min.mL (lisado sanguíneo).

4.10.3 Glutathione peroxidase (GPx)

A reação utilizada para a análise enzimática de GPx tem como base a redução de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH a GSSG, catalisada pela GPx, e subsequente regeneração de GSH pela enzima GR com oxidação de NADPH em 340 nm. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional a atividade da GPx na amostra (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984). Para a realização da técnica, um meio de reação contendo tampão fosfato 100 mM, pH 7,0; NADPH; ácido 2-etilenotriaminopentacético (DPTA) 5 mM, água destilada; GSH; GR 5U e KCN 50mM foi adicionado ao sobrenadante, seguido pela adição de t-BuOOH. A reação foi monitorada durante 3 min. A atividade enzimática foi expressa em μ mol/min.mg proteína (fígado) ou μ mol/min.mL (lisado sanguíneo).

4.10.4 Glutathione reductase (GR)

A GR foi determinada pela medida da taxa de oxidação do NADPH em 340 nm devido à formação de GSH, a partir da GSSG, por ação da GR presente na amostra (CALBERG; MANNERVICK, 1985). Um meio de reação contendo tampão fosfato 100 mM, pH 7,0; NADPH; água destilada, glutathione oxidada (GSSG) e DPTA 5 mM foi acrescentado ao sobrenadante dando início a reação que foi monitorada durante 3 min, gerando uma curva descendente. Os valores foram expressos em μ mol/min.mg proteína (fígado) ou μ mol/min.mL (lisado sanguíneo).

4.10.5 Glutathione-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi verificada usando o método descrito por Habig, Pabst e Jakoby (1976). A reação fundamenta-se na capacidade da GST em conjugar GSH ao xenobiótico (substrato), produzindo uma substância detectável em 340 nm, monitorada por 3 minutos. O sobrenadante foi adicionado em um meio contendo tampão fosfato 100 mM, pH 7,0; 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 100 mM (CDNB) e GSH 100 mM. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína (fígado) ou $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mL}$ (lisado sanguíneo).

4.11 CONTEÚDO DE GLUTATIONA REDUZIDA

A GSH foi analisada utilizando sangue total após exposição subcrônica de ratos ao HBG durante o período gestacional e lactacional. A determinação do conteúdo de GSH também foi realizada em fatias de fígado tratadas na presença ou ausência de 0,36 mg/L do HBG durante 30 min. A GSH reage com DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico) produzindo um ânion conjugado, o TNB (ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico) que pode ser detectado por fluorescência ou absorvância e é proporcional à quantidade inicial de GSH (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009). As amostras foram homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) a 12% (1:5 v/v sangue total ou 1:10 m/v fígado) seguido de centrifugação a 5000 xg por 5 minutos. Uma alíquota dos sobrenadantes foram acrescentadas em tampão fosfato 200 mM, pH 8,0. Após, foi adicionado DTNB 2,525 mM diluído em citrato de sódio a 1%. A absorvância foi medida em 412 nm (BEUTLER *et al.*, 1963). A concentração de GSH foi expressa em $\text{mmol}/\mu\text{g}$ proteína (fígado) ou mmol/mL (lisado sanguíneo).

4.12 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS

4.12.1 Lipoperoxidação-TBARS

O dano oxidativo aos lipídios resulta na formação de derivados tóxicos, sendo um dos principais produtos o malondialdeído (MDA). Uma técnica utilizada para mensurar o MDA consiste na reação dessa substância com o ácido tiobarbitúrico (TBA), ao produzir uma base de Schiff de coloração rosa (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979; BIRD; DRAPER, 1984). Concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas

nas fatias de fígado dos animais imaturos tratados *in vitro* com HBG. As fatias foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 20 mM, Triton X-100 a 0,1% e NaCl 150 mM, pH 7,4 (1:20 m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 5.000 xg por 5 min. À uma alíquota do sobrenadante foi acrescentado TCA a 12% (para precipitação das proteínas) e agitado em vórtex. Posteriormente, foi adicionado tampão Tris-HCl 0,06 M, pH 7,4 e TBA a 0,73%, agitado em vórtex e levado para aquecimento por 1 h a 100 °C. Depois o material foi refrigerado em banho de gelo e centrifugado a 10.000 xg por 5 minutos. A reação colorimétrica foi medida em espectrofotômetro a 535 nm. Os valores foram expressos como nmol MDA/mg proteína.

4.12.2 Proteína carbonilada

O dano oxidativo às proteínas por carbonilação foi analisado usando plasma dos ratos tratados *in vivo* com 1% de HBG. A proteína solúvel presente na amostra reagiu com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM em HCl 2 N durante 1 h à temperatura ambiente no escuro e posterior foi adicionado TCA a 20% para a precipitação das proteínas. Após centrifugação (10.000 xg por 5 min), o *pellet* de proteína foi lavado 3 vezes através da ressuspensão em etanol-acetato de etila (1:1 v/v). As proteínas foram solubilizadas em guanidina 6,0 M preparada em solução de KH₂PO₄ 20 mM e centrifugadas a 10.000 xg por 5 min para remover qualquer vestígio de material insolúvel. O conteúdo de carbonilação de proteína foi mensurado em 360 nm (LEVINE *et al.*, 1990). A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951) e a concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol/mg proteína.

4.13 HEMOGRAMA

Para a realização do hemograma nos animais expostos ao HBG durante o período gestacional até completarem 15 dias de idade, o sangue total foi coletado com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-ácetico (EDTA).

4.13.1 Perfil eritrocitário

A contagem de glóbulos vermelhos foi lida em câmara de Neubauer sob o microscópio, usando sangue total diluído 200 vezes com líquido de Dacie. A determinação da concentração de hemoglobina (HB) foi fundamentada na detecção fotométrica da cianometahemoglobina

(SINGH; SHINTON, 1965). A dosagem de HB foi medida de acordo com as instruções do fabricante. O sangue foi centrifugado em tubos microcapilares para a obtenção do hematócrito (HT). Os índices hematimétricos, tais como: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados de acordo com Wintrobe (1933) a partir de HB, HT e contagem de glóbulos vermelhos.

4.13.2 Perfil leucocitário

Os glóbulos brancos foram contados manualmente na área específica da câmara de Neubauer sob o microscópio, usando sangue total diluído 20 vezes com líquido de Turk. Para a contagem diferencial dos leucócitos, a extensão sanguínea foi preparada imediatamente após a colheita do sangue e submetida à coloração May-Grunwald-Giemsa. 100 células foram contadas e classificadas.

4.13.3 Perfil plaquetário

A contagem de plaquetas foi determinada após a leitura em câmara de Neubauer sob o microscópio, utilizando sangue total diluído 20 vezes em Oxalato de Amônio a 1%.

4.14 ENSAIO COMETA: DETECÇÃO DE DANOS AO DNA

O ensaio utilizado fundamentou-se na técnica proposta por Singh e colaboradores (1988) e adaptada por Tice e colaboradores (2000). O sangue periférico dos animais expostos ao HBG durante o período gestacional e lactacional foi coletado com anticoagulante heparina para obtenção do sangue total. As lâminas foram preparadas pela combinação de 5 µL de sangue heparinizado com 95 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), essa mistura foi adicionada a uma lâmina completamente coberta por agarose de ponto de fusão normal. Uma lamínula foi imediatamente colocada sobre a mistura agarose/amostra e o conjunto permaneceu em um refrigerador por 5 min (até a camada de agarose endurecer). Posteriormente, a lamínula foi removida com cuidado e a lâmina foi armazenada em cubeta vertical contendo solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM) com DMSO a 10% e Triton X-100 a 1%. Após pelo menos 1 h a 4 °C, as lâminas foram retiradas da solução de lise e o excesso de líquido foi removido por papel absorvente. Então, as lâminas foram expostas por 30 min em tampão

alcalino gelado (NaOH 300 mM, EDTA 1nM e água destilada, pH 13) e em seguida submetidas a eletroforese realizada em geladeira, por 20 min, 25 V e 300 mA. Todos os passos acima foram realizados na ausência de luz branca para evitar a indução de danos no DNA. Após a eletroforese, as lâminas foram tratadas com tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 5 min e em seguida lavadas 2 vezes com água destilada. Após no mínimo 2 horas de secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas (TCA a 15%, sulfato de zinco heptahidratado a 5% e glicerol a 5%) por 10 minutos e lavadas 3 vezes com água destilada e após pelo menos 2 horas de secagem as lâminas foram coradas. A coloração foi realizada seguindo o método descrito por Nadin *et al.* (2001). Solução corante A (carbonato de sódio 5%) e B (nitrato de amônio 0,02%, nitrato de prata 0,02%, ácido tungstosilícico 0,1%, formaldeído 0,05%) foram misturadas imediatamente antes do uso e as lâminas ficaram imersas nesta solução por aproximadamente 20 minutos. Após as lâminas terem atingido uma coloração acinzentada, estas foram lavadas com água destilada e colocadas na solução de parada (ácido acético 1%) por 5 min. As lâminas foram novamente lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente, e então foram analisadas. As avaliações foram feitas de forma cega, de modo que foram contadas 100 células (50 células em cada uma das duas lâminas confeccionadas por animal) em microscópio óptico. A migração do DNA danificado durante a eletroforese forma uma cauda parecida a um cometa, que corresponde à intensidade do dano. Cada célula foi classificada segundo a classe de dano observada e pontuada de 0 a 4 de acordo com a intensidade do dano formado. As células sem migração de fragmentos na eletroforese, ou seja, sem dano promovidos pela exposição ao HBG, receberam a pontuação 0; células com danos mínimos, receberam pontuação 1 (C1); células com danos médios, receberam pontuação 2 (C2); células com danos intensos, receberam pontuação 3 (C3) e células com danos máximos, receberam pontuação 4 (C4). O somatório dos valores das 100 células analisadas resulta no índice total de dano (ITD), fórmula $ITD = C1 + 2C2 + 3C3 + 4C4$. O ITD pode variar de 0 (todas não danificadas) a 400 (todas com dano máximo) (BAGATINI *et al.*, 2008).

4.15 ANÁLISE DA DEPOSIÇÃO DE FERRO MEDULAR

A medula óssea está presente no interior dos ossos chatos, como o esterno, o íliaco e ossos da coluna vertebral em adultos. Nos pré-púberes, além dos locais mencionados anteriormente, há hematopoese nos ossos longos do corpo, como fêmur e úmero. No presente estudo, o fêmur dos ratos imaturos tratados *in vivo* com 1% de HBG foram coletados para obtenção das lâminas de esfregaço de medula óssea submetidas a coloração de Perls.

Inicialmente, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 min e secas à temperatura ambiente. Em seguida, os esfregaços foram corados por 30 min com solução de HCl 2% e ferrocianeto de potássio a 2% (1:1 v/v). Após coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada, contra coradas com safranina a 0,1% por 1 min e novamente lavadas com água destilada. Na deposição de ferro, os grânulos de hemossiderina (depósitos insolúveis de ferro) reagem com ferrocianeto de potássio, resultando numa coloração azulada (CARVALHO, 1993; HENRY, 1995; LIMA, *et al.*, 1992). Após secarem, as lâminas com o esfregaço de medula óssea foram analisadas em microscópio óptico a fim de observar o depósito de ferro medular.

4.16 GLICOGÊNIO HEPÁTICO

A análise do conteúdo de glicogênio no fígado de animais expostos ao HBG durante o período perinatal foi realizada segundo Krisman (1962). O tecido foi pesado, homogeneizado em uma solução de KOH a 30% e fervido a 100°C por 20 min. Após a fervura, etanol a 95% foi adicionado ao homogeneizado e então novamente as amostras foram aquecidas e depois resfriadas em banho de gelo para a precipitação do glicogênio. Os homogeneizados foram centrifugados e o precipitado resultante foi solubilizado em água destilada. A concentração de glicogênio foi definida após adição de uma solução de iodo e iodeto de potássio com leitura em 460 nm. Os resultados foram expressos em mg/mL/mg de tecido.

4.17 DOSAGEM DE GLICOSE, LACTATO E UREIA

Os analitos foram determinados em fígado e/ou soro de ratos tratados *in vivo* com o HBG. Fatias de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato-salino (PBS) 100 mM, pH 7,4 e analisou-se a concentração de proteína no tecido (LOWRY *et al.*, 1951). A concentração de glicose foi verificada através do método da glicose oxidase e a dosagem de lactato pelo método da lactato oxidase; ambos usando uma reação colorimétrica com leitura de ponto final de kits comerciais da Labtest®. O conteúdo de ureia foi analisado pela utilização de kit comercial da Gold Analisa®. A reação fundamenta-se na oxidação de NADH a NAD⁺ e o NADH consumido foi quantificado de modo cinético. Todos os ensaios foram executados seguindo as instruções do fabricante. Os valores foram expressos em mg/dL/ μ g proteína (fígado) ou mg/dL (soro).

4.18 REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA

O *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) foi realizado no intuito de quantificar as citocinas TNF- α e IL-6 no fígado dos animais expostos ao HBG no período perinatal. Fatias de fígado foram homogeneizadas em PBS 100 mM, pH 7,4 e a concentração de proteína foi analisada segundo Lowry *et al.* (1951). O ensaio foi executado utilizando kits comercialmente disponíveis (BD Biosciences®) com anticorpo monoclonal específico para cada citocina a partir da metodologia do ELISA de captura. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. As citocinas foram expressas em pg/mL/ μ g proteína.

4.19 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS

A técnica de *Western blot* foi usada para a investigação do envolvimento de rotas de sinalização celular no mecanismo do HBG. O ensaio de imunodeteção utilizou anticorpos específicos para a forma total e fosforilada da GSK-3 β . Fatias do tecido hepático de ratos expostos ao HBG durante o período gestacional e de aleitamento foram homogeneizadas em tampão de lise contendo EDTA 2 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, 4% SDS (m/v) e a concentração de proteínas foi determinada (LOWRY *et al.*, 1951). Para a análise da eletroforese, quantidades iguais de proteínas foram aplicadas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, analisadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (Trizma 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% e SDS 0,25%) (60 min). As membranas de nitrocelulose foram lavadas e incubadas por 2 h em solução de bloqueio (TBS; NaCl 0,5M, Trizma 20 mM e leite em pó desnatado 5%). Após a incubação, as membranas foram lavadas e então incubadas durante a noite (18h) a 4° C com anticorpo primário (anti-GSK3 β ou anti-fosfo-GSK3 β diluídos 1:2000). Depois da incubação com os anticorpos, as membranas foram lavadas e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, diluído 1:2000) para posterior revelação. O *blot* foi revelado (Immobilon TM Western chemiluminescence HRP substrate kit), as autorradiografias foram quantificados com scanner Hewlett-Packard Scanjet 6100C e a densidade óptica foi determinada com o programa OptiQuant versão 02.00 da Packard Instrument Company.

4.20 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteína foi analisada pelo método de Lowry *et al.* (1951). Uma curva padrão utilizando a albumina de soro bovino (Sigma®) foi utilizada para calcular a concentração de proteína nas amostras.

4.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações feitas em duplicatas em 3 a 4 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste *t* de Student ou ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni usando o programa GraphPad Prism versão 5.0. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas quando o $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) (2015) o fígado é considerado o principal órgão alvo dos danos induzidos pelos HBG. Nesse contexto, no presente estudo foi dada ênfase aos possíveis efeitos da exposição *in vitro* de fatias de fígado de ratos imaturos ao HBG, bem como avaliamos os mecanismos de ação envolvidos na toxicidade do HBG em tecido hepático (Estudo I).

Considerando-se que as células sanguíneas são uma das primeiras a serem alteradas nas diversas situações, por estarem expostos a uma variedade de ambientes no organismo e entrarem em contato com inúmeros xenobióticos (PANDEY; RIZVI, 2010), investigamos os efeitos da exposição subcrônica ao HBG durante o período perinatal sobre a medula óssea de ratos imaturos em paralelo com a realização de análises hematológicas e bioquímicas em sangue dos animais expostos a fim de fornecer possíveis biomarcadores periféricos de dano tecidual (Estudo II).

Além disso, com o intuito de analisar os potenciais efeitos do HBG no metabolismo energético e sistema imunológico, investigou-se as consequências da exposição materna ao HBG em fígado, intestino delgado e soro de filhotes de ratos com 15 dias de idade (Estudo III).

5.1 ESTUDO I: HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO *IN VITRO* AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO MEDIADA PELO ACÚMULO DE CÁLCIO E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS IMATUROS.

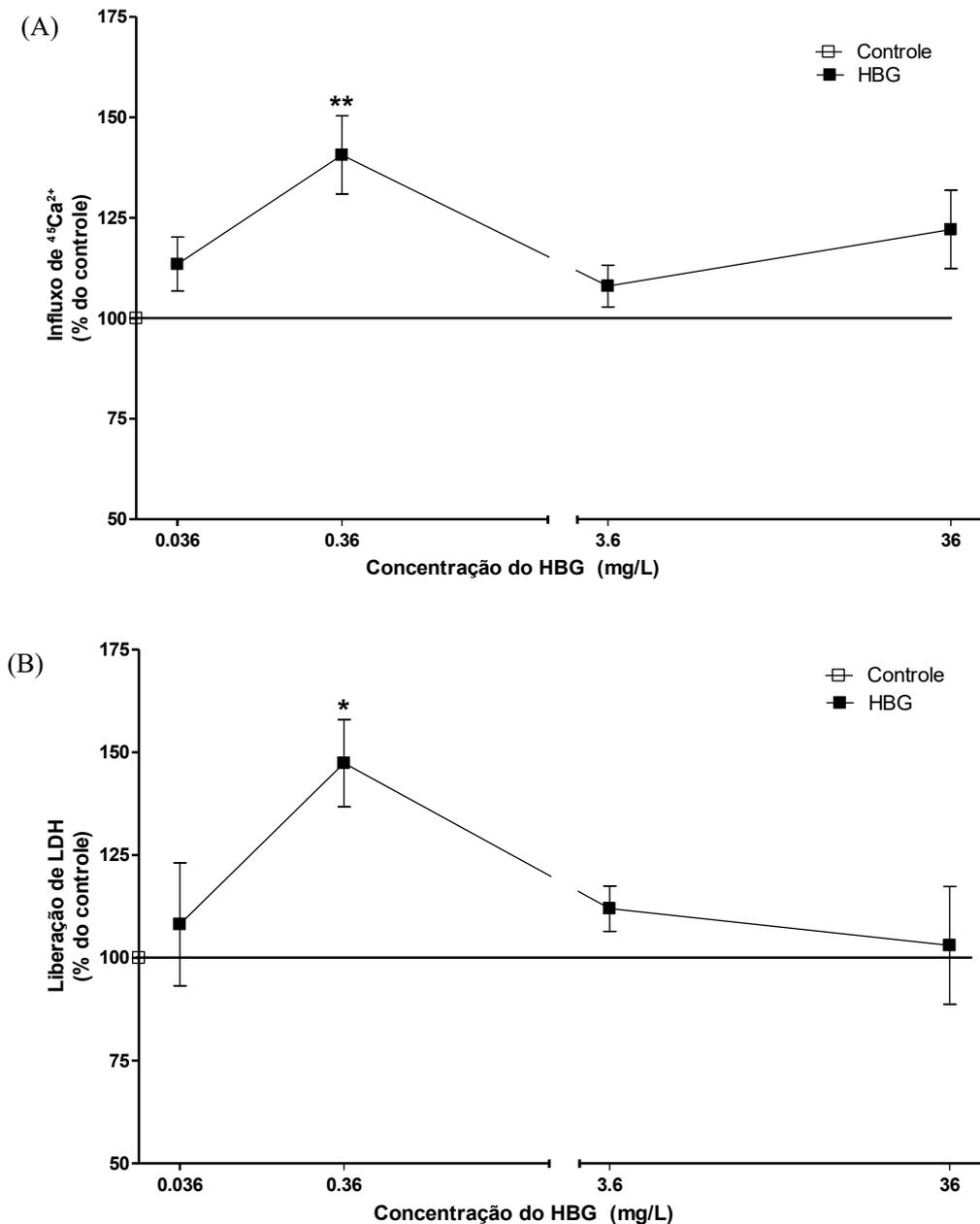
5.1.1 Caracterização do modelo experimental *in vitro* ao analisar o mecanismo de toxicidade hepática a partir do influxo de cálcio e da viabilidade celular

Achados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a exposição *in vivo* ao HBG induziu ao aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fígado da prole de ratos (RIEG, 2016), no presente estudo, tem-se o propósito de investigar se a ação *in vitro* do HBG em fígado de ratos imaturos também altera o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e a viabilidade celular. Desse modo, realizou-se uma curva de dose-resposta, no qual o tecido hepático foi exposto durante 30 min a diferentes concentrações da formulação comercial contendo glifosato que variaram de 0,036 a 36 mg/L.

Conforme indicado na Figura 8A, os resultados mostraram que o tratamento com o HBG na concentração de 0,36 mg/L promoveu aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. A mesma concentração do agrotóxico induziu morte celular, como demonstrado pelo aumento da

liberação da LDH citosólica para o meio extracelular (Figura 8B). Esses dados em conjunto sugerem que o herbicida promove hepatotoxicidade a partir do aumento de cálcio intracelular e morte das células. Os experimentos subsequentes foram realizados utilizando 0,36 mg/L do HBG com o objetivo de estudar os mecanismos envolvidos na toxicidade do mesmo.

Figura 8. Curva dose-resposta do tratamento *in vitro* com o HBG no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (A) e na viabilidade celular (B) em fígado de ratos imaturos.



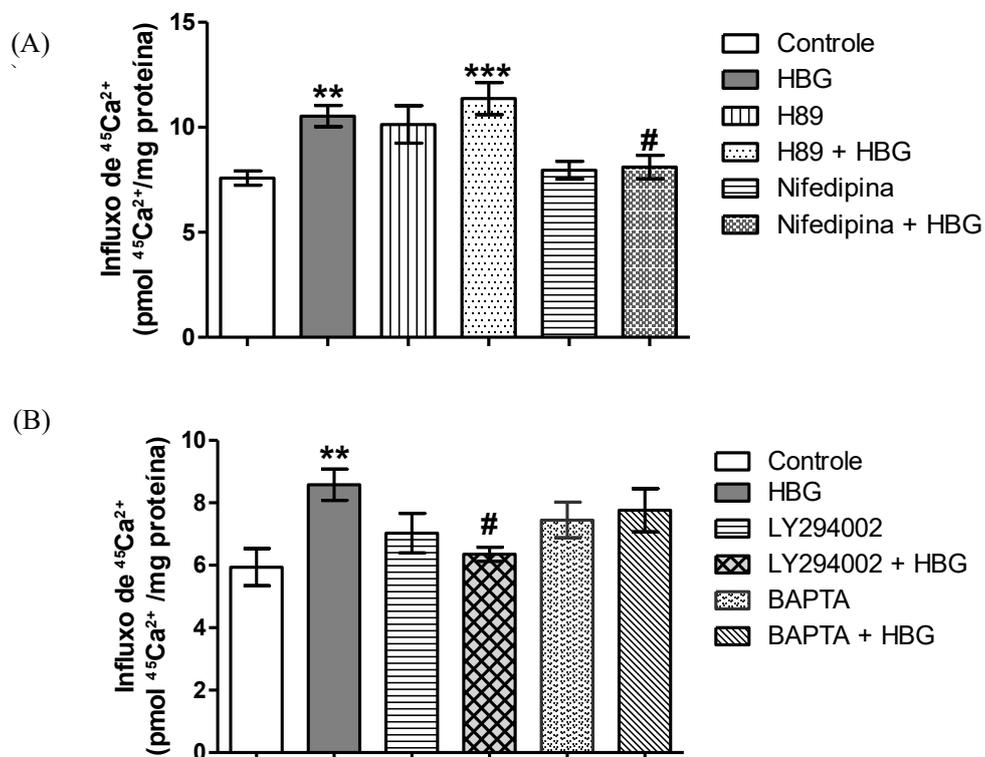
Fatias de fígado foram pré-incubadas por 15 min e depois incubadas por 30 min com $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ na presença ou ausência da formulação à base de glifosato em várias concentrações (0,036-36 mg/L). O tecido hepático de cada animal foi utilizado no grupo controle e tratado. Os dados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 7 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle.

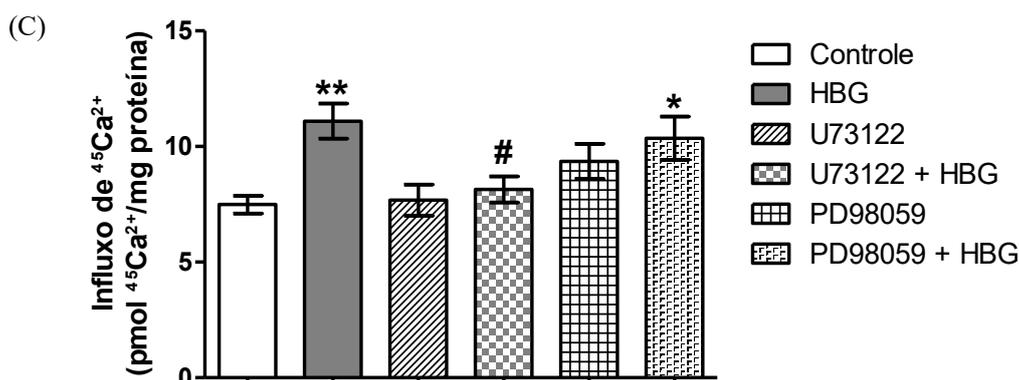
5.1.2 Mecanismos de transdução de sinais envolvidos na ação do HBG no influxo de cálcio em fígado de ratos imaturos

Devido a importância do cálcio no estabelecimento da homeostase celular, analisou-se o mecanismo de ação envolvido no aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzido pela exposição *in vitro* ao HBG. Desse modo, foram utilizados bloqueadores de canais de cálcio, quelantes de cálcio intracelular e inibidores de vias de sinalização.

A Figura 9A mostrou que a elevação no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzida pelo HBG foi mediada por canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo-L (CCDV-L), uma vez que a co-incubação do agrotóxico com a nifedipina (bloqueador de CCDV-L) preveniu o aumento do influxo de cálcio. Além disso, o uso de BAPTA-AM evitou parcialmente a elevação do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, demonstrando que provavelmente o cálcio intracelular esteja envolvido pelo menos em parte na ação do HBG frente ao influxo de cálcio (Figura 9B).

Figura 9. Envolvimento das vias de sinalização e a concentração de cálcio intracelular no mecanismo de ação do HBG no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fígado de ratos imaturos.





Fatias do tecido foram pré-incubadas por 15 min com ou sem (A) 10 μM de H89 (inibidor de PKA), ou 10 μM de nifedipina (bloqueador de CCDV-L); (B) 10 μM de LY294002 (inibidor de PI3K), ou 50 μM de BAPTA-AM (quelante de cálcio intracelular); (C) 10 μM de U73122 (inibidor de PLC), ou 10 μM de PD98059 (inibidor de MAPK). Posteriormente, fatias de fígado foram incubadas na presença ou ausência de 0,36 mg/L do HBG por 30 min com 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 7 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo HBG.

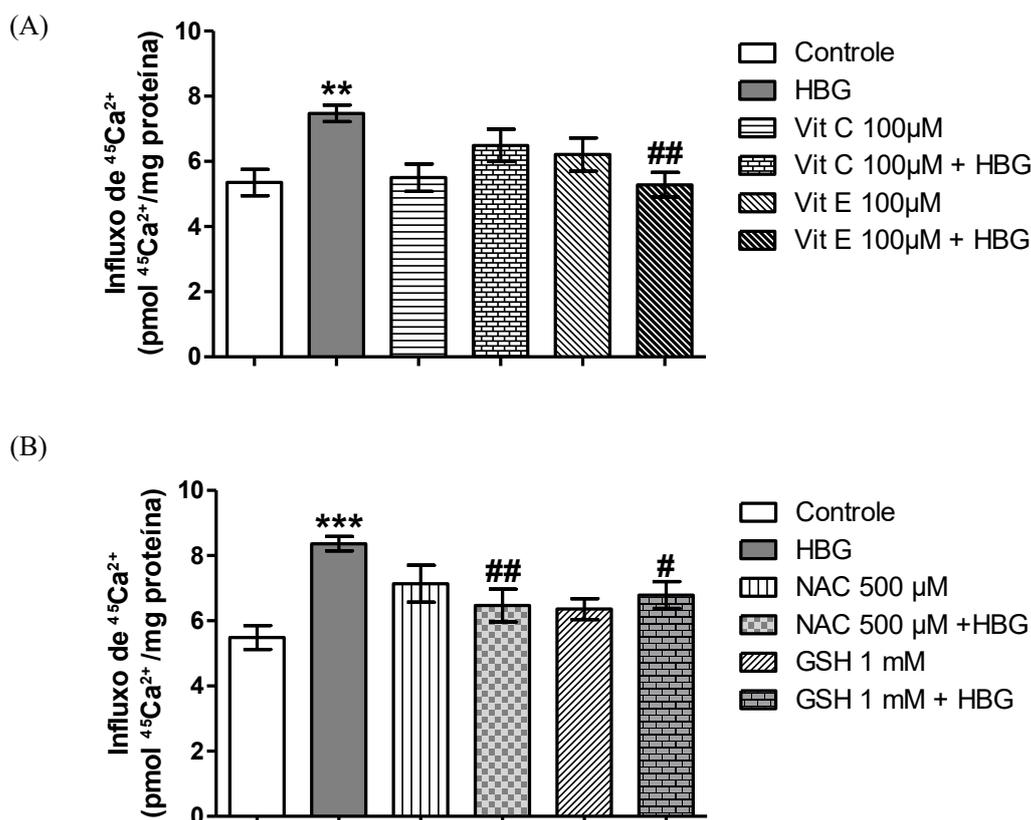
A fim de avaliar as possíveis vias de sinalização envolvidas no efeito estimulatório do HBG no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, utilizou-se H89 (inibidor de proteína cinase A [PKA]), LY294002 (inibidor de fosfatidilinositol-3-cinase [PI3K]), U73122 (inibidor de fosfolipase C [PLC]) e PD98059 (inibidor de proteína serina-treonina cinase ativada por mitógeno [MAPK]). Os resultados demonstraram que os inibidores LY294002 e U73122 foram eficazes na prevenção do efeito do agrotóxico no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, evidenciando que a ação do HBG é dependente da ativação de PI3K e de PLC. Em contrapartida, tanto o H89 quanto o PD98059 foram incapazes de reverter o aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, propondo que os efeitos do HBG independem da ativação de PKA e de MAPKs (Figura 9). Esses resultados mostram a participação de várias vias de transdução de sinais, como a via da PI3K e da PLC no mecanismo de ação do HBG no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fígado de ratos.

5.1.3 Envolvimento de antioxidantes na ação do HBG no influxo de cálcio em fígado de ratos com 15 dias de idade

Com o intuito de verificar a participação de desequilíbrio do estado redox no efeito do HBG sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, foram utilizados os antioxidantes ácido ascórbico (vitamina C), Trolox® (nome comercial da vitamina E), N-acetilcisteína (NAC) e GSH.

A Figura 10 mostrou que a vitamina E, a NAC e a GSH foram capazes de prevenir a ação do HBG sobre influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, sugerindo a participação de eventos oxidativos desencadeados pela exposição ao HBG em tecido hepático modulando o influxo de íons.

Figura 10. Participação do estresse oxidativo no mecanismo de ação do HBG no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fígado de ratos imaturos.

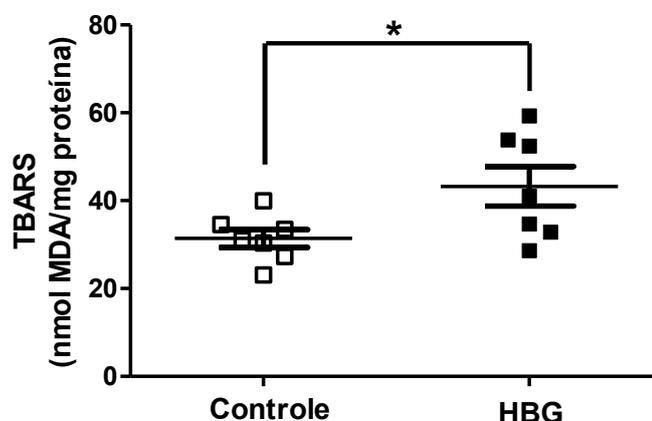


Tecido hepático foi pré-incubado por 15 min na presença ou ausência dos antioxidantes não enzimáticos: (A) 100 µM de ácido ascórbico (vitamina C), ou 100 µM de Trolox® (vitamina E); (B) 500 µM de N-acetil-cisteína (NAC), ou 1 mM de glutatona reduzida (GSH). Em seguida, fatias do tecido foram incubadas com os antioxidantes descritos acima com ou sem 0,36 mg/L do HBG durante 30 min na presença de 0,1 µCi/mL de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Os dados foram reportados como a média ± E.P.M. de 7 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. **p<0,01 e ***p<0,001 comparando ao grupo controle. #p<0,05 e ##p<0,01 comparando ao grupo tratado com HBG.

5.1.4 Conseqüências da exposição *in vitro* ao HBG sobre os parâmetros bioquímicos envolvidos no dano oxidativo em fígado de ratos imaturos

O aumento nas concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no grupo exposto ao HBG em relação ao grupo controle (Figura 11), sugere dano oxidativo via oxidação lipídica em fígado de ratos imaturos.

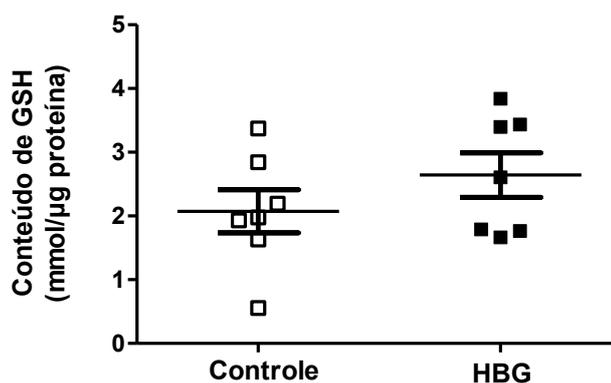
Figura 11. Efeito do tratamento *in vitro* com o HBG na concentração de peroxidação lipídica em tecido hepático de ratos imaturos.



Fatias de fígado foram incubadas com ou sem 0,36 mg/L do HBG por 30 min. Os dados foram expressos como concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) resultante da lipoperoxidação e como a média \pm E.P.M. de 7 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

Uma vez estabelecida a participação de eventos oxidativos no mecanismo de toxicidade do HBG, estudou-se a ação do agrotóxico sobre o principal antioxidante não enzimático do organismo, a GSH. Conforme demonstrado na Figura 12, a exposição *in vitro* ao HBG não alterou o conteúdo de GSH em fígado de filhotes com 15 dias de idade.

Figura 12. Análise da exposição *in vitro* ao HBG no conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) em fígado de ratos imaturos.



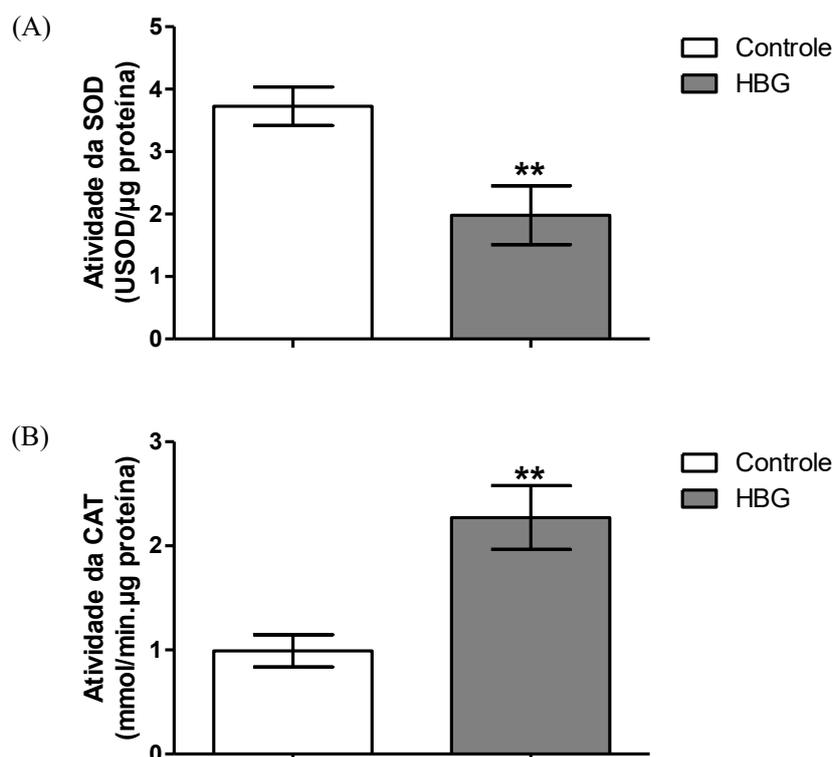
O tecido foi incubado na presença ou ausência de 0,36 mg/L do HBG por 30 min. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 7 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student.

Para investigar os marcadores bioquímicos relacionados às defesas antioxidantes enzimáticas em tecido hepático de animais tratados *in vitro* com HBG foi determinada a atividade de SOD, CAT, GPx, GR, G6PD, GST e GGT.

A SOD detoxifica o $O_2^{\cdot-}$, com conseqüente formação de H_2O_2 , este pode ser eliminado através da reação catalisada pela CAT. Os dados do presente estudo evidenciaram diminuição

na atividade da SOD (Figura 13A) e em contrapartida observou-se aumento na atividade da CAT (Figura 13B) no grupo tratado com a formulação comercial contendo glifosato em comparação ao grupo controle.

Figura 13. Implicações do tratamento *in vitro* com o HBG na atividade das enzimas: (A) superóxido dismutase (SOD) e (B) catalase (CAT) em tecido hepático de ratos imaturos.



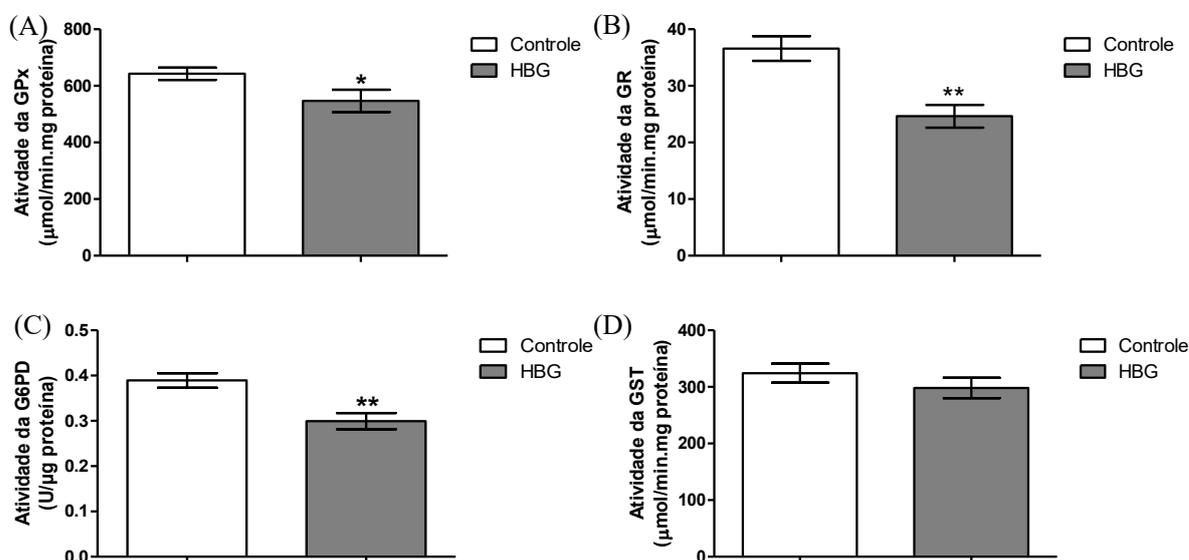
Fatias de fígado foram incubadas com ou sem 0,36 mg/L do HBG por 30 min. Os dados foram expressos como a média ± E.P.M. de 7 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. ***p*<0,01.

A GPx também tem a capacidade de detoxificar o H₂O₂, a reação acontece ao usar GSH como cofator e produzir GSSG. A Figura 14A indicou que a exposição *in vitro* ao HBG inibiu a atividade da GPx em fígado de ratos imaturos.

A GR é a enzima responsável pela redução da GSSG e formação de GSH às custas de NADPH. A G6PD é quem disponibiliza esse equivalente redutor para a regeneração da GSH, além de ser a enzima passo-limitante na via das pentoses-fosfato. Os resultados demonstraram que tanto a atividade da GR quanto a atividade da G6PD diminuíram após o tecido hepático ser tratado com o agrotóxico à base de glifosato (Figura 14B e 14C).

Diversos xenobióticos são conjugados com a GSH a fim de detoxificá-los, a enzima que catalisa essa reação é a GST. Como apresentado na Figura 14D, a incubação com o HBG não modificou a atividade da GST em fatias de fígado de ratos com 15 dias de idade.

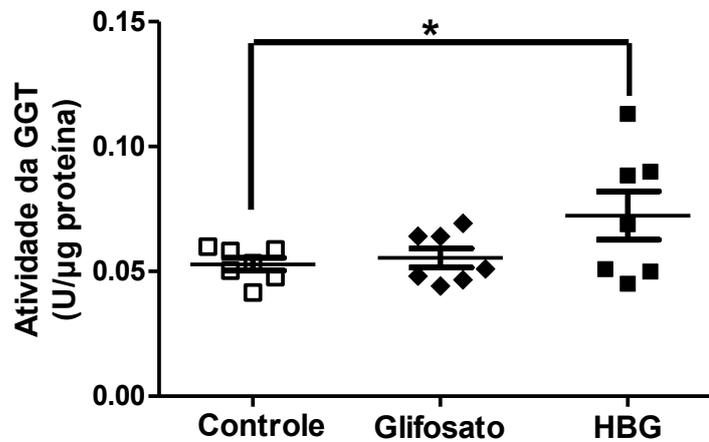
Figura 14. Conseqüências do tratamento *in vitro* com o HBG na atividade das enzimas: (A) glutatona peroxidase (GPx), (B) glutatona redutase (GR), (C) glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e (D) glutatona-S-transferase (GST) em fígado de ratos imaturos.



O tecido foi incubado na presença ou ausência de 0,36 mg/L do HBG por 30 min. Os resultados foram reportados como a média ± E.P.M. de 7 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Investigou-se a atividade da GGT, enzima que desempenha muitas funções em vários processos fisiológicos importantes, após exposição *in vitro* de fatias de fígado ao HBG ou ao glifosato isolado (sem surfactantes), com o objetivo de comparar a toxicidade desses compostos. O tecido foi incubado com 36 mg/L de glifosato ou 0,36 mg/L do HBG. Vale salientar que a dose da formulação comercial utilizada neste estudo apresenta uma concentração 100 vezes menor de glifosato. A Figura 15 evidenciou aumento na atividade da GGT no grupo tratado com HBG sem alteração na atividade da enzima no grupo tratado com glifosato, ambos quando comparados ao controle. Esses dados demonstraram que o HBG é mais tóxico do que o glifosato de grau analítico.

Figura 15. Efeitos comparativos da toxicidade entre o HBG e o glifosato sozinho na atividade da γ -glutamil transferase (GGT) em fígado de ratos imaturos.

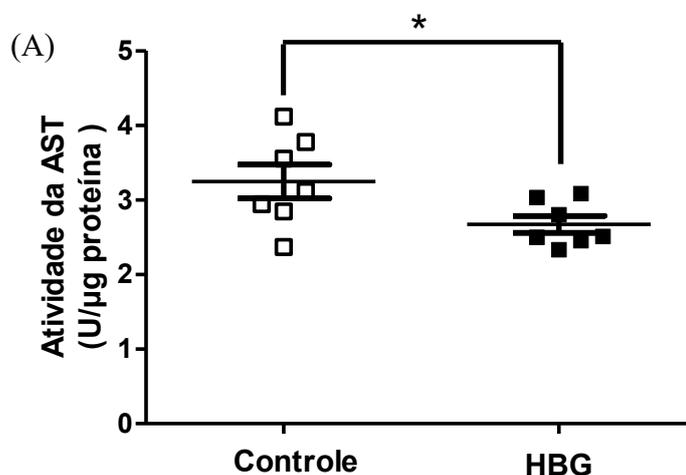


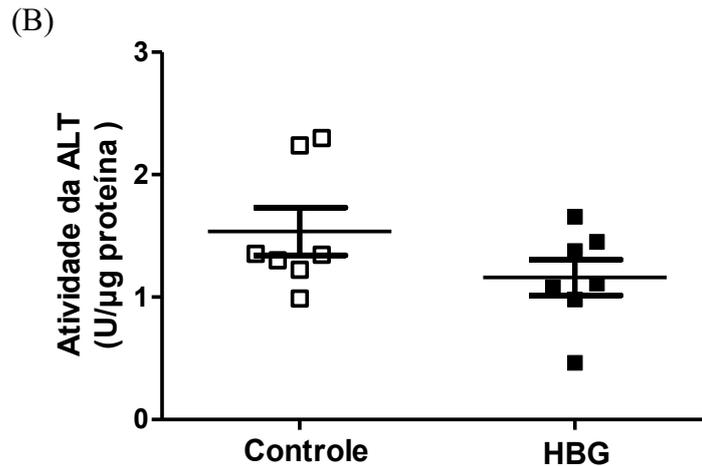
Fatias de fígado foram incubadas na presença ou ausência de 0,36 mg/L do HBG ou 36 mg/L de Glifosato P.A durante 30 min. Os dados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 7 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle.

5.1.5 Efeitos do tratamento *in vitro* com o HBG em fatias de fígado de ratos com 15 dias de idade na atividade das aminotransferases

As transaminases possuem funções fundamentais no metabolismo energético, destacando-se o metabolismo dos aminoácidos. Nesse contexto, avaliou-se a atividade da AST e da ALT em células hepáticas expostas ao HBG. Os resultados mostraram que o tratamento *in vitro* com o HBG diminuiu a atividade da AST (Figura 16A) sem interferir na atividade da ALT (Figura 16B), ambos em relação aos animais controles.

Figura 16. Estudos da exposição ao HBG na atividade das enzimas (A) aspartato aminotransferase (AST) e (B) alanina aminotransferase (ALT) em fígado de ratos imaturos.





O tecido foi incubado na presença ou ausência de 0,36 mg/L do HBG por 30 min. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 7 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

5.1.6 Discussão

No presente estudo foram avaliadas as possíveis ações ocasionadas pela exposição ao HBG em modelo animal *in vitro*, com o intuito de investigar os efeitos mediados pelo HBG em diferentes parâmetros bioquímicos, bem como os mecanismos de ação pelo qual esse herbicida exerce toxicidade em fígado de ratos com 15 dias de idade.

Mazon e Souza (2015) realizaram um estudo com o intuito de saber o panorama da exposição ocupacional aos agrotóxicos em agricultores da região Oeste de Santa Catarina. Os dados indicaram que o Roundup® (formulação comercial contendo glifosato) foi o agroquímico mais utilizado nas propriedades rurais. Foram entrevistadas 197 famílias, os resultados mostraram que 89,9% dos aplicadores de agrotóxicos eram homens, dos quais 48,7% eram expostos aos agrotóxicos por mais de 4 horas a cada aplicação, sendo que na grande parte das vezes os trabalhadores rurais não usavam nenhum tipo de proteção individual.

Pereira (2017) elaborou um estudo visando conhecer a relação entre a exposição ocupacional aos agrotóxicos e a presença de danos ao DNA e eventos oxidativos. Foram analisadas 50 amostras de sangue provenientes de agricultores residentes em Antônio Carlos-SC e 75 amostras de indivíduos controles, das quais 46 eram da mesma localidade e 29 eram residentes de Florianópolis-SC. Os dados evidenciaram que o glifosato foi o segundo agrotóxico (63,3%) mais utilizado pelos trabalhadores rurais. Além disso, o estudo demonstrou a presença de genotoxicidade e estresse oxidativo nos indivíduos expostos aos agrotóxicos de modo ocupacional.

Kupske (2018) realizou um estudo exploratório relacionando a exposição ao glifosato e a incidência de neoplasias em trabalhadores rurais no município de Cerro Largo-RS. 120 agricultores do sexo masculino foram entrevistados, a maior parte possuía apenas o ensino primário (60%). Os dados mostraram que 62,5% dos entrevistados utilizavam glifosato principalmente nas culturas de soja e milho, desses 26,6% afirmaram utilizar o herbicida a pelo menos 5 anos. 37,3% dos trabalhadores rurais ficavam expostos aos agrotóxicos entre 30 min-1 h a cada aplicação realizada na lavoura. Além disso, 51,7% dos entrevistados já tiveram ou tinham casos de câncer na família.

Estudos realizados com diversas espécies de animais de laboratório e de fazenda demonstraram que a concentração de glifosato e AMPA encontrada em fígado e rim são 10 a 100 vezes maiores do que a concentração do agrotóxico e do seu metabólito presentes em gorduras, músculos e na maioria dos demais tecidos. Esses dados sugerem que os resíduos do HBG podem apresentar maiores riscos ao tecido hepático e renal (MYERS *et al.*, 2016).

Nesse contexto, achados prévios do nosso grupo de pesquisa utilizaram uma concentração 100 vezes maior (36 mg/L do HBG) em estudos *in vitro* para demonstrar aumento no influxo de cálcio e desencadeamento de morte celular em células de Sertoli e testículos de ratos pré-púberes (DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI *et al.*, 2013), bem como em hipocampo de ratos imaturos (CATTANI *et al.*, 2014, 2017), indicando que o tecido hepático é mais sensível a esse toxicante.

O presente estudo mostrou que a concentração de 0,36 mg/L do HBG induziu influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e diminuição da viabilidade celular em fatias de fígado de ratos imaturos. Os experimentos subsequentes foram realizados com 0,36 mg/L do HBG, o que correspondeu a 360 μg /L de glifosato. De acordo com a Resolução nº 274/2005, a concentração máxima de glifosato permitida na água destinada ao consumo humano é de 500 μg / L (ANVISA, 2005), ou seja, a concentração usada nesse estudo foi inferior ao limite máximo de glifosato na água potável. Portanto, sugerimos que a concentração aceitável de resíduos de glifosato na água de beber seja revista, tornando-a mais restritiva.

Cálcio é um elemento essencial na regulação da sinalização metabólica e intracelular, e a concentração desse íon no citosol é rigorosamente controlada sob condições normais (HALESTRAP, 2006). Contudo, concentrações elevadas de cálcio intracelular por tempo prolongado promove morte às células (CLAPHAM, 1995), justificando o aumento da liberação de LDH extracelular e a consequente diminuição da viabilidade celular encontrada nesse trabalho após indução do influxo de cálcio mediada pela exposição ao HBG.

O primeiro estudo demonstrando que o glifosato podia modificar a homeostase do cálcio foi descrito por Olorunsogo (1990), que indicou aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial para íons hidrogênio e Ca^{2+} . Em 2017, Luo e colaboradores (2017) mostraram que o tratamento *in vitro* com diferentes concentrações (60, 90, 120, 150 e 180 mg/L) de Roundup® em linhagem de hepatócitos (L-02) por 24 h aumentaram a concentração de Ca^{2+} citoplasmática em todas as doses estudadas em comparação ao controle. No entanto, inicialmente aumentou e depois diminuiu o influxo de cálcio em relação as doses crescentes de Roundup®, indicando que as células estavam sofrendo vários graus de dano e alteração na permeabilidade da membrana.

Da mesma forma, Cai e colaboradores (2020) evidenciaram aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular em embriões bovinos na fase de pré-implantação expostos a 0,9 ppm ou 1,8 ppm de Roundup® por 84 h, o aumento na concentração do íon foi proporcional a dose do herbicida. Em adição, Kwiatkowska *et al.* (2019) relataram aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico em células mononucleares de sangue periférico humano tratadas *in vitro* com 5 mM de glifosato durante 4 h.

A entrada de Ca^{2+} no interior da célula pode acontecer por meio de canais de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática a partir de um sinal extracelular ou o íon pode ser liberado do RE ou da mitocôndria para o citosol em resposta a mensageiros intracelulares (ERMAK, DAVIES, 2002). Nesse sentido, a exposição *in vitro* ao HBG em fatias de fígado foi capaz de aumentar significativamente o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, e os mecanismos responsáveis por tais efeitos envolveram os CCDV-L, bem como a ativação das proteínas cinases PLC e PI3K, indicando que os efeitos citotóxicos do HBG estão relacionados as alterações na homeostase do Ca^{2+} . Corroborando os nossos resultados, De Liz Oliveira Cavalli *et al.* (2013) mostraram o envolvimento de CCDV-L e das vias PLC/PKC, PI3K e MAPKs (ERK e p38) no mecanismo de ação do HBG sobre a captação de cálcio em testículos de ratos pré-púberes.

Nossos dados demonstraram que a enzima PLC está envolvida no influxo $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzido pelo HBG. Considerando-se que a PLC cliva fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) para formar inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG); e o segundo mensageiro IP_3 induz a liberação de Ca^{2+} através do RE (ALBERTS *et al.*, 2015), esse evento contribuiu para a sobrecarga de Ca^{2+} intracelular em tecido hepático de ratos imaturos após tratamento *in vitro* com o HBG. Em adição, o excesso de Ca^{2+} citosólico pode estar sendo direcionado para as mitocôndrias, promovendo estresse oxidativo mitocondrial. Na mitocôndria, o Ca^{2+} pode interferir no ciclo do ácido tricarbóxico e nas enzimas da cadeia transportadora de elétrons, o

influxo do íon contribui para a geração de O_2^- dentro da organela e caso haja excesso de EROs e as defesas antioxidantes sejam menos eficientes (HEMPEL; TREBAK, 2017), tem-se disfunção mitocondrial em fígado de ratos expostos *in vitro* ao agrotóxico.

Estudos demonstraram que EROs e ERNs promovem aumento na concentração de Ca^{2+} citoplasmática de vários tipos celulares (JOSEPH *et al.*, 1997; WANG; JOSEPH, 2000; HEMPEL; TREBAK, 2017). Essa elevação nos níveis de Ca^{2+} no citosol pode ativar enzimas (p.ex. óxido nítrico sintase e xantina oxidase) que induzem a produção de RL (LYNCH; DAWSON, 1994; SÁNCHEZ, 2012). Desse modo, a indução do influxo de Ca^{2+} mediada por HBG pode causar a formação de RL e conseqüentemente aumentar ainda mais a concentração intracelular de Ca^{2+} .

Frente a isso, células de fígado de animais com 15 dias de idade tratadas com HBG e co-incubadas com os antioxidantes vitamina E, NAC ou GSH reverteram o aumento no influxo de $^{45}Ca^{2+}$ induzido pelo HBG a concentrações normais. A vitamina C preveniu pelo menos em parte o influxo de $^{45}Ca^{2+}$ desencadeado pelo tratamento com o agrotóxico. Esses dados sugerem que o estresse oxidativo é um importante evento no mecanismo de ação do HBG. Em suma, o herbicida promove de modo direto ou indireto a produção de RL e os antioxidantes previnem a ação deletéria do HBG em tecido hepático.

Os resultados de Gehin, Guyon e Nicod (2006) vão ao encontro dos nossos achados, os autores realizaram um estudo expondo uma linhagem de queratócitos humanos (HaCaT) ao Roundup 3 plus® (10, 15 e 20 nM) e demonstraram que o agrotóxico induziu depleção de GSH, mudanças na atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e GR, bem como aumento da peroxidação lipídica. Posteriormente a linhagem celular foi suplementada com 100 μ M de vitamina C ou 100 μ M de vitamina E por 24 h e ambos antioxidantes foram capazes de diminuir a peroxidação lipídica e aumentar a atividade da SOD, além da suplementação com vitamina E também modificar a atividades das enzimas CAT e GPx em queratócitos tratados com Roundup 3 plus®. Esses dados *in vitro* indicaram que a vitamina C e E podem ter efeitos preventivos contra o dano celular cutâneo causado pelo HBG.

Outro estudo desenvolvido por George e Shukla (2013) observou proliferação celular, diminuição da concentração de Ca^{2+} e aumento na geração de EROs em células de queratócitos humanos após exposição de 0,1mM de uma formulação comercial à base de glifosato, já o pré-tratamento com 20 mM de NAC conseguiu reverter os efeitos induzidos pela exposição ao herbicida.

Nossos achados também estão de acordo com estudos *in vivo* utilizando animais, como o demonstrado por Rebai e colaboradores (2017) que evidenciaram aumento na concentração

intracelular de Ca^{2+} em cérebro de ratos Wistar expostos a uma única dose do HBG (100 mg/kg) via intraperitoneal (i.p.) por 2 semanas. Enquanto os animais expostos a mistura de 100 mg/kg glifosato e 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de *Morus alba* (extrato das folhas de amoreira branca) via i.p. pelo mesmo período de tempo apresentaram concentração de Ca^{2+} em células cerebrais semelhante ao grupo controle. Os autores mencionaram que o extrato das folhas de amoreira é um potente protetor contra a toxicidade induzida pelo glifosato.

Arab e colaboradores (2018) mostraram aumento na concentração de MDA e redução no conteúdo de GSH em ovários de ratas Wistar adultas tratadas com 50 mg/kg do organofosforado malation via ip durante 2 semanas. Enquanto as ratas expostas a combinação de 50 mg/kg de malation + 200 mg/kg de ácido ascórbico pela mesma via de administração por 2 semanas obtiveram diminuição nos níveis de MDA e aumento na concentração de GSH em tecido ovariano, indicando que a vitamina C promove ação protetiva contra os efeitos tóxicos promovidos pelo malation.

Sun *et al.* (2018) submeteram os ratos Sprague Dawley ao tratamento com 180 mg/kg de phoxim ou à exposição concomitante de 180 mg/kg de phoxim + 200 mg/kg de vitamina E, uma vez por dia durante 28 dias por via intragástrica (gavagem). Os autores observaram que o tratamento com vitamina E reduziu estresse oxidativo, preservou a integridade do tecido intestinal e regulou o número e a composição da microflora intestinal alterados pela exposição ao phoxim, demonstrando que a vitamina E auxilia na redução da toxicidade desse organofosforado em intestino de ratos.

Muitos xenobióticos, como os agrotóxicos, causam danos celulares oxidativos por induzirem a formação de EROs através de vários mecanismos bioquímicos, tais como o comprometimento do transporte de elétrons ligado à membrana (por exemplo, transporte de elétrons microssomal na mitocôndria) (PEIXOTO, 2005), facilitação da reação de Fenton, inativação de enzimas antioxidantes (MODESTO; MARTINEZ, 2010; LARSEN *et al.*, 2012) e depleção de “scavengers” de RL (ASTIZ; DE ALANIZ; MARRA, 2009b; EL-SHENAWY, 2009).

A geração de EROs pode resultar em peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, modulação da expressão gênica e alterações do estado redox corroborando os possíveis danos celulares. Como efeito no organismo, o estresse oxidativo está envolvido no envelhecimento e em muitas doenças, como por exemplo, doenças que afetam o sistema imune, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas e câncer (SAYRE; SMITH; PERRY, 2001; SLANINOVA *et al.*, 2009; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Frente a isso, investigou-se os efeitos do HBG sobre parâmetros bioquímicos que podem demonstrar dano oxidativo. O presente estudo relatou que a incubação por 30 min com o HBG elevou o conteúdo de TBARS em células hepáticas. TBARS mensura a concentração de malondialdeído (MDA), que é o principal produto secundário da oxidação lipídica de ácidos graxos polinsaturados (SLANINOVA *et al.*, 2009). Desse modo, o conteúdo do TBARS em células de fígado de ratos imaturos reflete o nível de peroxidação lipídica e pode indicar indiretamente a concentração de EROs no tecido hepático. Esse achado sugere que a formulação contendo glifosato pode promover a formação de espécies reativas e desencadear estresse oxidativo.

Dados semelhantes foram encontrados pelo grupo de pesquisa de Jasper e colaboradores (2012), os quais demonstraram que o tratamento subagudo com 50 mg/kg ou 500 mg/kg de HBG diluídos na água de beber de camundongos Swiss Albinos durante 15 dias aumentou a concentração de TBARS em fígado de animais machos e fêmeas em ambas as doses administradas. Da mesma forma, Bhardwaj, Mittal e Saraf (2019) relataram que a exposição *in vitro* a concentrações crescentes (0,1; 2 ou 4 mg/mL) do HBG em células ovarianas de cabras (*Capra hircus*) durante 24, 48 e 72 horas elevou a concentração de MDA em todas as doses estudadas e nos diferentes tempos de exposição ao herbicida. Outro estudo desenvolvido por Guilherme *et al.* (2010) observou que a exposição aguda a 58 µg/L ou 116 µg/L de Roundup® em peixes (*Anguilla anguilla*) por 24 h ou 72 h aumentou a LPO em sangue periférico depois do tratamento com 58 µg/L do HBG por 24 horas sem interferir na concentração de GSH.

Nesse sentido, nossos resultados não evidenciaram efeitos no conteúdo de GSH no fígado de ratos com 15 dias de idade expostos ao HBG. Em 2017, Kašuba e colaboradores (2017) também demonstraram que a exposição *in vitro* ao HBG nas concentrações de 0,5 µg/mL (ingestão diária aceitável nos EUA), 2,91 µg/mL (valor de exposição residual) ou 3,5 µg/mL (valor de exposição ocupacional) em células HepG2 (hepatoma humano) durante 4 h ou 24 h não alterou o conteúdo de GSH em todas as doses estudadas em comparação ao controle.

Em oposição, Luo e colaboradores (2017) observaram diminuição do conteúdo de GSH associado ao aumento de TBARS em células hepáticas L-02, após tratamento agudo com concentrações crescentes do HBG (60, 90, 120, 150, 180 mg/L) por 24 horas. Contudo, Chaufan, Coalova e Molina (2014) relataram aumento no conteúdo de GSH em células HepG2 expostas durante 24 horas a 40 mg/L de uma formulação contendo glifosato, bem como após exposição a 900 mg/L de AMPA; todavia, não houve modificação no conteúdo de GSH quando a linhagem humana HepG2 foi exposta a 900 mg/L de glifosato sozinho.

Slaninova e colaboradores (2009) demonstraram que as concentrações teciduais de GSH são frequentemente esgotadas após um curto período de estresse oxidativo, mas seu conteúdo é elevado depois da exposição a longo prazo aos oxidantes. Além disso, a concentração de GSH pode ser dependente da dose administrada e da extensão da exposição ao glifosato.

Como uma forma de prevenir os danos induzidos por EROs, as células desenvolveram sistemas antioxidantes como um importante mecanismo de defesa. Desse modo, as principais enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante, tais como SOD, CAT, GPx, GR e GST podem proteger o organismo contra o estresse oxidativo, bem como as enzimas que participam indiretamente desse processo, como a G6PD e a GGT.

Nesse contexto, as enzimas antioxidantes são sensíveis a muitos fatores e mostram respostas diferentes a uma variedade de estressores químicos e ambientais (STOREY, 1996). As atividades dessas enzimas geralmente estão aumentadas em situações de elevado estresse oxidativo como uma resposta adaptativa para auxiliar na desintoxicação de RL e prevenir e/ou limitar os danos as macromoléculas. Em contrapartida, uma diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes expostas ao estresse oxidativo, parece estar relacionada à inativação pelas EROs. Estudos demonstram que SOD pode ser inativada por H_2O_2 (BRAY *et al.*, 1974), CAT é sensível ao $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (LARDINOIS, 1995) e GST é vulnerável aos produtos da reação de Haber-Weiss (HERMES-LIMA; STOREY, 1993).

Nwani e colaboradores (2013) reportaram que a enzima SOD é um indicador da capacidade dos tecidos em lidar com o estresse oxidativo. Os nossos resultados mostraram inibição na atividade da SOD em fatias de fígado após incubação por 30 min com HBG. Achados parecidos foram previamente demonstrado por Dos Santos Teixeira e colaboradores (2018), os quais observaram que a exposição aguda a crescentes concentrações (0,37; 0,75; 2,25; 4,50 e 7,50 mg/L) do HBG em peixes jundiara (peixe pintado da Amazônia) durante 96 horas diminuiu a atividade da SOD no fígado dos animais. Considerando que a SOD realiza a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em oxigênio mais H_2O_2 (SÁNCHEZ, 2012; SIES; JONES, 2020). No presente estudo, a redução na atividade da SOD pode indicar aumento na concentração do $O_2^{\cdot-}$ em tecido hepático de ratos imaturos tratados *in vitro* com o HBG.

CAT e GPx são enzimas responsáveis pela detoxificação do H_2O_2 . Ambas as enzimas têm o mesmo substrato, contudo apresentam características cinéticas diferentes, a CAT possui afinidade ($K_m=25$ mM) por altas concentrações de H_2O_2 , enquanto a GPx tem afinidade ($K_m=6$ μ M) por baixas concentrações de H_2O_2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Frente a isso, os nossos dados demonstraram aumento na atividade da CAT e diminuição na atividade da GPx

no grupo exposto ao HBG. Destaca-se que a CAT apresenta maior atividade em células hepáticas do que a GPx (SÁNCHEZ, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Os dados em conjunto sugerem elevadas concentrações de H₂O₂ em fígado de ratos expostos ao HBG. Esse aumento de H₂O₂ pode surgir da dismutação espontânea do O₂^{•-}, bem como a partir de outras fontes não vinculadas a ação da SOD.

Nosso estudo relatou redução na atividade da GR e G6PD em células de fígado tratadas *in vitro* com o HBG durante 30 min. Da mesma forma, Lushchak e colaboradores (2009) mostraram que o tratamento agudo com diferentes concentrações (2,5; 5,0; 10 e 20 mg/L) do HBG em peixes dourados (*Carassius auratus*) por 96 horas inibiu a atividade da GR e da G6PD no tecido hepático dos peixes nas duas menores concentrações do herbicida sem alterar a atividade enzimática nas demais doses. Os resultados do presente trabalho demonstraram que a diminuição na atividade da GPx reduz o substrato da GR e conseqüentemente a sua atividade. Além disso, a inibição na atividade da G6PD diminui a geração de NADPH, de modo que alterações nessa via compromete a reciclagem de NADP⁺ a NADPH e conseqüentemente modifica a homeostase redox das células expostas ao HBG.

Não foi observado efeito na atividade da GST em fígado de ratos imaturos tratados com a formulação à base de glifosato. Corroborando nossos achados, Astiz, De Alaniz e Marra (2009a) também não evidenciaram alteração na atividade da GST em fígado, cérebro e rim de ratos Wistar machos tratados com 10 mg/kg de glifosato via intraperitoneal 3 vezes na semana por 5 semanas.

A GGT é a enzima passo-limitante para a síntese *de novo* da GSH, regulando o metabolismo da GSH e conseqüentemente auxiliando na defesa antioxidante e detoxificação de xenobióticos glutationilados (ZHANG; FORMAN, 2009). No entanto, GGT contribui para a atividade pró-oxidante, particularmente na presença de ferro ou cobre. De tal modo que combinação GGT/GSH extracelular pode estimular a formação de oxidantes (DROZDZ *et al.*, 1998; CORTI *et al.*, 2009).

O processo inicia-se a partir do momento que a GGT remove o grupo γ -glutamil e forma cisteinil-glicina (cys-gly) como produto da decomposição da GSH (glu-cys-gly) extracelular, este dipeptídeo (cys-gly) é reintroduzido para o meio intracelular e em pH fisiológico encontra-se na forma aniônica, com capacidade de reduzir Fe³⁺ a Fe²⁺, então o ferro livre via reação de Fenton induz a formação de EROs. Além disso, cys-gly⁻ também pode reduzir diretamente oxigênio molecular, gerando mais EROs (DROZDZ *et al.*, 1998; PAOLICCHI *et al.*, 2002).

Os nossos resultados mostraram que a exposição *in vitro* ao HBG foi capaz de estimular a atividade da GGT em fígado de ratos imaturos enquanto a exposição ao glifosato não interferiu na atividade da enzima em tecido hepático, sugerindo que o aumento na atividade da GGT induzida pelo tratamento com o HBG pode paradoxalmente tanto estimular a manutenção de GSH quanto indiretamente contribuir para a formação de EROs. Os dados também indicaram que o HBG apresentou maior toxicidade do que o seu ingrediente ativo glifosato utilizado isoladamente.

Vinculado a isso, Peixoto (2005) demonstrou o potencial de toxicidade do Roundup® e sua substância essencial (glifosato) em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. Os resultados evidenciaram que o HBG promoveu alterações na bioenergética mitocondrial, enquanto o glifosato sozinho não apresentou efeito nas mitocôndrias hepáticas. As diferenças na toxicidade podem ser atribuídas aos componentes do HBG ou a ação sinérgica entre o glifosato e os outros constituintes da formulação, como por exemplo, o adjuvante POEA.

Em 2016, Defarge e colaboradores (2016) estudaram os efeitos tóxicos de 6 herbicidas contendo glifosato, 5 co-formulações e do ingrediente ativo glifosato em linhagem de células placentárias humanas (JEG3), os autores relataram que as co-formulações e formulações à base de glifosato foram mais tóxicas do que o glifosato sozinho.

Recentemente, Dedeke e colaboradores (2018) observaram maior acúmulo de resíduos de glifosato em tecido renal no grupo exposto ao Roundup® em relação ao grupo exposto ao glifosato P.A. e lesões histopatológicas foram evidenciadas apenas nos rins de animais tratados com Roundup®, demonstrando nefrotoxicidade induzida pelo HBG, uma vez que o glifosato sozinho quase não teve efeito sobre a função renal dos animais expostos. Em suma, todos esses estudos estão de acordo com os nossos achados.

As transaminases ALT e AST desempenham um papel vital na síntese e desaminação de aminoácidos, promovendo a interconversão entre metabolismo de proteínas e carboidratos durante condições impostas pelo estresse para atender a alta demanda de energia do organismo (VAN WAARDE; HENEGOUWEN, 1982). Sendo assim, com o intuito de compreender, pelo menos em parte, os efeitos do HBG sobre o metabolismo energético de ratos imaturos, foram avaliadas as atividades enzimáticas da ALT e da AST em fígado. Os resultados evidenciaram que a incubação por 30 min com o HBG diminuiu a atividade das AST sem alterar a atividade da ALT, indicando que o herbicida induz alterações metabólicas no tecido hepático.

Achados semelhantes foram descritos por Cattani e colaboradores (2014), os quais demonstraram que a exposição *in vitro* ao HBG reduziu a atividade da AST e da ALT em

hipocampo de ratos imaturos. Em um estudo desenvolvido por El-Demerdash, Yousef e Elagamy (2001), os autores avaliaram a toxicidade *in vitro* promovida por glifosato e paraquat após exposição a diferentes concentrações dos herbicidas em soro a partir do sangue humano de indivíduos saudáveis e observaram que ambos agrotóxicos inibiram a atividade da AST e da ALT.

Em contrapartida, o nosso grupo de pesquisa mostrou em estudos anteriores um aumento na atividade de ambas as transaminases (AST e ALT) tanto em fígado quanto em soro de ratos expostos *in vivo* a 1% do HBG desde a gestação até completarem 15 dias de idade (RIEG, 2016). Outro trabalho produzido por Samanta e colaboradores (2014) relatou que a exposição a 17,2 mg/L do Excel Mera 71 (formulação contendo glifosato) por 30 dias em duas espécies distintas de peixe foi capaz de estimular a atividade da ALT e da AST em tecido hepático. Além disso, Çavuşoğlu *et al.* (2011) demonstraram que o tratamento com uma única dose intraperitoneal de 50 mg/kg de Roundup® em camundongos Swiss Albinos aumentou a atividade sérica de ALT e AST. Os autores propõem que a duração da exposição ao HBG é um fator importante na modulação da atividade das transaminases, podendo o agrotóxico tanto estimular quanto inibir a atividade dessas enzimas.

Os nossos dados em conjunto demonstram que o HBG exerce ações modulatórias sobre o fígado de ratos imaturos, elevando o influxo de Ca^{2+} dentro da célula através da abertura de canais de cálcio dependente de voltagem (CCDV-L) e da ativação do receptor presente no retículo endoplasmático (como o IP_3), desencadeando um acúmulo de Ca^{2+} intracelular e consequente estresse oxidativo e morte celular. O aumento do influxo de Ca^{2+} é dependente das rotas de sinalização PLC e PI3K. A via PLC/ IP_3 induz liberação de cálcio a partir do retículo endoplasmático, contribuindo para a sobrecarga de Ca^{2+} . A exposição ao HBG induz modificações no metabolismo energético por diminuir a atividade da AST, bem como o agrotóxico promove alterações significativas no estado redox das células, ao estimular a peroxidação lipídica e modificar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GR, G6PD e GGT).

5.1.7 Conclusões parciais

- A ação tóxica do HBG nas células hepáticas da prole de ratos compreende modificação na homeostase do Ca^{2+} intracelular;
- Os mecanismos adjacentes ao aumento do influxo de Ca^{2+} induzido pelo HBG envolve abertura dos CCDV-L e a ativação de PLC e PI3K;

- Os efeitos tóxicos do HBG sobre o fígado de ratos imaturos são medidos por estresse oxidativo;
- O tratamento *in vitro* com o HBG promove alterações no metabolismo energético de células hepáticas.

5.2 ESTUDO II: CONSEQUÊNCIAS DO TRATAMENTO *IN VIVO* COM O HERBICIDA CONTENDO GLIFOSATO NO SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA DA PROLE DE RATOS.

5.2.1 Avaliação dos parâmetros biométricos em filhotes de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal

Com o intuito de analisarmos se a exposição materna ao HBG interfere no desenvolvimento da prole de ratos, analisou-se os parâmetros biométricos nesses animais. Os resultados demonstraram menor comprimento occipito-nasal, bem como diminuição no diâmetro umbilical em filhotes expostos ao HBG em relação ao grupo controle. Os demais parâmetros biométricos analisados em ratos imaturos não foram afetados pelo tratamento com o HBG (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos da exposição perinatal ao HBG nos parâmetros biométricos de ratos imaturos.

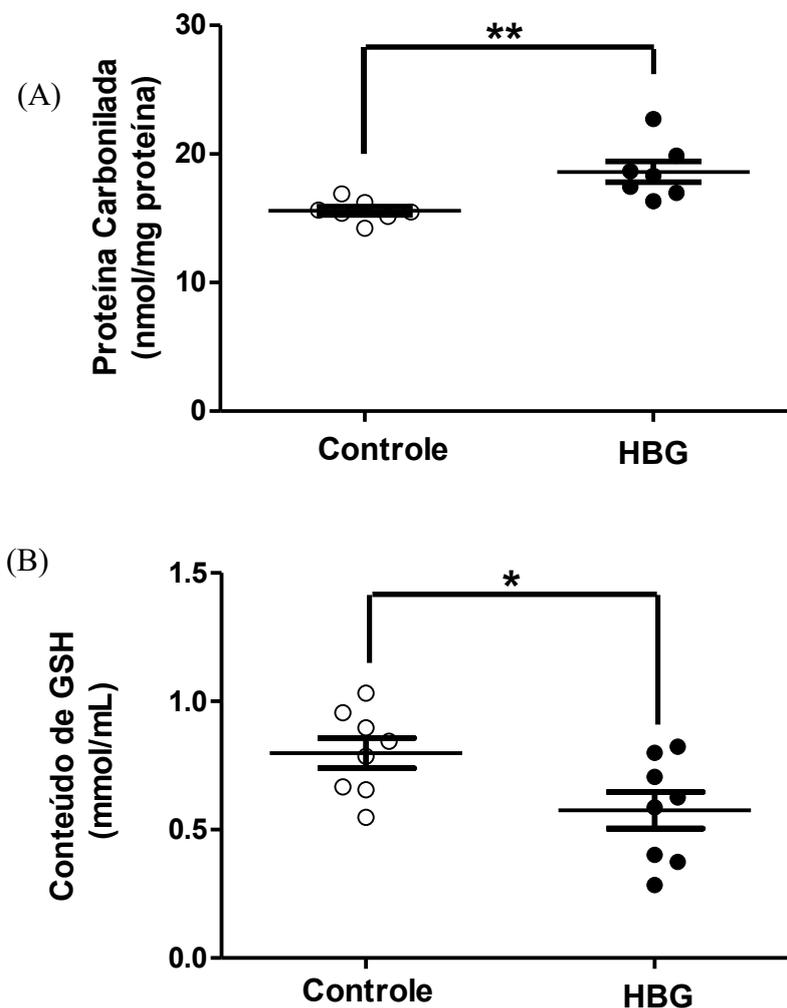
Parâmetros	Controle	HBG
C longitudinal (cm)	8,89±0,14	8,53±0,10
C occipito-nasal (cm)	7,96±0,09	7,24±1,14**
D transcervical (cm)	4,43±0,07	4,51±0,10
D umbilical (cm)	5,85±0,19	5,32±0,11*

Valores representados como a média ± E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. **p*<0,05; ***p*<0,01. C=comprimento; D=diâmetro.

5.2.2 Efeitos da exposição subcrônica ao HBG nos parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo em sangue periférico de ratos imaturos

Muitos agrotóxicos exercem seus efeitos através de mecanismo envolvendo o estresse oxidativo. Frente a isso, a concentração de proteína carbonilada foi investigada como um possível indicador de dano oxidativo. A Figura 17A mostrou que a exposição *in vivo* ao HBG aumentou a carbonilação de proteínas no plasma de filhotes de ratos. Além disso, o tratamento subcrônico com o HBG diminuiu o conteúdo de GSH no sangue dos ratos expostos ao agrotóxico (Figura 17B). Esses dados sugerem o envolvimento de estresse oxidativo nos efeitos tóxicos do HBG.

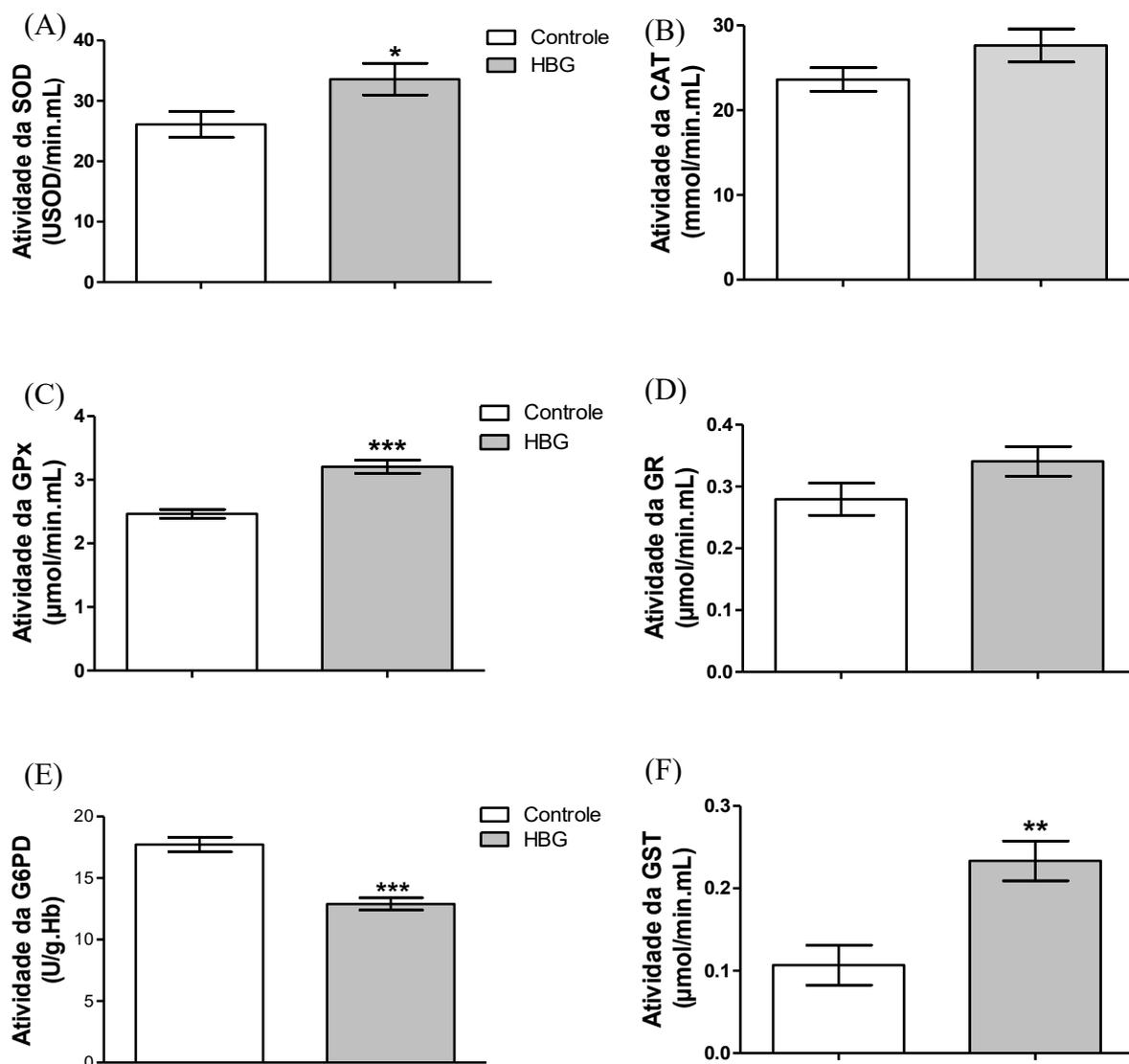
Figura 17. Efeitos da exposição perinatal ao HBG (A) na concentração de proteína carbonilada e (B) no conteúdo de GSH em sangue periférico de ratos imaturos.



Tratamento materno com 1 % do HBG diluído na água de beber durante o período gestacional e lactacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. A proteína carbonilada foi dosada em soro (7 animais em cada grupo) e a GSH foi mensura em sangue total (8 animais em cada grupo). Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Para melhor compreensão de danos oxidativos na participação da toxicidade do HBG em sangue periférico de ratos imaturos, determinamos a atividade da SOD, CAT, GPx, GR, G6PD e GST, enzimas envolvidas nos sistemas de defesas antioxidantes. Os resultados evidenciaram que a exposição materna ao HBG estimulou a atividade de SOD, GPx e GST em lisados sanguíneos da prole de ratos (Figura 18A, 18C e 18F). Por outro lado, a atividade da G6PD foi reduzida pelo tratamento *in vivo* com o HBG (Figura 18E). Além disso, as atividades da CAT e da GR não foram modificadas em sangue periférico de filhotes de ratos expostos ao HBG desde a prenhez até completarem 15 dias de idade (Figura 18B e 18D).

Figura 18. Efeitos da exposição perinatal ao HBG nas enzimas antioxidantes em sangue periférico de ratos imaturos.

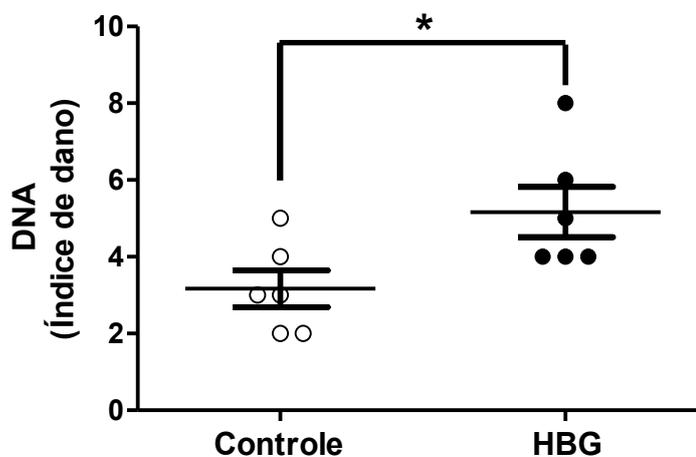


Tratamento materno com 1 % do HBG diluído na água de beber durante o período gestacional e lactacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. As atividades das enzimas antioxidantes: (A) superóxido dismutase (SOD), (B) catalase (CAT), (C) glutiona-peroxidase (GPx), (D) glutiona redutase (GR), (E) glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e (F) glutiona-S-transferase (GST) foram determinadas em sangue total. Valores representados como a média ± E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001.

5.2.3 Avaliação de danos genéticos em ratos imaturos expostos ao HBG durante o período perinatal

Considerando-se que os eventos oxidativos estão envolvidos nos mecanismos de ação do HBG e que essas reações de oxidação podem danificar o material genético, analisou-se os efeitos do tratamento com o HBG no DNA de ratos imaturos. A Figura 19 demonstrou que a exposição materna ao HBG promoveu danos ao DNA da prole de ratos.

Figura 19. Efeitos da exposição perinatal ao HBG no DNA a partir do sangue periférico de ratos imaturos.



Tratamento materno com 1 % do HBG diluído na água de beber durante o período gestacional e lactacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. Índice de dano ao DNA realizado através do ensaio cometa em sangue total. Valores representados como a média \pm E.P.M de 6 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

5.2.4 Consequências da exposição subcrônica ao HBG nos parâmetros hematológicos de ratos imaturos

Os parâmetros hematológicos podem ser considerados biomarcadores de toxicidade amplamente aplicáveis e têm papéis potenciais no monitoramento ambiental e ocupacional. Nesse contexto, investigamos os efeitos da exposição materna ao HBG no perfil eritrocitário, leucocitário e plaquetário em sangue periférico de filhotes de ratos com 15 dias de idade.

A Tabela 2 demonstrou que a exposição *in vivo* ao HBG foi capaz de alterar o perfil eritrocitário de ratos imaturos. Os resultados evidenciaram aumento significativo no número de hemácias, na concentração de HB, HT, VCM e HCM, sem modificar a CHCM. Além disso, nenhuma alteração foi encontrada na forma das hemácias e não houve a presença de inclusões nos eritrócitos no grupo tratado nem no grupo controle (resultados não mostrados). Esses dados em conjunto mostraram que os animais possuem macrocitose normocrômica mediada pela exposição ao HBG.

Como indicado na Tabela 3, o tratamento subcrônico com o HBG modificou o perfil leucocitário da prole de ratos, de tal modo que diminuiu a quantidade de leucócitos no sangue dos animais imaturos. No entanto, nenhuma alteração significativa na contagem diferencial de leucócitos foi observada.

O perfil plaquetário não foi alterado no sangue de ratos expostos ao HBG durante a prenhez e o aleitamento (Tabela 4).

Tabela 2. Perfil eritrocitário de filhotes de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal.

Parâmetros	Controle	HBG
Hemácias ($10^6/uL$)	3,27±0,07	3,98±0,06***
HB (g/dL)	6,8±0,2	9,2±0,1***
HT (%)	20,9±0,5	28,1±0,3***
VCM (fL)	63,8±0,7	70,6±0,3***
HCM (pg)	20,71±0,36	23,1±0,01***
CHCM (g/dL)	32,43±0,23	32,69±0,06

Valores representados como a média ± E.P.M de 8 animais em cada grupo. VCM= volume corpuscular médio, HCM= hemoglobina corpuscular média e CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média. Análise estatística: teste *t* de Student. ****p*<0,001.

Tabela 3. Perfil leucocitário de filhotes de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal.

Parâmetros	Controle	HBG
Leucócitos ($10^3/uL$)	5,26±0,23	4,28±0,27*
Neutrófilos (%)	17,3±2,3	20,1±0,9
Linfócitos (%)	71,4±2,7	68,4±0,4
Monócitos (%)	9,6±0,8	10,9±0,9
Eosinófilos (%)	1,6±0,5	1,1±0,2

Valores representados como a média ± E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. **p*<0,05.

Tabela 4. Perfil plaquetário de filhotes de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal.

Parâmetros	Controle	HBG
Plaquetas ($10^3/uL$)	613,6±65,5	485,1±73,9

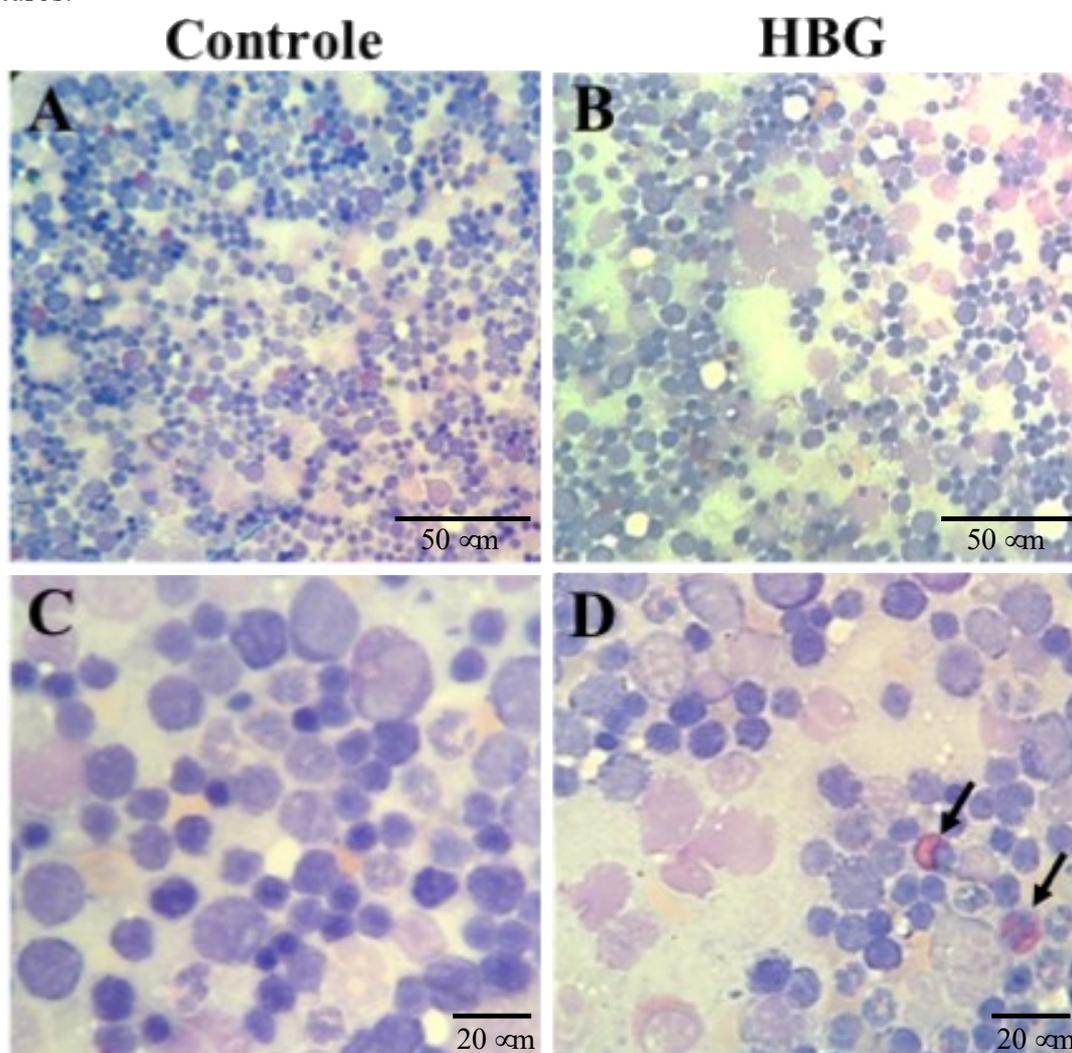
Valores representados como a média ± E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student.

5.2.5 Avaliação da celularidade na medula óssea da prole de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal

Uma vez estabelecido que a formulação contendo glifosato foi capaz de induzir toxicidade sobre os parâmetros hematológicos em ratos expostos ao agrotóxico, analisou-se os efeitos do HBG na principal fonte produtora de elementos celulares do sangue, a medula óssea.

As Figuras 20A e 20C demonstraram normocelularidade na medula óssea dos ratos controles, enquanto as Figuras 20B e 20D apresentaram hipocelularidade com presença de eosinofilia na medula óssea dos ratos imaturos tratados *in vivo* com o HBG.

Figura 20. Efeitos da exposição perinatal ao HBG na celularidade da medula óssea de ratos imaturos.



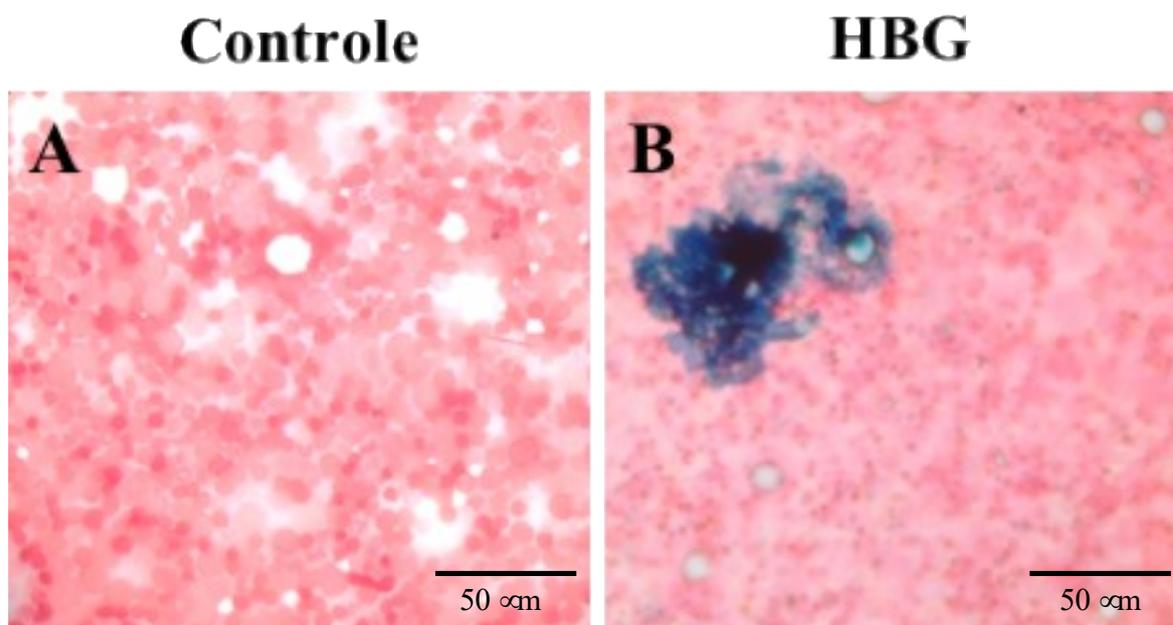
Fotomicrografias representativas dos mielogramas submetidos à coloração de May-Grunwald-Giemsa de ratos controles (A e C) e expostos ao HBG (B e D). A e B) Magnificação de 400X, barra de escala 50 µm. C e D) Magnificação de 1000X, barra de escala 20 µm. n= 8 animais de cada grupo. As setas representam os eosinófilos

5.2.6 Efeitos da exposição materna na deposição de ferro em medula óssea de ratos imaturos

O ferro é um elemento essencial para o organismo. Não obstante, tanto a escassez quanto o excesso deste micronutriente modifica a homeostase celular. Frente a isso, investigou-se a ação do HBG na deposição de ferro na medula óssea de ratos imaturos. Como indicado na

Figura 21A, os animais controles não apresentaram armazenamento de ferro medular. A Figura 21B mostrou a presença de depósito de ferro representado pela coloração azulada em esfregaços medulares de animais expostos ao HBG.

Figura 21. Efeitos da exposição perinatal ao HBG no depósito de ferro em medula óssea de ratos imaturos.



Fotomicrografias representativas de esfregaços medulares submetidos à coloração de Perls de ratos controles (A) e expostos ao HBG (B). Magnificação de 400X, barra de escala 50 µm. n= 8 animais de cada grupo.

5.2.7 Discussão

A exposição a formulações contendo glifosato durante a gravidez pode elevar ao risco de exposição fetal. Nesse sentido, Kongtip e colaboradores (2017) realizaram um estudo longitudinal com o intuito de detectar o glifosato no soro materno e soro do cordão umbilical de mulheres gestantes oriundas da Tailândia. Os achados revelaram que 44 das 82 participantes apresentaram glifosato no soro e que 37 dos 75 cordões umbilicais analisados possuíam glifosato acima do limite de detecção. Os autores demonstraram que as mulheres grávidas que trabalhavam na lavoura ou viviam perto de áreas agrícolas ou ainda que possuíam familiares que trabalham na agricultura apresentaram maiores exposições ao glifosato em relação às mulheres gestantes não agricultoras.

Em 2018, um estudo de coorte prospectivo desenvolvido por Parvez e colaboradores (2018) analisou a presença de glifosato em amostras residenciais de água potável e urina de 71 mulheres grávidas residentes no estado de Indiana nos EUA. Os dados demonstraram que não foram detectados resíduos de glifosato nas amostras de água potável. Surpreendentemente, 93%

das gestantes apresentaram concentração de glifosato na urina acima do limite de detecção (0,1 ng/mL), sendo que as maiores concentrações do herbicida foram encontradas na urina das mulheres que habitavam a zona rural e naquelas que ingeriram mais de 700 mL de bebidas cafeinadas por dia. Além disso, as maiores concentrações de glifosato na urina foram correlacionadas com tempos gestacionais encurtados, ou seja, nascimentos com menos de 37 semanas de gestação. Os autores mencionaram que esses resultados fornecem evidências diretas da exposição materna ao glifosato.

No presente trabalho, as ratas prenhas foram tratadas com 1% do HBG (equivalente a 0,36% de glifosato) dissolvidos na água de beber. Estudos prévios de toxicocinética mencionaram que o glifosato apresenta má absorção gastrointestinal (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000) e sua biodisponibilidade oral variou entre 19-36% (BREWSTER; WARREN; HOPKINS, 1991; CHAN; MAHLER, 1992; ANADÓN *et al.*, 2009). Em nossos estudos, durante a gestação os fetos foram expostos ao HBG através da placenta, dado que a mesma não consegue bloquear a passagem de muitos toxicantes da circulação materna à fetal. Neste contexto, Mose e colaboradores (2008) realizaram um estudo da cinética de transporte do glifosato via barreira placentária num sistema de perfusão *ex vivo* e demonstraram que o glifosato foi capaz de atravessar a placenta, de tal modo que após 2,5 h da perfusão, aproximadamente 15% do glifosato foi transferido para o compartimento fetal. Após o nascimento, os filhotes de ratos em nossos experimentos foram expostos ao HBG via aleitamento materno, como estudos já mencionaram a presença de agrotóxicos no leite materno (PALMA, 2011).

O modelo experimental *in vivo* utilizado nesse estudo foi previamente validado pelo nosso grupo de pesquisa. Os dados demonstraram que a exposição materna ao HBG diminuiu a massa corporal dos ratos imaturos, sem alterar o consumo de água, comida e a massa corporal das mães (CATTANI *et al.*, 2014). O tratamento subcrônico com HBG não induziu malformações corporais nos filhotes, nem provocou mortalidade na prole de ratos (CATTANI *et al.*, 2017).

Vinculado a isso, os nossos resultados demonstraram diminuição no comprimento occipito-nasal e no diâmetro umbilical dos filhotes de ratos expostos ao HBG durante o período gestacional e lactacional. Nenhum efeito do tratamento com o HBG foi observado no comprimento longitudinal na posição natural e no diâmetro transcervical dos ratos imaturos. Os dados indicaram que os animais do grupo tratado tinham o mesmo tamanho do grupo controle, no entanto os ratos expostos ao agrotóxico apresentaram diminuição no crânio e no abdômen, sugerindo que o HBG pode afetar o desenvolvimento físico da prole de ratos.

Achados anteriores do grupo de pesquisa já demonstraram redução na massa corporal dos filhotes expostos ao HBG (CATANNI *et al.*, 2014, 2017), justificando o menor diâmetro umbilical dos ratos. Dados semelhantes aos nossos foram encontrados por Ren e colaboradores (2018), os autores relataram que a exposição de camundongos fêmeas ICR prenhas (desde o 1º até o 19º dia de gestação) a 0,5% do HBG dissolvido em água destilada foi capaz de reduzir o peso dos fetos sem alterar o comprimento do corpo e o comprimento da cauda desses animais.

No presente estudo, a proteína carbonilada foi mensurada como um indicador de dano oxidativo para avaliar o potencial estresse oxidativo induzido pela exposição ao HBG. Os resultados mostraram aumento na concentração de grupos carbonil em proteínas plasmáticas de ratos imaturos tratados *in vivo* com o HBG. Corroborando os nossos dados, Hong e colaboradores (2018) demonstraram aumento na concentração de proteína carbonilada em soro de camarões de água doce (*Macrobrachium nipponensis*) expostos a 2,80 mg/L ou 5,60 mg/L do HBG por 24, 48, 72 e 96 h. Em adição, o elevado teor de carbonilação de proteínas sugere uma importante alteração do metabolismo proteico normal (GLUSCZAK *et al.*, 2011), o que promove acúmulo de moléculas danificadas no organismo, contribuindo com o estresse oxidativo.

O sangue total, principalmente os eritrócitos podem representar até 10% da síntese total de GSH no organismo (LYONS *et al.*, 2000; REID *et al.*, 2000). Vinculado a isso, os nossos dados evidenciaram diminuição no conteúdo de GSH em elementos sanguíneos da prole de ratos expostas ao HBG durante a prenhez e o aleitamento. Achados parecidos foram descritos por Ren e colaboradores (2018) que observaram menor capacidade antioxidante total no soro de camundongos fêmeas prenhas tratadas com 0,5% do HBG diluídos em água desde o 1º até o 19º dia de gestação. Considerando-se que a GSH tem várias funções de proteção contra as lesões oxidativas (CHEN *et al.*, 2013), o conteúdo reduzido de GSH relatado nesse estudo pode refletir a sua utilização direta como tripeptídeo redutor de espécies reativas ao tentar amenizar os danos tóxicos no organismo dos ratos imaturos causados pela exposição ao HBG.

Os sistemas biológicos têm vários mecanismos para neutralizar os danos oxidativas promovidas pelas espécies reativas, de modo que a SOD, CAT, GPx, GST, GR e G6PD são importantes enzimas antioxidantes e auxiliam a proteger o estresse oxidativo.

Frente a isso, nossos resultados demonstraram que a exposição materna ao HBG estimulou a atividade da SOD e não foi observado efeito na atividade da CAT em lisados sanguíneos de ratos imaturos. A GPx é a principal enzima responsável pela eliminação do H₂O₂ no sangue, especialmente nos eritrócitos (SÁNCHEZ, 2012), justificando o aumento na atividade da GPx encontrada em nossos estudos sem alteração na atividade da CAT. Esses

achados sugerem que o aumento na atividade da SOD e da GPx em sangue periférico de ratos imaturos é um mecanismo compensatório dos elementos sanguíneos frente ao aumento na concentração de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 induzido pelo tratamento com o HBG.

No sangue periférico a atividade da GR é fundamental para a redução da GSSG usando NADPH como agente redutor, o qual é fornecido pela G6PD (MASELLA *et al.*, 2005; ABDELLAH; OKADA; YASUDA, 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Nesse contexto, os resultados indicaram inibição na atividade da G6PD sem interferência na atividade da GR em lisado sanguíneo dos filhotes de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal. Destaca-se que a deficiência na atividade da G6PD promove eventos oxidativos que podem levar a alterações nas vias de sinalização celular, desenvolvimento embrionário anormal e aumento na susceptibilidade de infecções virais e de doenças degenerativas (HO; CHENG; CHIU, 2007). Os dados mostraram que a GR encontrada em sangue periférico de ratos imaturos expostos ao HBG não consegue regenerar a GSSG formada pelo aumento na atividade da GPx, uma vez que não há disponível o cofator NADPH devido a inibição da G6PD, o que pode contribuir para a diminuição do conteúdo de GSH observada em nosso trabalho.

Considerando-se que o aumento na atividade da GST é visto como importante e benéfico para o manejo das condições de estresse (MENEZES *et al.*, 2011), a elevação na atividade da GST evidenciado no presente estudo mostrou claramente uma resposta de biotransformação dos elementos sanguíneos frente aos efeitos tóxicos causados pelo HBG. Dados semelhantes foram obtidos por Banerjee e colaboradores (1999), os autores demonstraram aumento na atividade da GST no soro de seres humanos intoxicados por malation (organofosforado), lindano (organoclorado) ou propoxur (carbamato). A GST tem a função de catalisar a conjugação de diversos compostos eletrofílicos com a GSH, com o propósito de preservar as células contra as ações dos xenobióticos (WILCE; PARKER, 1994). Nesse contexto, o aumento na atividade da GST com o intuito de detoxificar o HBG pode ter favorecido também para a depleção de GSH em sangue periférico dos filhotes de ratos.

Os nossos achados demonstraram que a ação do HBG envolveu a oxidação de proteínas, diminuição no conteúdo de GSH e alteração nas enzimas antioxidantes resultando em estresse oxidativo no sangue periférico de filhotes de ratos expostos ao herbicida.

Os agrotóxicos podem induzir estresse oxidativo a partir da geração de EROs, as quais podem promover danos ao DNA. Como um resultado das EROs reagindo ao DNA, alterações permanentes no material genético são o primeiro passo nos processos de envelhecimento, mutagênese e carcinogênese (MAÑAS *et al.*, 2013). Vinculado a isso, nossos resultados relataram danos ao DNA em sangue periférico na prole de ratos expostas ao HBG durante o

período perinatal. Esses dados corroboram a descrição da OMS, que menciona o glifosato como provável cancerígeno (GUYTON *et al.*, 2015; IARC, 2015).

Estudos prévios realizados por Mañas e colaboradores (2006) mostraram que a exposição aguda a diferentes concentrações de glifosato (100, 200, 400 mg/kg) única dose via i.p. causaram danos ao DNA em células sanguíneas de camundongos Balb C expostos a maior concentração do herbicida depois de 24 h da injeção.

Outro trabalho desenvolvido por Milić e colaboradores (2018) evidenciaram que o tratamento subcrônico com doses crescentes (0,1; 0,5; 1,75; 10 mg/kg/dia) do glifosato administrado por gavagem em ratos Wistar machos durante 28 dias induziram danos ao DNA em células hepáticas e leucócitos. O dano genético foi medido como o comprimento da cauda de DNA, de tal modo que todas as doses estudadas no grupo tratado nos diferentes tipos celulares obtiveram maior dano ao DNA em relação ao grupo controle. O dano também foi mensurado como a intensidade da cauda (% de DNA na cauda) e observou-se dano genético no fígado de ratos após exposição aos diferentes tratamentos com glifosato, porém apenas a menor dose testada do agrotóxico resultou em maior intensidade da cauda em leucócitos. Os autores justificam os achados ao mencionarem que as células hepáticas são mais sensíveis aos xenobióticos do que os leucócitos.

Em adição, Manãs e colaboradores (2013) relataram que a exposição a 40 mg/kg ou 400 mg/kg de glifosato na água de beber de camundongos Balb C durante 14 dias foi capaz de promover danos ao DNA ao apresentar diferenças significativas no momento, intensidade e comprimento da cauda de DNA em sangue periférico de animais tratados com herbicida em ambas as concentrações estudadas em comparação aos animais controles.

Nossos dados também estão de acordo com estudos *in vitro* utilizando linfócitos humanos, como o demonstrado por Mladinic e colaboradores (2009), os quais observaram que a incubação com 0,5-580 µg/mL de glifosato por 4 horas, aumentou a intensidade e o comprimento da cauda promovendo danos ao DNA nas células expostas a 580 µg/mL do agrotóxico. Alvarez-Moya e colaboradores (2014) também evidenciaram aumento significativo na migração do DNA (comprimento da cauda) em linfócitos tratados com várias concentrações (0,0007-0,7mM) do glifosato durante 20 horas. Essa migração do material genético foi proporcional a dose do agrotóxico. Em 2017, Kwiatkowska e colaboradores (2017) mostraram que a exposição a concentrações crescentes (0,1; 0,25; 0,5; 5; 7,5; 10 mM) de glifosato durante 24 h aumentaram os danos ao DNA pela quebra das fitas simples e duplas em células expostas a partir de 0,5 mM do xenobiótico.

Visto que o sangue periférico é um marcador ideal para avaliar o estresse tóxico, os parâmetros hematológicos foram mensurados como indicadores de toxicidade mediada pela exposição subcrônica ao HBG com o intuito de analisar o estado funcional da saúde animal. O presente estudo demonstrou que o tratamento materno com o HBG alterou o perfil hematológico de ratos com 15 dias de idade.

Os resultados evidenciaram aumento no número de hemácias, na concentração de HB e no HT em sangue periférico de filhotes de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal, sugerindo mecanismos de proteção do organismo desses animais contra a toxicidade mediada pelo HBG. Dados semelhantes aos nossos foram encontrados por Modesto e Martinez (2010) que relataram elevação no número de eritrócitos e no HT em sangue de peixes (*Prochilodus lineatus*) expostos a 5 mg/L de Roundup Transorb® durante 24 h e 96 h. Outro estudo realizado por Braz-Mota e colaboradores (2015) demonstraram aumento na concentração de HB em peixes (*Colossoma macropomum*) expostos a 15 mg/L do HBG por 96 h. Em oposição, Hamdaoui e colaboradores (2019) observaram diminuição na quantidade de hemácias e na concentração de HB em sangue de ratas Wistar adultas tratadas com 315 mg/kg de Kalacha 360 SL (um HBG) administrado oralmente por gavagem durante 60 dias. Destaca-se que os autores utilizaram uma concentração do herbicida 4 vezes maior do que a usada em nosso estudo.

Os efeitos tóxicos do HBG promoveram excesso de glóbulos vermelhos no sangue (eritrocitose) na prole de ratos. De modo que a eritrocitose ocorreu a partir da liberação de eritrócitos de depósitos sanguíneos e/ou tecidos hematopoiéticos para a corrente sanguínea e (SVOBODOVA; VYKUSOVA; MACHOVA, 1994), portanto, refletiu em aumento do HT no sangue dos animais expostos ao agrotóxico. Além disso, o aumento do conteúdo de HB propõe um mecanismo adaptativo do organismo para manter a oxigenação tecidual dos ratos imaturos que pode ter sido prejudicada pelo tratamento com o HBG.

O aumento no VCM e na HCM sem alterar a CHCM no sangue periférico dos filhotes expostos ao HBG é típico de macrocitose normocrômica. Sendo que é importante avaliar a macrocitose mesmo na ausência de anemia, uma vez que pode ser o primeiro indício de uma patologia subjacente (VEDA, 2013). Nesse contexto, Kaferle e Strzoda (2009) relataram que a doença hepática não alcoólica é uma das causas comuns de macrocitose. Em adição, resultados prévios do grupo demonstraram que a exposição subcrônica ao HBG durante a prenhez e o aleitamento promoveu hepatotoxicidade associada ao aumento do influxo de cálcio, estresse oxidativo e sobrecarga de ferro nos ratos imaturos (RIEG, 2016).

Os leucócitos têm um papel fundamental na resposta imune humoral e celular específica e não específica. Portanto, é interessante usar este parâmetro como uma medida para

avaliar o estado do sistema de defesa do organismo (SVOBODOVA; VYKUSOVA; MACHOVA, 1994). Nosso estudo observou que o tratamento perinatal com o HBG reduziu o número de leucócitos sem alterar a contagem diferencial de leucócitos em filhotes de ratos, esses dados apontam diminuição da função imunológica dos ratos induzida pela exposição ao HBG.

Corroborando nossos achados, De Moura e colaboradores (2017) mostraram diminuição na quantidade de leucócitos em peixes híbridos jundiara expostos a 1,357 mg/L do HBG durante 48 e 96 h. Em contrapartida, Owagboriaye e colaboradores (2019) evidenciaram aumento no número de leucócitos em ratos albinos adultos tratados com 50,4 mg/kg ou 248,4 mg/kg de Roundup® via gavagem durante 12 semanas. Enquanto, Gluszczak *et al.* (2006) não observaram alteração na quantidade de leucócitos em piavas (*Leporinus obtusidens*) expostas a diferentes concentrações (3-20 mg/L) do HBG por curto prazo de tempo (96 h). Da mesma forma, Salbego e colaboradores (2010) não relataram modificação na quantidade de leucócitos após um longo período (90 dias) de exposição a 1 mg/L ou 5 mg/L do HBG na mesma espécie de peixe do estudo de Gluszczak *et al.* (2006).

A diminuição dos leucócitos na prole de ratos expostas ao HBG pode ser explicada pelo efeito tóxico prolongado do herbicida sobre essas células. Outro possível motivo pode ser devido ao estresse oxidativo mediado pela exposição materna ao HBG contribuir na redução de leucócitos circulantes no corpo dos ratos imaturos.

As alterações no perfil hematológico no sangue periférico dos ratos tratados com o HBG podem ser atribuídas às desordens no sistema hematopoiético. Nesse sentido, analisamos a celularidade do principal tecido hematopoiético, a medula óssea. Os nossos resultados encontraram hipocelularidade medular nos filhotes de ratos expostos ao HBG desde a prenhez até a lactação, demonstrando um possível mecanismo compensatório do sistema hematopoiético frente ao aumento do número de hemácias no sangue periférico dos animais.

Em adição, Prasad e colaboradores (2009) relataram que os camundongos Swiss albinos tratados com uma única dose do HBG via intraperitoneal nas concentrações de 25 mg/kg ou 50 mg/kg do herbicida demonstraram aberrações cromossômicas em células da medula óssea depois de 24, 48 e 72 h da injeção. Os autores citam que o HBG é clastogênico para a medula óssea de camundongos.

A exposição subcrônica do HBG também causou eosinofilia na medula óssea da prole de ratos. Os eosinófilos têm papel na remodelação e reparo dos tecidos (BAIN, 2017), os quais podem estar em maior número na medula óssea dos animais na tentativa de reparar os tecidos lesionados em consequência da administração subcrônica do HBG. Acreditamos que o aumento

da frequência dos eosinófilos na medula óssea podem estar relacionadas, pelo menos em parte, com a diminuição dos leucócitos no sangue periférico dos animais tratados com o HBG.

O ferro é um elemento fundamental para muitos processos biológicos, porém o seu excesso é tóxico para o organismo. Considerando-se que o ferro é utilizado na síntese de hemoglobina, a qual inicia-se nos proeritroblastos e aumenta a sua produção durante a maturação das células eritroides até a fase de reticulócitos, processo realizado na medula óssea no período extraembrionário (KAUSHANSKY *et al.*, 2016; DEV; BABITT, 2017) e que a exposição perinatal ao HBG induziu eritrocitose e aumento na concentração de HB dos ratos imaturos, os nossos resultados demonstraram deposição de ferro na medula óssea da prole de ratos expostas ao HBG durante a prenhez e lactação.

Corroborando os nossos dados, Tang e colaboradores (2017) encontraram sobrecarga de ferro no fígado, rim, baço e pulmão de ratos Sprague Dawley tratados com diferentes concentrações (5, 50, 500 mg/kg) de glifosato via gavagem durante 35 dias. Outro estudo desenvolvido por Rebai e colaboradores (2017) mostraram que a exposição a 100 mg/kg de glifosato em ratos Wistar administrado via intraperitoneal por 2 semanas foi capaz de promover aumento na concentração de ferro no cérebro dos animais.

O excesso de ferro no organismo está vinculado a muitas patologias, como as doenças hepáticas (CAMASCHELLA; NAI, 2016; PIETRANGELO, 2016), diabetes mellitus (FORD, COGSWELL, 1999; JIANG *et al.*, 2004; SIMCOX; MCCLAIN, 2013), doenças cardiovasculares (MURPHY; OUDIT, 2010), doenças neurodegenerativas (ROUAULT, 2013; SINGH *et al.*, 2014), doenças renais (WANG *et al.*, 2001; LINKERMANN *et al.*, 2014), câncer (MANZ *et al.*, 2016; BYSTROM; RIVELLA, 2015), anormalidades do sistema imune (LI; ZHU, SINGAL, 2000) e desordens minerais e ósseas (MAHACHOKLERTWATTANA *et al.*, 2003).

Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa indicaram elevação na concentração de ferro sérico e hepático em ratos expostos ao HBG, os quais foram acompanhados por diminuição da concentração de transferrina sérica e aumento na saturação de transferrina em soro dos filhotes de ratos expostos ao herbicida (RIEG, 2016). Em adição, no presente estudo observou-se a presença de depósito de ferro medular nesses animais. Segundo Rombout-Sestrienkova, van Kraaij e Koek (2016), em situações de sobrecarga de ferro, a concentração de ferro está elevada, particularmente no fígado, onde o ferro é normalmente armazenado, e a concentração de transferrina sérica está normal ou baixa, o que induz ao aumento da saturação de transferrina no soro.

Desse modo, nossos dados em conjunto demonstraram que o HBG promoveu sobrecarga de ferro no organismo dos ratos tratados com o agrotóxico, o que pode levar ao aparecimento de doenças. Reforçando a hipótese já mencionada por Rieg (2016) ao relatar que a exposição materna ao HBG pode causar hemocromatose secundária na prole de ratos, uma vez que o excesso de ferro é uma condição característica da doença.

Destaca-se que o alto teor de ferro pode agir como um catalisador de auto-oxidação exacerbando o estresse oxidativo encontrado no sangue periférico dos filhotes de ratos expostos desde a prenhez até o aleitamento. Sendo assim, quantidades elevadas de ferro podem ter efeitos deletérios sobre o organismo dos animais.

Os achados em conjunto sugerem que a exposição materna ao HBG altera a homeostase do ferro, esse evento associado à oxidação de proteínas, danos ao DNA, depleção de GSH e alteração nas enzimas antioxidantes culminam em estresse oxidativo em ratos imaturos. Os efeitos tóxicos do HBG modificam o perfil hematológico no sangue periférico da prole de ratos ao induzir eritrocitose, macrocitose normocrômica e leucopenia. Em adição, a exposição perinatal ao HBG promove distúrbios no sistema hematopoiético por causar hipocelularidade medular, bem como deposição de ferro na medula óssea dos filhotes de ratos.

5.2.8 Conclusões parciais

- A exposição ao HBG altera o estado redox e induz danos oxidativos nas células sanguíneas dos animais com 15 dias de idade;
- Os parâmetros hematológicos indicam toxicidade no sangue periférico da prole de ratos mediada pelo HBG;
- O tecido hematopoiético dos ratos imaturos é afetado pela ação tóxica da formulação contendo glifosato;
- O metabolismo do ferro é modificado no organismo dos filhotes de ratos tratados com o HBG.

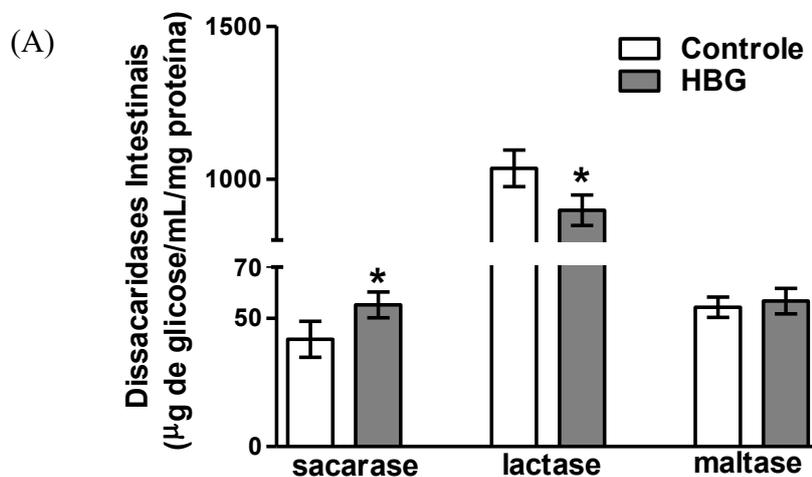
5.3 ESTUDO III: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL À FORMULAÇÃO CONTENDO GLIFOSATO NO METABOLISMO ENERGÉTICO E NO SISTEMA IMUNE DOS FILHOTES DE RATOS.

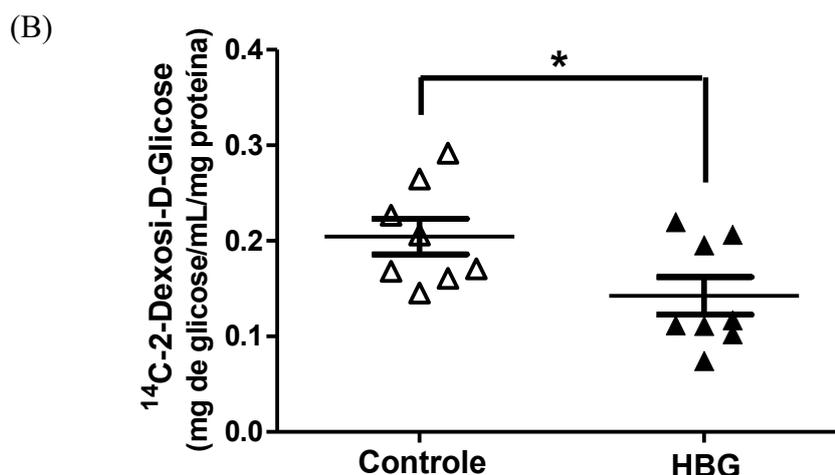
5.3.1 Consequências da exposição ao HBG no metabolismo de carboidratos de ratos imaturos

Com o propósito de avaliar as ações da exposição *in vivo* ao HBG sobre a digestão de carboidratos em filhotes de ratos com 15 dias de idade, determinou-se a atividade das dissacaridases intestinais. As dissacaridases estão presentes na membrana dos enterócitos e são conhecidas pela hidrólise de ligações dos dissacarídeos em monossacarídeos constituintes, digerindo os hidratos de carbono e favorecendo a absorção de carboidratos como a glicose para a corrente sanguínea (DROZDOWSKI; THOMSON, 2006). Nesse sentido, os nossos resultados demonstraram aumento na atividade da sacarase e diminuição na atividade da lactase em duodeno da prole de ratos tratadas com o HBG durante o período gestacional e lactacional. Todavia, a atividade da maltase em intestino de ratos imaturos não foi alterada pela exposição ao HBG (Figura 22A).

Considerando que a formulação contendo glifosato modificou a atividade de enzimas responsáveis pela digestão dos hidratos de carbono, investigamos os efeitos da exposição materna ao HBG na captação do principal carboidrato energético, a glicose. A Figura 22B mostrou redução na captação de glicose em duodeno dos animais tratados com o HBG.

Figura 22. Efeitos da exposição materna ao HBG na (A) atividade das dissacaridases intestinais: sacarase, lactase e maltase e na (B) captação de ^{14}C -2-desoxi-D-glicose em região duodenal da prole de ratos.

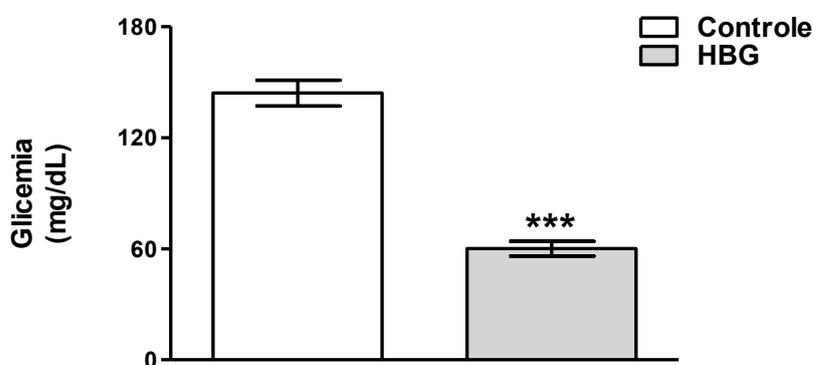




Ratas prenhas foram expostas a 1% do HBG na água de beber durante a prenhez e o aleitamento até os filhotes concluírem 15 dias de idade. Valores representados como a média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

Visto que o HBG tem a capacidade de interferir na absorção da glicose intestinal em ratos imaturos, analisou-se a glicemia nesses animais. A Figura 23 evidenciou menor concentração de glicose no soro dos filhotes de ratos expostos *in vivo* ao HBG.

Figura 23. Efeitos da exposição materna ao HBG na glicemia da prole de ratos.

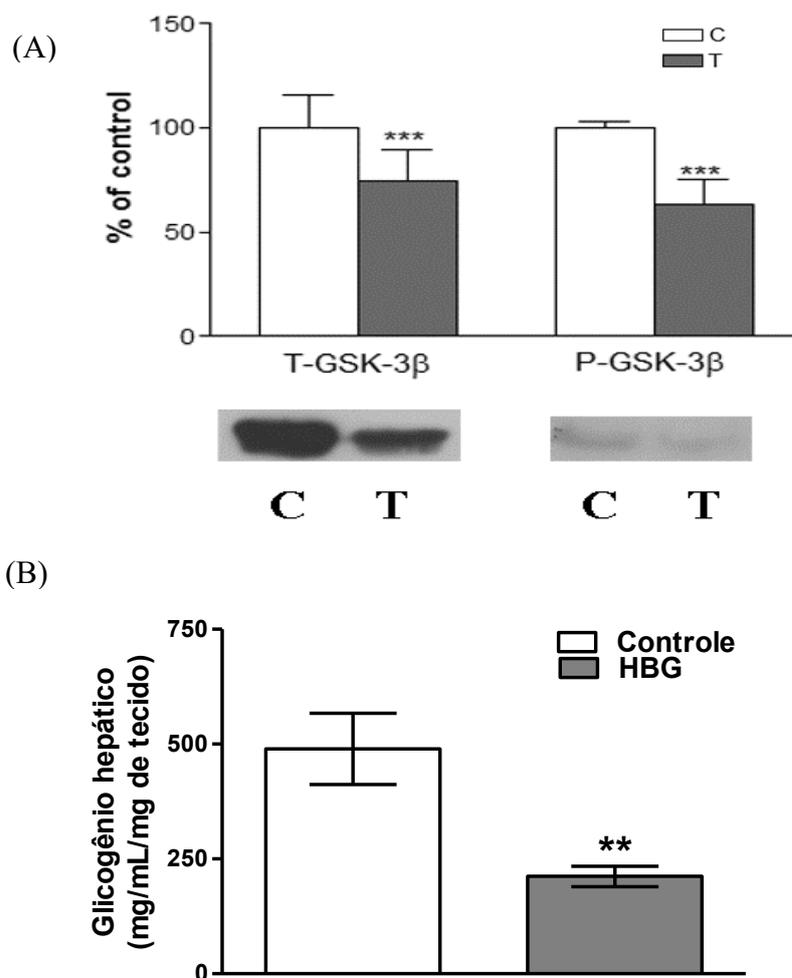


Ratas prenhas foram expostas a 1% do HBG na água de beber durante a prenhez e o aleitamento até os filhotes concluírem 15 dias de idade. Valores representados como a média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. *** $p < 0,001$.

O fígado é o principal tecido envolvido na homeostase da glicose, de modo que esse carboidrato entra nas células hepáticas através de transportadores específicos e dependendo da necessidade energética do organismo o fígado pode armazenar a glicose na forma de glicogênio. Vinculado a isso, investigou-se as ações do HBG na quantificação da GSK-3 β (enzima regulatória do metabolismo do glicogênio), bem como na concentração de glicogênio hepático em ratos imaturos. Como indicado na Figura 24, o tratamento subcrônico com o HBG

diminuiu a fosforilação da GSK-3 β e reduziu o conteúdo de glicogênio em fígado da prole de ratos.

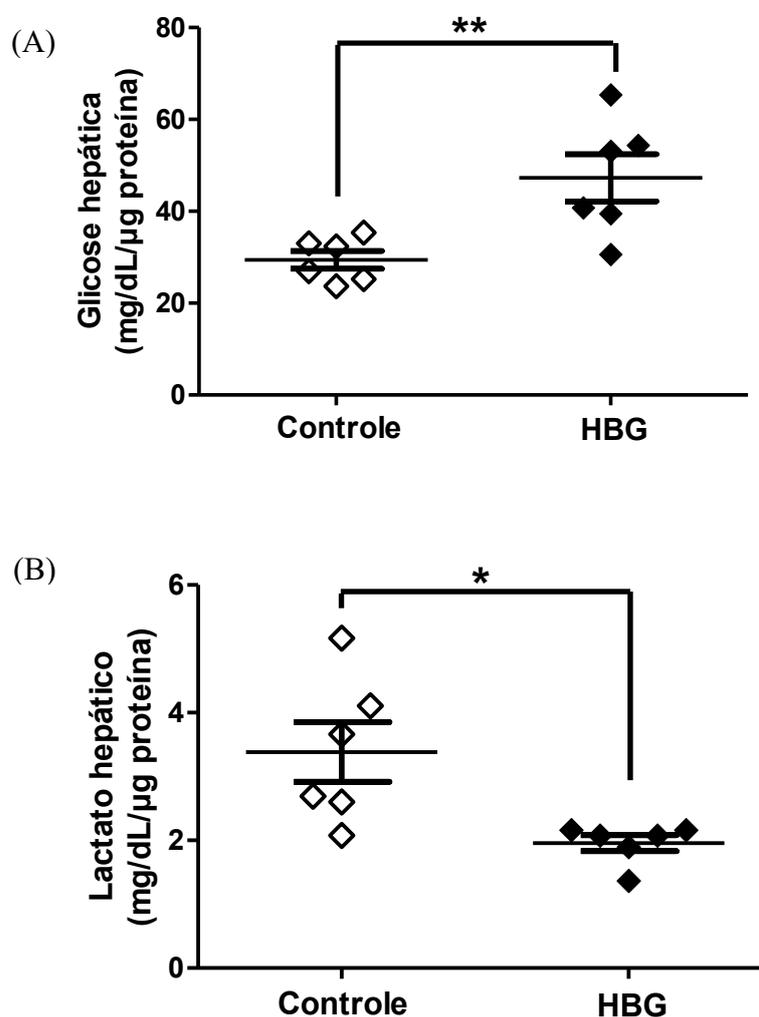
Figura 24. Efeitos da exposição materna ao HBG na (A) quantificação da GSK-3 β total e fosforilada e no (B) conteúdo de glicogênio em fígado da prole de ratos



Fatias de fígado foram lisadas e a concentração total e fosforilada da GSK-3 β foi determinada por Western blot. Valores representados como a média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. C= grupo controle e T= grupo tratado.

Outra rota da glicose após entrar nos hepatócitos é ser utilizada para a produção de energia pelo órgão. Frente a isso, observamos aumento na concentração de glicose hepática associado à redução do conteúdo de lactato em células hepáticas de ratos expostos ao HBG desde a prenhez até o aleitamento (Figura 25).

Figura 25. Efeitos da exposição materna ao HBG na (A) concentração de glicose e no (B) conteúdo de lactato em fígado da prole de ratos



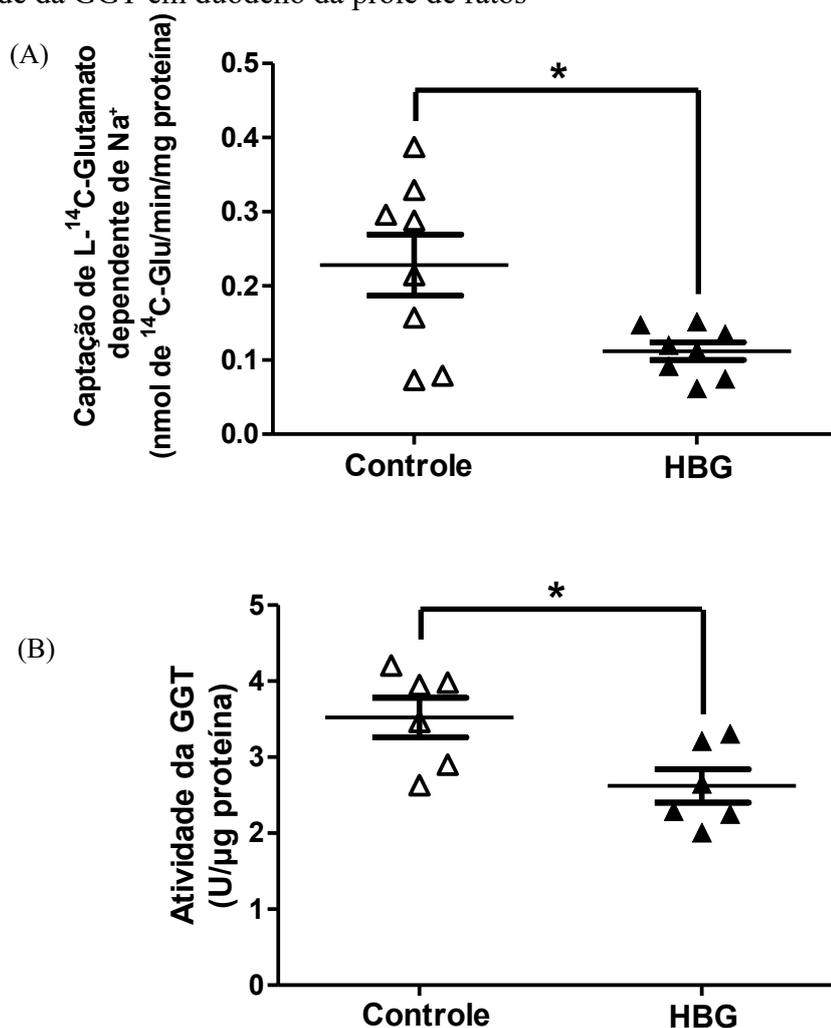
Ratas prenhas foram expostas a 1% do HBG na água de beber durante a prenhez e o aleitamento até os filhotes concluírem 15 dias de idade. Valores representados como a média \pm E.P.M de 6 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.3.2 Efeitos da exposição *in vivo* ao HBG no metabolismo dos aminoácidos de filhotes de ratos

O glutamato oriundo da dieta é um nutriente fundamental na manutenção da atividade da mucosa intestinal, de modo que a maior parte do glutamato é metabolizado pelos enterócitos para a formação de outros aminoácidos ou para a produção de importantes moléculas biologicamente ativas (REEDS *et al.*, 2000). Dessa forma, avaliamos as possíveis ações do HBG na captação de aminoácido em intestino de ratos imaturos. A Figura 26A mostrou diminuição da captação de glutamato no grupo tratado com o HBG em relação ao grupo controle.

GGT é uma ectoenzima que funciona como uma transportadora de aminoácidos do espaço extracelular para o intracelular (MEISTER, 1973). Dado a importância dessa enzima no metabolismo dos aminoácidos, estudou-se os efeitos do HBG sobre a GGT em intestino delgado. Conforme indicado na Figura 26B, a exposição perinatal inibiu a atividade da GGT em duodeno da prole de ratos.

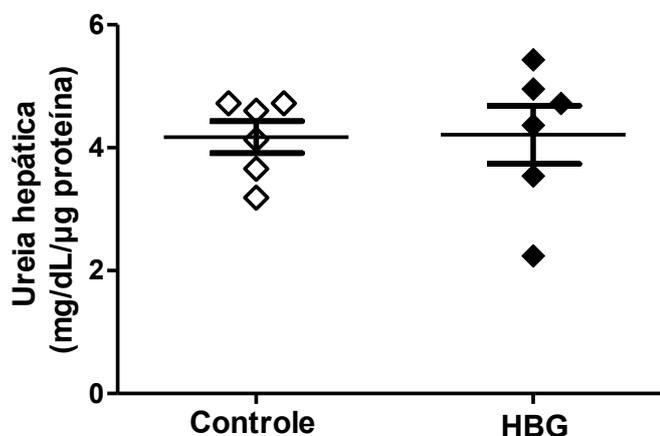
Figura 26. Efeitos da exposição materna ao HBG na (A) captação de ^{14}C -glutamato e na (B) atividade da GGT em duodeno da prole de ratos



Ratas prenhas foram expostas a 1% do HBG na água de beber durante a prenhez e o aleitamento até os filhotes concluírem 15 dias de idade. Valores representados como a média \pm E.P.M de 8 ou 6 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

A ureia é o principal produto final de degradação dos aminoácidos formada nos hepatócitos (BARMORE; STONE, 2018). A Figura 27 evidenciou que o tratamento subcrônico com o HBG não interferiu na concentração de ureia em fígado de filhotes de ratos com 15 dias de idade.

Figura 27. Efeitos da exposição materna ao HBG no conteúdo de ureia em fígado da prole de ratos

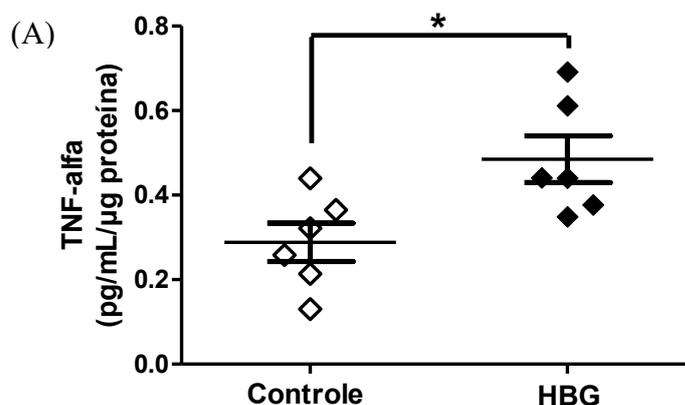


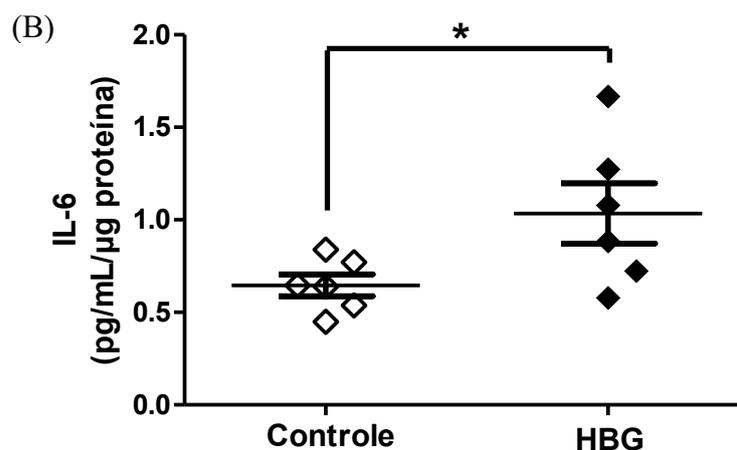
Ratas prenhas foram expostas a 1% do HBG na água de beber durante a prenhez e o aleitamento até os filhotes concluírem 15 dias de idade. Valores representados como a média \pm E.P.M de 6 animais em cada grupo.

5.3.3 Avaliação de marcadores inflamatórios na prole de ratos exposta ao HBG durante o período perinatal

O sistema imunológico é sensível a pressão interna ou ambiental e age rapidamente contra microrganismo patogênicos ou toxinas provenientes do meio externo, como os agrotóxicos (COLOSIO *et al.*, 2005). Nesse contexto, analisamos alguns marcadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6) em células hepáticas de ratos expostos *in vivo* ao HBG. Os resultados mostraram aumento na concentração de TNF- α e IL-6 no grupo tratado com o HBG em relação ao grupo controle (Figura 28).

Figura 28. Efeitos da exposição materna ao HBG nas concentrações das citocinas (A) TNF- α e (B) IL-6 em fígado da prole de ratos.





As concentrações das citocinas IL-6 e TNF- α foram analisadas por ELISA. Valores representados como a média \pm E.P.M de 6 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

5.3.4 Discussão

O glifosato age nas plantas através da inibição da via do chiquimato, que está envolvida com a síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais, fenilalanina, tirosina e triptofano (HERRMANN; WEAVER 1999). Sugeriu-se que o uso do glifosato seria considerado seguro e não prejudicial aos mamíferos incluindo os seres humanos, já que a rota do chiquimato não é encontrada no reino animal (WILLIAMS; WATSON; DESESSO, 2012).

No entanto, cabe salientar que a via de síntese dos aminoácidos essenciais está presente também nos microrganismos, os quais desempenham funções importante na fisiologia humana. As bactérias presentes no intestino auxiliam na absorção e digestão de nutrientes, sintetizam vitaminas, desintoxicam xenobióticos e participam da homeostase do sistema imune e da permeabilidade do trato gastrointestinal (LITTMAN; PAMER, 2011). Neste contexto, estudos demonstraram que o glifosato interfere na microbiota intestinal de animais ao induzir a morte preferencialmente de microrganismos benéficos e promover o crescimento excessivo de bactérias patogênicas (KRÜGER *et al.*, 2013; SHEHATA *et al.*, 2013).

A incidência de doenças inflamatórias intestinais aumentou nas últimas décadas na Europa Ocidental (ASHORN, 2003) e nos Estados Unidos (BEWTRA; SU; LEWIS, 2007). Uma das possíveis causas seria a deficiência de triptofano, induzida pelos efeitos do glifosato, prejudicando a capacidade de absorção de nutrientes através do intestino, devido a inflamação, sangramento e diarreia (SAMSEL; SENEFF; 2013). Estudo prévio de Williams e colaboradores (2011) mencionaram que o autismo está associado à disbiose intestinal. A doença celíaca também está relacionada, entre outros fatores, ao desequilíbrio da microbiota do intestino

(COLLADO; CALABUIG; SANZ, 2007; DI CAGNO *et al.*, 2011). Esses dados podem estar vinculados com os efeitos do glifosato sobre as bactérias intestinais e esse processo estar contribuindo para a exacerbação ou surgimento de doenças.

Em adição, o glifosato pertence ao grupo químico das glicinas N-substituídas, sendo considerado um aminoácido sintético. O herbicida pode agir como um análogo da glicina e ser erroneamente incorporado em peptídeos durante a síntese proteica (GODBALLE *et al.*, 2011; SAMSEL; SENEFF; 2016). Dado que a glicina apresenta propriedades singulares na regulação metabólica e como antioxidante, a substituição da glicina por glifosato poderia justificar o grande número de doenças crônicas e o aumento do uso de glifosato nas lavouras (SWANSON *et al.*, 2014; SAMSEL; SENEFF; 2016).

Chłopecka e colaboradores (2014) realizaram um estudo *in vitro* com jejuno de ratos Wistar incubadas em solução tamponada contendo glifosato nas concentrações de 0,003-1,7 g/L. Os resultados demonstraram que o herbicida afetou a atividade motora espontânea do intestino delgado. Os autores sugerem que o glifosato interfere na motilidade das porções gastrointestinais em concentrações que são observadas em humanos expostos a doses não tóxicas de glifosato. Destaca-se que mesmo pequenas perturbações na atividade motora do intestino podem causar sérios problemas de saúde ao prejudicar os processos de absorção e secreção de substâncias, bem como a velocidade dos compostos na passagem gastrointestinal (DROSSMAN, 1999).

Achados anteriores do nosso grupo de pesquisa indicaram que a exposição perinatal ao HBG promoveu modificações na composição da microbiota intestinal e acidificação nas fezes dos ratos imaturos. Além de demonstrar alterações ultraestruturais no intestino delgado ao evidenciar mitocôndrias com diferentes morfologias e tamanhos, bem como maior espaçamento e desorganização das microvilosidades em duodeno da prole de ratos exposta ao HBG desde a prenhez até o aleitamento (HELLBRUGGE, 2019).

Frente a isso, o atual estudo analisou os efeitos *in vivo* do HBG sobre a absorção e digestão de carboidratos e aminoácidos em duodeno de ratos, uma vez que é a região do intestino responsável pela absorção da maioria dos nutrientes e que pode estar com a permeabilidade comprometida como indicaram os dados prévios do grupo.

As dissacaridases estão presentes no epitélio intestinal e são responsáveis pela hidrólise de dissacarídeos com formação de monossacarídeos, esses posteriormente são transportados por transportadores específicos constituintes na membrana dos enterócitos, do lúmen intestinal para a corrente sanguínea (DROZDOWSKI; THOMSON, 2006). Vinculado a isso, os nossos resultados mostraram redução na atividade da lactase e aumento na atividade da

sacarase em duodeno da prole de ratos expostas ao HBG durante o período perinatal. Salienta-se que os filhotes com 15 dias de idade receberam alimento apenas via leite materno, de modo que a enzima responsável pela lise do carboidrato do leite (a lactase) está com sua atividade diminuída, demonstrando que o HBG pode afetar a digestão dos hidratos de carbono em intestino delgado dos animais.

Dentre os monossacarídeos, a glicose é a principal fonte de energia do corpo (DROZDOWSKI; THOMSON, 2006). Nesse contexto, o presente estudo observou que a exposição materna ao HBG diminuiu a captação de glicose no intestino delgado, bem como reduziu a glicemia em filhotes de ratos. Esses dados demonstraram que a menor captação de glicose pode estar relacionada com a diminuição da lactase no intestino refletindo em baixas concentrações de glicose na corrente sanguínea. Frente a isso, a absorção prejudicada de carboidratos pode interferir no crescimento e desenvolvimento da prole de ratos exposta ao HBG, visto que uma fonte constante de glicose é necessária para a funcionalidade do organismo.

O fígado é o órgão mais importante para sintetizar e armazenar glicogênio no organismo, bem como para manter a concentração de glicose no sangue (SUAREZ; MOMMESEN, 1987). A GSK-3 β apresenta como uma das principais funções no tecido hepático a regulação do metabolismo do glicogênio. Os nossos resultados demonstraram redução na fosforilação da GSK-3 β , o que sugere ativação da atividade enzimática. A GSK-3 β é um modulador negativo da glicogênio sintase (GS), uma enzima passo limitante da glicogênese (VILLAGARCÍA *et al.*, 2018). Portanto, a ativação da GSK-3 β levou a fosforilação e inativação na atividade da GS, o que se correlacionou com a baixa concentração de glicogênio hepático observada nos filhotes de ratos expostos ao HBG.

Achados semelhantes foram encontrados por Salbego e colaboradores (2010), os autores evidenciaram diminuição do conteúdo de glicogênio hepático em piavas expostas cronicamente com 1 mg/L ou 5 mg/L do HBG durante 90 dias. Da mesma forma, De Moura e colaboradores (2017) observaram redução do glicogênio em fígado de peixes expostos a 1,357 mg/L do HBG agudamente (6, 24, 48, 96 h). Além da exposição ao HBG diminuir a glicogênese, sugerimos que o agrotóxico seja capaz de levar a degradação do glicogênio hepático, através da mobilização dos compostos energéticos pela glicogenólise, a fim de manter energia suficiente para a realização das reações metabólicas do organismo.

Os dados do presente estudo também mostraram aumento na concentração de glicose hepática e diminuição do lactato em fígado de ratos tratados com HBG desde a prenhez até o

aleitamento. Corroborando estes resultados, Glusczak e colaboradores (2006) demonstraram elevação de glicose e redução de lactato em tecido hepático de piavas expostas a diferentes concentrações (3, 6, 10, 20 mg/L) de glifosato durante um curto período de tempo (96 h). O nosso grupo de pesquisa mostra que a exposição ao HBG promove distúrbios metabólicos e acredita que as alterações desses analitos seja uma resposta do fígado dos animais a depleção de energia.

O glutamato é um aminoácido não essencial e o mais importante neurotransmissor excitatório do organismo (TOMÉ, 2018). No intestino, glutamato é absorvido a partir do lúmen intestinal e em grande parte metabolizado pelos enterócitos em várias vias, incluindo a produção de energia para estimular a motilidade e as funções intestinais (REEDS *et al.*, 2000; BLACHIER *et al.*, 2009). Nesse contexto, os nossos resultados demonstraram diminuição da captação de glutamato em células do duodeno de ratos expostos ao HBG durante o período perinatal. Como o intestino delgado possui pouca relação com o glutamato produzido pelo próprio organismo, o fornecimento desse aminoácido a partir da alimentação é crucial para o crescimento, desenvolvimento e função do intestino neonatal (JACOBI; ODLE, 2012; JIAO *et al.*, 2015), demonstrando que o HBG tem a capacidade de perturbar o intestino delgado dos filhotes de ratos.

Considerando-se que o glutamato dietético está envolvido no metabolismo de proteínas intestinais e é o precursor de importantes moléculas bioativas produzidas dentro da mucosa intestinal, tais como 2-oxoglutarato, L-alanina, ornitina, arginina, prolina, glutatona e ácido γ -aminobutírico (GABA) (HOU; WU, 2018; TOMÉ, 2018), a redução da captação de glutamato pode estar interferindo no metabolismo energético, metabolismo oxidativo, bem como na geração de neurotransmissores nos ratos expostos ao HBG.

Além da origem dietética, glutamato livre é produzido pela microbiota intestinal, a partir de diferentes estirpes de bactérias, dentre elas as pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (MAZZOLI; PRESSIONE, 2016). Nesse sentido, Tang e colaboradores (2020) mostraram diminuição na abundância relativa de *Lactobacillus* em fezes de ratos Sprague Dawley adultos expostos a 500 mg/kg de glifosato administrado oralmente por gavagem durante 35 dias. Frente a isso, os nossos dados sugerem que a menor captação de glutamato esteja, pelo menos em parte, relacionado com as ações do glifosato sobre as bactérias intestinais.

GGT é uma enzima do metabolismo dos aminoácidos que catalisa a transferência de resíduos γ -glutamil da GSH (ou outro composto contendo γ -glutamil) para aminoácidos ou pequenos peptídeos (MEISTER, 1973; DROZDZ *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2005). Em adição, estudos mencionaram que a GGT pode estar envolvida na absorção de aminoácidos e

peptídeos do lúmen intestinal através de um mecanismo de translocação (CORNELL; MEISTER, 1976; GARVEY; HYMAN; ISSELBACHER, 1976).

Os nossos resultados evidenciaram que a exposição materna ao HBG foi capaz de diminuir a atividade da GGT em duodeno de ratos imaturos. Achados semelhantes foram descritos por Gera, Kiran e Mahmood (2009), os quais observaram inibição da atividade da GGT em intestino de ratos Wistar machos tratados oralmente com 2,8 mg/kg do agrotóxico carbofurano (classe dos carbamatos) durante 30 dias.

A ureia é o produto de excreção do nitrogênio oriundo do catabolismo dos aminoácidos. As proteínas são degradadas e geram nitrogênio na forma de amônia, contudo essa substância é tóxica ao organismo. Desse modo, a amônia gerada em tecidos extra-hepáticos é transportada na forma de aminoácidos específicos até o fígado, nos hepatócitos a amônia é liberada e entra no ciclo da ornitina para produção de ureia que é uma substância menos tóxica, sendo então eliminada do corpo na urina através dos rins (BARMORE; STONE, 2019).

Vinculado a isso, mesmo com a diminuição da captação do glutamato e a inibição da atividade de uma enzima importante na transferência de aminoácidos como a GGT no intestino dos animais, o tratamento perinatal com o HBG não interferiu na formação de ureia em fígado de filhotes de ratos. Dessa forma, é possível observar que apesar das alterações metabólicas em ratos imaturos, não houve expressiva oxidação dos aminoácidos para a geração de energia no organismo da prole de ratos expostos ao HBG durante a prenhez e o aleitamento.

O sistema imunológico dos mamíferos é o primeiro sistema de defesa contra patógenos ou produtos químicos ambientais ou ocupacionais, como os agrotóxicos (COLOSIO *et al.*, 2005). Frente a isso, analisamos as ações do HBG sobre alguns mediadores inflamatórios em fígado da prole de ratos.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica gerada por diversas células, como os macrófagos, monócitos, linfócitos T e B e células NK (TRACEY; CERAMI, 1993). Ele está envolvido na proliferação celular, inflamação e apoptose, bem como na estimulação do sistema imunológico (GOETZ; PLANAS, MACKENZIE, 2004). Os nossos resultados demonstraram que a exposição perinatal ao HBG estimulou a produção de TNF- α em células hepáticas de ratos imaturos. Corroborando nossos achados, Pandey, Dhabade e Kumarasamy (2019) evidenciaram aumento na expressão de TNF- α em fígado de ratos tratados com 100 mg/kg ou 250 mg/kg do HBG via gavagem por 14 dias. Da mesma forma, Ma e Li (2015) observaram aumento na concentração de TNF- α em fígado de peixes expostos a 52,08 mg/L ou 104,15 mg/L de glifosato durante 24, 72, 168 horas. Em adição, El-Shenawy (2009) relatou

elevação de TNF- α no soro de ratos albinos machos tratados com 269,9 mg/kg do HBG via intraperitoneal em dias alternados durante 1 ou 2 semanas.

A IL-6 é produzida por quase todas as células estromais e células do sistema imune. Essa citocina apresenta propriedades pró e anti-inflamatórias, com capacidade de modular aspectos do sistema imune inato e adaptativo (HUNTER; JONES, 2015). O presente estudo evidenciou aumento na concentração de IL-6 em fígado dos filhotes de ratos expostos ao HBG desde a prenhez até a lactação. Nossos achados são semelhantes ao estudo desenvolvido por Tang e colaboradores (2017), os autores mostraram que o tratamento oral com 5, 50 ou 500 mg/kg de glifosato durante 5 semanas aumentou a expressão de IL-6 e TNF- α no tecido hepático de ratos Sprague Dawley nas duas maiores doses estudadas. Esses resultados indicam que o HBG tem efeitos imunotóxicos ao promover alterações no sistema imunológico dos ratos expostos ao agrotóxico, demonstrando que a toxicidade hepática induzida pelo HBG é mediada por inflamação.

Esses dados num todo sugerem que as ações tóxicas do HBG podem modular a absorção e a digestão de carboidratos e aminoácidos, ao diminuir a captação de glicose e glutamato em duodeno, bem como interferir em enzimas responsáveis pela síntese ou catabolismo de nutrientes, prejudicando as funções do intestino delgado e as reservas energéticas no fígado de ratos expostos ao agrotóxico. Em adição, o tratamento subcrônico com o HBG aumenta a produção de citocinas no fígado da prole de ratos, indicando inflamação no tecido hepático induzida pela formulação contendo glifosato.

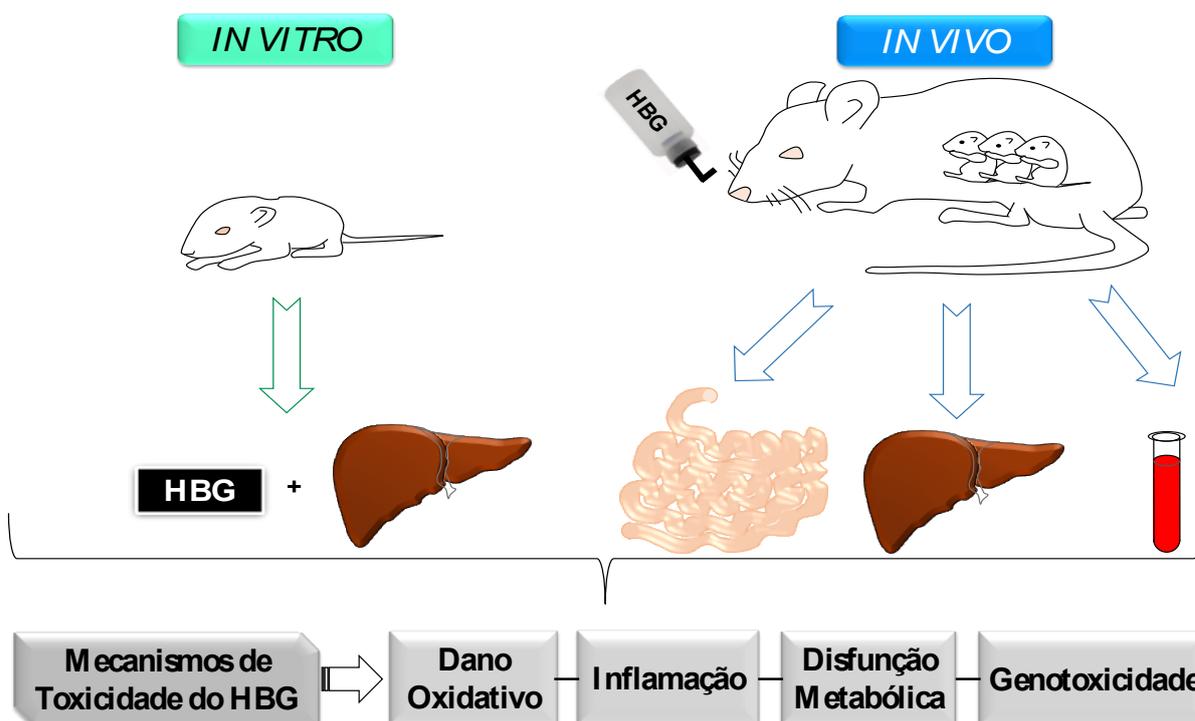
5.3.5 Conclusões parciais

- A exposição perinatal ao HBG altera o metabolismo dos carboidratos dos filhotes de ratos;
- O tratamento *in vivo* com o HBG promove modificações no metabolismo de aminoácidos dos animais com 15 dias de idade;
- Os mecanismos pelos quais a exposição materna ao HBG induz hepatotoxicidade são associados à inflamação no fígado dos ratos imaturos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que dentre os mecanismos de toxicidade subjacentes da exposição *in vitro* e/ou *in vivo* ao HBG, destaca-se desbalanço redox em diferentes tipos celulares. Corroborando estes achados, dados prévios do grupo de pesquisa demonstraram a indução de dano oxidativo pela exposição ao herbicida contendo glifosato em hipocampo e células testiculares de ratos (DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI *et al.*, 2013; CATTANI *et al.*, 2014, 2017). O aumento no influxo de Ca^{2+} pode levar a ruptura da homeostase do íon, assim como a deposição tecidual de ferro pode aumentar a produção de EROs e RL. Esses eventos podem estar induzindo processos inflamatórios e morte celular. Em conjunto, os dados sugerem que os mecanismos de toxicidade do glifosato envolvem dano oxidativo, inflamação, disfunção metabólica e genotoxicidade (Figura 29).

Figura 29. Representação esquemática dos estudos desenvolvidos nessa tese e os mecanismos de toxicidade da formulação à base de glifosato.



Os estudos desenvolvidos nesse trabalho utilizaram de abordagem *in vitro* (Estudo I) e *in vivo* (Estudo II e III) com modelo animal de ratos Wistar para demonstrar os efeitos tóxicos do HBG nos diferentes tecidos.

Fonte: do Autor

Os resultados apresentados demonstram a relevância de estudos focados no melhor entendimento dos impactos dos HBG sobre os organismos não alvo, em especial em mamíferos. O conhecimentos das ações e dos mecanismos envolvidos na toxicidade do glifosato podem

auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e/ou profiláticas em prol dos indivíduos mais vulneráveis aos efeitos desses compostos, em especial os trabalhadores rurais.

7 CONCLUSÕES

- Os efeitos da exposição *in vitro* ao HBG demonstram que os mecanismos participantes da toxicidade do agrotóxico envolvem o aumento no influxo de Ca^{2+} e desbalanço redox, culminando em morte celular;
- Os mecanismos envolvidos no aumento da captação intracelular de Ca^{2+} induzida pelo HBG são dependentes do influxo do íon via CCDV-L, bem como da ativação das vias de sinalização da PLC e PI3K;
- Os antioxidantes GSH, vitamina E e N-acetilcisteína previnem o influxo de Ca^{2+} mediado pelo HBG em tecido hepático;
- A exposição *in vitro* ao HBG promove dano oxidativo aos lipídios, como demonstrado pelo aumento na concentração de TBARS em fígado de animais com 15 dias de idade;
- O tratamento *in vitro* com o HBG ocasiona desbalanço redox em células hepáticas, associado ao aumento na atividade da CAT e diminuição na atividade da SOD, GPx, GR e G6PD;
- A exposição *in vitro* ao HBG estimula a atividade da GGT enquanto o glifosato isolado não modifica a atividade da enzima em fígado de ratos imaturos, demonstrando que a formulação comercial apresenta maior toxicidade do que o princípio ativo;
- O tratamento *in vitro* com o HBG é capaz de inibir a atividade da AST sem alterar a atividade da ALT em tecido hepático;
- A exposição *in vivo* ao HBG demonstra que o agrotóxico promove estresse oxidativo em células sanguíneas de ratos imaturos, devido ao aumento na concentração de proteína carbonilada, depleção no conteúdo de GSH, suprarregulação da atividade da SOD, GPx, GST e inibição da G6PD em sangue total dos filhotes expostos ao HBG *in útero* e durante o aleitamento;
- O tratamento perinatal com o HBG promove genotoxicidade devido aos danos ao DNA em sangue periférico de animais com 15 dias de idade;
- A exposição *in vivo* ao HBG leva a toxicidade hematológica em ratos imaturos ao aumentar a quantidade de hemácias, a concentração de HB, HT, VCM, HCM e reduzir o número de leucócitos;
- O tratamento subcrônico com o HBG induz hipocelularidade medular, bem como a presença de ferro na medula óssea da prole de ratos;
- A exposição perinatal ao HBG altera a absorção intestinal, como demonstrado pela diminuição na captação de glicose e de glutamato em duodeno dos filhotes;

- O tratamento *in vivo* com o HBG afeta a digestão de carboidratos e proteínas, devido à elevação da atividade da sacarase, associado à diminuição na atividade da lactase e da GGT em duodeno da prole de ratos;
- A exposição perinatal ao HBG interfere no metabolismo do glicogênio ao reduzir a fosforilação da GSK-3 β e o conteúdo de glicogênio em fígado de animais com 15 dias de idade;
- O tratamento subcrônico com o HBG induz alterações metabólicas na prole ao diminuir a glicemia e a concentração de lactato hepático, além de aumentar o conteúdo de glicose sem interferir na concentração de ureia em células hepáticas de filhotes de ratos;
- A exposição *in vivo* ao HBG estimula a produção de TNF- α e IL-6 em tecido hepático de ratos imaturos, sugerindo a indução de processos inflamatórios no fígado.

REFERÊNCIAS

- ABD ELLAH, M.R.; OKADA, K.; YASUDA, J. Oxidative stress and bovine liver diseases: role of glutathione peroxidase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. **Jpn J Vet Res**, v. 54, n. 4, p. 163-173, 2007.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**, v. 204, p. 234–254, 1984.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 6nd ed, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2015.
- ALVAREZ-MOYA, C.; SILVA, M.R.; RAMÍREZ, C.V.; GALLARDO, D.G.; SÁNCHEZ, R.L.; AGUIRRE A.C.; VELASCO A.F. Comparison of the *in vivo* and *in vitro* genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. **Genet Mol Biol**, v. 37, n. 1, p. 105-110, 2014.
- AMAYA, M.J; NATHANSON, M.H. Calcium signaling in the liver. **Compr Physiol**, v. 3, n. 1, p. 515-539, 2013.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; MARTÍNEZ, M.A.; CASTELLANO, V.J.; MARTÍNEZ, 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.
- ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **J Appl Toxicol**, v. 34, n. 5, p. 458-479, 2014.
- ANVISA (2005). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO Nº 274, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0274_22_09_2005.html. Acesso em: 20 jul 2021.
- ANVISA (2012). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Seminário volta a discutir mercado de agrotóxicos em 2012**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 08 set 2019.
- ANVISA (2019a). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica nº 23/2018. Nota técnica preliminar sobre as conclusões da reavaliação do Glifosato**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/notas-tecnicas/nota-tecnica-23-de-2018-glifosato.pdf/view>. Acesso em: 21 set 2019.
- ANVISA (2019b). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): Relatórios das Amostras Analisadas no Período de 2017-2018. Primeiro ciclo do Plano Plurianual 2017-2020**. Gerência Geral de Toxicologia 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>. Acesso em: 18 jul 2021.

ANVISA (2020a). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica nº 12/2020. Conclusões da Reavaliação do Glifosato**. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5344168/%281%29Nota+técnica+final+de+reavaliação+do+Glifosato.pdf/00558a91-3cc5-49bb-8c49-761c387d0681>. Acesso em: 20 jul 2021.

ANVISA (2020b). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO- RDC Nº 441, DE 2 DE DEZEMBRO DE 2020**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-441-de-2-de-dezembro-de-2020-293190758>. Acesso em: 20 jul 2021.

ANVISA (2021). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos. Monografias Autorizadas. **G01-Glifosato**. Última modificação: 17/08/2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/g-h-i/4378json-file-1/view>. Acesso em: 12 out 2021.

AOYAMA, K.; NAKAKI, T. Inhibition of GTRAP3-18 may increase neuroprotective glutathione (GSH) synthesis. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 9, p. 12017-12035, 2012.

APPLEGATE, E. **Anatomia e fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ARAB, S.A.; NIKRAVESH, M.R.; JALALI, M.; FAZEL, A. Evaluation of oxidative stress indices after exposure to malathion and protective effects of ascorbic acid in ovarian tissue of adult female rats. **Electron Physician**, v. 10, n. 5, p. 6789-6795, 2018.

ASHORN, M. Gastrointestinal diseases in the paediatric age groups in Europe: epidemicology and impact on healthcare. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 18, Suppl. 3, p. 80-83, 2003.

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, 2009a.

ASTIZ, M., DE ALANIZ, M.J.T., MARRA, C.A. The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. **Pestic Biochem Physiol**, v. 94, n. 2-3, p.93-99, 2009b.

BAGATINI, P.B.; PALAZZO, R. P.; RODRIGUES, M. T.; COSTA, C. H.; MALUF, S.W. Induction and removal of DNA damage in blood leukocytes of patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. **Mutat Res.**, v. 657, n. 2, p.111–115, 2008.

BAIN, B. J. Structure and function of red and white blood cells. **Medice**, 2017. Disponível em: <https://africa-health.com/wp-content/uploads/2018/01/25-Medicine-Publishing-1.pdf>. Acesso em: 29 set 2019.

BANERJEE, B.D.; SETH, V.; BHATTACHARYA, A.; PASHA, S.T.; CHAKRABORTY, A.K. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. **Toxicol Lett**, v. 107, n. 1-3, p. 33-47, 1999.

- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R. BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARMORE, W; STONE, W.L. **Physiology, Urea Cycle**. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.
- BATRA, S.; SJÖGREN, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Sci**, v. 32, n. 4, p. 315-319, 1983.
- BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G.E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chem Res Toxicol**, v. 22, n. 1, p. 97-105, 2009.
- BENBROOK, C.M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environ Sci Eur**, v. 28, n. 3, p. 1-15, 2016.
- BEUREL, E.; GRIECO, S.F.; JOPE, R.S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. **Pharmacol Ther**, v. 148, p. 114-131, 2015.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 61, p. 882-90, 1963.
- BEWTRA, M.; SU, C.; LEWIS, J.D. Trends in hospitalization rates for inflammatory bowel disease in the United States. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 5, n. 5, p. 597-601, 2007.
- BHARDWAJ, J.K.; MITTAL, M.; SARAF, P. Effective attenuation of glyphosate induced oxidative stress and granulosa cell apoptosis by vitamin C and E in caprines. **Mol Reprod Dev**, v. 86, n. 1, p. 42-52, 2019.
- BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol**, v. 90, p. 105– 10, 1984.
- BLACHIER, F.; BOUTRY, C.; BOS, C.; TOMÉ D. Metabolism and functions of L-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. **Am J Clin Nutr**, v. 90, n. 3, p. 814S-821S, 2009.
- BOMBARDI, L. M. Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado. **Boletim DATALUTA**, 2011. Disponível em: http://www2.fct.unesp.br/nera/artigodomes/9artigodomes_2011.pdf. Acesso em: 21 jun. 2019.
- BOMBARDI, L. M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia**. São Paulo: FFLCH-USP, 2017.
- BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.I.; KOCH, O.R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 227, n. 2, p. 534–541, 1983.

BRAKE, D.G.; EVENSON, D.P. A generational study of glyphosate- tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development. **Food Chem Toxicol.**, v. 42, n. 1, p. 29-36, 2004.

BRASIL (2006). Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica de Saúde do Trabalhador. **Diretrizes para atenção integral à saúde do trabalhador de complexidade diferenciada: protocolo de atenção à saúde dos trabalhadores expostos a agrotóxicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_atencao_saude_trab_exp_agrotoxicos.pdf. Acesso em: 21 set 2019.

BRASIL (2016). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano, Brasil, 2014.** Boletim Epidemiológico, v. 47, n. 12, 2016. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/23/2015-052---Agrot--xicos-publica----o.pdf>. Acesso em: 22 set de 2019.

BRASIL (2018). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf. Acesso em: 22 set de 2019.

BRAY, R.C.; COCKLE, S.A.; FIELDEN, E.M.; ROBERTS, P.B.; ROTILIO, G.; CALABRESE, L. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. **Biochem J**, v. 139, n. 1, p. 43-48, 1974.

BRAZ-MOTA, S.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; DUARTE, R.M.; VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. **Chemosphere**, v. 135, p. 53-60, 2015.

BREWSTER, D.W., WARREN, J., HOPKINS II, W.E. Metabolism of glyphosate in Sprague–Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. **Fundam Appl Toxicol**, v. 17, n.1, p. 43–51, 1991.

BURRIN, D.G.; STOLL, B.; CHANG, X.; VAN GOUDOEVER, J.B.; FUJII, H.; HUTSON, S.M.; REEDS, P.J. Parenteral nutrition results in impaired lactose digestion and hexose absorption when enteral feeding is initiated in infant pigs. **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 3, p. 461-470, 2003.

BURRIN, D.G.; STOLL, B. Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. **Am J Clin Nutr**, v. 90, n. 3, p. 850S-856S, 2009.

BYSTROM, L.M.; RIVELLA, S. Cancer cells with irons in the fire. **Free Radic Biol Med**, v. 79, p. 337-342, 2015.

CADET, J.; DOUKI, T; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J.L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. **Mutat Res**, v. 531, n. 1-2, p. 5-23, 2003.

CAI, W.; YANG, X.; LI, X.; LI, H.; WANG, S.; WU, Z.; YU, M.; MA, S.; TANG, S. Low-dose Roundup induces developmental toxicity in bovine preimplantation embryos *in vitro*. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 27, n. 14, p. 16451-16459, 2020.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-490, 1985.

CAMACHO, A.; MEJÍA, D. The health consequences of aerial spraying illicit crops: the case of Colombia. **J Health Econ**, v. 54, p. 147-160, 2017.

CAMASCHELLA, C.; NAI, A. Ineffective erythropoiesis and regulation of iron status in iron loading anaemias. **Br J Haematol**, v. 172, n. 4, p. 512-523, 2016.

CARNEIRO, F.F.; AUGUSTO, L.G.S.; RIGOTTO, R.M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A.C. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem Toxicol**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARVALHO, W. F. **Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia**. 4ed. Belo Horizonte: Coopmed, 1993.

CASSAULT-MEYER, E.; GRESS, S.; SÉRALINI, G.É.; GALERAUD-DENIS, I. An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 38, n. 1, p. 131-140, 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: Implications of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, p. 67-80, 2017.

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, p. 34-45, 2014.

ÇAVUŞOĞLU, K.; YAPAR, K.; ORUÇ, E.; YALÇIN, E. Protective effect of Ginkgo biloba L. leaf extract against glyphosate toxicity in Swiss albino mice. **J Med Food**, v. 14, n. 10, p. 1263-72, 2011.

CERVELLO, M.; AUGELLO, G.; CUSIMANO, A.; EMMA, M.R.; BALASUS, D.; AZZOLINA, A.; MCCUBREY, J.A.; MONTALTO, G. Pivotal roles of glycogen synthase-3 in hepatocellular carcinoma. **Adv Biol Regul**, v. 65, p. 59-76, 2017.

- CHAN, P.; MAHLER, J. NTP technical report on the toxicity studies of glyphosate (CAS N^o. 1071-83-6) administered in dosed feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. **Toxic Rep Ser**, n. 16, 1992.
- CHAUFAN, G.; COALOVA, I.; MOLINA, M.C.R. Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. **Int J Toxicol**, v. 33, n. 1, p. 29-38, 2014.
- CHEN, Y.; DONG, H.; THOMPSON, D.C.; SHERTZER, H.G.; NEBERT, D.W.; VASILIOU, V. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. **Food Chem Toxicol.**, v. 60, p. 38-44, 2013.
- CHŁOPECKA, M.; MENDEL, M.; DZIEKAN, N.; KARLIK, W. Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses – *in vitro* study. **Pestic Biochemi Physiol**, v. 113, p. 25-30, 2014.
- CLAIR, E.; MESNAGE, R.; TRAVERT, C.; SÉRALINI, 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.
- CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 259-268, 1995.
- COLLADO, M.C.; CALABUIG, M.; SANZ, Y. Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. **Curr Issues Intest Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 9-14, 2007.
- COLOSIO, C.; BIRINDELLI, S.; CORSINI, E.; GALLI, C.L.; MARONI, M. Low level exposure to chemicals and immune system. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 207, 2 Suppl., p. 320-328, 2005.
- CORNELL, J.S.; MEISTER, A. Glutathione and gamma-glutamyl cycle enzymes in crypt and villus tip cells of rat jejunal mucosa. **Proc Natl Sci USA**, v. 73, n. 2, p. 420-422, 1976.
- CORTI, A.; DUARTE, T.L.; GIOMMARELLI, C.; DE TATA, V.; PAOLICCHI, A.; JONES, G.D.; POMPELLA, A. Membrane gamma-glutamyl transferase activity promotes iron-dependent oxidative DNA damage in melanoma cells. **Mutat Res**, v. 669, n. 1-2, p. 112-121, 2009.
- 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, p. 150-161, 2016.
- DAHLQVIST, A. Assay of intestinal disaccharidases. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 44, n. 2, p. 169-172, 1984.
- DAMMEYER, P.; ARNÉR, E.S. Human protein Atlas of redox system – What can be learnt? **Biochim Biophys Acta**, v. 10, n. 1, p. 111- 138, 2011.
- DANIELSON, U. H.; MANNERVIK, B. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. **Biochem J**, v. 231, p.263-267, 1985.

DAVILA, H.M. Molecular and functional diversity of voltage-gated calcium channels. **Ann N Y Acad Sci**, v. 868, p. 102-117, 1999.

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, p. 335-346, 2013.

DE MARIA SERRA, F.; PARIZI, J.L.S.; ODORIZZI, G.A.S.M.; SATO, G.M.R.H.; PATRÃO, I.B.; CHAGAS, P.H.N.; DE AZEVEDO MELLO, F.; NAI, G.A. Subchronic exposure to a glyphosate-based herbicide causes dysplasia in the digestive tract of Wistar rats. **Environ Sci Pollut Res Int**, 2021.

DE MOURA, F.R.; DA SILVA LIMA, R.R.; DA CUNHA, A.P.S.; DA COSTA MARISCO, P.; AGUIAR, D.H.; SUGUI, M.M.; SINHORIN, A.P.; SINHORIN, V.D.G. Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazônia: hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 56, p. 241-248, 2017.

DEDEKE, G.A.; OWAGBORIAYE, F.O.; ADEMOLU, K.O.; OLUJIMI, O.O.; ALADESIDA, A.A. Comparative assessment on mechanism underlying renal toxicity of commercial formulation of Roundup herbicide and glyphosate alone in male albino rat. **Int J Toxicol**, v. 37, n. 4, p.285-295, 2018.

DEFARGE, N.; TAKÁCS, E.; LOZANO, V.L.; MESNAGE, R.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G.E.; SZÉKÁCS, A. Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. **Int J Environ Res Public Health**, v.13, n. 3, 2016.

DEV, S.; BABITT, J.L. Overview of iron metabolism in health and disease. **Hemodial Int**, v. 21, p. S6–S20, 2017.

D'GREGORIO, R. E. P.; MILLER, R. K. Teratogenicity of tellurium dioxide: prenatal assessment. **Teratology**, v. 37, p. 307-316, 1988.

DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; DE PASQUALE, I.; NDAGIJIMANA, M.; VERNOCCHI, P.; RICCIUTI, P.; GAGLIARDI, F.; LAGHI, L.; CRECCHIO, C.; GUERZONI, M.E.; GOBBETTI, M.; FRANCAVILLA, R. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. **BMC Microbiol**, v. 11, p. 219, 2011.

DOS SANTOS TEIXEIRA, J.M.; DA SILVA LIMA, V.; DE MOURA, F.R.; DA COSTA MARISCO, P.; SINHORIN, A.P.; SINHORIN, V.D.G. Acute toxicity and effects of Roundup Original® on pintado da Amazônia. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 25, n. 25, p. 25383-25389, 2018.

DROSSMAN, D.A. The functional gastrointestinal disorders and the Rome II process. **Gut**, v. 45, Suppl. 2, p. II1–II5, 1999.

DROZDOWSKI, L.A.; THOMSON, A.B. Intestinal sugar transport. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 11, p.1657-1670, 2006.

DROZDZ, R.; PARMENTIER, C.; HACHAD, H.; LEROY, P.; SIEST, G.; WELLMAN, M. Gamma-glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. **Free Radic Biol Med**, v. 25, n. 7, p. 786-792, 1998.

DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once in a century herbicide. **Pest Manag Sci**, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

DUNLAP, K.; LUEBKE, J.L.; TURNER, T.J. Exocytic Ca²⁺ channels in mammalian central neuron. **Trends Neurosci**, v. 18, n. 2, p. 89-98, 1995.

EFSA- European Food Safety Authority (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. **EFSA J**, v. 13, n. 11, p. 1-107, 2015.

EL-DEMERDASH, F. M.; YOUSEF, M. I.; ELAGAMY, E. I. Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (*in vitro*). **J Environ Sci Health B**, v. 36, n. 1, p. 29-42, 2001.

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.

ERMAK, G.; DAVIES, K. J. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. **Mol Immunol**, v. 38, n. 10, p. 713-721, 2002.

EVSTATIEV, R.; GASCHÉ, C. Iron sensing and signalling. **Gut**, v. 61, n. 6, p. 933-952, 2012.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n.1, p. 61-68, 1997.

FERRER, J. C.; FAVRE, C.; GOMIS, R.R; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; GARCÍA-ROCHA, M; DE LA IGLESIA, N.; CID, E.; GUINOVART, J.J. Control of glycogen deposition. **FEBS Lett**, v. 546, n. 1, p. 127-132, 2003.

FIOCRUZ (2014). Fundação Oswaldo Cruz. **Brasil consome 14 agrotóxicos proibidos no mundo**. Disponível em: <http://redesfito.far.fiocruz.br/index.php/noticias/58-brasil-consome-14-agrotoxicos-proibidos-no-mundo>. Acesso em: 10 set 2019.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114–121, 1984.

FORD, E.S.; COGSWELL, M.E. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. **Diabetes Care**, v. 22, n. 12, p. 1978-1983, 1999.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Mol Aspects Med.**, v. 30, p. 1-12, 2009.

- GANZ, T. Systemic iron homeostasis. **Physiol Rev**, v. 93, n. 4, p. 1721-1741, 2013.
- GARVEY, T.Q.; HYMAN, P.E.; ISSELBACHER, K.J. Gamma-glutamyl transpeptidase of rat intestine: localization and possible role in amino acid transport. **Gastroenterology**, v. 71, n. 5, p. 778-785, 1976.
- GAUCHER, C.; BOUDIER, A.; BONETTI, J.; CLAROT, I.; LEROY, P.; PARENT, M. Glutathione: antioxidant properties dedicated to nanotechnologies. **Antioxidants (Basel)**, v. 7, n. 5, p. 1-21, 2018.
- GEHIN, A.; GUYON, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 22, n. 1, p. 27-34, 2006.
- GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Emptying of intracellular calcium pool and oxidative stress imbalance are associated with the glyphosate-induced proliferation in human skin keratinocytes HaCaT cells. **ISRN Dermatol**, v. 2013, p. 12, 2013.
- GERA, N.; KIRAN, R.; MAHMOOD, A. Subacute effects of carbofuran on enzyme functions in rat small intestine. **Toxicol Mech Methods**, v. 19, n. 2, p. 141-147, 2009.
- GLUSCZAK, L.; DOS SANTOS MIRON, D.; CRESTANI, M.; BRAGA DA FONSECA, M.; DE ARAÚJO PEDRON, F.; DUARTE, M.F.; VIEIRA, V.L.P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 65, n. 2, p. 237-241, 2006.
- GLUSCZAK, L.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; MORAES, B.S.; RAABE, A.; DUARTE, M.F.; FONSECA, M.B.; MENEZES, C.C.; VALLADÃO, D.M.S. Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 61, n. 4, p. 624-630, 2011.
- GODBALLE, T.; NILSSON, L.L.; PETERSEN, P.D.; JENSSEN, H. Antimicrobial β -peptides and α -peptoids. **Chem Biol Drug Design**, v. 77, n. 2, p. 107-116, 2011.
- GOETZ, F.W.; PLANAS, J.V.; MACKENZIE, S. Tumor necrosis factors. **Dev Comp Immunol**, v. 28, n. 5, p. 487-497, 2004.
- GRAHAM, T.E.; SGRO, V.; FRIARS, D.; GIBALA, M.J. Glutamate ingestion: the plasma and muscle free amino acid pools of resting humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 278, n. 1, p. E83-E89, 2000.
- GUILHERME, S.; GAIVÃO, I.; SANTOS, M.A.; PACHECO, M. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup-a glyphosate-based herbicide. **Mutagenesis**, v. 25, n. 5, p. 523-530, 2010.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.
- GUYTON, K.Z.; LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; EL GHISSASSI, F.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; SCOCCIANI, C.; MATTOCK, H.; STRAIF, K. Carcinogenicity

of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **Lancet Oncol**, v. 16, n. 5, p.490-491, 2015.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S- transferase AA from rat liver. **Arch Biochem Biophys.**, v. 175, n. 2, p. 710-6, 1976.

HALESTRAP, A.P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. **Biochem Soc Trans**, v. 34, pt 2, p. 232-237, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 5th ed. New York: Oxford University Press, 2015.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**. v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HAMDAOUI, L; NAIFAR, M; RAHMOUNI, F; AYADI, F; REBAI, T. Sub-chronic exposure to Kalach 360 SL–induced damage in rats’ liver and hematological system. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 26, n. 36, p. 36634-36646, 2019.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 51–88, 2005.

HAYES, J.D; MANTLE, T. J. Use of immunoblot techniques to discriminate between the glutathione S-transferase Yf, Yk, Ya, Yn/Yb and Yc subunits and to study their distribution in extrahepatic tissues. **Biochem J**, v. 233, p.779-788, 1986.

HE, L.; HE, T.; FARRAR, S.; JI, L.; LIU, T.; MA, X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. **Cell Physiol Biochem**, v. 44, n .2, p. 532-553, 2017.

HELLBRUGGE, A. **Exposição materna ao herbicida a base de glifosato e sua relação com a microbiota, histomorfologia intestinal e estado redox no duodeno e cólon da prole**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

HEMPEL, N.; TREBAK, M. Crosstalk between calcium and reactive oxygen species signaling in câncer. **Cell Calcium**, v. 63, p. 70-96, 2017.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento: por métodos laboratoriais**. 18ed. São Paulo: Manole, p. 825-826, 1995.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K.B. *In vitro* oxidative inactivation of glutathione S-transferase from a freeze tolerant reptile. **Mol Cell Biochem**, v. 124, n. 2, p. 149-158, 1993.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annu Rev Plant PhysiolPlant Mol Biol**, v. 50, p. 473-503, 1999.

HO, H.Y.; CHENG, M.L.; CHIU, D.T. Glucose-6-phosphate dehydrogenase—from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. **Redox Rep**, v. 12, n. 3, p. 109-118, 2007.

HONG, Y.; YANG, X.; HUANG, Y.; YAN, G.; CHENG, Y. Assessment of the oxidative and genotoxic effects of the glyphosate-based herbicide Roundup on the freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponensis*. **Chemosphere**, v. 210, p. 896-906, 2018.

HOU, Y.; WU, G. L-glutamate nutrition and metabolism in swine. **Amino Acids**, v. 50, n. 11, p. 1497-1510, 2018.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim Nova**, v. 31, n. 5, p.1170-1179, 2008.

HUNTER, C.A.; JONES, S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nat Immunol**, v. 16, n. 5, p. 448-457, 2015.

IARC (2015). International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans-Glyphosate monograph**. Volume 112. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono112-10.pdf>. Acesso em: 15 fev 2019.

IBAMA (2020). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Dados Atualizados: 15/08/2020. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>. Acesso em: 18 jul 2021.

IKEDA, Y.; FUJII, J.; TANIGUCHI, N.; MEISTER, A. Expression of an active glycosylated human gamma-glutamyl transpeptidase mutant that lacks a membrane anchor domain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, n. 1, p. 126-130, 1995.

IWANAGA, T.; GOTO, M.; WATANABE, M. Cellular distribution of glutamate transporters in the gastrointestinal tract of mice: an immunohistochemical and in situ hybridization approach. **Biomed Res**, v. 26, n. 6, p. 271-278, 2005.

JACOBI, S.K.; ODLE, J. Nutritional factors influencing intestinal health of the neonate. **Adv Nutr**, v. 3, n. 5, p. 687-696, 2012.

JASPER, R.; LOCATELLI, G. O.; PILATI, C.; LOCATELLI, C. Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. **Interdiscip Toxicol**, v. 5, n.3, p.133-140, 2012.

JAYASUMANA, C.; PARANAGAMA, P.; AGAMPUDI, S.; WIJewardane, C.; GUNATILAKE, S.; SIRIBADDANA, S. Drinking well water and occupational exposure to Herbicides is associated with chronic kidney disease, in Padavi-Sripura, Sri Lanka. **Environ Health**, v. 14, n. 6, p. 1-10, 2015.

JIANG, R.; MA, J.; ASCHERIO, A.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C.; HU, F.B. Dietary iron intake and blood donations in relation to risk of type 2 diabetes in men: a prospective cohort study. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 1, p. 70-75, 2004.

JIAO, N.; WU, Z.; JI, Y.; WANG, B.; DAI, Z.; WU, G. L-glutamate enhances barrier and antioxidative functions in intestinal porcine epithelial cells. **J Nutr**, v. 145, n. 10, p. 2258-2264, 2015.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2-3, p. 65-87, 2011.

JOSEPH, J.A.; STRAIN, J.G.; JIMENEZ, N.D.; FISHER, D. Oxidant injury in PC12 cells-a possible model of calcium "dysregulation" in aging: I. Selectivity of protection against oxidative stress. **J Neurochem**, v. 69, n. 3, p. 1252-1258, 1997.

KAFERLE, J.; STRZODA, C.E. Evaluation of macrocytosis. **Am Fam Physician**, v. 79, n. 3, p. 203-208, 2009.

KAŠUBA, V.; MILIĆ, M.; ROZGAJ, R.; KOPJAR, N.; MLADINIĆ, M.; ŽUNEC, S.; VRDOLJAK, A.L.; PAVIČIĆ, I.; ČERMAK, A.M.M.; PIZENT, A.; LOVAKOVIĆ, B.T.; ŽELJEŽIĆ, D. Effects of low doses of glyphosate on DNA damage, cell proliferation and oxidative stress in the HepG2 cell line. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 24, n. 23, p. 19267-19281, 2017.

KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M.A.; PRCHAL, J.T.; LEVI, M.M.; PRESS, O.W.; BURNS, L.J.; CALIGIURI, M.A. **Williams Hematology**. 9 ed. New York: McGraw-Hill Education, 2016.

KONGTIP, P.; NANKONGNAB, N.; PHUPANCHAROENSUK, R.; PALARACH, C.; SUJIRARAT, D.; SANGPRASERT, S.; SERMSUK, M.; SAWATTRAKOOL, N.; WOSKIE, S.R. Glyphosate and paraquat in maternal and fetal serums in thai women. **J Agromedicine**, v. 22, n. 3, p. 282-289, 2017.

KRASI KOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. alpha-Glucosidases. **Biochem (Mosc)**, v. 66, n. 3, p. 267-281, 2001.

KRAUSS, G. **Biochemistry of Signal Transduction and Regulation**. 5nded. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014.

KREUTZ, L.C.; GIL BARCELLOS, L.J.; DE FARIAS VALLE, S.; DE OLIVEIRA SILVA, T.; ANZILIERO, D.; DAVI DOS SANTOS, E.; PIVATO, M.; ZANATTA, R. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. **Fish Shellfish Immunol**, v. 30, n. 1, p. 51-57, 2011.

KRISMAN, C. R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Anal Biochem**, v. 4, p. 17-23, 1962.

KRÜGER, M.; SCHLEDORN, P.; SCHRÖDL, W.; HOPPE, H.W.; LUTZ, W.; SHEHATA, A.A. Detection of glyphosate residues in animals and humans. **J Environ Anal Toxicol**, v. 4, issue 2, p. 1-5, 2014a.

KRÜGER, M.; SCHRÖDL, W.; NEUHAUS, J.; SHEHATA, A.A. Field investigations of glyphosate in urine of Danish dairy cows. **J Environ Anal Toxicol**, v. 3, n. 5, p. 186, 2013.

KRÜGER, M.; SCHRÖDL, W.; PEDERSEN, I.; SCHLEDORN, P.; SHEHATA, A.A. Detection of glyphosate in malformed piglets. **J Environ Anal Toxicol**, v. 4, issue 5, p. 1-2, 2014b.

KUPSKE, C. **Exposição ao glifosato e incidência de câncer em agricultores familiares do município de Cerro Largo-RS**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2018.

KWIATKOWSKA, M., MICHAŁOWICZ, J., JAROSIEWICZ, P., PINGOT, D., SICIŃSKA, P., HURAS, B., ZAKRZEWSKI, J.; JAROSIEWICZ, M.; BUKOWSKA, B. Evaluation of apoptotic potential of glyphosate metabolites and impurities in human peripheral blood mononuclear cells (*in vitro* study). **Food Chem Toxicol**, v. 135, p. 1-12, 2019.

KWIATKOWSKA, M.; RESZKA, E.; WOŹNIAK, K.; JABŁOŃSKA, E.; MICHAŁOWICZ, J.; BUKOWSKA, B. DNA damage and methylation induced by glyphosate in peripheral blood mononuclear cells (*in vitro* study). **Food Chem Toxicol**, v. 105, p. 93-98, 2017.

LARDINOIS, O.M. Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide. **Free Radical Res**, v. 22, n. 3, p. 251-274, 1995.

LARSEN, K.; NAJLE, R.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 34, n. 3, p. 811-818, 2012.

LETURQUE, A.; BROT-LAROCHE, E.; LE GALL, M. Carbohydrate intake. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 108, p. 113-127, 2012.

LETURQUE, A.; BROT-LAROCHE, E.; LE GALL, M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 5, p. 985-992, 2009.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v.186, p.464-478, 1990.

LI, J.; ZHU, Y.; SINGAL, D.P. HFE gene mutations in patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 27, n. 9, p. 2074-2077, 2000.

LIMA, E. S.; SAES, D.; ABDALLA, P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA, A. O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação**. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 68-69, 1992.

LINKERMANN, A.; SKOUTA, R.; HIMMERKUS, N.; MULAY, S.R.; DEWITZ, C.; DE ZEN, F.; PROKAI, A.; ZUCHTRIEGEL, G.; KROMBACH, F.; WELZ, P.S.; WEINLICH, R.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P.; PASPARAKIS, M.; BLEICH, M.; WEINBERG, J.M.; REICHEL, C.A.; BRÄSEN, J.H.; KUNZENDORF, U.; ANDERS, H.J.;

STOCKWELL, B.R.; GREEN, D.R.; KRAUTWALD, S. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 111, n. 47, p. 16836-16841, 2014.

LITTMAN, D.R.; PAMER, E.G. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. **Cell Host Microbe**, v. 10, n. 4, p. 311-323, 2011.

LLORET, A.; ESTEVE, D.; MONLLOR, P.; CERVERA-FERRI, A.; LLORET, A. The effectiveness of vitamin E treatment in Alzheimer's disease. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 4, p. 1-17, 2019.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA-Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

LOUREIRO, A.P.M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Quim Nova**, v. 25, n. 5, p. 777-793, 2002.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-267, 1951.

LUO, L.; WANG, F.; ZHANG, Y.; ZENG, M.; ZHONG, C.; XIAO, F. *In vitro* cytotoxicity assessment of roundup (glyphosate) in L-02 hepatocytes. **J Environ Sci Health B**, v. 52, n. 6, p. 410-417, 2017.

LUSHCHAK, O.V.; KUBRAK, O.I.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v. 76, n. 7, p. 932-937, 2009.

LYNCH, D.R.; DAWSON, T.M. Secondary mechanisms in neuronal trauma. **Curr Opin Neurol**, v. 7, n. 6, p. 510-516, 1994.

LYONS, J.; RAUH-PFEIFFER, A.; YU, Y.M.; LU, X.M.; ZURAKOWSKI, D.; TOMPKINS, R.G.; AJAMI, A.M.; YOUNG, V.R.; CASTILLO, L. Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, n. 10, p. 5071-5076, 2000.

MA, J.; LI, X. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. **Chemosphere**, v. 128, p. 293-298, 2015.

MAHACHOKLERTWATTANA, P.; SIRIKULCHAYANONTA, V.; CHUANSUMRIT, A.; KARNOMBAT, P.; CHOUBTUM, L.; SRIPHRAPRANG, A.; DOMRONGKITCHAIORN, S.; SIRISIRO, R.; RAJATANAVIN, S. Bone histomorphometry in children and adolescents with beta-thalassemia disease: iron-associated focal osteomalacia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 8, p. 3966-3972, 2003.

MAÑAS, F.; GONZALEZ CID, M.; GARCÍA OVANDO, H.; WEYERS, A.; UGNIA, L.; LARRIPA, I.; GORLA, N. La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados. **Theoria**, v. 15, n. 2, p. 53-60, 2006.

MAÑAS, F.; PERALTA, L.; UGNIA, L.; WEYERS, A.; GARCÍA OVANDO H.; GORLA, N. Oxidative stress and comet assay in tissues of mice administered glyphosate and ampa in drinking water for 14 days. **J Basic Appl Genet**, v. 24, n. 2, p. 67-75, 2013.

MANZ, D.H.; BLANCHETTE, N.L.; PAUL, B.T.; TORTI, F.M.; TORTI, S.V. Iron and cancer: recent insights. **Ann NY Acad Sci**, v. 1368, n. 1, p. 149-161, 2016.

MAPA (2021). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: Consulta de ingrediente ativo-Glifosato**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 18 jul 2021.

MARGIS, R.; DUNAND, C.; TEIXEIRA, F.K. MARGIS-PINHEIRO, M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. **FEBS J**, v. 275, n.15, p. 3959-3970, 2008.

MARTINI, F.H.; TIMMONS, M.J.; TALLITSCH, R.B. **Anatomia humana**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

MASELLA, R.; DI BENEDETTO, R.; VARÌ, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J Nutr Biochem**, v. 16, n. 10, p. 577-586, 2005.

MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 1-3, p. 83-104, 2000.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; NÚÑEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem**, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.

MAZON, L. M.; SOUZA, A. Z. P. Estudo exploratório entre trabalhadores rurais expostos ocupacionalmente a agrotóxicos. **Rev Uniandrade**, v. 16, n. 1, p. 31-38, 2015.

MAZZOLI, R.; PESSIONE, E. The neuro-endocrinological role of microbial glutamate and GABA signaling. **Front Microbiol**, v. 30, p. 1934, 2016.

MEISTER, A. On the enzymology of amino acid transport. **Science**, v. 180, n. 4081, p. 33-39, 1973.

MENEGHEL, S.N.; VICTORA, C.G.; FARIA, N.M.X.; CARVALHO, L.A.; FALK, J.W. Características epidemiológicas do suicídio no Rio Grande do Sul. **Rev Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 804-810, 2004.

MENEZES, C.C.; FONSECA, M.B.; LORO, V.L.; SANTI, A.; CATTANEO, R.; CLASEN, B.; PRETTO, A.; MORSCH, V.M. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 60, n. 4, p.665-671, 2011.

MESNAGE, R.; ARNO, M.; COSTANZO, M.; MALATESTA, M.; SÉRALINI, G.E.; ANTONIOU, M.N. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. **Environ Health**, v. 14, n. 70, p.1-14, 2015.

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

MESNAGE, R.; RENNEY, G.; SÉRALINI, G.E.; WARD, M.; ANTONIOU, M. N. Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. **Scientific Reports**, v. 7, n. 39328, p. 1-15, 2017.

MEYER, T.N.; RESENDE, I.L.C.; ABREU, J.C. Incidência de suicídios e uso de agrotóxicos por trabalhadores rurais em Luz (MG), Brasil. **Rev Bras Saúde Ocup**, v. 32, n. 116, p. 24-30, 2007.

MILIĆ, M.; ŽUNEC, S.; MICEK, V.; KAŠUBA, V.; MIKOLIĆ, A.; LOVAKOVIĆ, B.T.; SEMREN, T.Z.; PAVIČIĆ, I.; ČERMAK, A.M.M.; PIZENT, A.; VRDOLJAK, A.L.; VALENCIA-QUINTANA, R.; SÁNCHEZ-ALARCÓN, J.; ŽELJEŽIĆ, 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.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, 1972.

MLADINIC, M.; BEREND, S.; VRDOLJAK, A.L.; KOPJAR, N.; RADIC, B.; ZELJEZIC, D. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes *in vitro*. **Environ Mol Mutagen**, v. 50, n. 9, p. 800-807, 2009.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 294-299, 2010.

MONSANTO (2015). **FISPQ - Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos: Roundup® Original**. Disponível em: http://www.roundup.com.br/pdf/roundup_original/fispq-roundup-original.pdf. Acesso em: 22 set 2019.

MOSE, T.; KJAERSTAD, M. B.; MATHIESEN, L.; NIELSEN, J. B.; EDELFORS, S.; KNUDSEN, L. E. Placental passage of benzoic acid, caffeine, and glyphosate in an ex vivo human perfusion system. **J Toxicol Environ Health A**, v. 71, n. 15, p. 984-91, 2008.

MURPHY, C.J.; OUDIT, G.Y. Iron-overload cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and treatment. **J Card Fail**, v. 16, n. 11, p. 888-900, 2010.

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, p. 19, 2016.

- NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A silver staining method for single-cell gel assay. **J Histochem Cytochem.**, v. 49, n. 9, p. 1183-1186, 2001.
- NAVA, A. **Análise toxicológica de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em camundongos prenhes.** Dissertação de mestrado, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2010.
- NIJIMA, A. Reflex effects of oral, gastrointestinal and hepatoportal glutamate sensors on vagal nerve activity. **J Nutr**, v. 130 (4S suppl), p. 971S-973S, 2000.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n.11, p.1287-1312, 2001.
- NWANI, C.D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; LAKRA, W. S. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 36, n. 2, p. 539-547, 2013.
- OAKLEY, A. Glutathione transferases: a structural perspective. **Drug Metab Rev**, v.43, p. 138-151, 2011.
- OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, 1979.
- OLIVA-VILARNAU, N.; HANKEOVA, S.; VORRINK, S.U.; MKRTCHIAN, S.; ANDERSSON, E.R.; LAUSCHKE, V.M. Calcium signaling in liver injury and regeneration. **Front Med (Lausanne)**, v. 5, article 192, p. 1-17, 2018.
- OLIVEIRA, E.; MAGGI, M.F.; MATOS, E.; RAMOS, M.S.; VAGNER, M.W.; LOPES, E.C. Technology of application of defensives and relations with the risk of contamination of the water and soil. **Applied Research & Agrotechnology**, v. 2, n. 3, p. 161-169, 2009.
- OLORUNSOGO, O. O. Modification of the transport of protons and Ca^{2+} ions across mitochondrial coupling membrane by N-(phosphonomethyl)glycine. **Toxicology**, v. 61, n. 2, p. 205-209, 1990.
- OMS (2009). Organização Mundial da Saúde. World Health Organization. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009.** Disponível em: http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf. Acesso em: 22 set 2019.
- OWAGBORIAYE, F; DEDEKE, G; ADEMOLU, K; OLUJIMI, O; ALADESIDA, A; ADELEKE, M. Comparative studies on endogenic stress hormones, antioxidant, biochemical and hematological status of metabolic disturbance in albino rat exposed to roundup herbicide and its active ingredient glyphosate. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 26, n. 14, p. 14502-14512, 2019.
- PAGANELLI, A.; GNAZZO, V.; ACOSTA, H.; LÓPEZ, S.L.; CARRASCO, A.E. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. **Chem Res Toxicol**, v. 23, n. 10, p. 1586–1595, 2010.

- PALMA, D. C. A. **Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde-MT**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.
- PANDEY, A; DHABADE, P.; KUMARASAMY, A. Inflammatory effects of subacute exposure of roundup in rat liver and adipose tissue. **Dose Response**, v. 17, n. 2, p. 1-11, 2019.
- PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxid Med Cell Longev**, v. 3, n. 1, p. 2-12, 2010.
- PANTOPOULOS, K.; PORWAL, S.K.; TARTAKOFF, A.; DEVIREDDY, L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. **Biochemistry**, v. 51, n. 29, p. 5705-5724, 2012.
- PAOLICCHI, A.; DOMINICI, S.; PIERI, L.; MAELLARO, E.; POMPELLA, A. Glutathione catabolism as a signaling mechanism. **Biochem Pharmacol**, v. 64, n. 5-6, p.1027-1035, 2002.
- PARANÁ. Governo do Estado. Secretária da Saúde. **Intoxicações agudas por agrotóxicos: atendimento inicial do paciente intoxicado**. 2018. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/IntoxicacoesAgudasAgrotoxicos2018.pdf>. Acesso em: 21 set 2019.
- PARVEZ, S; GERONA, R.R.; PROCTOR, C; FRIESEN, M.; ASHBY, J.L.; REITER, J.L.; LUI, Z; WINCHESTER, P.D. Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: a prospective Indiana birth cohort study. **Environ Health**, v. 17, n. 1, p. 23, 2018.
- PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin Chim Acta**, v. 333, n. 1, p. 19-39, 2003.
- PEI, Y.; LIU, H.; YANG, Y.; YANG, Y.; JIAO, Y.; TAY, F.R.; CHEN, J. Biological activities and potential oral applications of N-acetylcysteine: progress and prospects. **Oxid Med Cell Longev**, p. 1-14, 2018.
- PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p. 1115-1122, 2005.
- PEREIRA, C.H.J. **Avaliação da instabilidade genômica e do estresse oxidativo em agricultores expostos a agrotóxicos em um município do estado de Santa Catarina**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
- PETERSEN, O.H; MICHALAK, M.; VERKHRATSKY. Calcium signalling: past, presente and future. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3-4, p.161-169, 2005.
- PETERSEN, O.H.; PETERSEN, C.C.; KASAI, H. Calcium and hormone action. **Annu Rev Physiol**, v. 56, p. 297-319, 1994.
- PIETRANGELO, A. Iron and the liver. **Liver Int**, v. 36, Suppl 1, p. 116-123, 2016.
- PIRES, D.X.; CALDAS, E.D.; RECENA, M.C.P. Uso de agrotóxicos e suicídios no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Cad Saúde Pública**, v. 21, n. 2, p. 598-605, 2005.

POLLEGIONI, L.; SCHONBRUNN, E.; SIEHL, D. Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering. **FEBS J**, v. 278, n. 16, p.2753-2766, 2011.

PRASAD, S.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, M.; SHUKLA, Y. Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of swiss albino mice. **J Toxicol**, p.1-6, 2009.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **Biomed Res Int**, 2014.

RAHMAN K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clin Interv Aging**, v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

RANGAN, C.; BARCELOUX, D.G. Food additives and sensitivities. **Dis Mon**, v. 55, n. 5, p. 292-311, 2009.

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.

REEDS, P.J.; BURRIN, D.G.; STOLL, B.; JAHOOOR, F. Intestinal glutamate metabolism. **J Nutr**, v. 130, 4S Suppl, p. 978S-982S, 2000.

REID, M.; BADALOO, A.; FORRESTER, T.; MORLESE, J.F.; FRAZER, M.; HEIRD, W.C.; JAHOOOR, F. *In vivo* rates of erythrocyte glutathione synthesis in children with severe protein-energy malnutrition. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 278, n. 3, p. 405-412, 2000.

REN, X.; LI, R.; LIU, J.; HUANG, K.; WU, S.; LI, Y.; LI, C. Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses. **Environ Pollut**, v. 243, p. 833-841, 2018.

RIEG, C.E.H. **Consequências da exposição materna à formulação comercial contendo glifosato nos parâmetros bioquímicos e morfológicos em fígado e sangue periférico de ratos imaturos**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

RIO GRANDE DO SUL. Secretária Estadual da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. **Agrotóxicos: impactos à saúde e ao ambiente**. Porto Alegre: CEVS, 2008.

ROACH, P. J. Glycogen and its metabolism. **Curr Mol Med**, v. 2, n. 2, p. 101-120, 2002.

ROACH, P. J.; DEPAOLI-ROACH, A.A; HURLEY, T.D.; TAGLIABRACCI, V.S. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. **Biochem J**, v. 441, n. 3, p. 763-787, 2012.

ROMBOUT-SESTRIENKOVA, E.; VAN KRAAIJ, M.G.J.; KOEK, G.H. How we manage patients with hereditary haemochromatosis. **Br J Haematol**, v. 175, n. 5. p. 759-770, 2016.

ROUAULT, T.A. Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 8, p. 551-564, 2013.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

ROY, N. M.; CARNEIRO, B.; OCHS, J. Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 42, p. 45-54, 2016.

ŠALAMON, Š.; KRAMAR, B. MAROLT, T.P.; POLJŠAK, B.; MILISAV, I. Medical and dietary uses of N-acetylcysteine. **Antioxidants (Basel)**, v. 8, n. 5, p. 1-16, 2019.

SALBEGO, J.; PRETTO, A.; GIODA, C.R.; DE MENEZES, C.C.; LAZZARI, R.; RADUNZ NETO, J.; BALDISSEROTTO, B.; LORO, V.L. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 58, n. 3, p. 740-745, 2010.

SAMANTA, P.; PAL, S.; MUKHERJEE, A.K.; GHOSH, A.R. Evaluation of metabolic enzymes in response to Excel Mera 71, a glyphosate-based herbicide, and recovery pattern in freshwater teleostean fishes. **BioMed Res Int**, v. 2014, p. 6, 2014.

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.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate pathways to modern diseases V: amino acid analogue of glycine in diverse proteins. **J Biol Phys Chem**, v. 16, n. 1, p. 9-46, 2016.

SÁNCHEZ, G.M. **Ambiente anti-oxidante/pro-oxidante su impacto medico**. 1 ed. Aracne, 2012.

SAYRE, L.M.; SMITH, M.A. PERRY, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. **Curr Med Chem**, v. 8, n. 7, p.721-738, 2001.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H.G.; SCHURMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 28, n.5, p. 364-371, 2004.

SCLAFANI, A.; ACKROFF, K. Role of gut nutrient sensing in stimulating appetite and conditioning food preferences. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 302, n. 10, p. R1119–R1133, 2012.

SHEHATA, A.A.; SCHRÖDL, W.; ALDIN, A.A.; HAFEZ, H.M.; KRÜGER, M. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota *in vitro*. **Curr Microbiol**, v. 66, n. 4, p. 350-358, 2013.

SIES, H.; JONES, D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 21, n. 7, p. 363-383, 2020.

SILVÉRIO, F.O.; SILVA, J.G.S.; AGUIAR, M.C.S.; CACIQUE, A.P.; PINHO, G.P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quím Nova**, v. 35, n. 10, p. 2052-2056, 2012.

SIMCOX, J.A.; MCCLAIN, D.A. Iron and diabetes risk. **Cell Metab**, v. 17, n. 3, p. 329-341, 2013.

SINDIVEG (2016). Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. **BALANÇO 2015**: Setor de agroquímicos confirma queda de vendas. Disponível em:<https://sindiveg.org.br/docs/balanco-2015.pdf>. Acesso em: 20 set 2019.

SINDIVEG (2017). Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. **Setor de defensivos agrícolas registra queda nas vendas em 2016**. Disponível em:<https://sindiveg.org.br/wp-content/uploads/2017/06/Release-03abr2017-FINAL.pdf>. Acesso em: 20 set 2019.

SINGH, N.; HALDAR, S.; TRIPATHI, A.K.; HORBACK, K.; WONG, J.; SHARMA, D.; BESERRA, A.; SUDA, S.; ANBALAGAN, C.; DEV, S.; MUKHOPADHYAY, C.K.; SINGH, A. Brain iron homeostasis: From molecular mechanisms to clinical significance and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 8, p. 1324-1363, 2014.

SINGH, N. P.; MCCOY, M.T; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SINGH, A.K; SHINTON, N.K. International committee for standardization in haematology of the european society of haematology: recommendations and requirements for haemoglobinometry in human blood. **J Clin Pathol.**, v. 18, p.353-355, 1965.

SINHORIN, V.D.G.; SINHORIN, A.P.; TEIXEIRA, J.M.S.; MILÉSKI, K. M. L.; HANSEN, P.C.; MOREIRA, P.S.A.; KAWASHITA, N.H.; BAVIERA, A.M.; LORO, V.L. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidante responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 106, p. 181-187, 2014.

SLANINOVA, A.; SMUTNA, M.; MODRA, H.; SVOBODOVA, Z. A review: oxidative stress in fish induced by pesticides. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 30, Suppl 1, p. 2-12, 2009.

STEGINK, L.D.; FILER, L.J.JR.; BAKER, G.L.; BELL, E.F. Plasma glutamate concentrations in 1-year-old infants and adults ingesting monosodium L-glutamate in consommé. **Pediatr Res**, v. 20, n. 1, p. 53-58, 1986.

STEINRUCKEN, H.C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 94, n. 4, p. 1207-1212, 1980.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz J Med Biol Res**, v. 29, n. 12, p. 1715-1733, 1996.

SUAREZ, R.K.; MOMMESEN, T.P. Gluconeogenesis in teleost fishes. **Can J Zool**, v. 65, p. 1869-1882, 1987.

SUN, Y.; ZHANG, J.; SONG, W.; SHAN, A. Vitamin E alleviates phoxim-induced toxic effects on intestinal oxidative stress, barrier function, and morphological changes in rats. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 25, n. 26, p. 26682-26692, 2018.

SURYAWAN, A.; HAWES, J.W.; HARRIS, R.A.; SHIMOMURA, Y.; JENKINS, A.E.; HUTSON, S.M. A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. **Am J Clin Nutr**, v. 68, n. 1, p. 72-81, 1998.

SUTOR, B.; LUHMANN, H.J. Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex. **Perspect Dev Neurobiol**, v. 2, n. 4, p. 409-419, 1995.

SVOBODOVA, Z.; VYKUSOVA, B.; MACHOVA, J. The effects of pollutants on selected haematological and biochemical parameters in fish. In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford: FAO Fishing News Books, Great Britain, p. 39-52, 1994.

SWANSON, N.L.; LEU, A.; ABRAHAMSON, J.; WALLET, B. Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America. **J Org Systems**, v. 9, n. 2, p.6-37, 2014.

SWEATT, A.J.; WOOD, M.; SURYAWAN, A.; WALLIN, R.; WILLINGHAM, M.C.; HUTSON, S.M. Branched-chain amino acid catabolism: unique segregation of pathway enzymes in organ systems and peripheral nerves. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 286, n. 1, p. E64-E76, 2004.

TAHA, C.; KLIP, A. The insulin signaling pathway. **J Membr Biol**, v. 169, n. 1, p. 1-12, 1999.

TANG, J.; HU, P.; LI, Y.; WIN-SHWE, T.T.; LI, C. Ion imbalance is involved in the mechanisms of liver oxidative damage in rats exposed to glyphosate. **Front Physiol**, v. 8, p. 1-12, 2017.

TANG, Q.; TANG, J.; REN, X.; LI, C. Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. **Environ Pollut**, v. 261, p. 1-10, 2020

TARDIOLO, G.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. Overview on the effects of N-acetylcysteine in neurodegenerative diseases. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 1-20, 2018.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 2, p. 141-145, 2010.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TOMÉ, D. The roles of dietary glutamate in the intestine. **Ann Nutr Metab**, v. 73, Suppl 5, p. 15-20, 2018.

TORTI, S. V.; TORTI, F.M. Iron and cancer: more ore to be mined. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 5, p.342-355, 2013.

TRACEY, K.J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. **Annu Rev Cell Biol**, v. 9, p. 317-343, 1993.

TRAVLOS, G.S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. **Toxicol Pathol**, v. 34, n. 5, p. 548-565, 2006.

UNEYAMA, H.; KOBAYASHI, H.; TONOUCHE, N. New functions and potential applications of amino acids. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 159, p. 273-287, 2017.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Bio Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

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, p. 255-268, 2018.

VAN WAARDE, A.; HENEGOUWEN, M.W.B. Nitrogen metabolism in goldfish, *Carassius auratus* (L.). Pathway of aerobic and anaerobic glutamate oxidation in goldfish liver and muscle mitochondria. **Comp Biochem Physiol B**, v. 72, n. 1, p. 133-136, 1982.

VEDA, P. Evaluation of macrocytosis in routine hemograms. **Indian J Hematol Blood Transfus**, v. 29, n. 1, p. 26-30, 2013.

VILLAGARCÍA, H.G.; ROMÁN, C.L.; CASTRO, M.C.; GONZÁLEZ, L.A.; RONCO, M.T.; FRANCÉS, D.E.; MASSA, M.L.; MAIZTEGUI, B.; FLORES, L.E.; GAGLIARDINO, J.J.; FRANCINI, F. Liver carbohydrates metabolism: A new islet-neogenesis associated protein peptide (INGAP-PP) target. **Peptides**, v. 101, p. 44-50, 2018.

VISIOLI, F.; BORSANI, L.; GALLI, C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. **Cardiovasc Res**, v. 47, n. 3, p.419-425, 2000.

VOS R.M.; VAN BLADEREN, P.J. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. **Chem Biol Interact**, v. 75, n. 3, p. 241-265, 1990.

WANG, H.; JOSEPH, J.A. Mechanism of hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells. **Free Rad Biol Med**, v. 28, n. 8, p. 1222-1231, 2000.

WANG, H.; NISHIYA, K.; ITO, H.; HOSOKAWA, T.; HASHIMOTO, K.; MORIKI, T. Iron deposition in renal biopsy specimens from patients with kidney diseases. **Am J Kidney Dis**, v. 38, n. 5, p.1038-1044, 2001.

WHITFIELD, J.B. Gamma glutamyl transferase. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 38, n. 4, p. 263-355, 2001.

WIJAYANTI, N.; KATZ, N.; IMMENSCHUH, S. Biology of heme in health and disease. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 8, p. 981-986, 2004.

WILCE, M.C.; PARKER, M.W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1205, n. 1, p. 1-18, 1994.

WILLIAMS, B.L.; HORNIG, M.; BUIE, T.; BAUMAN, M.L.; CHO PAIK, M.; WICK, I.; BENNETT, A.; JABADO, O.; HIRSCHBERG, D.L.; LIPKIN, W.I. Impaired carbohydrate digestion and transport and mucosal dysbiosis in the intestines of children with autism and gastrointestinal disturbances. **PLoS One**, v. 6, n. 9, e24585, 2011.

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, p. 117- 165, 2000.

WILLIAMS, A. L.; WATSON, R. E.; DESESSO, J. M. Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 15, n. 1, p. 39-96, 2012.

WINTROBE M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematol**, v. 51, p. 32-49, 1933.

WUNNAPUK, K.; GOBE, G.; ENDRE, Z.; PEAKE, P.; GRICE, J.E.; ROBERTS, M.S. BUCKLEY, N.A.; LIU, X. Use of a glyphosate-based herbicide-induced nephrotoxicity model to investigate a panel of kidney injury biomarkers. **Toxicol Lett**, v. 225, n. 1, p. 192-200, 2014.

YOUNG, B.; O'DOWN, G.; WOODFORD, P. **Wheater's functional histology: a text and color atlas**. 6nded. Elsevier, 2014.

ZAMONER, A.; ROYER, C.; BARRETO, K.P.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neurosci Res**, v. 57, n. 1, p. 98-103, 2007.

ZHANG, H.; DICKINSON, D.A.; LIU, R.M.; FORMAN, H.J. 4-Hydroxynonenal increases gamma-glutamyl transpeptidase gene expression through mitogen-activated protein kinase pathways. **Free Radic Biol Med**, v. 38, n. 4, p. 463-471, 2005.

ZHANG, H.; FORMAN, H. J. Redox regulation of gamma-glutamyl transpeptidase. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 41, n. 5, p. 509-515, 2009.