



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Sandra Joseane Fernandes Garcia

**EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO: IMPACTOS
E MECANISMOS SUBJACENTES A TOXICIDADE RENAL NA PROLE DE RATOS
IMATUROS**

Florianópolis

2023

Sandra Joseane Fernandes Garcia

**EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO: IMPACTOS
E MECANISMOS SUBJACENTES A TOXICIDADE RENAL NA PROLE DE RATOS
IMATUROS**

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

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

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Ourique da Silva

Florianópolis

2023

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

Garcia, Sandra Joseane Fernandes
EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO:
IMPACTOS E MECANISMOS SUBJACENTES A TOXICIDADE RENAL NA
PROLE DE RATOS IMATUROS / Sandra Joseane Fernandes Garcia
; orientador, Ariane Zamoner Pacheco de Souza,
coorientador, Fabiana Ourique da Silva, 2023.
116 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. 1- Glifosato. 3. 2- Estresse
oxidativo. 4. 3-Nefrotoxicidade. 5. 4- Lesão renal aguda.
I. Souza, Ariane Zamoner Pacheco de . II. Silva, Fabiana
Ourique da . III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Sandra Joseane Fernandes Garcia

Exposição perinatal ao herbicida à base de glifosato: impactos e mecanismos subjacentes a toxicidade renal na prole de ratos imaturos

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

Prof.(a) Pedro Fontes de Oliveira, Dr(a).

Universidade de Aveiro

Prof.(a) Manuela Pinto Kaster, Dr(a).

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dirleise Colle, Dr(a).

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 doutor em Bioquímica.

Prof. Dr.(a) Marcelo Farina

Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza

Orientador(a)

Florianópolis, 18 de dezembro de 2023

Dedico este trabalho aos meus pais José e
Benilda (*In memoriam*) que sempre foram inspiração na
minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me inspirar e amparar nos momentos difíceis para seguir em frente!

À minha família, que sempre me apoiaram com muito amor e paciência, em especial a minha querida Beatriz e a minha filha de coração Maria Vitória. Minhas irmãs Silvia (In memoriam) e Suzana que acreditaram no meu potencial, a vocês minha gratidão!

A minha orientadora Ariane pelo conhecimento compartilhado, pela lição de vida como mãe e ser humano e pela grande profissional como pesquisadora. Sou muito grata e sinto admiração pela tua trajetória!

A minha coorientadora Fabiana, que mesmo em momentos difíceis na pandemia esteve comigo nos experimentos, dividindo seu saber. Serei eternamente grata!

A professora Rosangela Pedrosa que me incentivou a fazer o doutorado e oportunizou minha entrada no PPGBQA, Obrigada!

A minha colega e amiga de laboratório Katiuska, que me ajudou intensamente nos experimentos, mas que além disso, manteve à vontade vencer os obstáculos diários com serenidade. Muitas vezes você foi um alicerce, gratidão!

As nossas colegas Valdelúcia, Claudia, Mari, Filomena, Beatriz, Carmem, Patrícia, Adny, Rodrigo e as bolsistas Carol e Giovanna, que ajudaram de alguma forma na realização dos protocolos laboratoriais, cada uma tem lugar guardado comigo. Muito obrigada de coração!

Aos meus amigos e colegas de Joinville que iniciaram essa jornada comigo, em especial Maurici, Lucinha e Nice e aos meus colegas docentes do Instituto Federal de Santa Catarina Campus Joinville e Campus Florianópolis. Obrigada pelo incentivo, gratidão imensa!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao corpo de funcionários do Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC) pelas contribuições. E todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para realização do estudo.

Enfim, agradeço por manter a força e a fé em dias melhores, a vontade de cuidar, inspirar e melhorar vidas. Muito Obrigada!

RESUMO

Formulações comerciais de herbicidas contendo glifosato como ingrediente ativo, especialmente o Roundup®, são amplamente utilizadas em todo o mundo. O presente estudo investigou os efeitos da exposição perinatal ao Roundup® (herbicida a base de glifosato; HBG) no tecido renal da prole aos 15 dias de idade. O herbicida foi administrado na água de beber das ratas na dose equivalente a 0,36% de glifosato, desde o 5º dia de prenhez até a prole completar 15 dias de vida pós-natal (PND15). Para compreender os possíveis mecanismos de toxicidade renal induzidos pela exposição ao HBG, foram avaliados parâmetros histomorfométricos do tecido renal, indicadores bioquímicos da função renal, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo bem como vias de sinalização celular. Os resultados revelaram redução na massa corpórea e renal dos filhotes expostos ao HBG. Os dados histomorfométricos mostraram diminuição no tamanho da área do tufo glomerular/vasculatura renal e alterações na histoarquitetura renal, incluindo perda do espaço de Bowman, atrofia e colapso dos glomérulos renais. A avaliação de possível lesão renal revelou aumento na concentração de lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), indicando lesão renal aguda, associada perda da função renal com aumento nas concentrações plasmáticas de creatinina no grupo exposto ao herbicida. Observou-se ainda aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) no tecido renal dos filhotes expostos. A diminuição na atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase no tecido renal do grupo exposto sugere diminuição da resposta antioxidante, embora o conteúdo de glutathione (GSH) tenha aumentado. A concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α diminuiu no tecido renal dos filhotes expostos ao HBG em relação aos controles. A exposição ao HBG aumentou a atividade da adenosina desaminase que pode estar associada ao aumento da concentração de inosina. A diminuição na fosforilação das proteínas JNK1 e JNK2, bem como no imunocóntido de Nrf2 sugerem que estas vias de sinalização estão envolvidas no mecanismo de toxicidade do herbicida. Os resultados sugerem que a exposição perinatal ao HBG induz nefrotoxicidade associada a lesão glomerular, estresse oxidativo e supressão das respostas pró-inflamatórias.

Palavras-chave: Roundup®. Glifosato. Estresse oxidativo. Nefrotoxicidade. lesão renal aguda.

ABSTRACT

Commercial herbicide formulations containing glyphosate as an active ingredient, especially Roundup®, are widely used throughout the world. This study investigated the effects of perinatal exposure to Roundup® (glyphosate-based herbicide; GBH) on the immature rat kidney. The herbicide was administered in the drinking water of the pregnant rats at a dose equivalent to 0.36% glyphosate, from the 5th day of pregnancy until the offspring reached 15 days of postnatal life. To understand the potential mechanisms of renal toxicity induced by GBH exposure, histomorphometric parameters of renal tissue, biochemical indicators of renal function, inflammatory markers, oxidative stress, and cellular signaling pathways were assessed. The results revealed a reduction in the body and renal mass of the offspring exposed to GBH. Histomorphometric data showed a decrease in the size of the glomerular tuft/renal vasculature and alterations in renal histoarchitecture, including loss of Bowman's space, atrophy, and collapse of renal glomeruli. Acute kidney injury evaluation indicated an increase in the concentration of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), indicating early renal injury, associated with increased plasma creatinine concentrations in the herbicide-exposed group. An increase in the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in kidney of the exposed rats was also observed. The decrease in superoxide dismutase (SOD) and catalase activities suggest a decrease in the antioxidant response, although the glutathione (GSH) content increased in the GBH-exposed group. The concentration of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β , and TNF- α decreased in the renal tissue of the GBH-exposed offspring compared to the controls. Exposure to GBH also induced an increase in the adenosine deaminase activity, suggesting a subsequent increase in extracellular inosine concentration. The decrease in the phosphorylation of JNK1 and JNK2 proteins, as well as the immunoreactivity of Nrf2, suggests that these signaling pathways are involved in the herbicide's toxicity mechanism. The results suggest that perinatal exposure to GBH induces nephrotoxicity associated with glomerular injury, oxidative stress, and suppression of pro-inflammatory responses.

Keywords: Roundup®. Glyphosate. Oxidative stress. Nephrotoxicity. Acute kidney injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Percentual de propriedades rurais que utilizam agrotóxicos, por município (2017).	21
Figura 2 - Fórmula estrutural do glifosato e do sal de isopropilamina.....	23
Figura 3 - Mecanismo de ação do glifosato em plantas.	25
Figura 4 – Estruturas do Néfron.	32
Figura 5 – Representação da barreira de filtração glomerular.....	33
Figura 6 - Representação esquemática que mostra capilares glomerulares e a localização de podócito e a célula mensangial entre eles.....	34
Figura 7 - Fotomicrografia Túbulo proximal, capilares e borda em escova.....	35
Figura 8 - Fotomicrografia Túbulo contorcido proximal, distal e mácula densa.	36
Figura 9 - Estruturas Corpúsculo renal e Aparelho justaglomerular.	37
Figura 10 - Visão geral anatômica, filtração e reabsorção nos segmentos do néfron..	Erro!
Indicador não definido.	
Figura 11 - Relação entre Espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio.	44
Figura 12 - Estresse oxidativo e Sistema de defesa antioxidante.	45
Figura 13 - Via metabólica do ATP e Adenosina no rim.	48
Figura 14 - Sinalização de CD39, ATP e Adenosina no complexo inflamossoma NRP3.	50
Figura 15 - Metabolismo da glutamina e do glutamato e interação metabólica com Ciclo de Krebs, Ciclo da Uréia, Ciclo da Gama-glutamil e as reações de transaminação.....	51
Figura 16 - Sinalização JNK efeitos biológicos nas células renais.	53
Figura 17 - Fatores que ativam a sinalização da p53 promovendo a Insuficiência Renal.....	55
Figura 18 - Vias de sinalização da apoptose celular.....	57
Figura 19 - Mecanismo de molecular de Nrf2 para induzir a produção de genes que envolvem a citoproteção contra o estresse oxidativo.	59
Figura 20 - Desenho experimental da exposição perinatal no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida a base de glifosato Roundup®.	63
Figura 21 - Efeitos na morfologia tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida a base de glifosato Roundup®.....	76
Figura 22 - Dosagem de Lipocaína Associada à Gelatinase Neutrofílica (NGAL) no soro de	77
Figura 23 - Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida a base de glifosato Roundup®.	79

Figura 24 - Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GGT, GTS, GPX e do conteúdo do tripeptídeo GSH no tecido renal de ratos imaturos (PDN15) expostos ao herbicida à base de glifosato-Roundup®.....	80
Figura 25 - Citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a atividade da enzima mieloperoxidase no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base de glifosato-Roundup®.....	81
Figura 26 - Atividade das ectoenzimas purinérgicas na hidrólise do ATP, ADP, AMP e desaminação da adenosina (ADO) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base glifosato Roundup®.....	82
Figura 27 - Atividade das enzimas da alanina aminotransferase (ALT) e atividade da aspartato aminotransferase (AST) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) exposto ao herbicida à base de glifosato Roundup®.....	83
Figura 28 - Expressão das proteínas γ H2AX, p53, caspase 3 no tecido renal de ratos imaturos expostos ao herbicida à base de glifosato-Roundup®.....	85
Figura 29 - Expressão das proteínas p-p54 JNK, p-p46 JNK, Nrf2 no tecido renal de ratos imaturos expostos ao herbicida glifosato-Roundup®	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pesticidas mais comercializados no Brasil: quantidade, classificação e periculosidade (2019).	22
Tabela 2 - Efeitos da exposição ao Roundup® na massa corpórea e massa relativa dos rins de ratos imaturos (PND15).	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Adenosina desaminase
Ado	Adenosina
AJG	Aparelho justaglomerular
ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOEL	Nível Aceitável de Exposição Ocupacional
Apaf-1	Fator 1 de ativação da apoptose
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BRG1	Gene relacionado a brahma
CaMKII	Proteína cinase II dependente de cálcio/calmodulina
CAT	Catalase
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CD36	Glicoproteína plaquetária 4
CD39	Ectoenzima E-NTPDase
CD73	Ectoenzima Ecto-5'-nucleotidase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	Comitê de Ética na Pesquisa com Animais
CHD6	Proteína de ligação ao DNA da helicase cromodomínio 6
COBEA	Comissão Nacional de Bem-estar Animal
CP4	Gene tolerante ao glifosato
CPT1	O-palmitoil transferase 1
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta de AMP cíclico
CYP450	Citocromo P450
DCFS	diclorofenolsulfonato
DNPB	2,4 dinitrofenilhidrazina
DPTA	Ácido dietilenotriaminopentacético
DRfA	Dose de Referência Aguda
DTNB	2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E-NPP	Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
E-NTPDase	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
EPSP	<i>5-enolpiruvato- shiquimato-3-fosfato sintase</i>
EPSPS	Enzima <i>5-enolpiruvato- shiquimato-3-fosfato sintase</i>
ERK	Proteínas cinases ativadas por mitógeno
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FABP	Proteínas de ligação dos ácidos graxos
FADD	Proteína domínio de morte do adaptador Fas
FADH	Dinucleotídeo de flavina-adenina reduzida
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
FC	Fator de correção
GDP	Glutaminase dependente de fosfato
GGT	gama-glutamil transferase
GM	Geneticamente modificadas
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione dissulfeto
GST	Glutathione s-transferase
H ₂ DCFDA	Sonda diacetato de β' ,7'- diclorodihidrofluoresceína
HBG	Herbicida à base de glifosato
HE	Hematoxilina e Eosina
HOCl	Ácido hipocloroso
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IL	Interleucinas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRA	Insuficiência renal aguda
JG	Justaglomerular
JIP1	Proteína de interação 1

JNK	Quinase c-Jun N-terminal
KCl	Cloreto de potássio
LaBioSignal	Laboratório de Bioquímica e Sinalização Celular
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LF	Leituras fotométricas
LMR	Limites máximos de resíduos de agrotóxicos
LPO	Lipoperoxidação
LRA	Lesão renal aguda
Maf	Musculoaponeurótico fibrossarcoma
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NGAL	Lipocaína Associada à Gelatinase Neutrofílica
NLRP3	Receptores da família NLR contendo domínio pirina 3
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
Nrf2	Fator eritróide nuclear 2
NTPDase	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
NTPDase-1	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases do tipo 01
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPT	o-ftaldialdeído fluorescente
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PBS	Tampão fosfato-salino
PEP	Fosfoenolpiruvato
PND	Dia pós-natal, do inglês “post-natal day”
POEA	Polioxietilenoamina
PSH	Tióis proteicos
RNA	Ácido ribonucleico
RP1	Receptores P1

RP2	Receptores P2
RTq-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
S3P	Chiquimato-3-fosfato
SDS	Lauril sulfato de sódio
SH	Sulfidril
SOD	Superóxido dismutase
SNA	Sistema nervoso autônomo
TCA	Ácido tricloroacético
TCD	Túbulo contorcido distal
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TGF	Taxa de filtração glomerular
TNF- α	Fator de necrose tumoral tipo alfa
TRADD	Proteína do domínio da morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral tipo 1
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
Tris-HCL	Tris (hidroximetil aminometano) hidrocloreto
UCP2	Proteína desacopladora 2
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
γ H2AX	histona H2AX fosforilada
4-AMP	4-aminoantipirina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo Geral	17
1.1.2 Objetivos Específicos	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 CONTEXTO HISTÓRICO DO CONSUMO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL E NO MUNDO	19
2.1.1 Herbicida a base de glifosato	22
2.2 MECANISMO DE AÇÃO E DEGRADAÇÃO DO GLIFOSATO	24
2.2.1 Toxicidade do glifosato	26
2.2.2 Efeitos da exposição ao glifosato em organismos vivos	27
2.3 MORFOLOGIA E FISIOLOGIA RENAL	30
2.4 FORMAÇÃO DA URINA PELOS PROCESSOS DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR..	37
2.4.1 Filtração Glomerular	37
2.5 LESÃO RENAL E MARCADORES BIOQUÍMICOS	40
2.6 PRODUÇÃO ENERGÉTICA, ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE NO TECIDO RENAL	42
2.6.1 Antioxidantes renais	46
2.7 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NO SISTEMA RENAL	47
2.8 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS NO TECIDO RENAL	50
2.9 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO DANO AO DNA, MORTE CELULAR E ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES NOS PROCESSOS PATÓLOGICOS RENAIIS γ H2AX, P53, CASPASE 3 P-P54 JNK, P-P46 JNK, NRF2	52

3 METODOLOGIA	61
3.1 MATERIAIS	61
3.2 MÉTODOS.....	62
3.2.1 Animais	62
3.2.1.1 <i>Tratamento in vivo com Roundup®</i>	62
3.3 ANÁLISES HISTOMORFOLÓGICAS E HISTOMORFOMÉTRICAS CELULARES..	63
3.3.1 Massa corporal e massa relativa dos rins	63
3.3.2 Microscopia de Luz	64
3.3.2.1 <i>Histologia e morfometria dos tecidos renais de ratos imaturos (PND15) expostos ao Herbicida a base glifosato Roundup®</i>	64
3.4 COLETA DE SANGUE E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO	64
3.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DA FUNÇÃO RENAL	65
3.5.1 Concentração de Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrofílica (NGAL)	65
3.5.2 Dosagem de Ácido Úrico	65
3.5.3 Dosagem de Creatinina	65
3.6 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	66
3.6.1 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida glifosato-Roundup®	66
3.6.2 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida glifosato-Roundup®	67
3.6.2.1 <i>Catalase (CAT)</i>	67
3.6.2.2 <i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	67

3.6.2.3 Gama-glutamil transferase (GGT)	68
3.6.2.5 Glutathione S-Transferase (GST)	69
3.6.2.6 Conteúdo de Glutathione Reduzida (GSH)	69
3.7 MARCADORES INFLAMATÓRIOS	70
3.7.1 Concentração de Citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1β, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	70
3.8 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA	71
3.8.1 Atividade da enzima ectonucleotidase trifosfato difosforilase (NTPDase)	71
3.8.2 Atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase	71
3.8.3 Atividade da adenosina desaminase (ADA)	72
3.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	72
3.10 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT), ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST).....	73
3.11 IMUNOCONTEÚDO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MORTE CELULAR, DANO AO DNA E ESTRESSE OXIDATIVO	73
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
4 RESULTADOS	75
4.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO NO TECIDO RENAL DE RATOS IMATUROS (PND15) NOS PARÂMETROS HISTOMORFOLÓGICOS E HISTOMORFOMÉTRICOS CELULARES	75
4.1.1 Perfil ponderal dos animais controle e expostos ao herbicida a base de glifosato Roundup®	75
4.1.2 Avaliação da morfologia no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida a base de glifosato Roundup®	75

4.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO ROUNDUP® NOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DA FUNÇÃO RENAL EM RATOS IMATUROS (PND15).....	77
4.2.1 Dosagem de Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrofílica (NGAL) creatinina e ácido úrico no soro de ratos imaturos (PND15) exposto ao herbicida a base glifosato Roundup®	77
4.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NO ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO RENAL DE RATOS IMATUROS (PND15).	78
4.3.1 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida glifosato-Roundup®	78
4.3.2 Atividade das enzimas antioxidantes e conteúdo de glutathione no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida glifosato-Roundup®.....	79
4.4 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO NAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS IL-6, IL-1 β , FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α) E ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) NO TECIDO RENAL DE RATOS IMATUROS(PND15)	81
4.5 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO ROUNDUP® NO TECIDO RENAL DE RATOS IMATUROS (PND15) NA HIDRÓLISE TRIFOSFATO DE ADENOSINA (ATP)	82
4.6 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO ROUNDUP® NO TECIDO RENAL DE RATOS IMATUROS (PND15) NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS AMINOTRANSFERASES (ALT E AST)	83
4.7 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO ROUNDUP® NOS NÍVEIS DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MORTE CELULAR, DANO AO DNA E ESTRESSE OXIDATIVO NO TECIDO RENAL DE RATOS IMATUROS (PND15).....	84

4.7.1 Expressão das proteínas γH2AX, p53, caspase 3 no tecido renal de ratos imaturos expostos ao herbicida à base de glifosato-Roundup®	84
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÃO.....	98
7 PERSPECTIVAS.....	99
REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional desencadeou o aumento na produção agrícola. Para alimentar uma população de 8 bilhões de pessoas é necessária uma produção em grande escala, o que refletiu no consumo alarmante de agrotóxicos. Tais justificativas do uso tem colocado o Brasil na segunda posição mundial na compra desses produtos. Em 2019, a União Europeia comercializou 12 mil toneladas de agrotóxicos com o Brasil e o consumo anual chegou a 660 mil toneladas (IBAMA, 2020). O uso exacerbado tem chamado a atenção das autoridades sanitárias para os riscos à saúde pública, dado que levou a criação do monitoramento de estudos com estas formulações químicas. O principal objetivo foi elucidar se os compostos predisõem riscos à saúde humana e se estariam envolvidos no desenvolvimento de câncer, doença renal crônica em trabalhadores rurais, doenças respiratórias e doenças dermatológicas (Jayasumana; Gunatilake; Senanayake, 2014; Camacho; Mejía, 2017). Dentre os produtos mais consumidos e monitorados está o glifosato [N-(fosfometil) glicina] que é o agrotóxico mais amplamente aplicado em todo o mundo e é um ingrediente ativo de todos herbicidas a base de glifosato (HBGs), e encontrado na formulação comercial “Roundup”. As sementes geneticamente modificadas (GM) resistentes ao glifosato foram introduzidas no mercado mundial a partir de 1996 com objetivo de aumentar a produção de alimentos. Nos Estados Unidos (EUA) o glifosato está contido em mais de 750 produtos, particularmente herbicidas utilizados para cultivos GM, mas também em outros produtos usados na agricultura, aplicações florestais, urbanas e domésticas. Em 2015, 89% da produção de milho, 94% de soja e 89% de algodão cultivados foram de sementes GM para serem tolerantes ao glifosato. No Brasil, o uso e a comercialização dos HBGs ocupam a primeira colocação representando mais de 30% das vendas nacionais. No ano de 2021, cerca de 719 mil toneladas de agrotóxicos foram comercializadas no país (IBAMA, 2021; ANVISA, 2017; Panzacchi, 2018).

O mecanismo de ação do glifosato é via inibição específica da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase na via de biossíntese de aminoácidos aromáticos na via do chiquimato. A 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase é uma enzima presente somente em plantas e algumas bactérias, essa via é inexistente em vertebrados, sendo o glifosato inicialmente considerado não-tóxico para estes animais. Seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), tem sido detectado na água e no solo juntamente com o glifosato (Struger *et al.*, 2008; Willians *et al.*, 2011; Valavanidis, 2018).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a preocupação com o uso excessivo de agrotóxicos fez a agência analisar e determinar novos parâmetros de referência para uso do glifosato. A ANVISA criou a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 441, de 02 de dezembro de 2020 que dispõe sobre a manutenção do ingrediente ativo glifosato em produtos agrotóxicos no país e define os valores de referência de exposição toxicológica ao ser humano, considerando a dose de Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,5 mg/kg peso/dia que é o parâmetro de segurança definido como a quantidade máxima de agrotóxico que podemos ingerir por dia, durante toda a vida, de modo a não causar danos à saúde. A quantidade máxima de ingestão permitida é calculada para cada agrotóxico, expressa no valor de IDA, medida em miligramas de agrotóxico por quilo de peso corpóreo da pessoa que o ingere (mg/kg). A Dose de Referência Aguda (DRfA) = 0,5 mg/kg peso/dia que é o parâmetro de segurança toxicológico agudo definido como a quantidade estimada do resíduo de agrotóxico presente nos alimentos que pode ser ingerida durante um período de 24 horas, sem causar efeitos adversos à saúde, expressa em miligrama de resíduo por quilograma de peso corpóreo (mg/kg p.c.). O Nível Aceitável de Exposição Ocupacional (AOEL) = 0,1 mg/kg peso/dia considerado o valor de referência utilizado para se comparar com a exposição aos agrotóxicos, sendo a estimativa da quantidade de substância à qual o operador ou o trabalhador pode estar exposto diariamente, sem que apresente efeitos adversos à saúde, expresso em miligramas de substância por quilograma de peso corpóreo por dia (mg/kg p.c./dia). As referidas doses aceitas no Brasil são tipicamente superiores à ingestão diária aceitável de glifosato na União Europeia que atualmente é de 0,3 mg/kg peso/dia, baseando-se na toxicidade hepato-renal após exposição crônica de glifosato em ratos (Valavanidis, 2018). Atualmente, as agências de saúde preconizam limites de uso regulatório, porém, não há um consenso global. Em 2015, a IARC (*International Agency for Research on Cancer*), vinculada à Organização Mundial da Saúde (OMS), classificou o glifosato como agente do Grupo 2A, sendo provavelmente carcinogênico para humanos. A referida categorização é usada quando há evidência limitada de carcinogenicidade em humanos e evidência suficiente de carcinogenicidade em modelos animais experimentais. As evidências basearam-se em estudos epidemiológicos após exposições ao glifosato. Os estudos com roedores demonstram associações entre glifosato e carcinoma dos túbulos renais, hemangiossarcoma, adenoma das células das ilhotas pancreáticas e/ou tumores cutâneos (IARC, 2015; ANVISA, 2019).

O glifosato é absorvido principalmente pela pele, intestino e trato respiratório, e foi detectado em amostras de urina de agricultores, mas também em recém-nascidos e crianças (Trasande *et al.*, 2020) Observa-se que as concentrações urinárias de glifosato nos indivíduos expostos que aplicam produtos fitofarmacêuticos tendem a ser superiores aos resultantes da ingestão alimentar de glifosato pelos consumidores (Acquavella *et al.*, 2004). Desta forma, o efeito do glifosato na saúde humana tem atraído atenção pelos riscos à saúde. Portanto, estudos que elucidem os mecanismos de toxicidade dessas formulações podem auxiliar a compreender os mecanismos fisiopatológicos, bem como as alterações morfológicas e funcionais celulares desencadeadas pelo composto. A compreensão desses processos visa ampliar o conhecimento sobre as disfunções celulares e seu potencial tóxico.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Sinalização Celular (LaBioSignal) já demonstrou que a exposição materna ao HBG, durante os períodos pré e pós-natal, leva à sobrecarga de cálcio e hiper estimulação do sistema glutamatérgico caracterizada pela excitotoxicidade glutamatérgica em hipocampo de ratos imaturos. Os mecanismos que envolvem tais efeitos ativam as vias de sinalização da proteína cinase II dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) e proteínas cinases ativadas por mitógeno (ERK), causam aumento da liberação e diminuição da captação de glutamato na fenda sináptica, aumento no influxo de cálcio e ativação de receptores de glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA) e de canais de cálcio dependentes de voltagem, caracterizando excitotoxicidade glutamatérgica e dano oxidativo em hipocampo de ratos imaturos (Cattani *et al.*, 2014; Cattani *et al.*, 2017). Além disso, demonstrou-se recentemente que a exposição perinatal ao HBG acarreta em diminuição das concentrações de melatonina na prole (Cattani *et al.*, 2023).

Na última década, muitos agricultores foram acometidos com o aparecimento de alterações renais de etiologia desconhecida e evoluíram com diagnóstico de doença renal crônica (Jayasumana *et al.*, 2014; Jayasumana *et al.*, 2017). Pesquisadores concluíram que os agrotóxicos contêm metais como cádmio, cobre que em contato com a água formam complexos metálicos que afetam o sistema renal (Mohamed *et al.*, 2016). A compreensão e o estudo dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos que envolvem o uso do glifosato e o desenvolvimento de nefrotoxicidade é uma demanda de saúde pública. Mediante o exposto, este estudo tem como objetivo investigar os efeitos da exposição perinatal ao HBG no tecido renal de ratos imaturos (PND15), tendo como hipótese compreender os possíveis mecanismos de toxicidade induzida pela exposição precoce a preparação comercial Roundup®.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar os impactos da exposição perinatal ao HBG no tecido renal de ratos imaturos e os possíveis mecanismos de toxicidade induzida.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os impactos da exposição perinatal ao HBG sobre a histomorfologia e morfometria do tecido renal de ratos imaturos;
- Avaliar o efeito da exposição perinatal ao HBG sobre parâmetros bioquímicos associados a função renal dos filhotes imaturos: concentração de Lipocaína Associada à Gelatinase Neutrófila (NGAL), ureia, creatinina e ácido úrico no tecido renal de ratos imaturos;
- Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) no tecido renal de ratos imaturos expostos ao HBG durante o período perinatal;
- Verificar os impactos da exposição perinatal ao HBG na atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), gama-glutamil transferase (GGT), glutathione-S-transferase (GST), e glutathione peroxidase (GPx) bem como no conteúdo de glutathione (GSH) no tecido renal de ratos imaturos;
- Avaliar o efeito da exposição perinatal ao HBG sobre a concentração de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a atividade da mieloperoxidase no tecido renal de ratos imaturos;
- Avaliar se a exposição perinatal ao HBG interfere na sinalização purinérgica através da determinação da hidrólise dos nucleotídeos de adenina (trifosfato de adenosina - ATP, difosfato de adenosina - ADP e monofosfato de adenosina - AMP), e da desaminação do nucleosídeo adenosina (Ado) no tecido renal de ratos imaturos expostos ao HBG;

- Avaliar a atividade da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) no tecido renal de ratos imaturos expostos ao HBG;
- Avaliar os impactos da exposição perinatal ao HBG no imunocnteúdo de proteínas envolvidas na morte celular, dano ao DNA e estresse oxidativo: γ H2AX, Caspase 3, p53, p-p54 JNK, p-p46 JNK e Nrf2 no tecido renal de ratos imaturos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONTEXTO HISTÓRICO DO CONSUMO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL E NO MUNDO

A produção de agrotóxicos teve origem em indústrias químicas que produziam compostos usados como armas químicas durante a Primeira Guerra Mundial. Na sua maioria, os compostos foram moléculas químicas que encontraram na agricultura um novo mercado. As pesquisas na área agrícola tiveram como avanço o desenvolvimento de sementes selecionadas que respondessem aos agrotóxicos em sistemas de monocultura altamente mecanizado e em grande escala. A difusão desse conceito foi conhecida como “Revolução Verde”, justificada como fundamental para derrotar a fome que assolava parte da população mundial, uma iniciativa da FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura) e do Banco Mundial (Octaviano,2010). No entanto, a Revolução Verde, enquanto trouxe avanços na produção agrícola, também gerou preocupações ambientais e de saúde devido ao uso intensivo de agrotóxicos e à prática de monocultura. Assim, a história da agricultura moderna é marcada por complexas interações entre o desenvolvimento de agrotóxicos, avanços na seleção de sementes e as consequências econômicas, ambientais e de saúde associadas a essas práticas.

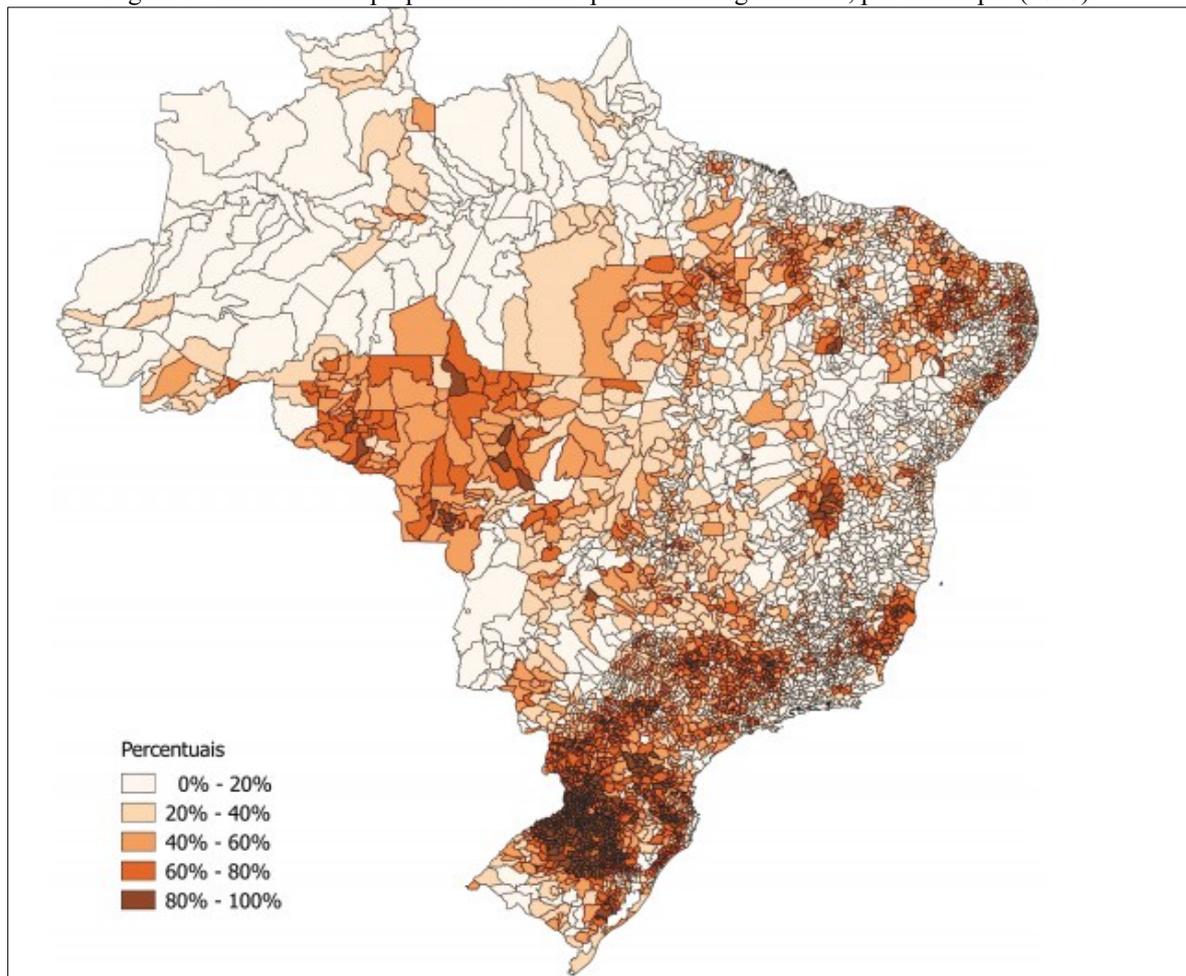
No Brasil, o governo estimulou a implementação do uso de agrotóxicos com a intenção de “modernização da agricultura”, para tanto, promoveu em 1965 o Sistema Nacional de Crédito Rural, que vinculava a obtenção de crédito agrícola à obrigatoriedade da compra de insumos químicos pelos agricultores e, em 1975, o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas, no âmbito do II Plano Nacional de Desenvolvimento, que subsidiou as empresas nacionais e a instalação no país de subsidiárias internacionais de insumos agrícolas. A indústria de agrotóxicos implantada no país cresceu de forma significativa entre 1975/2007. O Brasil é um grande consumidor de agrotóxicos, sendo que em 2004 foi responsável por 13,5% do faturamento mundial da indústria. Durante todo o período 1975/2007 o país sempre esteve entre os seis maiores mercados de agrotóxicos do mundo (Pelaez; Terra; Da Silva, 2010).

O início da comercialização e liberação do plantio de soja "Roundup Ready" e milho "Roundup Ready" no Brasil foi um marco na agricultura do país. Essas variedades de culturas geneticamente modificadas (OGMs) foram desenvolvidas pela Monsanto (hoje parte da Bayer) e se tornaram emblemáticas pela sua resistência ao herbicida glifosato, comercializado sob a

marca "Roundup". A primeira aprovação para o plantio de soja "Roundup Ready" no Brasil ocorreu em 2005, e logo depois, em 2008, o milho "Roundup Ready" também foi autorizado para cultivo comercial. A tecnologia de resistência ao glifosato na soja foi através do gene *CP4* (Gene tolerante ao glifosato) que confere insensibilidade à enzima *5-enolpiruvato-shiquimato-3-fosfato sintase* (EPSPS). O gene CP4 provém de bactérias de solo do gênero *Agrobacterium*, identificadas a partir da seleção entre microrganismos que decompõem o glifosato. A produtividade, morfologia e constituição das cultivares de soja com a resistência incorporada, permaneceu igual às linhagens susceptíveis correspondentes. Linhagens de soja com esse gene tratadas com glifosato, nas doses comerciais, não apresentaram sintomas de fitotoxicidade ou redução da produtividade e qualidade do produto, viabilizando seu uso comercial (Moraes, 2019). Entretanto, as culturas transgênicas demandam mais pulverizações que as convencionais e os limites máximos de resíduos de agrotóxicos (LMR) permitidos nas culturas agrícolas são elevados. Para a soja, o limite de glifosato era 0,2 mg/kg, valor que foi aumentado em 50 vezes com a liberação da soja "Roundup Ready". O uso extensivo desses OGMs e glifosato tem gerado debates sobre questões ambientais e de saúde no país e no mundo.

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017) sobre uso de agrotóxicos nos municípios brasileiros, observados na Figura 1, mostram que o uso intensivo não ocorre apenas em áreas de grandes propriedades rurais (como no Mato Grosso e Rondônia, por exemplo), mas também onde prevalecem propriedades de menores dimensões na região Sul (Paraná, Santa Catarina e partes do Rio Grande do Sul).

Figura 1 - Percentual de propriedades rurais que utilizam agrotóxicos, por município (2017).



Fonte: Imagem Censo Agropecuário de 2017, adaptado por Moraes (2019).

Os dados indicam que o Brasil está entre os países que mais intensificaram o uso de agrotóxicos para cada hectare de área cultivada. Outro dado relevante é o ingrediente ativo mais vendido no Brasil. A Tabela 1 apresenta os ingredientes, a quantidade usada, a classificação de toxicidade e periculosidade ao meio ambiente. O glifosato é líder de vendas com 266 mil toneladas de ingredientes ativos usados na agricultura no ano de 2022. Acredita-se que estes dados sejam reflexo da flexibilização do governo com a ausência de legislação restritiva para agrotóxicos (IBAMA, 2022).

Tabela 1 - Agrotóxicos mais comercializados no Brasil: quantidade, classificação e periculosidade (2020).

Ingrediente ativo	Classificação Toxicológica	Periculosidade Ambiental	Quantidade (1mil toneladas)	Posição Ranking
Glifosato e seus sais	IV	III	246.017,40	1
2,4-D	I	III	57.597,60	2
Mancozebe	I	III	50.526,90	3
Atrazina	III	II	33.321,10	4
Acetato	III	II	29.982,50	5
Clorotalonil	IV	II	24.191,00	6
Malationa	V	II	15.702,10	7
Enxofre	III	IV	11.390,90	9
Imidacloprido	IV	IV	9.401,60	10
Total/ano			478.131,10	

Fonte: IBAMA (2022).

Legenda: 1) Classificação toxicológica (Agência Nacional de Vigilância – Anvisa): extremamente tóxico (I), altamente tóxico (II), medianamente tóxico (III) e pouco tóxico (IV). 2) Periculosidade ambiental (Ibama): altamente perigoso (I), muito perigoso (II), perigoso (III) e pouco perigoso (IV).

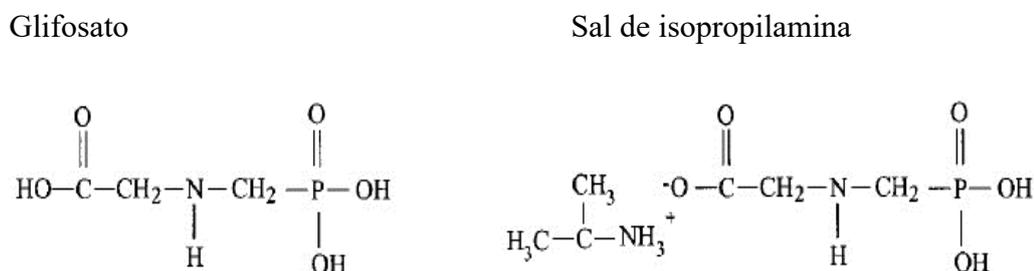
Segundo a FAO (2021), os agrotóxicos causam danos ao meio ambiente com a contaminação dos recursos hídricos e do solo, poluição dos ecossistemas aquáticos e a bioacumulação em peixes e crustáceos. A letalidade em abelhas, que são responsáveis pela polinização de 75% de todas as plantas com flores que estão disponíveis no planeta tem despertado a atenção (Sánchez-Bayo *et al.*, 2016; Butcherine *et al.*, 2019). Além dos riscos ambientais, o uso inadequado e indiscriminado de agrotóxicos pode resultar em sérios riscos para a saúde humana. A exposição direta ou indireta a agrotóxicos pode causar intoxicações em trabalhadores agrícolas, residentes próximos a áreas de cultivo e consumidores de produtos contaminados. Na população brasileira, o Ministério da Saúde registrou intoxicação por agrotóxico agrícola em 2022, sendo que no Estado de Santa Catarina foram 153 casos, Rio Grande do Sul 309 casos e Paraná 540 casos. Somente a região Sul representa 30% das notificações, sendo um dado importante de saúde pública para os gestores. A média anual do consumo de agrotóxicos no Brasil por habitante é 7,5 kg do produto (FAO,2021; SINAN, 2022).

2.1.1 Herbicida à base de glifosato

A indústria Monsanto descobriu as propriedades do glifosato para uso como herbicida na agricultura e lançou a formulação comercial Roundup® em 1974; seu baixo custo popularizou a comercialização como “mata mato” e, com o término dos direitos de patente em 2005, muitas indústrias químicas começaram a fabricar herbicidas contendo glifosato, transformando-o no produto mais comercializado no mercado mundial de agrotóxicos.

O glifosato [N-(fosfonometil)glicina] é um herbicida sistêmico, pós-emergente e não seletivo, largamente utilizado na agricultura. Integrante da classe química dos organofosforados, o glifosato pertence ao grupo químico dos aminoácidos fosfonatos. O Roundup® é composto por sal de isopropilamina de N-(Fosfonometil) glicina com 480 g/L (48,0% m/v), equivalente ácido de N-(Fosfonometil) glicina (Glifosato) com 360 g/L (36,0% m/v) e ingredientes inertes com 684 g/L (68,4% m/v). (Coutinho; Mazo, 2005; Valavanidis, 2018). A fórmula estrutural do glifosato e de seu sal de isopropilamina são mostradas na Figura 2.

Figura 2 - Fórmula estrutural do glifosato e do sal de isopropilamina, presente na formulação Roundup®.



Fonte: Adaptado de Williams (2000).

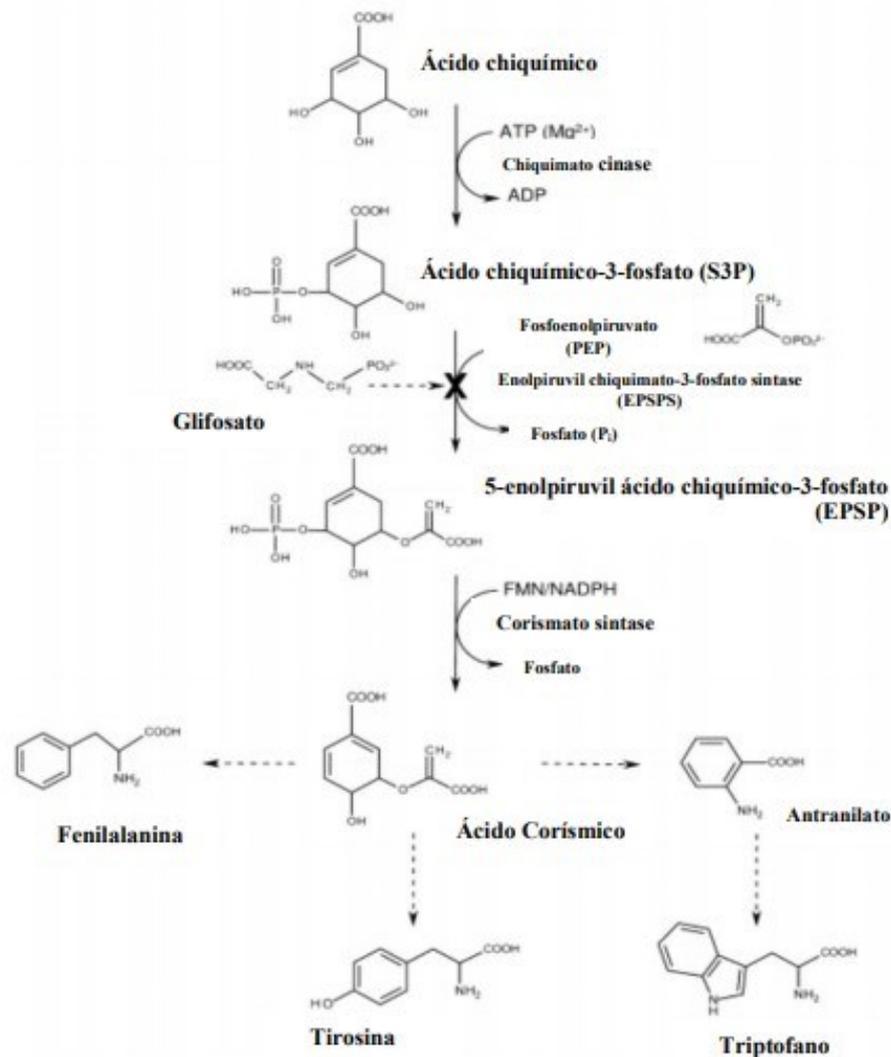
A estrutura química do glifosato é composta por grupamentos funcionais de fosfonato, amino e carboxilato. O grupamento fosfonato R-PO(OH)₂, tem a habilidade de formar complexos fortes com metais nos processos de adsorção, fotodegradação e biodegradação dos fosfonatos. Na presença de íons metálicos eles são modificados e podem formar complexos solúveis e não solúveis. Os grupamentos amino e carboxilato também se ligam fortemente com íons metálicos, especialmente com os metais de transição em pH próximo de neutro onde os grupos carboxilato e fosfonato estão desprotonados. A presença de água dura, contendo cátions como ferro, zinco, estrôncio, cálcio e magnésio, na solução “spray” de glifosato, pode resultar na formação de sais complexos insolúveis, que não são absorvidos pelas plantas, reduzindo a eficácia da aplicação do composto e que podem causar alterações renais com desenvolvimento de doença renal crônica (Coutinho; Mazo, 2005; Jayasumana; Gunatilake; Senanayake, 2014). O surfactante presente na formulação Roundup® é o polioxietilenoamina (POEA) uma mistura de alquilaminas de cadeia longa polietoxiladas sintetizadas a partir de ácidos graxos (Williams, 2000; Mesnage *et al.*, 2013).

O consumo excessivo e a sua popularização para uso doméstico parece ser uma marca registrada do herbicida Roundup®; seu uso é banalizado no controle de ervas daninhas (mata-mato) em parques, jardins e até mesmo em calçamentos com gretas. O uso de agrotóxicos exige “padrões específicos de comercialização”. A Lei dos Agrotóxicos nº 7.802 de 11 de julho de 1989 determina que os agrotóxicos sejam comercializados com receituário agrônomo, semelhante os medicamentos. A receita deve ser emitida por engenheiro agrônomo e precisa conter o nome do usuário, da propriedade e sua localização, o diagnóstico, o nome do produto que deverá ser utilizado, dosagens e quantidades totais. A falta de fiscalização dos estabelecimentos comerciais faz com que o acesso a compra do produto seja facilitado, mesmo com a legislação vigente, e há uma tendência crescente e desenfreada de aumento do consumo do agrotóxico Roundup®, considerando-se que a grande maioria das plantas geneticamente modificadas é tolerante. Em cultivos transgênicos resistentes ao glifosato (pós-emergentes), ele é aplicado em grande quantidade com o intuito de remover ervas daninhas sem causar danos às plantações. Porém, cabe ressaltar que consumo elevado se deve principalmente a liberação da soja transgênica no Brasil em 2005, refletindo no alto consumo atual (Valavanidis, 2018).

2.2 MECANISMO DE AÇÃO E DEGRADAÇÃO DO GLIFOSATO

O mecanismo de ação do glifosato em plantas, algas, bactérias e fungos se dá pela inibição da via do Chiquimato, responsável pela síntese de aminoácidos essenciais ao desenvolvimento das plantas. A enzima chave dessa via é a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS) como descrito na Figura 3. Ela desempenha um papel fundamental na biossíntese do intermediário corismato, necessário para a síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais fenilalanina, tirosina e triptofano. Como esta enzima EPSPS é ausente em mamíferos, acreditava-se que não haveria efeitos tóxicos relacionados ao glifosato; entretanto, a segurança do uso de glifosato tem sido amplamente debatida. Estudos mostram que o glifosato é capaz de inibir outras enzimas presentes em mamíferos como a aromatase, uma enzima do grupo do citocromo P450 (CYP450), responsável pela síntese de estradiol, atuando como desregulador endócrino (Barry, 1994; Zhang *et al.*, 2020).

Figura 3 - Mecanismo de ação do glifosato em plantas.



Fonte: Adaptado de Valavanidis (2018).

A biossíntese de aminoácidos nas plantas é realizada pela enzima enolpiruvilchiquimato fosfato sintase (EPSPS) que catalisa a reação do chiquimato-3-fosfato (S3P) e fosfoenolpiruvato (PEP) para produzir 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico (Pi). A reação ocorre em duas etapas, inicialmente a enzima EPSPs se liga ao S3P, formando o complexo EPSPs-S3P e, posteriormente, o PEP se encaixa nesse complexo, permitindo o prosseguimento da reação produzindo EPSP. O glifosato não se liga à enzima livre, mas ao complexo EPSPs-S3P, impedindo a ligação de PEP, formando o complexo inativo EPSPS-S3P-glifosato. O glifosato é um inibidor competitivo que se liga ao complexo EPSPS-S3P inibindo a biossíntese de aminoácidos essenciais a planta. A EPSP é um precursor para a

formação de corismato, a molécula base para biossíntese dos aminoácidos (triptofano, tirosina e fenilalanina), levando a distúrbios metabólicos incluindo diminuição da síntese proteica; inibição da formação de compostos secundários e desregulação da via do chiquimato. Quando o glifosato inibe a EPSP sintase chiquimato, o substrato desfosforilado da enzima se acumula nas folhas, flores e raízes (Devine *et al.*, 1993; Herrmann, 1995; Kruse *et al.*, 2000). A rota de degradação de glifosato é a conversão de glifosato a ácido aminometilfosfônico (AMPA) pela ação de enzimas como as oxidoredutases, transaminases e ácido glioxílico (Andrighetti *et al.*, 2014).

2.2.1 Toxicidade do glifosato

O glifosato é o princípio ativo mais comercializado dentre todos os agrotóxicos no Brasil e está presente nos principais cultivos da monocultura brasileira, como a soja, o milho e a cana-de-açúcar (IBAMA, 2020). A legislação nos países da União Europeia permite que apenas 0,1 µg/L de glifosato esteja contido na água consumida pela população. No Brasil, o limite permitido é 500 µg/L da água potável, um valor cinco mil (5.000) vezes maior que o permitido na comunidade europeia (Moreira *et al.*, 2012; Bombardi, 2017; Moraes, 2019; Freitas; Regino, 2020). Os estudos de toxicidade aguda consideram a toxicidade via oral (>5000 mg/kg/massa corporal), toxicidade via dérmica (>2000/kg/massa corporal) e por via intraperitoneal (134-545 mg/kg/massa corporal) (Bradberry; Proudfoot; Vale, 2004; WHO, 2009). A ANVISA classificou o glifosato quanto a periculosidade ao meio ambiente como perigoso Classe III e quanto a classificação toxicológica como pouco tóxico Classe IV, fato que faz muitos agricultores negligenciarem o uso de equipamentos de proteção individual por acharem que o produto é inofensivo à saúde. A IARC classifica o glifosato como agente da categoria 2A provável agente carcinogênico em humanos e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) classifica o herbicida no Grupo “E” carcinogênico. O glifosato está entre os principais compostos tóxicos para os organismos vivos e induz estresse oxidativo. Seu principal metabólito, o AMPA, é frequentemente encontrado no solo, águas superficiais e subterrâneas. Estudos de toxicidade em peixes (carpas jovens) *revelaram* que o que herbicida a base glifosato Roundup® causa alterações hematológicas como imunossupressão e anemia, mesmo em doses baixas de glifosato (0,005 mg /L) causa aumento da mortalidade e

malformações podendo alterar populações dessa biodiversidade (Fiorino *et al.*, 2018; Kondera *et al.*, 2018).

2.2.2 Efeitos da exposição ao glifosato em organismos vivos

A exposição contínua aos agrotóxicos tem despertado um interesse crescente nos potenciais efeitos tóxicos do glifosato na formulação Roundup® e seus produtos de degradação, à medida que se acumulam no meio ambiente, e pela exposição prolongada em organismos vivos, incluindo seres humanos. Em animais aquáticos, um estudo francês realizado pelo departamento de águas dos Pirenéus Orientais, mostrou que a contaminação da água onde vivem tartarugas jovens alterou a expressão de genes e os biomarcadores de estresse oxidativo causando a morte dos animais. Os resultados indicam a péssima qualidade da água e ameaça a resistência das tartarugas que são menos sensíveis a contaminantes do que os anfíbios. Estudos experimentais com concentrações 50 µg/mL na exposição por 48h reportam a toxicidade aguda em embriões de zebrafish causando malformações como edema no pericárdio e defeitos oculares (Héritier *et al.*, 2017).

Cattani e colaboradores (2017) demonstraram que a exposição materna em ratos Wistar ao glifosato durante os períodos pré e pós-natal até 15 dias de vida da prole, leva à sobrecarga de cálcio e excitotoxicidade glutamatérgica em hipocampo de ratos imaturos. Sendo que a exposição subcrônica em ratos adultos com sessenta dias de idade resultou no comportamento tipo-depressivo dos animais. A exposição perinatal ao glifosato também causou hepatotoxicidade associada a inflamação e acúmulo de ferro na medula óssea e no fígado dos filhotes imaturos (Rieg *et al.*, 2022). Estudos experimentais de exposição crônica por 28 dias em ratos Wistar, usando doses permitidas pelas agências reguladoras de saúde, exposição ocupacional aceitável (AOEL) e 0,5 mg/kg/dia dose diária aceitável por massa corpórea (IDA), causaram redução da massa corporal dos grupos tratados em relação ao grupo controle, dano ao DNA de células hepáticas e leucócitos. A atividade da acetilcolinesterase foi inibida mesmo no tratamento com doses baixas, demonstrando a toxicidade do glifosato. Em estudos com populações de zangões, a exposição ao glifosato causou alteração na espermatogênese (Hoopman *et al.*, 2018; Milić *et al.*, 2018; Gaur; Bhargava, 2019).

Estudos experimentais em ratos adultos nutridos por 2 anos com milho geneticamente modificado cultivado com herbicida à base de glifosato, indicam claramente que níveis mais

baixos de formulações completas de herbicidas agrícolas com o constituinte glifosato em concentrações bem abaixo dos limites de segurança estabelecidos oficialmente, pode induzir graves distúrbios mamários, hepáticos e renais hormônio-dependentes (Séralini *et al.*, 2014)

Um estudo experimental em ratas Wistar adultas com administração intraperitoneal de Roundup® (269,9 mg/kg) por 14 dias induziu dano aos hepatócitos. A depleção significativa dos níveis de GSH mostra a indução de estresse oxidativo, níveis elevados de lipoperoxidação corroborando o potencial do Roundup® para induzir estresse oxidativo no tecido hepático. A exposição aguda ao HBG promoveu a inflamação confirmada pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos tratados (El-Shenawy, 2009).

Em répteis, como o lagarto argentino (*Salvator merianae*), que vive em regiões agrícolas, a exposição a agrotóxicos causou imunossupressão. Em cultura de células com eritrócitos humanos causou danos ao DNA por hipermetilação (Kwiatkowska *et al.*, 2017; Fortes *et al.*, 2016; Mestre *et al.*, 2019). Estudos em animais demonstram que a exposição crônica ao herbicida a base de glifosato Roundup®, dose ambiental ultrabaixa 0.1 ppb Roundup® (50 ng/L glifosato) na água de beber, resultou em danos ao fígado e rins de roedores (Mesnage *et al.*, 2015).

As formulações comerciais a base do herbicida glifosato, em especial o Roundup® demonstraram causar nefrotoxicidade em ratos albinos adultos com administração via gavagem de Roundup® (248,4 mg/kg) por 12 semanas. O estresse oxidativo induzido pelo herbicida Roundup foi observado pela depleção da atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante. O mecanismo de peroxidação lipídica parece ser atribuível a uma interação direta das composições do herbicida com a membrana citoplasmática das células renais. O rompimento das membranas é o mecanismo molecular associado a toxicidade de vários compostos organofosforado. A exposição com Roundup® em ratas Wistar fêmeas adultas, via gavagem por 2 semanas com alta dose 500 mg/kg, decresce atividade enzimática do citocromo P450, o que resulta na perturbação da membrana plasmática em tecidos hepáticos e renais (Hietanen; Linnainmaa; Vaino, 1983; Dedeker *et al.*, 2018).

Em humanos, os estudos de toxicidade causada por agrotóxicos têm sido intensificados, o glifosato tem sido investigado em trabalhadores rurais e pessoas que vivem próximo a áreas rurais. A toxicidade aguda e crônica é o principal enfoque nessa população. A inalação é uma via secundária de exposição, em áreas rurais a névoa de spray pode causar desconforto oral ou nasal, um gosto desagradável na boca, ou formigamento e irritação na

garganta. Uma meta-análise incluiu 7 estudos de coorte e 14 casos controle associando o glifosato pelo menos a um tipo de câncer. Os resultados são consistentes com relação em casos totais em adultos e crianças em locais específicos com exposição ao glifosato (Mink *et al.*, 2012).

Foram encontradas correlações entre o aumento do uso de glifosato a ocorrência de abortos espontâneos, doenças dermatológicas e respiratórias na pulverização de plantações de coca na Colômbia, aumentos na infertilidade e malformação entre porcos foram correlacionados com as concentrações de glifosato no fígado e rins e com resíduos na ração (Krüger *et al.*, 2013; Camacho; Mejía, 2017; Van Bruggen *et al.*, 2018).

Em humanos o uso de glifosato tem relação com transtornos mentais como depressão e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), risco de melanoma em agricultores expostos e desenvolvimento de doença renal crônica (Jayasumana; Unatilake; Senanayake, 2014; Fluegge; Fluegge, 2015; Jayasumana *et al.*, 2017).

A intensa preocupação com o uso exacerbado dos agrotóxicos reforçou as preocupações em relação a saúde da população mundial, em 2015 a OMS e IARC realizaram estudos que tem evidência científica sobre a carcinogenicidade de cinco ingredientes ativos de agrotóxicos. Um dos principais é o herbicida glifosato, classificado como provável agente carcinogênico para humanos (Grupo 2A). Contudo, anteriormente, a literatura relatava a incidência de intoxicações agudas em humanos que causam irritação da pele e dos olhos, prurido, vômitos, diarreia, dificuldades respiratórias e convulsões. A exposição crônica aos agrotóxicos também é relatada tendo efeitos endócrinos, neurotóxicos, reprodutivos, imunológicos e câncer. Além disso, estudos relatam que herbicida a base de glifosato Roundup® gera patologias transgeracionais como doenças da próstata, obesidade, doença renal, doença ovariana e anormalidades no nascimento (Kubsad *et al.*, 2019; INCA, 2021).

Na década de 1990, uma epidemia de doença renal crônica de etiologia desconhecida surgiu em agricultores de uma área rural da província centro norte do Sri Lanka. A doença acometeu 15% da população, totalizando 400.000 mil doentes e 20.000 mortes, acendendo um alerta para OMS. O estudo constatou que o uso de fertilizantes (composição arsênico e cádmio) no solo transformam a água em água dura, a qual reage com agrotóxicos formando complexos metálicos que são nefrotóxicos e causam doença renal. Nesse estudo, podemos observar que, vinte anos após a exposição, a evolução das doenças renais é evidente em trabalhadores da região rural, havendo a necessidade de compreender se há predisposição na exposição aos herbicidas desde

o período de desenvolvimento até a infância no comprometimento precoce da função renal e causa de doenças renais na idade adulta. Dando continuidade do estudo anterior, foi demonstrado uma epidemia nas comunidades agrícolas de Nefrite Intersticial Crônica relacionada a pulverização e contaminação do solo por agrotóxicos (Jayasumana; Gunatilake; Senanayake, 2014; Jayasumana *et al.*,2017). Um estudo exposição ocupacional de trabalhadores rurais que usam o agrotóxico glifosato em Maravilha/Brasil detectou elevação dos níveis de creatinina, pode ser indicativo de insuficiência renal sem diagnóstico (ZANCHI *et al.*,2023).

2.3 MORFOLOGIA E FISIOLOGIA RENAL

O rim é um dos órgãos mais bem caracterizados na biologia do desenvolvimento, os rins de mamíferos se desenvolvem de forma semelhante, porém o tempo varia de acordo com a espécie. Durante o período de desenvolvimento renal em ratos, a nefrogênese inicia no 12º dia de gestação e finaliza no período pós-natal (11-15 dias PND) (Gobetto *et al.*, 2020). Durante o desenvolvimento renal, a nefrogênese está dividida em dois períodos, o período de formação glomerular em torno de 17 dias de gestação e o período de proliferação celular que ocorre após o nascimento até o 10º dia pós-natal com a nefrogênese completa (Larsson *et al.*, 1980). Comparando o desenvolvimento renal em humanos, o rim humano de neonato de 0 a 28 dias corresponde em ratos do 1º ao 7º dia de vida e crianças de 28 dias até 2 anos corresponde aos rins de ratos imaturos do 8º ao 21º dia de vida. Os períodos pré-natais e pós-natais são usados pois compreendem marcos do desenvolvimento funcional do rim para estudos de toxicidade. É neste período que o rim é vulnerável a exposição de produtos químicos como os agrotóxicos. Dependendo da idade de exposição, a administração do agente tóxico pode resultar em anomalias renais ou malformações, nefrotoxicidade, alterando o funcionamento renal.

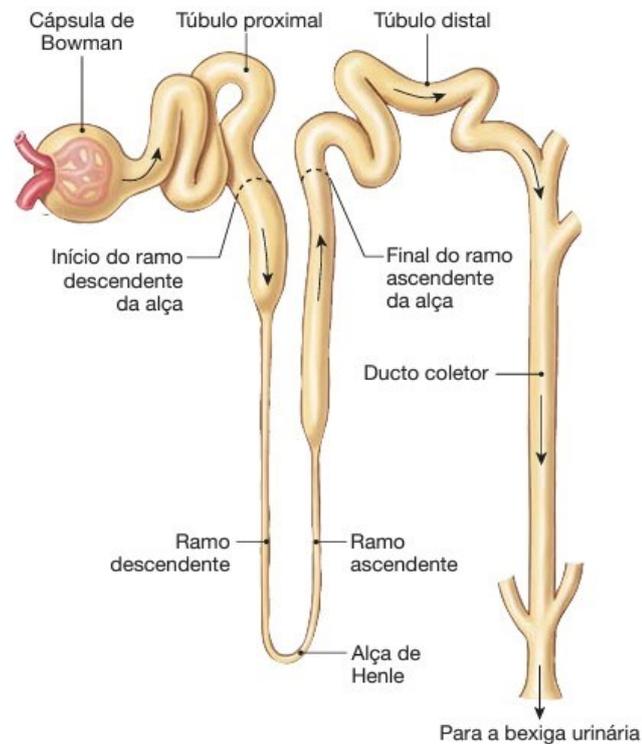
O rim é revestido externamente por uma cápsula de tecido conjuntivo denso rico em fibras elásticas, abaixo da cápsula, a região externa é denominada região cortical, onde estão os corpúsculos renais, os túbulos contorcidos proximais e distais. Na parte interna está localizada a região medular onde fica a alça de Henle (Seely, 2017; Gobetto *et al.*, 2020).

As principais funções do rim são a regulação da pressão arterial a longo prazo, pela excreção de quantidades variáveis de sódio e água e a curto prazo pela secreção de hormônios

e fatores ou substâncias vasoativas (ex., renina) que levam à formação de produtos vasoativos (ex., angiotensina II) renais. Atuam na regulação do equilíbrio ácido-base conjuntamente com os pulmões e os tampões dos líquidos corporais, pela excreção de ácidos e pela regulação dos estoques de tampões dos líquidos corporais. Eliminam ácidos fixos, gerados principalmente pelo metabolismo das proteínas. Os rins regulam a produção de eritrócitos através da secreção de eritropoietina, que estimula a produção de hemácias pelas células-tronco hematopoiéticas na medula óssea. São responsáveis pela regulação das concentrações da 1,25-Di-hidroxitamina D3 (calcitriol), pela 1 α -hidroxilase. Em períodos de jejum prolongado, os rins sintetizam glicose a partir de aminoácidos e outros precursores, pela gliconeogênese. A capacidade dos rins de adicionar glicose ao sangue durante períodos prolongados de jejum, equivale à do fígado (Guyton; Hall, 2017).

Os rins são constituídos por unidades funcionais denominadas néfrons. O néfron é constituído pelo corpúsculo renal, túbulo contorcido proximal, alça de Henle, túbulo contorcido distal e os ductos coletores (Figura 4) (Junqueira; Carneiro, 2013). Parte dos corpúsculos localiza-se próximo à junção corticomedular, fazendo parte dos néfrons justamedulares e os outros são chamados néfrons corticais. Todos os néfrons participam dos processos de filtração, absorção e secreção. Os néfrons justamedulares desempenham o importante papel de estabelecer um gradiente de hipertonicidade no interstício da medula renal, que é base funcional para os rins produzirem urina hipertônica. Os néfrons justamedulares têm alças de Henle muito longas, estendendo-se até a profundidade da medula renal. Essas alças têm segmentos espessos curtos, e segmento delgado longo, tanto descendente quanto ascendente. Os néfrons corticais têm alças de segmento delgado descendente muito curto, sem segmento delgado descendente.

Figura 4 - Néfron.



Fonte: Adaptado de Silverthorn (2017).

Legenda: Estrutura do néfron formada pelo Corpúsculo renal (Cápsula de Bowman e Glomérulo), Túbulo contornado proximal, Alça de Henle, Túbulo contornado dista e ducto coletor.

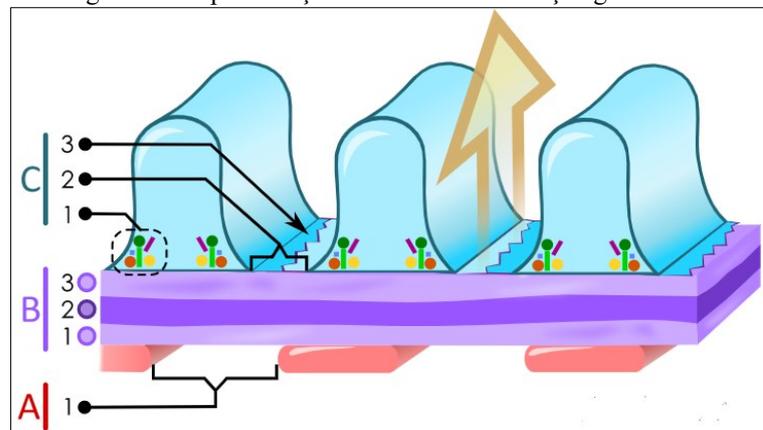
O Corpúsculo renal/corpúsculo de Malpighi é formado pelo glomérulo renal (tufo de capilares) e pela Cápsula de Bowman. A cápsula é formada por um saco epitelial que envolve o glomérulo e apresenta dois folhetos, um parietal e outro visceral. Entre os dois folhetos encontra-se o espaço de Bowman ou capsular que capta o filtrado glomerular (Montanari, 2016).

Os podócitos são as células do folheto interno ou visceral e formadas pelo corpo celular, de onde partem diversos prolongamentos primários que dão origem aos prolongamentos secundários. Os podócitos contêm actina, apresentam mobilidade e localizam-se sobre uma membrana basal. Seus prolongamentos envolvem completamente o capilar, e o contato com a membrana basal é feito pelos prolongamentos secundários. Os podócitos se prendem à membrana basal por meio das proteínas denominadas integrinas. Entre os prolongamentos secundários dos podócitos existem espaços denominados fendas de filtração, fechados por uma membrana com cerca de 6 nm de espessura constituída pela proteína nefrina

que se liga transmembrana com os filamentos citoplasmáticos de actina dos podócitos. Os capilares glomerulares são do tipo fenestrado, sem diafragmas nos poros das células endoteliais (Junqueira; Carneiro, 2013).

A membrana basal glomerular é uma membrana localizada entre as células endoteliais e os podócitos. A membrana basal glomerular humana é constituída por três camadas: membrana basal rara interna situada próximo às células endoteliais; a lâmina densa, mais elétron-densa; e a lâmina rara externa localizada mais externamente ao lúmen do capilar e, portanto, em contato com os podócitos como podemos observar na Figura 5.

Figura 5 – Representação da barreira de filtração glomerular.

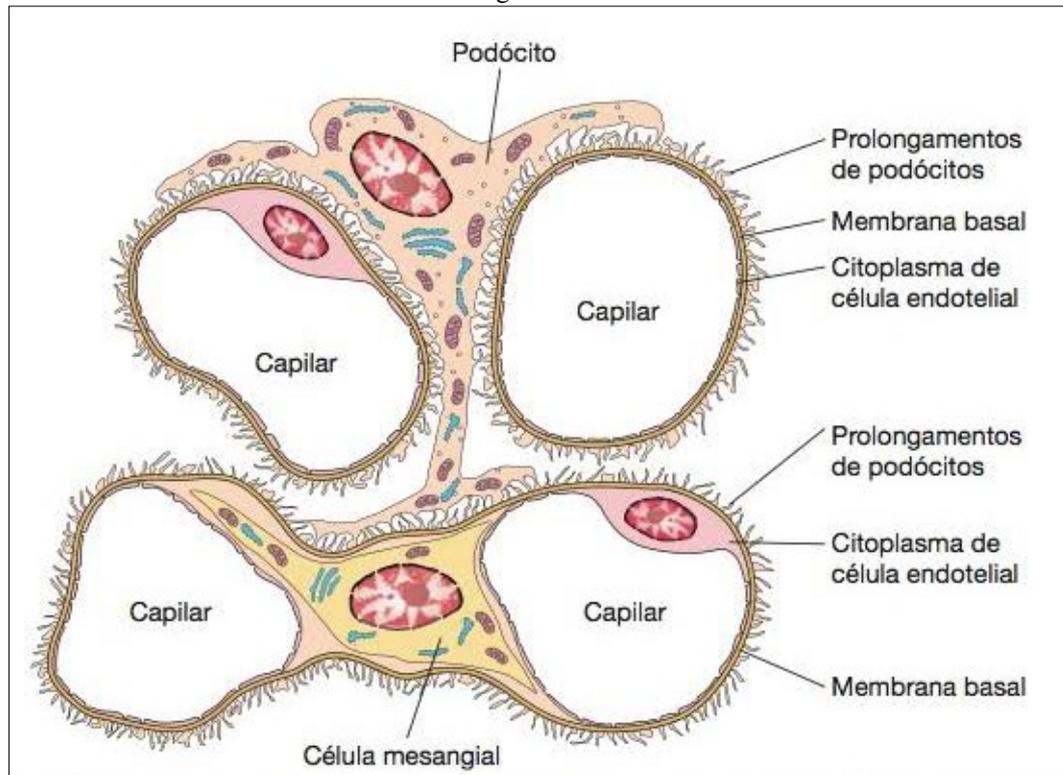


Fonte: Michal Komorniczak (Poland) (2009).

Legenda: A) Células endoteliais glomerulares: 1 – Fenestra. B) Membrana basal glomerular: 1 – Lâmina rara interna. 2 – Lâmina densa. 3 – Lâmina rara externa. C) Podócitos: 1 – Proteína nefrina. 2 - Fenda de filtração. 3 – Diafragma/abertura.

As células mesangiais e a matriz mesangial formam a região glomerular denominada mesangium (região entre vasos). As células mesangiais estão mergulhadas em uma matriz mesangial, há pontos em que a lâmina basal não envolve toda a circunferência de um só capilar, constituindo uma membrana comum a duas ou mais alças capilares. É principalmente nesse espaço entre os capilares que se localizam as células mesangiais (Figura 6). Elas podem também ser encontradas na parede dos capilares glomerulares, entre as células endoteliais e a lâmina basal (Migliorini *et al.*, 2013). As propriedades contráteis das células mesangiais permitem que participem do controle do fluxo capilar intraglomerular, da área de ultrafiltração glomerular e, conseqüentemente, da taxa de filtração glomerular em cada néfron.

Figura 6 - Representação esquemática que mostra capilares glomerulares e a localização de podócito e a célula mesangial entre eles.

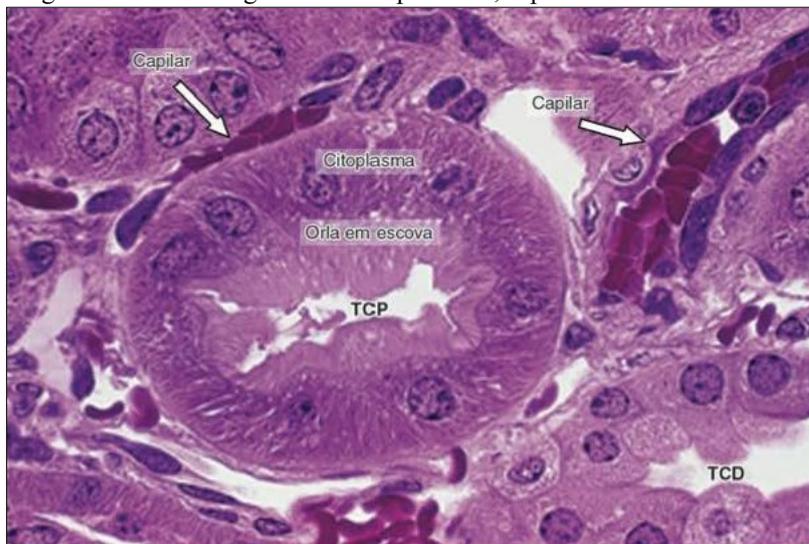


Fonte: Junqueira e Carneiro (2013).

Legenda: Nota-se no esquema que tanto a célula mesangial quanto os dois capilares estão envoltos pela mesma membrana basal.

O túbulo contorcido proximal tem sua parede composta por um epitélio cúbico simples, apresentando uma grande quantidade de microvilosidades (“Borda em escova”) na superfície apical (Figura 7). O limite entre essas células é impreciso, e o lúmen é estreito, se comparado com o lúmen do túbulo contorcido distal. As células do túbulo proximal têm o citoplasma basal fortemente acidófilo em razão de numerosas mitocôndrias alongadas. O citoplasma apical apresenta microvilos, que formam a orla/borda em escova. Como as células são largas, em cada corte transversal de um túbulo proximal aparecem apenas três a quatro núcleos esféricos. Os túbulos proximais apresentam lumens amplos e são circundados por muitos capilares sanguíneos. O citoplasma apical das células dos túbulos proximais contém canaliculos que partem da base dos microvilos e aumentam a capacidade de o túbulo proximal absorver macromoléculas. Nos canaliculos se formam vesículas de pinocitose, que introduzem na célula macromoléculas que atravessaram a barreira de filtração glomerular, principalmente proteínas com massa molecular abaixo de 70 kDa.

Figura 7 - Fotomicrografia Túbulo proximal, capilares e borda em escova.



Fonte: Adaptado de Junqueira e Carneiro (2013).

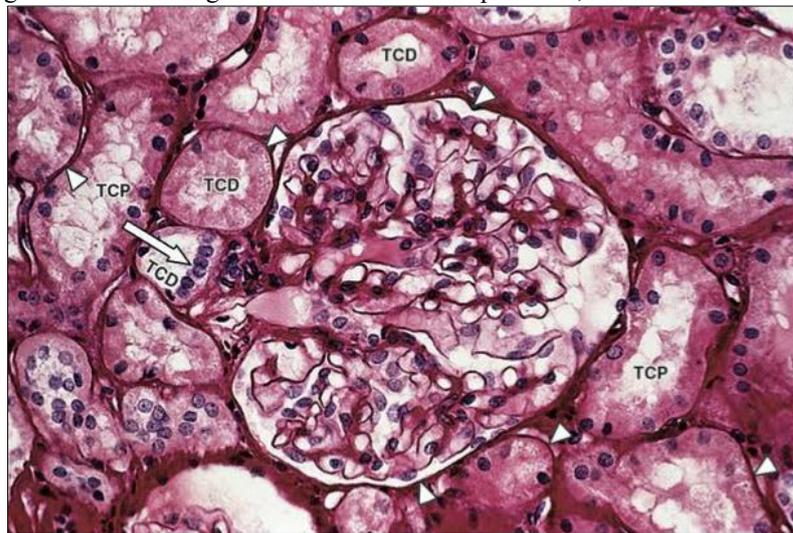
Legenda: Fotomicrografia do preparado histológico *em* resina sintética. Note na cortical do rim: capilares contendo hemácias, um túbulo contorcido proximal (TCP) com suas células cuboides volumosas e acidófilas, apresentando orla *em* escova formada por numerosos microvilos paralelos e bem preservados pela técnica histológica. Observe também parte de túbulo contorcido distal (TCD). Compare as características do túbulo proximal com as do distal. Pararosanilina e azul de toluidina. (Grande aumento).

A alça de Henle é uma estrutura em forma de U que consiste em um segmento delgado interposto a dois segmentos espessos. Na parte mais externa da medula, o segmento espesso descendente da alça de Henle, com um diâmetro externo de 60 μm , estreita-se para um diâmetro de 12 μm e se continua como a parte descendente delgada da alça. O lúmen deste segmento do néfron é largo, porque a parede da alça é formada por epitélio simples pavimentoso. A alça de Henle participa da retenção de água; apenas os animais com essas alças são capazes de produzir urina hipertônica, e assim poupar a água do corpo, conservando-a conforme as necessidades. A alça de Henle cria um gradiente de hipertonidade no interstício medular que influencia a concentração da urina, à medida que ela passa pelos ductos coletores. Embora o segmento delgado descendente da alça de Henle seja completamente permeável à água, o segmento ascendente inteiro é impermeável à água. No segmento espesso ascendente, o cloreto de sódio é transportado ativamente para fora da alça, para estabelecer o gradiente medular já mencionado e que é necessário para concentrar a urina. A osmolaridade do interstício renal nas extremidades das pirâmides (medula renal) é aproximadamente quatro vezes maior do que a do sangue.

O túbulo contorcido distal (TCD) é revestido por epitélio cúbico simples, observa-se a mácula densa, região em que o TCD se encosta ao corpúsculo renal do mesmo néfron, modificando a parede do túbulo neste ponto. As células tornam-se cilíndricas altas, com núcleos

alongados e próximos uns dos outros. Após curto trajeto na cortical, a parte espessa da alça de Henle toma-se tortuosa e passa a se chamar túbulo contorcido distal, também revestido por epitélio cúbico simples. Nos cortes histológicos, a distinção entre os túbulos contorcidos distais e os proximais, ambos encontrados na cortical e formados por epitélio cúbico, baseia-se nos seguintes dados: suas células são menores (maior número de núcleos em cada corte transversal), não têm orla em escova e são menos acidófilas (contêm menor quantidade de mitocôndrias) (Figura 8).

Figura 8 - Fotomicrografia Túbulo contorcido proximal, distal e mácula densa.



Fonte: Adaptado de Junqueira e Carneiro (2013).

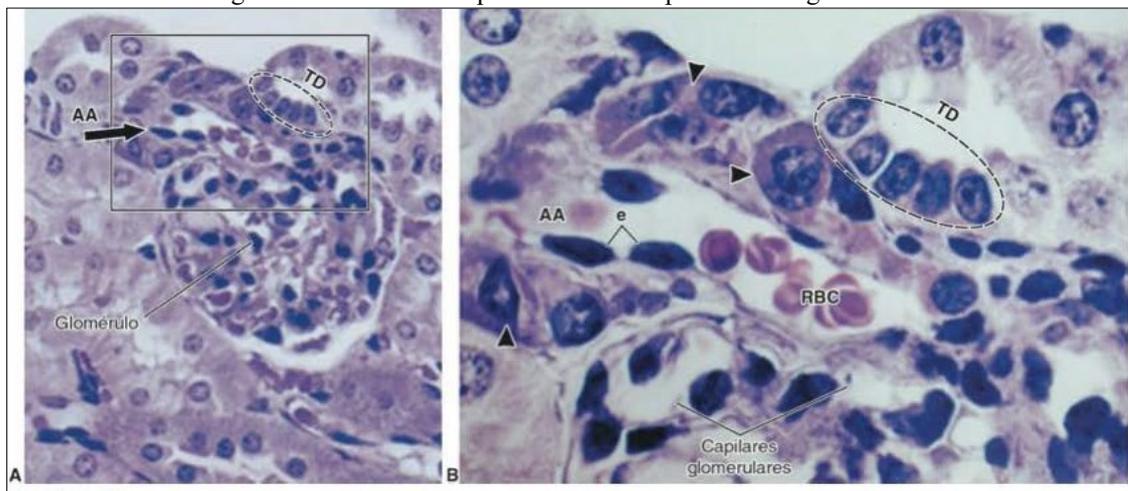
Legenda: Fotomicrografia da camada cortical do rim, que mostra um corpúsculo renal, túbulos contorcidos proximais (TCP) e distais (TCD). A seta aponta para a mácula densa do túbulo distal encostado ao polo vascular de corpúsculo renal do mesmo néfron. A mácula é formada por células epiteliais do TCO mais estreitas, cujos núcleos ficam muito próximos. Note também as membranas basais dos capilares glomerulares e as dos túbulos renais (*pontas de seta*). (Coloração pelo picrossirius-hematoxilina). Médio aumento.

Os ductos coletores são formados por epitélio que varia de cúbico a cilíndrico simples. A urina passa dos túbulos contorcidos distais para os túbulos coletores, que desembocam em tubos mais calibrosos, os ductos coletores, que se dirigem para as papilas. Tanto os túbulos como os ductos coletores seguem um trajeto retilíneo. Em toda a sua extensão, os tubos coletores são formados por células com citoplasma que se cora fracamente pela eosina e cujos limites intercelulares são nítidos.

O aparelho justaglomerular (AJG) é formado por um componente vascular (arteríola aferente e eferente), um componente tubular (mácula densa) e pelo mesângio extraglomerular. É uma estrutura próxima ao corpúsculo renal, a arteríola aferente e eferente não tem membrana elástica interna e suas células musculares apresentam-se modificadas (Figura 9). Elas são

chamadas justaglomerulares (JG) ou células granulares têm núcleos esféricos e citoplasma carregado de grânulos de secreção de renina. A secreção desses grânulos participa da regulação da pressão do sangue. O AJG é parte de um complexo mecanismo de feedback que regula o fluxo sanguíneo renal (feedback tubuloglomerular) e a taxa de filtração glomerular e, indiretamente, modula o balanço de sódio e a pressão sanguínea sistêmica, através do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Gonzalez et al, 2018) . As células com citoplasma claro são denominadas células mesangiais extraglomerulares.

Figura 9 - Estruturas Corpúsculo renal e Aparelho Justaglomerular.



Fonte: Adaptado de Junqueira e Carneiro (2013).

Legenda: Fotomicrografias de corpúsculo renal que mostram glomérulo e o aparelho justaglomerular. Tanto em A quanto em B podem-se notar o aparelho formado pela mácula densa (*elipse tracejada*) do túbulo contorcido distal (TCD) e as células justaglomerulares (JG) (produtoras de grânulos de renina), intensamente coradas (*pontas de seta*) na parede da arteríola aferente (M). No detalhe B notam-se: a proximidade dos núcleos das células mais estreitas da mácula densa; a coloração intensa das células JG (*pontas de seta*), devido ao acúmulo de grânulos de secreção; endotélio (e) da arteríola aferente e hemácias (RBC) no seu lúmen. (Hematoxilina-eosina. A. Pequeno aumento. B. Médio aumento.).

2.4 FORMAÇÃO DA URINA PELOS PROCESSOS DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

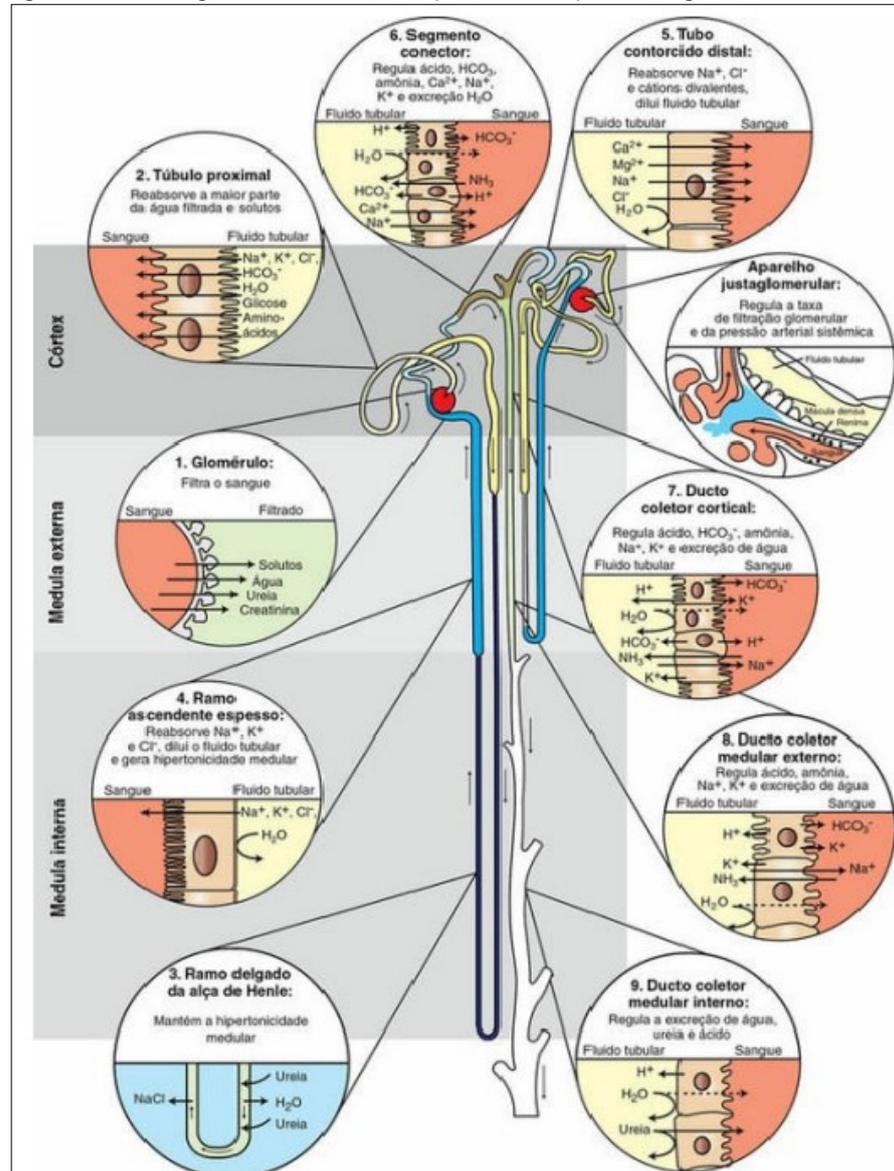
2.4.1 Filtração Glomerular

A formação de urina é realizada pela filtração de grandes quantidades de plasma nos capilares glomerulares para cápsula de Bowman, cerca de 180 litros ao dia. A maior parte desse filtrado é reabsorvida deixando em torno de 1 litro de líquido para excreção diária (Guyton; Hall, 2017).

A membrana capilar glomerular apresenta três camadas principais: o endotélio capilar, a membrana basal; e a camada de células epiteliais (podócitos), sobre a superfície externa da membrana basal capilar. A união das três camadas compõe uma barreira à filtração que filtra água e solutos com grande intensidade. Porém, mesmo com a alta intensidade da filtração, a membrana capilar glomerular normalmente não filtra proteínas plasmáticas. A alta intensidade da filtração pela membrana capilar glomerular é decorrente, em parte, à sua característica especial. O endotélio capilar é perfurado por milhares de pequenos orifícios chamados fenestrações. Embora as fenestrações sejam relativamente grandes, as proteínas das células endoteliais são dotadas de cargas fixas negativas impedindo a passagem das proteínas plasmáticas. Revestindo o endotélio, está a membrana basal que consiste em uma trama de colágeno e fibrilas proteoglicanas com grandes espaços, pelos quais grande quantidade de água e de pequenos solutos pode ser filtrada. A membrana basal evita de modo eficiente a filtração das proteínas plasmáticas, em parte devido às fortes cargas elétricas negativas associadas aos proteoglicanos. Por fim a última camada é composta de células epiteliais que recobre a superfície externa do glomérulo. Essas células não são contínuas, mas têm longos processos semelhantes a pés (podócitos) que revestem a superfície externa dos capilares. Os podócitos são separados por lacunas, chamadas fendas de filtração, pelas quais o filtrado glomerular se desloca. As células epiteliais, que também contêm cargas negativas, criam restrições adicionais para a filtração das proteínas plasmáticas. Assim, todas as camadas da parede capilar glomerular representam barreiras à filtração das proteínas do plasma.

O néfron é composto pelo glomérulo e seus segmentos renais tubulares e coletores associados, de onde as substâncias filtradas são absorvidas e para onde os componentes plasmáticos são excretados no fluido tubular (GUYTON; HALL, 2017). No córtex renal, os néfrons intercalam o sistema de ductos coletores que atravessam o rim e desembocam na pelve renal. A Figura 10 fornece uma visão geral da disposição anatômica dos néfrons dentro do rim e as principais funções do néfron, dos segmentos e do ducto coletor (CUNNINGHAM; BRADLEY, 2014).

Figura 10 - Visão geral anatômica, filtração e reabsorção nos segmentos do néfron.



Fonte: Adaptado de Cunningham e Bradley (2014).

Legenda: O glomérulo de um néfron justamedular está localizado profundamente no córtex, próximo à junção corticomedular. O ramo delgado da alça de Henle estende-se profundamente na medula interna. O glomérulo de um néfron superficial está localizado no córtex externo e a alça de Henle estende-se na medula externa. As setas indicam a direção do fluxo do fluido tubular. Os segmentos estão numerados na ordem sequencial de modificação do fluido tubular, iniciando pelo glomérulo.

O transporte de solutos nos epitélios tubulares ocorre em duas vias, a via transcelular, através das membranas luminal ou apical e basolateral e a via paracelular, através da junção estreitas e espaços intercelulares (FEEHALLY *et al.*, 2018).

Os mecanismos miogênicos e a taxa de filtração glomerular (TGF) são dependentes da sinalização extracelular de trifosfato de adenosina (ATP). O ATP é liberado das células durante o estiramento vascular e pode promover vasoconstrição via receptores purinérgicos P2Y6. O ATP também é o principal mediador de TGF, o aumento da liberação de NaCl para as derivações da mácula densa causa o aumento da captação de NaCl por essas células por meio de um cotransportador sensível à furosemida $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$, desencadeando a liberação de ATP do espaço extracelular. O ATP pode ter um efeito vasoconstritor direto sobre a arteríola aferente, ativando receptores purinérgicos P2X1 para despolarizar as células musculares lisas. No entanto, porque a mácula densa é anatomicamente separada da arteríola aferente pelo mesângio extraglomerular, o sinal final para estimular a TGF é a adenosina. Os receptores de adenosina A1 agem na arteríola aferente causando vasoconstrição. A sensibilidade do TGF é modulada por angiotensina II (Ang II), óxido nítrico (NO) e certos eicosanoides produzidos localmente (Guyton; Hall, 2017)

2.5 LESÃO RENAL E MARCADORES BIOQUÍMICOS

A lesão renal aguda (LRA) pode ser definida como uma perda ou redução da função renal súbita e inesperada, caracterizada pela rápida deterioração das funções tubular e glomerular, sendo relacionada com um rápido declínio na TGF, resultando no acúmulo de substâncias nitrogenadas como ureia e creatinina, com ou sem redução do volume urinário (Li *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2016; Parikh; Mansour, 2017). Os processos de injúria renal estão associados a lesões por isquemia-reperfusão, sepse e substâncias tóxicas. A nível celular há uma perda rápida da integridade do citoesqueleto das células tubulares proximais, escape de enzimas e micro proteínas para luz tubular, perda da borda em escova, alteração na polaridade celular, apoptose e necrose (Bonventre, 2010). A dependência da fosforilação oxidativa para produção de energia nas células tubulares as torna susceptíveis nos processos isquêmicos e a substâncias nefrotóxicas interrompendo a atividade mitocondrial e a produção de ATP (Siegel; Devarajan; Why, 1994).

Inicialmente, as alterações causadas pela Lesão renal aguda (IRA) são estruturais sendo detectáveis precocemente por marcadores que consigam detectar injúrias que alterem a composição morfológica renal. Para avaliar a lesão renal aguda foi utilizado a lipocalina gelatinase associada ao neutrófilo (NGAL), um biomarcador liberado após lesões renais agudas, onde seus níveis plasmáticos estão aumentados, quando há danos morfológicos e a presença de infiltrado de células do sistema imunológico no túbulo renal proximal (Castro *et al.*, 2016). A NGAL é uma proteína de 25 KDa e membro da família das lipocalinas secretada pelas células epiteliais do rim. Uma proteína formada e elevada na fase precoce do rim pós-isquêmico em modelo animal utilizando ratos. O NGAL foi detectável na urina de ratos com nefrotoxicidade induzida pela cisplatina (Peres *et al.*, 2013; Mansour *et al.*, 2017).

A Glutathione-S-transferase (GST) é um biomarcador renal que catalisa uma variedade de reações. A alfa GST é uma enzima citosólica presente nas células tubulares proximais, o aumento da proteinúria causado pela perda da borda em escova está associado com a redução da GST nas células do túbulo renal. Um aumento nas concentrações urinárias é um marcador de dano específico das células tubulares. A utilidade clínica da alfa GST urinária tem sido explorada como um meio de distinguir a necrose tubular aguda de outras causas de lesão renal aguda, sendo um preditor de nefrotoxicidade para compostos que afetam o rim (McMahon; Koynerb; Murray, 2010).

A gama-glutamil transferase (GGT) é uma enzima presente na borda em escova dos túbulos proximais e tem-se mostrado útil como marcador precoce de nefrotoxicidade. O aumento na excreção da GGT urinária é diagnóstico de lesão ou disfunção tubular renal. Administração de aurotiomalato de sódio para modelo de nefrotoxicidade em ratos Wistar causou dano tubular agudo seletivo com extravasamento da enzima e aumento da excreção urinária, porém a filtração glomerular foi mantida (Waring; Moonie, 2011).

Para avaliar a função renal a quantificação da creatinina sérica é um método tradicional de diagnóstico da lesão renal. Entretanto, as concentrações de creatinina sérica não se alteram até que uma quantidade significativa da função renal já tenha sido perdida, quando já ocorreu um maior grau de lesão renal com redução de pelo menos 30% da TFG, o que significa que a lesão renal já estava presente ou ocorreu antes que a creatinina sérica estivesse elevada. O exame é tradicionalmente utilizado na prática clínica, mas apresenta limitações na detecção precoce do dano renal devido a ser detectável quando 75% dos néfrons já estão acometidos (Castro *et al.*, 2016).

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas em seres humanos. O urato plasmático é filtrado livremente pelos glomérulos, mas a excreção fracional do ácido úrico filtrado é inferior a 10%. Isto demonstra a preponderância dos processos de reabsorção tubular em seres humanos, realizados principalmente pela proteína transportadora denominada URAT1 presente no túbulo contornado proximal. A ocorrência de hiperuricemia é decorrente da diminuição da excreção fracional do ácido úrico pelos rins ao longo dos anos ou décadas, gera um aumento da quantidade de ácido úrico no organismo, favorecendo a deposição de urato não só nas articulações, mas também em outros tecidos, principalmente os rins, e no endotélio vascular. Esses achados caracterizam o aumento dos níveis de ácido úrico no soro como um biomarcador na doença renal crônica (Bastos *et al.*, 2009).

A ureia é o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas, cerca de 90% da ureia é excretada no rim e correspondendo a aproximadamente 75% do nitrogênio não-proteico excretado. O restante da ureia é eliminado basicamente pelo trato gastrointestinal e pela pele. Ela é filtrada livremente pelo glomérulo e não pode ser reabsorvida nem secretada ativamente. A principal utilidade clínica da ureia tem determinação em conjunto com a creatinina. A razão ureia sérica/creatinina sérica pode indicar patologias renais. Valores baixos podem ser indicativo de necrose tubular aguda (Sodré; Costa; Lima, 2007).

2.6 PRODUÇÃO ENERGÉTICA, ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA ANTIOXIDANTE NO TECIDO RENAL

A produção de energia no metabolismo renal é decorrente da produção de ATP pelo processo de fosforilação oxidativa. A cadeia de transportadora de elétrons oxida NADH para produzir NAD^+ e $\text{FAD}(2\text{H})$ e doa elétrons para O_2 , o qual é reduzido em H_2O . A cadeia de transporte de elétrons contém três grandes complexos de proteínas (I, III e VI) integrais da membrana interna da mitocôndria. Quando elétrons passam através desses complexos em uma série de reações de oxirredução, prótons são transferidos da matriz mitocondrial para o lado citosólico da membrana interna da mitocôndria. O bombeamento de prótons gera um gradiente eletroquímico (Δp) através da membrana composto pelo potencial de membrana e pelo gradiente de prótons. A ATP sintase contém um poro para prótons através da membrana interna da mitocôndria e uma “cabeça” que sobressai para a matriz. A medida que os prótons (H^+) são conduzidos para matriz através do poro, eles alteram a conformação da cabeça, a qual libera

ATP de um sítio e catalisa a formação de ATP a partir de ADP e P_i em outro sítio. Os elétrons são bombeados nos complexos ao longo da cadeia e são finalmente aceitos pelo oxigênio no complexo IV. À medida que os elétrons são transferidos de complexo para complexo, prótons (H^+) são conduzidos para matriz através do poro para fora dos complexos I, III e IV para o espaço intermembrana para manter o potencial de membrana e impulsionar a produção de ATP pela ATP sintase (Bhargava; Schnellmann, 2017).

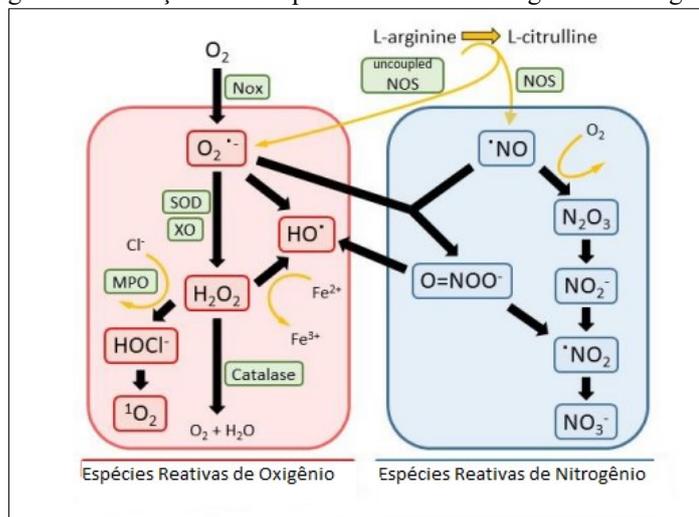
A produção energética também é realizada pelo transporte e ativação de ácidos graxos nas células do túbulo proximal renal. Os túbulos proximais requerem grandes quantidades de ATP para conduzir transporte de íons e, portanto, dependem da respiração aeróbica, o mecanismo mais eficiente para a produção de ATP. Os túbulos proximais utilizam ácidos graxos como o palmitato através da β -oxidação para aumentar a produção de ATP (Simom; Hertig, 2015).

Estudos demonstram que o aumento EROs podem desencadear e acelerar a progressão de doenças renais. Pacientes em estágios avançados na doença renal crônica com desequilíbrio na produção de EROs tendem a complicações associadas como hipertensão, aterosclerose, insuficiência renal aguda, as nefropatias induzidas por substâncias tóxicas e algumas formas severas de doença inflamatória renal inflamação e anemia (Daenen *et al.*, 2019). A geração de EROs e ERNs no rim ocorre nas células tubulares renais e células endoteliais. Sua produção está presente na adaptação e transdução de sinais fisiológicos celulares e em processos patológicos. As EROs em concentrações basais desempenham um papel na regulação da reabsorção de solutos e água no rim, o que é vital para manter a homeostase eletrolítica e o volume de líquido extracelular e sinalizam vias biológicas para proliferação e crescimento celular, atuam como sensor de hipóxia detectando alterações na perfusão renal (Ishimoto *et al.*, 2018). Quando as células têm um desequilíbrio na produção de EROs e ERNs e a insuficiente degradação pelo sistema antioxidante, nós temos o estresse oxidativo. As organelas celulares estruturalmente são afetadas pelos danos oxidativos em proteínas, lipídeos e DNA celular alterando as funções biológicas (Gutteridge; Halliwell, 2018; Sies, 2018).

As ERNs são formadas pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS), e que utilizam L-arginina, L-citrulina, oxigênio e outros cofatores. Elas são seletivas por reagirem com peróxidos formando peroxinitrito, capazes de interagir com componentes celulares, incluindo grupos tiol e ácidos graxos insaturados, promovendo a oxidação de lipídios e nitroação modificando

proteínas. É importante salientar que EROs e ERNs estão intimamente ligadas sendo sua geração sinergicamente potencializada uma pela outra, conforme demonstra a Figura 11.

Figura 10 - Relação entre Espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio.



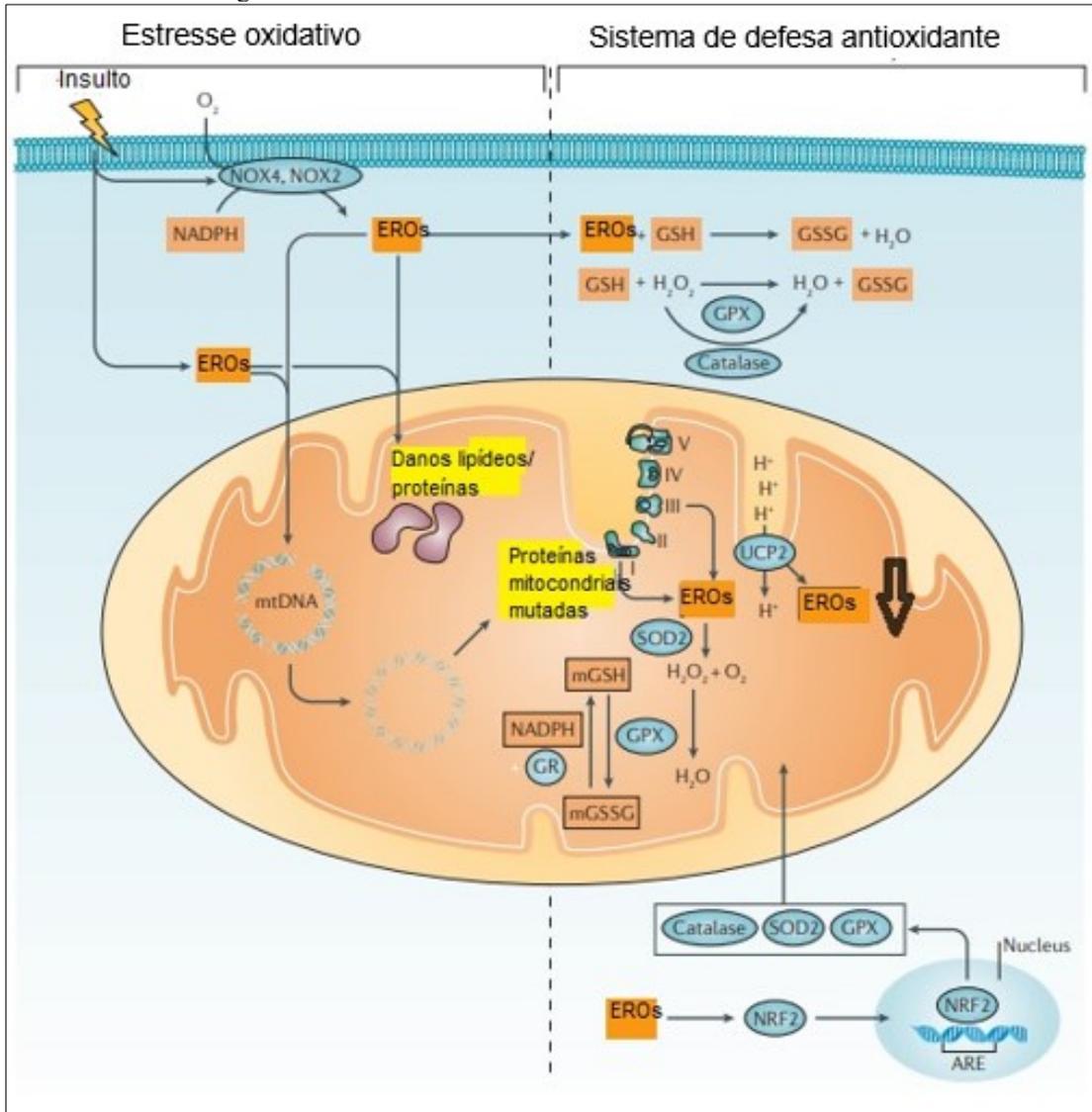
Fonte: Adaptado de Barbosa (2010)

Legenda: EROs e ERNs são tipos de moléculas instáveis que contêm oxigênio ou nitrogênio e incluem muitas espécies reativas. Os principais ROS são superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (HO^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2). As principais ERNs incluem óxido nítrico (NO), trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), peroxinitrito ($O=NOO^-$), dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}) e outros óxidos de nitrogênio. XO: xantina oxidase, SOD: superóxido dismutase, NOS: óxido nítrico sintase.

O estresse oxidativo é caracterizado por níveis aumentados de EROs que causam danos no DNA mitocondrial e danos a proteínas e lipídios (Daenen *et al.*, 2018). As EROs podem desencadear a apoptose na célula e liberação do citocromo c, levando à disfunção mitocondrial. Para inibir os efeitos deletérios as mitocôndrias possuem um sistema de defesa antioxidante. As defesas enzimáticas como a SOD, a Catalase e a glutatona peroxidase são ativadas no núcleo da célula através do fator eritróide nuclear 2 (Nrf2) na resposta ao insulto oxidativo. O Nrf2 sinaliza para transcrição de genes que codificam essas enzimas. A superóxido dismutase (SOD2) é um sistema que atua na mitocôndria convertendo o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio em água (Ratliff *et al.*, 2016). Outro sistema de defesa presente envolve a glutatona. A mitocôndria tem níveis basais de glutatona que reduzem as EROs e previne a saída de Citocromo c da membrana interna. A glutatona é um tripeptídeo (glutamina, cisteína, glicina) nucleofílico que existe na forma reduzida e se oxida na forma de glutatona dissulfeto (GSSG). A glutatona detoxifica o radical ânion superóxido formado a glutatona dissulfeto GSSG. A GSSG é reduzida pela glutatona redutase podendo assim ser reciclada a GSH. A glutatona peroxidase está localizada no citoplasma e núcleo mitocondrial, fazendo a redução do peróxido de hidrogênio em água. A conversão de GSSG para GSH requer NADPH, o mecanismo que

mantém os níveis de GSH é a via da pentose fosfato produtora de NADPH, juntos os mecanismos tem um papel de prevenção contra o aumento nos níveis de EROs e na manutenção da função mitocondrial como observamos na Figura 12 (Bhargava; Schnellmannzhou, 2017; Zhou *et al.*, 2017).

Figura 11 - Estresse oxidativo e Sistema de defesa antioxidante.



Fonte: Adaptado de Bhargava (2017).

Legenda: Os insultos podem aumentar a produção de EROs no citosol e na mitocôndria. O complexo enzimático NADPH oxidase (NOX2 e NOX 4) produz EROs, o aumento dos EROs pode causar quebra no DNA mitocondrial e dano aos lipídeos e proteínas. O dano ao DNA mitocondrial gera proteínas mitocondriais mutadas. Os danos a lipídeos e proteínas causam perda de função mitocondrial. As EROs ativam o fator Nrf2 translocado para o núcleo ou elemento de resposta antioxidante, para codificação de genes das defesas enzimáticas antioxidantes como a superóxido dismutase 2 (SOD2), a glutatona peroxidase e catalase. A SOD2 reduz o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. A catalase está no citoplasma e a GPX no citoplasma e na mitocôndria, elas reduzem o peróxido de hidrogênio em água. A GPX oxida glutatona (GSH) em glutatona dissulfeto (GSSG) um subproduto da redução do peróxido de hidrogênio a água. A GSSG na mitocôndria volta a ser convertida em GSH

pela glutathione redutase em um processo que requer NADPH. Os complexos da cadeia transportadora de elétrons estão indicados como I, II, III, IV.

2.6.1 Antioxidantes renais

A SOD protege o tecido e as células renais das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sendo a primeira enzima intrínseca na dismutação dessas espécies. A isoforma SOD1 está em 80% nas células renais. Sua importância na patogênese renal é devido a capacidade de reduzir o estresse oxidativo. A SOD está localizada nas mitocôndrias, no citoplasma e no espaço extracelular ancoradas por um domínio de ligação a heparina. Nas células do córtex, nas células justaglomerulares do túbulo renal proximal, nas células musculares dos vasos sanguíneos renais e com atividade reduzida na medula e no glomérulo (Ratliff *et al.*, 2016). A redução na sua atividade resulta no aumento das EROs no rim, fato que reduz o fluxo sanguíneo medular, a excreção de sódio, a taxa de filtração glomerular induzindo a hipertensão em ratos e que são fatores presentes no desenvolvimento de lesão renal aguda. A catalase tem um papel importante na redução das EROs e prevenção da lipoperoxidação. A deficiência de catalase resulta no aumento da EROS e afeta a função mitocondrial. A perda da atividade da catalase induzida por lipopolissacarídeos em modelos de endotoxemia demonstrou agravar significativamente os danos renais (Vasko *et al.*, 2013). A glutathione é outra defesa importante distribuída a nível celular na mitocôndria, no citoplasma e no núcleo. A glutathione atua na regulação redox da célula e esses mecanismos são capazes de controlar a síntese de DNA, a proliferação celular e a apoptose. Estudos demonstram que o decréscimo nos níveis de SOD, catalase e glutathione estão presentes em modelos de nefropatia em ratos (Chander *et al.*, 2004). No sistema renal os antioxidantes são primordiais na manutenção fisiológica celular e tecidual e estão associados a homeostase prevenindo processos fisiopatológicos causados pelo acúmulo de EROs e ERNs. Quando sua capacidade de detoxificação é excedida há o estresse oxidativo resultando em lesões renais (Araújo; Wilcox, 2014).

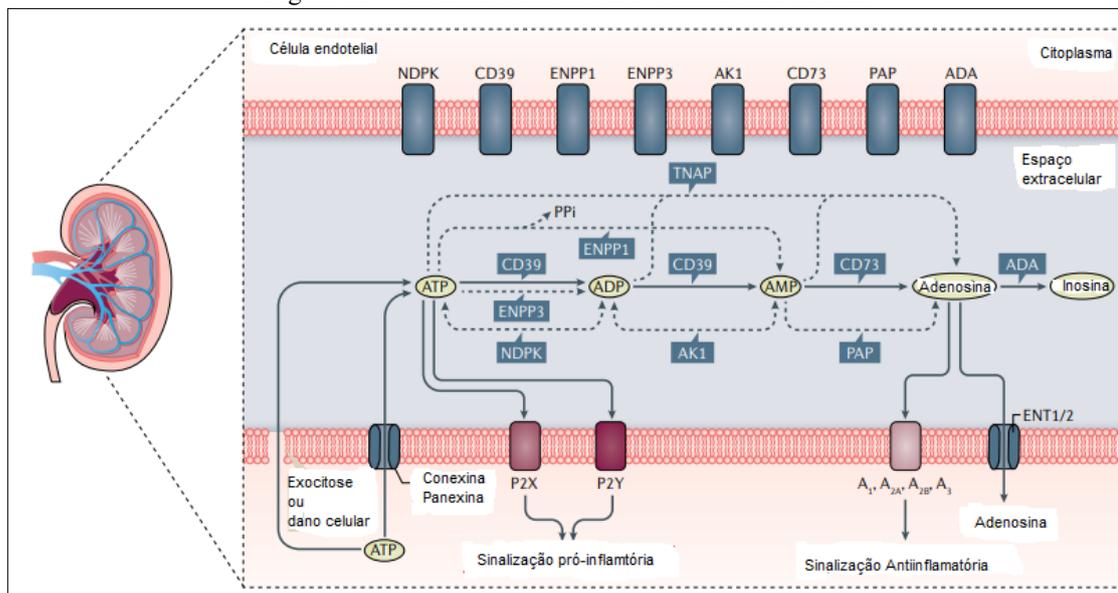
2.7 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NO SISTEMA RENAL

No rim, uma grande demanda de energia é mobilizada para a atividade da bomba sódio potássio ATPase, responsável pela troca iônica na membrana celular. Os túbulos proximais, alça de henle, tubulos distais e ductos coletores demandam atividade de transporte e reabsorção de íons. Em contraste, a filtração glomerular é um processo passivo dependente da manutenção da pressão hidrostática glomerular. Os túbulos proximais requerem mais mecanismos de transporte ativo que outros tipos de células renais por reabsorvem 80% do filtrado que passa pelo glomérulo, incluindo glicose e íons. Desta forma, eles contêm mais mitocôndrias do que outras estruturas no rim. Os mecanismos de controle da função renal que demandam aumento da carga de trabalho, usam energia advinda da hidrólise de ATP (Dwyer *et al.* (2020).

O sistema purinérgico sinaliza processos fisiológicos renais como regulação da água, a homeostase do sódio tubular, a função glomerular e vascular, o fluxo sanguíneo renal e a autoregulação. Nos processos fisiopatológicos com desenvolvimento de hipertensão e na inflamação, a sinalização purinérgica ativa vias de sinalização extracelular para o desenvolvimento da insuficiência renal aguda (Monaghan; Bailey; Unwin, 2021).

A sinalização para hidrólise do ATP extracelular (ATPe) é regulada pela enzima ectonucleotidase trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) CD 39, na qual hidrolisa a adenosina trifosfato (ATP) em adenosina difosfato (ADP) e o ADP em adenosina monofosfato (AMP). O AMP resultante é degradado em adenosina pela enzima 5`ectonucleotidase (CD73). A adenosina extracelular é convertida em inosina pela enzima adenosina desaminase (ADA) (Dwyer; Kishore; Robson, 2020). O ATP intracelular envolve transferência de energia, enquanto que no ambiente extracelular ele funciona como um padrão molecular associado ao dano da célula e estimula a resposta inflamatória, estudos com administração de adenosina na artéria renal para elevação de seus níveis, causa diminuição da filtração glomerular e aumento da resistência vascular (Castrop, 2007). Existem vias e enzimas hidrolisam o ATP e regulam a atividade do padrão molecular associado ao dano via purinoma como observamos na Figura 13.

Figura 12 - Via metabólica do ATP e Adenosina no rim.



Fonte: Adaptado de Dwyer *et al.* (2020).

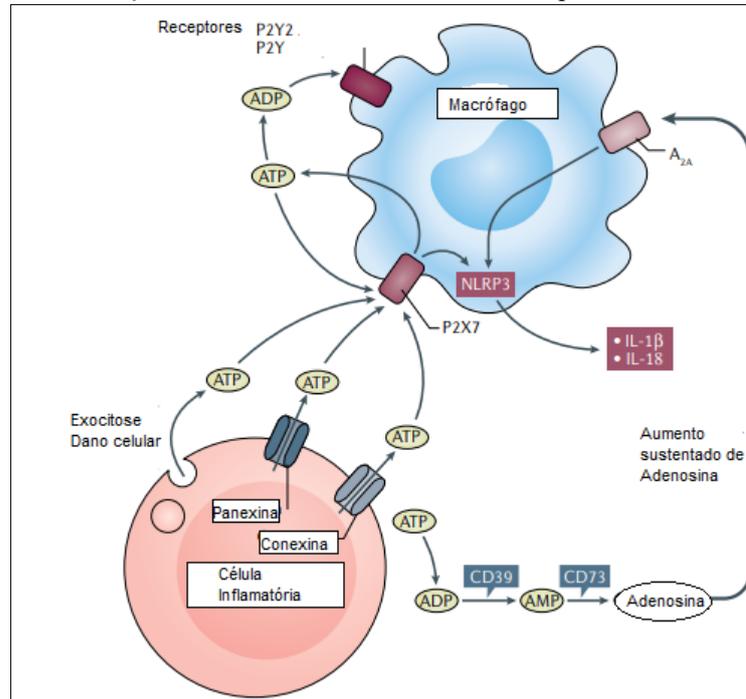
Legenda: O ATP é liberado no espaço extracelular quando há dano na célula através dos canais de conexina e panexina. O ATP extracelular pode desencadear a sinalização pró-inflamatória pela ativação de receptores P2X e P2Y. A via canônica do metabolismo do ATP (setas preenchidas) ocorre através da hidrólise sequencial de ATP pela hidrolase CD39 em ADP e AMP, que por sua vez é hidrolisado em adenosina pela CD73. Adenosina pode ser hidrolisada em inosina via adenosina desaminase (ADA) ou absorvida pelas células por meio de nucleosídeos equilibrados transportadores (ENT1 / 2). A adenosina ativa os receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ da adenosina P1 para mediar as vias de sinalização antiinflamatória. Vias metabólicas não canônicas também operam no espaço extracelular (tracejado; setas; flechas). O ATP pode ser metabolizado em AMP pelo ectonucleotídeo pirofosfatase / membro da família da fosfodiesterase 1 (ENPP1), liberando pirofosfato (PPi) ou para ADP por ENPP3. A regeneração de ATP pode ocorrer através da atividade de nucleotídeo difosfoquinase (NDPK) e adenilato quinase 1 (AK1) por meio de reações reversíveis de fosfotransferência. Fosfatase alcalina não específica de tecido (TNAP) pode converter ATP diretamente em adenosina e fosfatase ácida prostática (PAP) pode converter AMP em adenosina.

As purinas extracelulares podem atuar como agentes autócrinos ou parácrinos nos rins, ativando receptores específicos da superfície celular que sinalizam vias regulatórias. Os purinoceptores são subdivididos em receptores P1 e P2. Os receptores P1 respondem à adenosina e são denominados receptores de adenosina (A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃). Os receptores P2 são ativados pelos nucleotídeos (ATP, ADP) e são subdivididos em P2X (ionotrópicos) e receptores P2Y (metabotrópicos). Os receptores A₁ e P2X₁ são encontrados nas arteríolas aferentes e artérias interlobares e medeiam a vasoconstrição (Chan *et al.*, 1998; Monaghan; Bailey; Unwin, 2021). Os purinoceptores também são encontrados nas membranas apical e basolateral das células tubulares renais. A estimulação de receptores A₁ aumenta a reabsorção tubular proximal e inibe a reabsorção no túbulo coletor distal de Na⁺, enquanto a estimulação de receptores P2 geralmente tem um efeito inibitório no transporte tubular. Assim, os nucleotídeos liberados luminalmente, agem nos subtipos de receptores P2, podem inibir a

reabsorção de Na^+ na região do túbulo proximal, túbulo distal e ducto coletor. A estimulação dos receptores P2Y2 no ducto coletor inibe a reabsorção de água sendo sensível à vasopressina (Bailey *et al.*, 2000). A adenosina está presente em baixas concentrações no espaço pericelular das células renais e regula a liberação de renina, a taxa de filtração glomerular e o tônus renal vascular. A adenosina aumenta significativamente durante os estados inflamatórios e a hipóxia através da hidrólise ATP (Roberts *et al.*, 2014).

Na inflamação renal o complexo de proteínas citosólicas intracelulares inflamossoma (NLRP3 – receptores da família NLR contendo domínio pirina 3) é ativado em resposta ao dano tecidual e desregulação metabólica. O complexo NLRP3 é identificado nas doenças renais como a lesão renal aguda, insuficiência renal crônica e nefropatia diabética. Os inflamassomas medeiam a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (Hutton *et al.*, 2016). Estudos atuais destacaram o papel da sinalização purinérgica na ativação do NLRP3. Na resposta a nanopartículas, como ácido úrico, sílica os macrófagos renais liberam ATP via exocitose ou por meio de canais de conexina e panexina para o meio extracelular. O ATP extracelular ativa receptores P2X7 de maneira autócrina e, subsequentemente, ativam o inflamassoma NLRP3, resultando na produção de citocinas proinflamatórias IL-1 β e IL 18 causando morte celular por piroptose na Figura 14 (Sakaki *et al* 2013; Baron *et al.*, 2015). O inflamassoma NLRP3 também pode ser ativado pelo receptor P2X7 de forma parácrina, em resposta ao ATP extracelular liberado após lesão por hipóxia. A ativação de receptores P2X7 pode amplificar ainda mais a hidrólise do ATP em macrófagos (Riteau *et al.*, 2012; Brandao-Burch *et al*, 2012). Níveis aumentados de ATP sinalizam a ativação do receptor P2Y em macrófagos ativando NLRP3 (Riteau *et al.*, 2012; Baron *et al*, 2015). Além disso, o ADP pode estimular a produção de IL-1 β através de receptores P2Y expressos em macrófagos (Riteau *et al.*, 2012). A via NLRP3 contribui significativamente para a progressão da doença renal crônica causando morte celular por piroptose (Hutton *et al.*, 2016; Xiang *et al.*, 2020).

Figura 13 - Sinalização de CD39, ATP e Adenosina no complexo inflamassoma NLRP3.



Fonte: Adaptado de Dwyer *et al.* (2020)

2.8 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS NO TECIDO RENAL

O rim sintetiza glicose a partir de aminoácidos, lactato e piruvato via gliconeogênese, regula o equilíbrio ácido-base por meio do metabolismo inter-orgânico da glutamina e sintetiza arginina, tirosina e glicina, respectivamente, a partir de citrulina, fenilalanina e 4-hidroxiprolina. No rim, o metabolismo de degradação de aminoácidos envolve a eliminação do grupo amina (desaminação) intrarrenal e incorporação da amônia e produção de ureia e posterior excreção urinária e conversão do esqueleto carbônico em intermediários metabólicos para produção de energia. A desaminação da maior parte dos aminoácidos envolve uma transaminação prévia, que consiste na transferência do seu grupo amina para um alfa-cetoácido, produzindo o aminoácido correspondente ao alfa-cetoácido e o alfa-cetoácido correspondente ao aminoácido original. Geralmente é transferido um grupo amina ao alfa-cetoglutarato, que é convertido em glutamato (Vinay *et al.*, 1986). A função renal demanda substratos para produção de energia, o aumento da atividade de enzimas como aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são indicadores de mobilização de aminoácidos. A degradação de aminoácidos ocorre pela desaminação e a conversão de um intermediário que pode entrar no

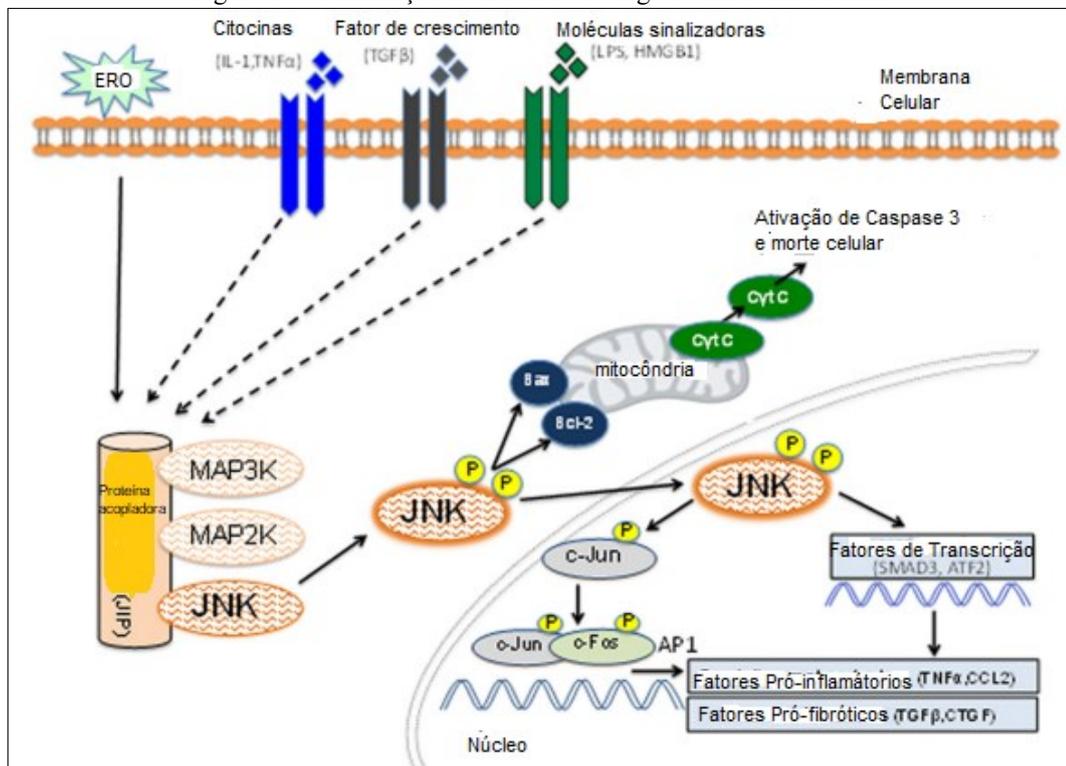
glutamina é via reação de gama-glutamyltranspeptidase (γ -GT), que é encontrada na região renal da borda em escova e que medeia o consumo renal de GSH e glutamina. Ela catalisa a transferência de um grupo γ -glutamil a um aceptor, usando a GSH como doador do grupo γ -glutamil, com formação de cisteinil-glicina e γ -glutamil. O último pode ser transferido para um aminoácido ou peptídeo aceptor para formar um aminoácido γ -glutamil ou um peptídeo γ -glutamil (transpeptidação) (Nissim, 1999; Kumar *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2020). Além disso, o metabolismo da Gln/Glu se interconecta com reações de transaminação, o ciclo da gama-glutamil (síntese de GSH), ciclo de nucleotídeos de purina (PNC) e ciclo do ácido tricarbóxico (TCA). No fígado, essas rotas metabólicas também se interrelacionam com o ciclo da ureia. A compreensão das vias metabólicas e a atividade enzimática tem correlação com a disfunção renal, levando a alterações nas concentrações de aminoácidos no sangue, degradação da proteína muscular, inflamação e anormalidades mitocondriais.

2.9 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO DANO AO DNA, MORTE CELULAR E ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES NOS PROCESSOS PATÓLOGICOS RENAIIS γ H2AX, P53, CASPASE 3 P-P54 JNK, P-P46 JNK, NRF2

O estresse oxidativo e a apoptose celular são processos biológicos relacionados ao desenvolvimento de várias patologias renais e são mediados por vias de sinalização celular ativadas por fosforilação. A JNK (quinase c-Jun N-terminal) é uma proteína da família de quinases serina/treonina MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) que ativa a transdução de sinais de proliferação celular, diferenciação, migração e apoptose celular. Nas células glomerulares durante a lesão renal aguda e sua ativação sinaliza para vias de transcrição de mediadores pró-inflamatórios, estresse oxidativo, fatores pró-fibróticos e apoptose (Grynberg; Ma; Paterson, 2017). A administração de inibidores JNK mostrou proteger as células tubulares contra lesão renal aguda e suprimir o desenvolvimento de glomeruloesclerose e fibrose. Sua ativação é promovida por uma cascata de reações fosforilação. Ativação rápida da sinalização é facilitada pela proteína de interação 1 (JIP1) e a inativação por um grupo de fosfatases com especificidade dupla (Peterson *et al.*, 2009). Na inflamação, a via da JNK promove a resposta inflamatória nos leucócitos pelo mecanismo primário de pela ativação do fator de transcrição AP-1, JNK pode fosforilar c-Jun e fazer a dimerização de c-Fos para AP-1 para transcrever genes da resposta inflamatória, incluindo as citocinas TNF- α e quimiocinas CCL2 e moléculas

de adesão VCAM-1/CD106 (Grynberg, Ma; Paterson, 2017) (Figura 16). Uma segunda fosforilação da JNK ativa o fator 2 (ATF-2) que transcreve genes que contribuem na resposta inflamatória. A via da JNK ativa Linfócitos T, os subtipos T helper (Th1) e (Th2) (Yu *et al.*, 2014). Na apoptose, a via de sinalização JNK ativa a via intrínseca na mitocôndria, o estresse oxidativo causa liberação do citocromo c no citoplasma e levando a ativação de caspase 3 e apoptose. Outra via é a ativação nas Células B no linfoma com ativação de Bcl2 e Bcl2 com gene Bcl-x_s oncoproteínas na superfície mitocondrial (Maundrell *et al.*, 1997) como observamos Figura 16.

Figura 15 - Sinalização JNK efeitos biológicos nas células renais.



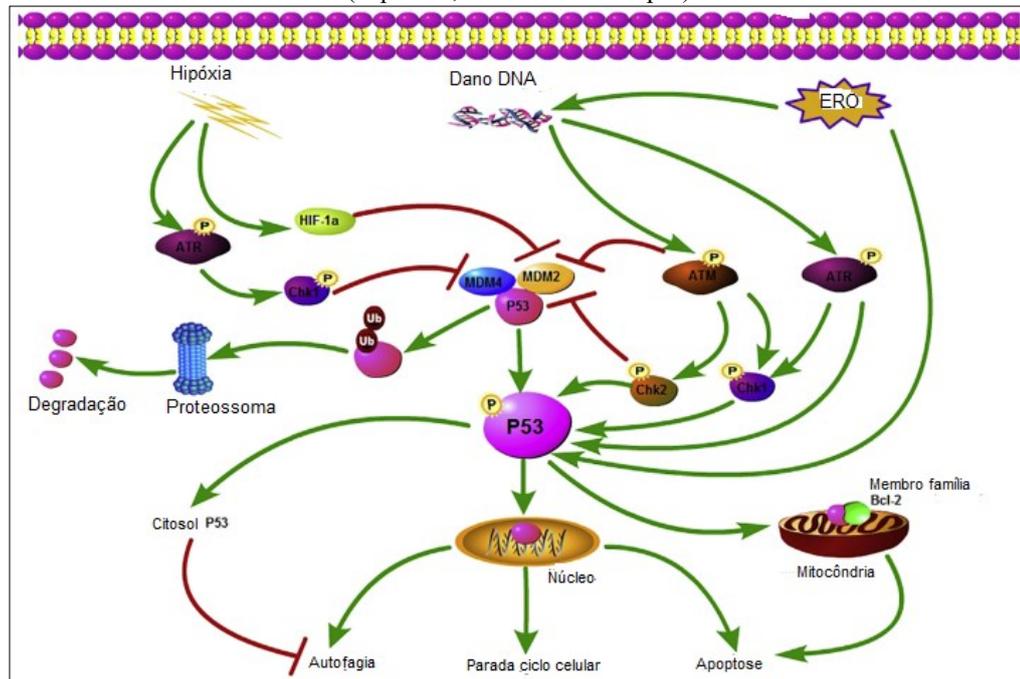
Fonte: Adaptado de Grynberg, Ma e Paterson (2017).

Legenda: As Citocinas inflamatórias, moléculas padrão ligantes associadas ao perigo (alarminas) e pró-fibróticas, os fatores de crescimento podem induzir a ativação de membros da família da proteína quinase ativada por mitogênio (MAP3K). Outros fatores, como espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse osmótico também podem levar à ativação de MAP3K. Membros individuais das famílias MAP3K e MAP2K e JNK são mantidos nas proximidades do proteína-esqueleto (proteína-1 acopladora) facilita uma série rápida de reações de fosforilação que levam à fosforilação do local de ativação de JNK. A JNK ativada se dissocia deste complexo e pode promover apoptose dependente de mitocôndria através de células de linfoma, células B (Bcl-2) e Bcl-2 associado proteína x (Bax). JNK ativa promove a transcrição de genes envolvidos nas respostas inflamatórias e fibróticas através da fosforilação de c-Jun para promover função da proteína ativadora-1 (AP-1), SMAD3 e ATF2. A ativação de JNK pode promover a morte celular, inflamação e fibrose.

Os danos exógenos ao DNA podem ocorrer quando as células são expostas a agentes químicos como os agrotóxicos podem levar a quebra na dupla fita do DNA celular, inibindo assim, a síntese de proteínas gerando instabilidade genômica (Jackson; Bartek, 2009). A análise da expressão da γ H2AX é importante indicativo de quebra na dupla fita do DNA que atua como um sensor de dano quando fosforilado (Podhorecka; Skladanowski; Bozko, 2010). O dano ao DNA foi descrito em células de mamíferos expostos a radiação ionizante. O dano ativa o recrutamento da proteína quinase Ataxia-telangectasia mutante (ATR). A proteína ATR fosforila a proteína Checkpoint quinase (Chk1) que fosforila histona H2AX em serina139 (γ H2AX) e ativa p53/p21 impedindo a progressão do ciclo celular (Jackson; Bartek, 2009).

A proteína de tumor (p53) é uma proteína citoplasmática com massa molecular 53kDa que ativa genes de transcrição em lesões tubulares renais, tendo como função regular o reparo do DNA danificado, a hipóxia e, no caso de ineficiência do reparo, o ciclo celular é imediatamente bloqueado e então desencadeia-se a apoptose, pelo aumento da fosforilação da proteína p53 (Tang *et al.*, 2019). No rim, a sinalização da proteína p53 está envolvida nos fenômenos de isquemia e reperfusão causa de insuficiência renal em ratos no modelo de Dagher. Nesse modelo a expressão da proteína p53 foi detectada 24hs após o início da insuficiência renal na medula renal e a inibição da atividade da p53 pela pifitirina- α durante a isquemia renal preveniu a apoptose das células tubulares resultando na proteção da função renal (Kelly *et al.*, 2003). No dano ao DNA a sinalização de p53 é ativada pelas proteínas quinases ATM e ATMR, responsáveis pela sinalização e ativação do mecanismo de Checkpoint, levando à interrupção do ciclo celular para correção do dano, prevenindo assim a transmissão dos erros às células em formação Figura 17. As EROs regulam a atividade de p53 induzindo vias de sinalização resposta (por exemplo, via de resposta de dano de DNA) para a ativação de p53, ou através de um direto modificação redox chamada s-glutationilação em p53 para inibir sua ligação ao DNA atividade. A hipóxia induz a ativação do p53 principalmente por meio de HIF-1 α e ATR (Tang *et al.*, 2019), todos os fatores ativam p53 de acordo com a Figura 17.

Figura 16 - Fatores que ativam a sinalização da p53 promovendo a Insuficiência Renal (isquemia, nefrotoxinas e sepse)



Fonte: Adaptado de Tang (2019).

Legenda: As lesões renais são decorrentes de hipóxia, dano ao DNA e / ou produção de EROs nas células renais. O dano ao DNA induz a ativação de p53 pela fosforilação das proteínas quinases ATM e ATR. As EROs regulam a atividade de p53 induzindo via de sinalização em resposta (por exemplo, via de resposta de dano de DNA) para a ativação de p53, ou através de modificação redox chamada s-glutacionilação em p53 para inibir sua ligação ao DNA. A hipóxia induz a ativação do p53 por meio de HIF-1a e ATR. Ativada a p53 nuclear transaciona uma ampla gama de genes envolvidos na apoptose, na parada do ciclo celular e autofagia. O p53 citoplasmático atua de forma independente por suas interações diretas com proteínas citoplasmáticas.

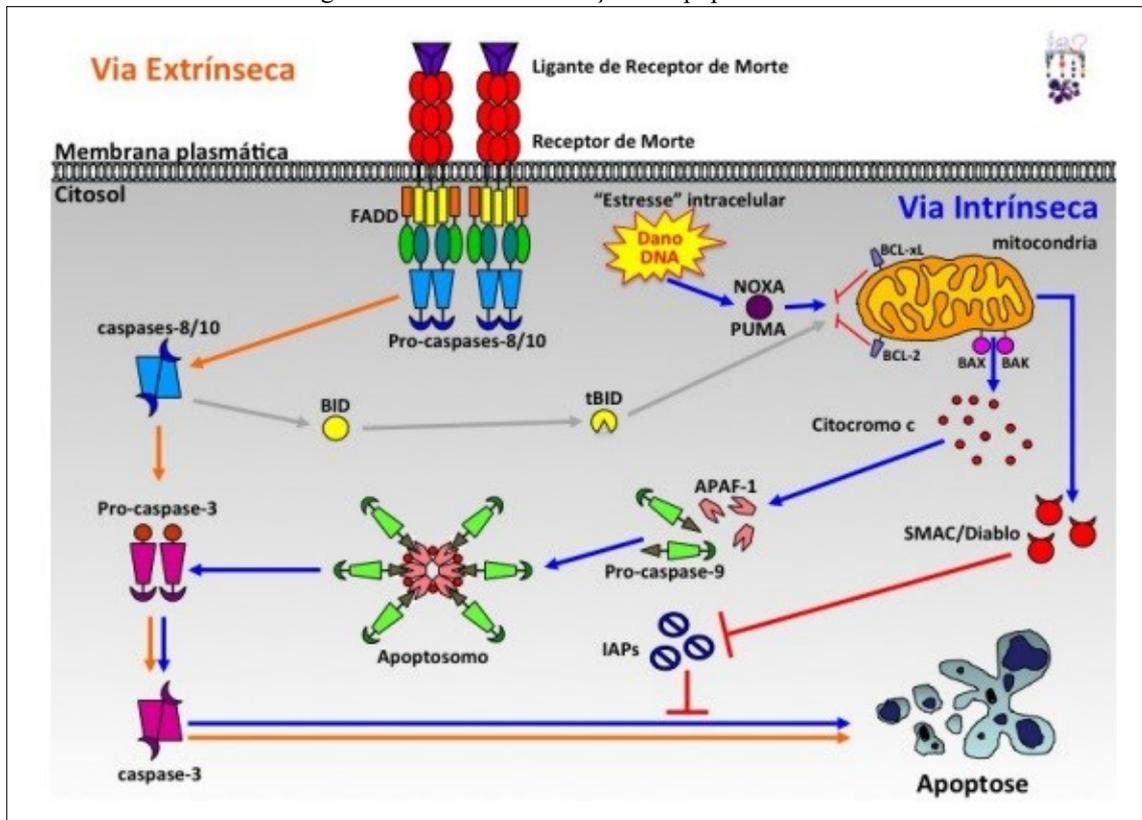
O dano ao DNA ocorre na insuficiência renal e no reparo de lesões renais pela regulação da apoptose, da parada do ciclo celular e da autofagia. A p53 regula vários de tipos de morte celular incluindo a apoptose, a necrose e a ferroptose. No desenvolvimento da lesão renal aguda ela causa sinalização para morte das células tubulares. A transcrição de p53 foi demonstrada na nefrotoxicidade por cisplatina causando apoptose das células tubulares (Peres; Cunha Junior, 2013).

O processo de apoptose envolve duas vias já conhecidas, a via extrínseca e a via intrínseca da apoptose, na qual a proteína caspase 3 efetora participa da sinalização. A via mitocondrial ou intrínseca responde a estímulos como dano ao DNA, estresse osmótico e radiações. A via é regulada por proteínas anti e pró-apoptóticas da família BCL-2 (B-cell CCL/Lymphoma 2), cuja classificação é baseada nos domínios de homologia ao BCL-2 (BH-BCL-2 homology domain). As proteínas antiapoptóticas (BCL-2, BCLx1) estão localizadas na membrana externa da mitocôndria, no citosol. As proteínas pró-apoptóticas são divididas em

dois grupos, as moléculas efetoras (BAX e BAK), e possuem domínios (BH1 e BH3), são responsáveis pelos poros da membrana externa mitocondrial. As proteínas BH3 (BID, BIM, PUMA, NOXA) atuam como sensores de estresse intracelular e ligam-se diretamente às proteínas antiapoptóticas BAX e BAK (Jeong; Seol, 2008). As caspases são cisteíno-proteases e estão presentes na forma de precursores inativos (zimogênios). Quando há dano ao DNA as proteínas PUMA e NOXA funcionam como sensores de despolarização liberando o citocromo c do espaço intermembrana mitocondrial para o citosol. Na sequência, o fator 1 de ativação da apoptose (Apaf-1), a pró-caspase 9 e o citocromo c vão formar um complexo no citosol, denominado apoptossoma. A ligação do Apaf-1 e do citocromo c à pro-caspase 9 leva à sua auto-clivagem. A caspase-9 ativa, cliva e ativa a caspase-3 que a seguir induz a clivagem da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). A PARP é uma enzima nuclear que catalisa a transferência da porção adenina difosfato (ADP)-ribose da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) para um subconjunto específico de substratos nucleares, em resposta às alterações do DNA (Yuan; Filippova; Hughes, 2012).

A via extrínseca da apoptose é iniciada pela ligação de um ligante da família FNT ao seu receptor, seguida pela ativação de proteínas de sinalização. Os fatores que desencadeiam esse percurso são o FNT, o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL), e o FasL. Estas moléculas podem ligar-se a receptores da superfície da célula para desencadear uma cascata apoptótica. Após a ativação dos receptores de morte, domínios da porção intracelular do receptor recrutam o domínio de morte contendo adaptadores, tais como a proteína domínio de morte do adaptador Fas (FADD) e a proteína do domínio da morte associada ao receptor do fator de necrose tumoral tipo 1 (TRADD). O FADD liga-se à pró-caspase 8 que, em seguida, é submetida a homodimerização e auto-clivagem, para formar a caspase 8 ativa. Em seguida inicia-se a ativação de caspase 3, levando a célula à apoptose (Yuan; Filippova; Hughes, 2012). Ambas as vias vão ativar a caspase-3 (efetora) e promover a morte celular como observamos na Figura 18.

Figura 17 - Vias de sinalização do apoptose celular.



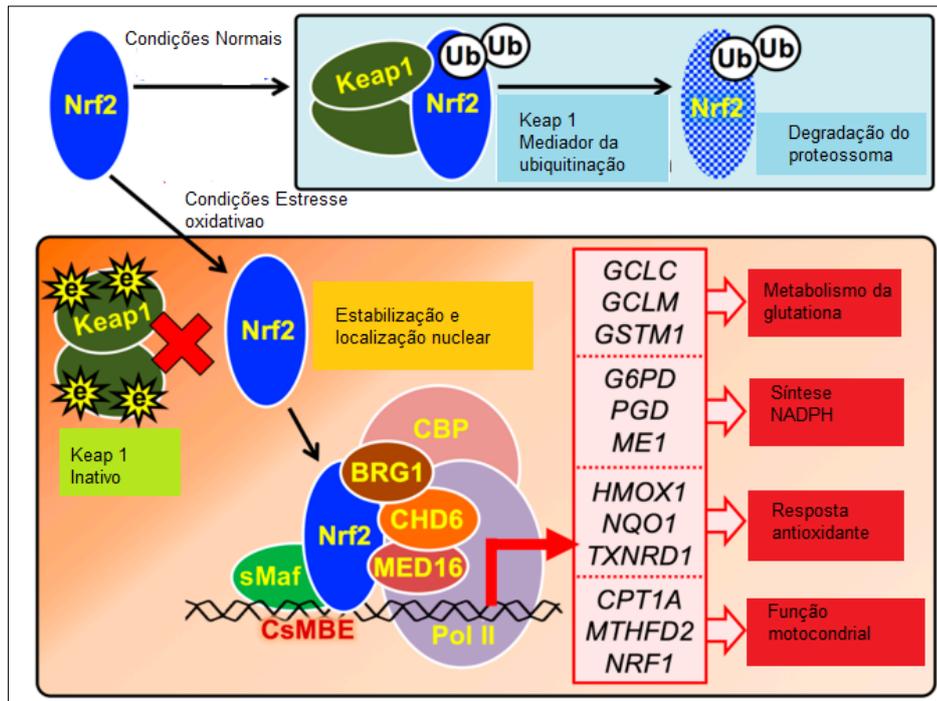
Fonte: Adaptado de Hengartner (2000).

Legenda: Apoptose. Sinalização da apoptose pela via extrínseca é induzida através da interação entre receptores de morte e seus respectivos ligantes e pela via intrínseca, ativada por estresses intracelulares. Ambas as vias resultam numa via comum de morte, na qual há ativação da caspase 3 que resulta na apoptose celular. A comunicação com a mitocôndria é realizada pela proteína BID da família BCL-2.

As vias apoptóticas estão presentes nos processos de isquemia e reperfusão onde há mudanças morfológicas nos túbulos proximais, incluindo perda de polaridade, perda da borda em escova resultando na morte celular (Havasi; Borkan, 2011). Entretanto, é importante avaliar a moléculas de proteção contra as patologias renais. O fator de transcrição antioxidante Nrf2 está presente nas células tubulares renais com nefroprotetor contra agressões locais, quando há estresse oxidativo Nrf2 induz a expressão de genes antioxidantes que fazem a citoproteção local evitando danos nas células tubulares promovendo uma resposta antioxidante (Nezu; Suzuki, 2017). Com a finalidade de proteger as células do estresse oxidativo, o fator de transcrição Nrf2 desempenha um papel integrativo na indução da expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na produção da resposta antioxidantes (por exemplo, glutathiona e NADPH), produção e redução de pró-oxidantes (por exemplo, heme e quinoides) (Figura 19) (Nezu; Suzuki; Yamamoto, 2017). Nas células normais o Nrf2 é sintetizado constitutivamente, mas

degradado pela ubiquitina específica de Nrf2 complexo ligase, no qual a molécula sensor de estresse Keap1 captura diretamente Nrf2 (Figura 19). A Keap1 é uma molécula que contém cisteínas reativas, que são aduzidas por oxidantes e eletrófilos, para detectar estresse oxidativo. Uma vez que o Keap1 modificado na cisteína não se liga mais ao Nrf2, o Nrf2 evita a degradação e ativa a expressão de seus genes alvo sob condições de estresse oxidativo. Várias proteínas foram identificadas como cofatores transcricionais essenciais e se ligam diretamente ao núcleo do Nrf2. A formação de heterodímero de Nrf2 com um dos pequenos Maf (musculoaponeurótico fibrossarcoma), proteínas (MafF, MafG e MafK) são necessárias para a ligação do Nrf2 ao CsMBE (CNC e pequeno elemento de ligação Maf são promotores e potencializadores de Genes alvo Nrf2 (Figura 19) (Otsuki, *et al.*, 2016). Os de fatores de ligação ao DNA, como pequenas proteínas Maf, proteína de ligação ao elemento de resposta de AMP cíclico (CREB), proteína de ligação (CBP), gene relacionado a brahma 1(BRG1), e a proteína de ligação ao DNA da helicase cromodomínio 6 (CHD6), estão envolvidas na transcrição ativação de genes relacionados à citoproteção contra o estresse oxidativo pela ligação direta ao Nrf2 (Figura 19) (Otsuki, *et al.*, 2016; Nioi *et al.*, 2005). O complexo do mediador transcricional contribui para a expressão do gene antioxidante por meio de uma interação direta entre Nrf2 e uma subunidade mediadora, MED16 (conforme a Figura 19) (Sekine *et al.*, 2015).

Figura 18 - Mecanismo de molecular de NRF2 para induzir a produção de genes que envolvem a citoproteção contra o estresse oxidativo.



Fonte: Adaptado de Nezu e Suzuki (2020).

Legenda: Nas células livres de estresse oxidativo, o Nrf2 recém-sintetizado captura a proteína diretamente pelo homodímero Keap1 e degradada por ubiquitinação via do proteossoma. Sob condições de estresse oxidativo, Nrf2 evita a degradação mediada por Keap1, porque Keap1 é desnaturado por EROs ou eletrófilos (e). Nrf2 estabilizado é translocado para o núcleo e forma heterodímeros com pequenas proteínas Maf (sMaf), permitindo a ligação a CSMBE nos promotores ou potencializadores de genes antioxidantes (listados na caixa vermelha); a transcrição desses genes é induzida pelo complexo Nrf2 contendo CBP, BRG1, CHD6 e MED16. HMOX1, heme oxigenase 1; NQO1, NADPH quinona oxidoreductase 1; TXNRD1, tioredoxina redutase 1; G6PD, glicose-6-fosfato desidrogenase; PGD, 6-fosfogluconato desidrogenase; ME1, enzima málica 1; GCLC, subunidade catalítica de glutamato cisteína ligase; GCLM, subunidade modificadora da ligase de cisteína glutamato; GSTM1, glutatona S-transferase μ 1; CPT1A, carnitina palmitoiltransferase 1A; MTHFD2, metilenotetrahidrofolato desidratado.

A ativação de Nrf2 nos túbulos renais é uma estratégia para prevenir danos renais em condições de estresse oxidativo, o Nrf2 atua como inibidor do estresse oxidativo (Nezu *et al.*, 2017). A importância dessa via é que sua inibição pode causar redução na resposta antioxidante a nível renal, o que mantém a homeostase do tecido renal.

2.10 HIPÓTESE

A saúde humana tem sido afetada pelos efeitos sistêmicos dos agrotóxicos, especialmente pelo uso e comercialização de HBGs. O uso globalizado nas comunidades agrícolas leva a exposição ambiental da população a resíduos na água e alimentos, como consequência temos intoxicações agudas e crônicas que causam alterações celulares e bioquímicas nos sistemas biológicos. Nosso grupo de pesquisa (LaBioSignal da UFSC) publicou estudos sobre os mecanismos de ação e toxicidade no Sistema Nervoso Central, Sistema Digestivo, Sistema Hepático e Hematopoiético. Na última década, quinze por cento da população de agricultores Sri Lanka, foram acometidos com o aparecimento de alterações renais de etiologia desconhecida, destes 400.000 mil evoluíram com diagnóstico de doença renal crônica e 20.000 morreram. Considerando o exposto, a hipótese deste estudo é que a exposição perinatal ao HBG altera o perfil histomorfológico e bioquímico causando toxicidade no sistema renal que pode afetar diferentes rotas metabólicas e oxidativas durante o desenvolvimento renal e pós-natal (PND15)

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

A formulação comercial utilizada foi o Roundup Original® (sal de isopropilamina de Glifosato 480 g/L – 360 g/L equivalente glifosato) registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob o número 898793®. Foi adquirido no comércio em geral e produzido pela empresa Monsanto Company (St Louis, MO, EUA). Os anticorpos Caspase 3 rabbit (#9664), antifosfo-JNK, p-p 46 p-p54 rabbit (#4671) foram adquiridos da Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, EUA); anti-Nrf2 rabbit (AV39465) adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), anti-p53 mouse (sc-126), histona γ -H2AX (Ser 139) rabbit (sc-101696) e anticorpo β -actina mouse (sc-47778) adquiridos da Santa Cruz Biotechnology, Anticorpo anti-mouse IgG conjugado à peroxidase rabbit (A9044) (Sigma-Aldrich, Inc, AP181P), anticorpo anti-rabbit IgG conjugado à peroxidase goat (A0545) (Sigma-Aldrich, Inc, AP132P). Como marcador de lesão renal precoce foi usado o kit Elisa Human NGAL (*Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin*) (EL-H0096) ElabScience (Houston, TX, EUA). Na mensuração dos marcadores inflamatórios foram usados o Kit Elisa IL-6 (88-7066), IL-1beta (88-7261), TNF-beta (88-7346) Invitrogen Thermo Fischer Scientific (EUA). Na determinação da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) foi usado o Kit de Sistema colorimétrico Doles (Brasil), na atividade da Gama-glutamil transferase (GGT) foi usado Kit GAMA GT Liquiform Ref 105, marca Labtest. Para mensuração da hidrólise do ATP em ADP e AMP foram usados o sal dissódico de adenosina 5'-trifosfato (CAS 34369-07-8), sal de sódio de adenosina 5'-difosfato (CAS 2398-34-9), sal de sódio 5'-monofosfato(CAS 149022-20-8), adenosina (CAS 58-61-7), Ficoll-Histopaque® (10771) e Coomassie Brilliant Blue G (CAS:6104-58-1) os quais foram obtidos da Sigma -Aldrich (St. Louis, MO, EUA) as leituras de absorbância executadas no espectrofotômetro UV/VIS 5300PC, da Metash. Os reagentes para às análises de biomarcadores de estresse oxidativo, foram adquiridos da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). O Immobilon TM Western chemiluminescence HRP substrate kit foi adquirido da Millipore (©EMD Millipore Corporation, Bilerica, Ma, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e alta pureza.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Animais

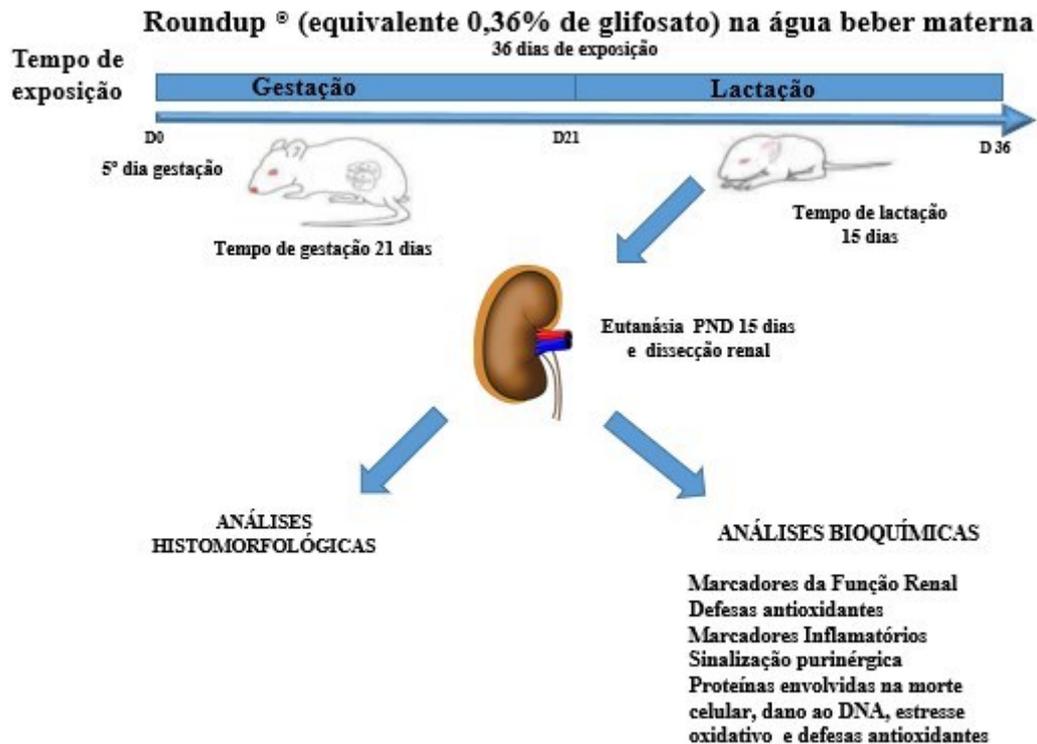
Foram utilizadas doze ratas *Wistar* prenhas provenientes do Biotério Central da UFSC que permaneceram no Biotério do LaBioSignal durante a gestação e desenvolvimento da prole até os 15 dias de vida. Os animais foram acondicionados em gaiolas com controle do ciclo sob ciclo de luz dia/noite de 12 h (luz fria artificial de 7h às 19hs) a 21 °C e água e ração *ad libitum*. O tamanho das ninhadas foi padronizado de forma que cada rata foi mantida com 8 filhotes/gaiola durante todo o período de tratamento e manutenção dos animais. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética na Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina e aprovado pelo mesmo sob o número (PP00471). Foram mantidos os princípios éticos da Comissão Nacional de Bem-estar Animal (COBEA) durante todos os experimentos.

3.2.1.1 Tratamento *in vivo* com Roundup®

Ratas *Wistar* fêmeas foram expostas a 1% de Roundup® (equivalente a 0,36% de glifosato) na água de beber durante a gestação e lactação até a prole completar 15 dias de vida. (Williams *et al.*, 2000; Beuret; Zirulnik; Giménez, 2005). As ratas foram acasaladas e o aparecimento de plug vaginal foi considerado o primeiro dia de gestação. A exposição iniciou no 5º dia gestacional e se estendeu durante o período pós-natal (PND) até 15 dias de idade dos filhotes (PND15). Durante todo o período de exposição foram totalizados 36 dias (Figura 20). Os grupos experimentais são compostos pelo grupo controle que recebeu água potável para beber e grupo tratado com Roundup Original® 1% (equivalente a 0,36% de glifosato) na água de beber. As ninhadas de oito filhotes foram pareadas em quatro machos e quatro fêmeas durante o experimento foram utilizados 96 filhotes. No décimo quinto dia os filhotes foram eutanasiados por decapitação seguida de dissecação dos tecidos renais e coleta de sangue. O tecido renal foi fragmentado e homogeneizado em tampões específicos para as análises bioquímicas e histológicas (Williams *et al.*, 2000; Cattani *et al.*, 2014). O consumo materno de água

durante os períodos de prenhez e lactação das ratas controles e tratadas foi monitorado diariamente.

Figura 19 - Desenho experimental da exposição perinatal no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base de glifosato-Roundup®.



Fonte: A autora.

Ratas prenhas foram expostas ao herbicida a base de glifosato Roundup® através da ingestão na água de beber. A exposição iniciou no 5º dia de gestação e se estendeu durante o período pós-natal (PND) até 15 dias de idade dos filhotes (PND15). No décimo quinto dia de vida os animais foram eutanasiados e os tecidos renais coletados para análise. O tempo médio de exposição foi de 36 dias.

3.3 ANÁLISES HISTOMORFOLÓGICAS E HISTOMORFOMÉTRICAS CELULARES

3.3.1 Massa corporal e massa relativa dos rins

Os filhotes foram divididos em grupo controle (n=8) e tratado (n=8) para pesagem individual ao longo do experimento e ao final do experimento após a eutanásia. Calculou-se a

massa relativa de cada órgão usando a fórmula: Massa relativa do órgão = (massa do órgão/massa vivo) x100 (El-Shenawy, 2009).

3.3.2 Microscopia de Luz

3.3.2.1 Histologia e morfometria dos tecidos renais de ratos imaturos (PND15) expostos ao Herbicida à base glifosato Roundup®

As análises histológicas e morfométricas foram realizadas após a eutanásia e os tecidos renais foram dissecados e fragmentados sagitalmente, após fixados em solução de paraformaldeído 4% e tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, e ósmio por 24 horas. Posteriormente processados com uma sequência de lavagens de 15 minutos com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 e, em seguida, desidratados em etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), durante 30 minutos cada. A pré-infiltração e a infiltração foram feitas com historesina glicol metacrilato e após emblocados com adição do agente endurecedor e posterior secagem. As lâminas foram produzidas a partir de cada bloco. Os cortes histológicos foram realizados com micrótomo em espessura de 4 µm, cada lâmina recebeu 4 cortes. Para coloração das amostras foi utilizada a colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) (Junqueira; Junqueira, 1983). As capturas de imagens foram realizadas no microscópio BX41 Olympus em objetivas 40X e 100X no campo claro para analisar a morfologia das células do córtex renal. Foram selecionados 9 glomérulos aleatoriamente ao longo dos 3 cortes histológicos por animal, sendo 3 animais do grupo controle e 3 animais expostos (Stevens; Oltean, 2018). Calculou-se o tamanho da área do tufo glomerular por meio da captura da imagem de cada glomérulo com lente de aumento de 40X obtidas com o auxílio do programa Image J e digitalizador de imagens Axio Scan com sistema Zeiss Blue. As imagens foram executadas no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) vinculado ao Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.4 COLETA DE SANGUE E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO

Após a eutanásia por decapitação, o sangue periférico foi coletado para obtenção do soro, acondicionado em microtubos plásticos sem anticoagulante. Após as amostras foram centrifugadas por 10 min à 1000 x g e o soro separado imediatamente.

3.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DA FUNÇÃO RENAL

3.5.1 Concentração de Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrofílica (NGAL)

Para determinar a concentração de NGAL foi usado 100 µL do padrão e de soro em cada poço (adicionar no fundo da placa para evitar espuma), cobrir com o selador e incubar 90 minutos à 37°C. Na placa foram pipetadas 100µL de soro em cada poço com as amostras de soro são adicionados o anticorpo NGAL humano e a peroxidase, incubados, após lavados e adicionado o substrato. A reação entre o anticorpo e a peroxidase forma a cor azul. A reação enzima substrato é finalizada com a solução de parada e formação de cor amarela. As concentrações foram mensuradas utilizando a técnica de ELISA tipo sanduíche, realizados de acordo com o fabricante, as medidas colorimétricas em 450 nm, em leitor de ELISA (Organon Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). A concentração de NGAL estimada por interpolação a partir da curva padrão de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de NGAL foram expressos em pg/mL.

3.5.2 Dosagem de Ácido Úrico

Foi utilizada 40 µL de soro de cada amostra, na reação o ácido úrico é oxidado pela uricase (UOD) em alantoína, CO₂ e água. Através de uma reação de copulação oxidativa, catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com o diclorofenolsulfonato (DCFS) e 4-aminoantipirina (4-AMP), produzindo uma antipirilquinonimina de cor vermelha. A absorbância do complexo formado é medida em 505 nm, é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico da amostra (Kaplan; Szabo; Opheim, 1988).

3.5.3 Dosagem de Creatinina

Foi utilizado 75 μ L do sobrenadante após desproteinização (ácido pícrico) do soro, a creatinina e os interferentes presentes na amostra reagem com o picrato alcalino, formando um complexo colorido que é medido fotometricamente em 492nm. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, decompondo o picrato de creatinina, deixando inalterada a cor derivada dos cromogênios que também é medida fotometricamente. O valor de creatinina da amostra é calculado pela diferença entre duas leituras fotométricas (LF): LF1 realizada após 30 segundos visando eliminar o efeito dos interferentes de reação rápida e LF2 realizado após 90 segundos visando eliminar os interferentes de reação lenta. Dessa forma, a determinação fotométrica do produto final fica livre de interferentes, referindo-se exclusivamente à creatinina presente.

3.6 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.6.1 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida glifosato-Roundup®

A formação de EROs foi medida utilizando a sonda diacetato de β' ,7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA), enquanto para formação de ERNs foi utilizada dihidrorodamina (DHR), permeáveis as células. Esterases celulares hidrolisam a sonda para o não fluorescente β' ,7' diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), que é retido nas células. O H₂DCF é transformado no β' ,7'-diclorofluoresceína (DCF), substância altamente fluorescente. Na presença de ERNs e peroxidases celulares, DHR 123 é convertido no fluoróforo Rhodamina-123 (Halliwell; Whiteman, 2004). A dosagem de proteínas pelo método de Lowry *et al.* (1951). Os tecidos foram dissecados com bisturi nº 11, pesados e homogeneizados em solução contendo fosfato de sódio 20 mM e KCl 140 mM, pH 7,4, com posterior centrifugação (960 x g por 10 min a 4°C). Em placa preta de 96 poços, 10 μ L de H₂DCFDA 1 mM ou DHR 123 1mM (preparado em DMSO e protegido da luz) foram adicionados em 90 μ L de sobrenadante, seguido de uma incubação no escuro a 37°C por 30 min. O produto foi detectado em comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias, sendo os valores corrigidos pela concentração de proteína de cada amostra.

3.6.2 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida glifosato-Roundup®

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GGT, GST, GPx) e do conteúdo de GSH, os tecidos foram pesados e homogeneizados com uma solução contendo tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4; 0,1% Triton e NaCl 150 mM, (1:20 m/v), e uma alíquota foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry *et al.* (1951). As determinações enzimáticas foram realizadas usando-se o sobrenadante após centrifugação do homogeneizado (5.000 x g por 5 min).

3.6.2.1 Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada pela velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio 30% (10 mM). Os tecidos foram pesados e homogeneizados em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 conforme proposto por Aebi (1984). Adicionou-se 200 μ L desta solução na placa de 96 poços, com acréscimo de 5 μ L dos tecidos homogeneizados, em seguida realizou-se leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 5 minutos. Os valores foram expressos em $\text{mmol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

3.6.2.2 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada pela da oxidação da adrenalina (mudança de pH 2.0 para pH 10.0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, o qual é mensurado em 480 nm. Os tecidos foram pesados e homogeneizados em tampão fosfato 50 mM pH 7,4. Em uma placa de 96 poços uma curva de amostras dos tecidos homogeneizados é feita (5, 10, 15, 20, 40 μ l) após foi adicionado glicina 50 mM, pH 10.2, foram adicionados 5 μ L de adrenalina 60 mM (pH em torno de 2,0). Curvas de 4 ou 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD foram expressos como unidades de SOD x mg proteína⁻¹, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo Misra e Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1983).

3.6.2.3 *Gama-glutamil transferase (GGT)*

A atividade enzimática da GGT segue os princípios descrito por Orłowski e Meister (1963) e foi determinada por metodologia cinética-colorimétrica, utilizando kit comercial da marca Labtest®. A técnica fundamenta-se na capacidade da GGT catalisar a transferência do grupamento glutamil da gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida (molécula doadora) para a glicilglicina (molécula aceptora) liberando gama-glutamil-glicilglicina e 3-carboxi-4-nitroanilina (ou *p*-nitroanilina), a qual é diazotada, gerando um composto final de cor rósea (gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida + glicilglicina → gama-glutamil-glicilglicina + 3-carboxi-4-nitroanilina). A *p*-nitroanilina apresenta elevada absorção em 405 nm e a quantidade liberada é diretamente proporcional à atividade de GGT presente na amostra. A atividade catalítica é determinada a partir da velocidade de formação da *p*-nitroanilina.

Os tecidos renais foram pesados e homogeneizados em 300 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M em pH 8,5, e alíquotas de 5 µL do homogeneizado foram incubadas com o substrato enzimático a 37 °C pelo tempo recomendado pelo fabricante e a reação enzimática foi bloqueada pela adição de ácido acético. A absorbância foi mensurada em 405 nm. Os resultados foram expressos como U/L/µg proteína.

3.6.2.4 *Glutathione Peroxidase (GPx)*

A determinação da atividade enzimática da GPx foi determinada pelo método de Flohe e Gunzler (1984) e modificado por Torsoni, Viana e Ogo (1998), utilizando *t*-Bu-OOH e glutathione (GSH) como substratos. A GPx dismuta o *t*-Bu-OOH gerando uma ponte de dissulfeto entre duas moléculas de GSH, chamada de GSSG, que por sua vez, retorna ao estado reduzido (GSH) pela ação da GR que oxida o NADPH. A oxidação do NADPH é medida em 340 nm. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade de GPx presente na amostra.

No momento de realização da técnica, foi preparado um meio de reação contendo 25 mL de TKF 0,1 M em pH 7,0, 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 5 mM, 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH e 5000 U de GR. Em placas de 96 poços foi adicionado 15 ou 30 µL do sobrenadante, dependendo da amostra analisada,

completando o volume para 200 μL de volume final do meio da reação e 5 μL de *t*-Bu-OOH preparado no tampão fosfato citado acima. Imediatamente foi realizado a leitura do decaimento da absorbância em espectrofotômetro a 340 nm, mantendo a temperatura em 37 °C, durante cinco minutos. Para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar no NADPH ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), em que uma unidade de GPx é equivale a hidrólise de 1 μmol de NADPH por minuto (Torsoni; Viana; Ogo, 1998) e os resultados foram expressos em $\text{mmol}/\mu\text{g}$ proteína/min.

3.6.2.5 *Glutathione S-Transferase (GST)*

A atividade da enzima GST foi determinada de acordo com o método de Habig, Pabst e Jakoby (1974) e utilizado 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0,1 M como substrato para GST. A GST irá promover a formação do conjugado GSH:CDNB, que é mensurável em 340 nm. Na sequência foram preparadas as soluções de CDNB 0,1 M em etanol e GSH 0,1 M em tampão fosfato de potássio 0,1 M em pH 7,0. Ambas as soluções ficaram protegidas da luz e em banho de gelo até o momento do uso. Em placas de 96 poços foi adicionado 5 μL do sobrenadante do tecido renal, completando o volume para 250 μL de volume final com tampão fosfato de potássio 0,1 M em pH 7,0, por último, foi adicionado 5 μL de CDNB e 5 μL de GSH. Em seguida foi realizada a leitura do aumento da absorbância em espectrofotômetro a 340 nm, mantendo-se a temperatura em 37 °C, por cinco minutos. Para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar do conjugado CDNB:GSH ($\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Wang *et al.*, 1997) e a atividade enzimática foi expressa em $\text{mmol}/\mu\text{g}$ proteína/min.

3.6.2.6 *Conteúdo de Glutathione Reduzida (GSH)*

Para mensurar o conteúdo de GSH foi utilizado o método proposto por Hissin e Hilf (1976). Neste método é usado o reagente fluorescente OPT (fluorescente o-ftaldialdeído), a GSH reage especificamente com OPT em pH 8,0, produzindo um produto altamente fluorescente. A leitura de excitação foi medida em 350 nm e pico de emissão em 420 nm. A intensidade do complexo OPT-GSH está diretamente relacionada à concentração de GSH presente na amostra. Os tecidos foram pesados e homogeneizados em tampão fosfato de sódio 100 mM em pH 8,0. Após foi adicionado ácido tricloroacético 2,5% para precipitação de

proteínas, seguida de centrifugação a 15.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi usado na determinação do conteúdo de GSH. No momento de execução da técnica, foi preparado uma solução de OPT 1% em metanol, armazenada ao abrigo da luz e em gelo. Em placa preta de 96 poços foi adicionado 50 μ L do sobrenadante, 150 μ L de tampão fosfato de sódio 100 mM em pH 8,0 e 50 μ de OPT, seguido da leitura da fluorescência em leitor TECAN Infinity M200. Os valores de fluorescência obtidos foram corrigidos pela curva padrão de GSH (0,4 a 1,6 μ M) e expressos como μ M de GSH / μ g proteína.

3.7 MARCADORES INFLAMATÓRIOS

3.7.1 Concentração de Citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Para avaliar as concentrações de IL-6, IL-1 β e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) os tecidos foram pesados e homogeneizados em tampão contendo Tris-HCl 50 mM, Tween 20, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, NaF 50 mM em pH 7,4 foram usados os *kits* comerciais disponíveis (Thermo Fisher Scientific Inc.®), com anticorpos monoclonais específicos para as citocinas pró-. As concentrações das citocinas foram mensuradas utilizando a técnica de ELISA tipo sanduíche, realizada de acordo com o fabricante, a leitura foi realizada em 450 nm, no leitor de ELISA (Organon Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). As concentrações de citocinas foram estimadas por interpolação a partir da curva padrão de cada citocina, de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de IL-6, IL-1 β e TNF- α foram expressos em pg/mg de proteína.

A atividade da enzima MPO foi mensurada segundo o método descrito por Rao *et al.* (1993). Os tecidos renais foram homogeneizados em tampão HTAB 0,05% (brometo de hexadeciltrimetilamônio). No dia do experimento, 20 μ L da amostra foi transferida para placas de 96 poços contendo 150 μ L de meio de reação (0,167 mg.mL⁻¹ de o-dianisidina 2HCl, 0,0005% de H₂O₂ e TFK 50 mM). Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 30 μ L de azida sódica 1% e aguardado 10 minutos para realizar leitura pontual em espectrofotômetro a 450 nm. Curvas-padrão com atividades conhecidas de MPO (0,7 - 140 mU/mL) também tiveram suas densidades óticas

determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores da MPO foram expressos em mU/ μ g proteína (Dalmarco, 2003).

3.8 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

3.8.1 Atividade da enzima ectonucleotidase trifosfato difosforilase (NTPDase)

O método usado foi proposto por Pilla *et al.* (1996) adaptado por Lunkes *et al.* (2003). Os tecidos foram pesados e homogeneizados em tampão HEPES 3,5 mM. Para incubação é preparada uma solução contendo cloreto de sódio (NaCl) 1,2 M, glicose 60 mM, cloreto de potássio (KCl) 50 mM, tris-hidrocloreto (Tris-HCL) 500 mM (pH 7,4), cloreto de cálcio (CaCl₂) 50 mM. Em triplicata para cada poço é adicionado 160 μ L da solução (sistema de incubação) e 20 μ L das amostras e pré-incubadas à 37°C por 10 minutos. Após a incubação é adicionado 20 μ L do substrato (ATP/ADP 10 mM) e incubado por 70 minutos, ao final foi adicionado 150 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 15%. Desta solução retirou-se 30 μ L que foi adicionada em uma nova placa conjuntamente com 300 μ L de verde malaquita, para leitura de absorbância em 630 nm. A medida é calculada pelas médias das absorbâncias de cada amostra multiplicadas pelo FC do fosfato, e divididas pelo tempo de incubação, volume e concentração de proteínas. Os resultados foram expressos em nmol Pi/min/mg de proteína.

3.8.2 Atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase

O método usado foi proposto por Pilla *et al.* (1996) adaptado por Lunkes *et al.* (2003). Os tecidos foram pesados e homogeneizados em tampão HEPES 3,5 mM. Para incubação é preparada uma solução contendo cloreto de sódio (NaCl) 1,2 M, glicose 60 mM, cloreto de potássio (KCl) 50 mM, tris-hidrocloreto (Tris-HCL) 500 mM (pH 7,4), por cloreto de magnésio (MgCl₂) 100 mM. Em triplicata para cada poço é adicionado 160 μ L da solução (sistema de incubação) e 20 μ L das amostras e pré-incubadas à 37°C por 10 minutos. Após a incubação é adicionado 20 μ L do substrato (AMP 20 mM) e incubado por 70 minutos, ao final foi adicionado 150 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 15%. Desta solução retirou-se 30 μ L que foi adicionada em uma nova placa conjuntamente com 300 μ L de verde malaquita, para leitura de absorbância em 630 nm. A medida é calculada pelas médias das absorbâncias de cada amostra

multiplicadas pelo Fator de Correção (FC) do fosfato, e divididas pelo tempo de incubação, volume e concentração de proteínas. Os resultados foram expressos em nmol Pi/min/mg de proteína.

3.8.3 Atividade da adenosina desaminase (ADA)

Os tecidos foram pesados e homogeneizados em tampão HEPES 3,5 mM. Para dosagem adenosina desaminase (ADA) foi adicionada na placa 30 μ L de amostra e 90 μ L de adenosina, também se identificou a cavidade denominada “branco da amostra”, na qual adicionou-se apenas a solução de adenosina, após placa foi incubada por 60 minutos à 37°C. A seguir pipetou-se 30 μ L da amostra no poço branco de cada amostra, e em ambos os poços se colocou 80 μ L de fenol/nitroprussiato e 80 μ L de hipoclorito alcalino. A placa foi novamente incubada pelo período de 30 minutos a 37°C. A desaminação da adenosina (ADO) foi medida pela avaliação da atividade da adenosina desaminase (ADA). A leitura do índice de amônia liberada pela ação da ADA foi realizada com leitura de absorbância em 620 nm (Giusti; Galanti, 1984). O protocolo foi realizado em triplicata e para definição dos resultados utilizou-se a média das absorbâncias e do padrão, multiplicados pelo FC, sendo os valores obtidos expressos em unidades/litro (U/L).

3.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Uma curva padrão utilizando a albumina de soro bovino (Sigma®) foi utilizada para calcular os níveis de proteína nas amostras. Na atividade das ectoenzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase o protocolo analítico foi realizado utilizando o reagente de Coomassie, a partir do qual realizou-se curva padrão em triplicata com albumina bovina, procedendo as leituras da absorbância s em espectrofotômetro UV/VIS 5300PC, da Metash, leitura de 595 nm, e obteve-se o FC. Para dosagem de proteína das amostras adicionou-se em um tubo de ensaio 2.500 μ L do reagente e 50 μ L de amostra, sendo calculadas as concentrações. As concentrações de proteína das amostras foram normalizadas entre 0,10,2 e 0,4-0,6 mg/mL (Bradford, 1976).

3.10 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT), ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)

Os tecidos retirados foram homogeneizados em 300 μ L de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4 e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). As atividades das enzimas ALT e AST foram determinadas através de reações colorimétricas. Na reação, a alanina aminotransferase (ALT/TGP) catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. A aspartato aminotransferase (AST/TGO) catalisa especificamente a transferência do grupo amina do aspartato para o cetoglutarato com a formação de glutamato e oxaloacetato. Tanto o piruvato quanto o oxaloacetato 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, a absorbância foi mensurada em 505 nm. Os resultados foram expressos como U/L/ μ g proteína.

3.11 IMUNOCONTEÚDO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MORTE CELULAR, DANO AO DNA E ESTRESSE OXIDATIVO

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é baseada na separação das proteínas por peso molecular através de uma eletroforese, seguindo-se da transferência para uma membrana e a detecção da proteína de interesse com um anticorpo específico. Foram analisadas as proteínas γ H2AX, p53, caspase-3, p-p54 JNK, p-p46 JNK e Nrf2. A concentração de proteínas presente em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford utilizando um kit para determinação (BioRad). Posteriormente, as amostras foram desnaturadas em tampão de lise contendo glicerol 40%, azul de bromofenol 0,1% e Tris-HCl 500 mM em pH 6.8, suplementado de 20% de β -mercaptoetanol 5%, esse tampão de lise foi adicionado no homogenato na proporção de 20% e incubado por três minutos a 100°C. Quantidades iguais de proteínas (40 μ g) provenientes dos homogenato dos tecidos foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE). Posteriormente, as proteínas foram separadas e transferidas para membranas de nitrocelulose por eletrotransferência. Na sequência, estas membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado, lavadas e incubadas overnight com os anticorpos primários nas diluições indicadas

nos datasheets dos mesmos. Transcorrido o período de incubação, as membranas foram lavadas e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase nas diluições indicadas nos respectivos datasheets. Os anticorpos primários utilizados para detecção de proteínas são os anticorpos primários anti-caspase 3 rabbit (#9664), antifosfo-JNK rabbit p-p46 e p-p54 (#46715), anti-Nrf2 rabbit (AV39465), anti-p53 mouse (sc-126), histona γ -H2AX (Ser 139) rabbit (sc-101696), anticorpo β -actina mouse (sc-47778), seguidos por anticorpos secundários anti-mouse IgG conjugado à peroxidase rabbit (A9044) e anticorpo anti-rabbit IgG conjugado à peroxidase goat (A0545). Para o controle de carga de proteínas utilizou-se como marcador a β -actina. As bandas referentes às proteínas estudadas foram obtidas pelo fotodocumentador ChemiDoc MP Bio-Rad. As bandas referentes às proteínas estudadas foram obtidas pelo fotodocumentador ChemiDoc MP Bio-Rad.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através teste *t* de Student complementada por teste de Mann-Whitney, quando necessário, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo, $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (D.P.) com auxílio do programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) para todas as análises.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO NO TECIDO RENAL DE RATOS IMATUROS (PND15) NOS PARÂMETROS HISTOMORFOLÓGICOS E HISTOMORFOMÉTRICOS CELULARES

Os parâmetros histomorfológicos apresentados a seguir, foram obtidos através da avaliação do perfil ponderal dos filhotes expostos ao HBG durante fase perinatal.

4.1.1 Perfil ponderal dos animais controle e expostos ao herbicida à base de glifosato-Roundup®

A massa corporal e a massa relativa dos rins dos animais estão demonstradas na Tabela 2. A massa corporal no grupo controle foi $26,13 \pm 0,5154$ g, enquanto no grupo tratado foi $23,88 \pm 0,8332$ g. Houve uma redução significativa no ganho de massa corporal em torno de 8,62 % (* $p < 0,05$) nos animais expostos ao HBG. Observou-se diminuição da massa relativa dos rins dos filhotes expostos ao HBG ($1,109 \pm 0.010$; * $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($1,21 \pm 0.025$), representando uma redução significativa de 8,12% na massa relativa do órgão.

Tabela 2 - Efeitos da exposição ao Roundup® na massa corpórea e massa relativa dos rins de ratos imaturos (PND15).

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo Exposto
Massa corpórea (g)	$26,13 \pm 0,5154$	$23,88 \pm 0,8332$ *
Massa relativa do rim (g)	$1,207 \pm 0.025$	$1,109 \pm 0.010$ *

Fonte: Autora.

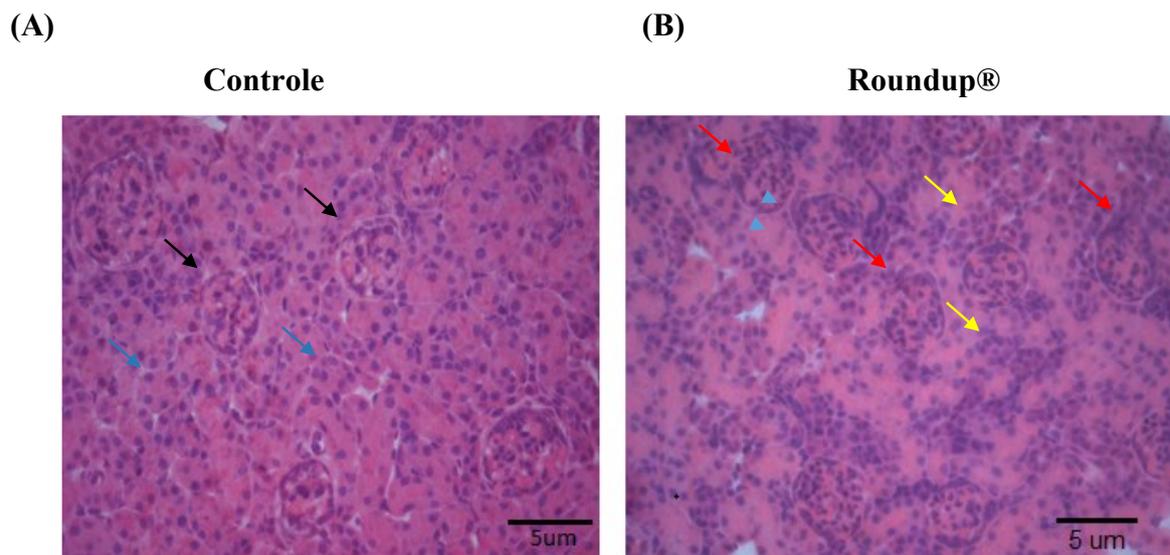
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M, (n=8). Análise estatística: Teste *t* de Student. * $p < 0,05$ comparado com controle.

4.1.2 Avaliação da morfologia no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base de glifosato Roundup®

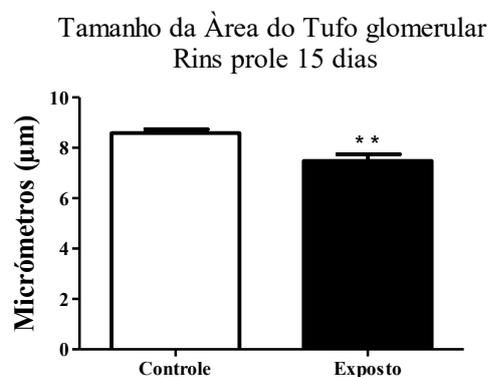
Para avaliar o efeito do herbicida à base de glifosato Roundup® sobre a morfologia do tecido renal de ratos imaturos (PND15), cortes histológicos do tecido renal foram corados com hematoxilina-eosina, como demonstra a Figura 21(A-B). Os resultados mostraram que a

histomorfologia do tecido renal da prole foi modificada pela exposição ao HBG. Nas fotomicrografias observa-se danos glomerulares nos animais expostos caracterizado pela perda do espaço de Bowman com atrofia e colapso dos glomérulos renais e vacuolização. Nos túbulos proximais foi observado rompimento da membrana citoplasmática enquanto no grupo controle permaneceu íntegra. Na Figura 21 (C) estão mostrados os impactos da exposição perinatal ao HBG na morfometria da área do tufo glomerular, que compreende a vasculatura do glomérulo responsável pela filtração glomerular, observou-se uma redução significativa de 12,1% (** $p < 0,01$) no tamanho do corpúsculo renal dos animais expostos ao herbicida em relação ao grupo controle.

Figura 20 – Efeitos da exposição ao glifosato na morfologia do tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base de glifosato Roundup®.



(C)



Fonte: Autora

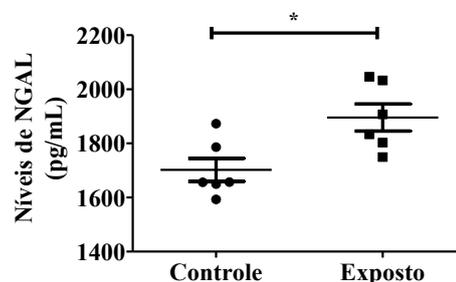
Microfotografias representativas de preparações histológicas coradas com hematoxilina-eosina (A-B) do córtex do renal de ratos imaturos expostos ao herbicida à base de glifosato Roundup®. Seta preta: glomérulos normais, seta vermelha: glomérulos com perda do espaço de Bowman e atrofia e colapso do glomérulo renal, seta azul: túbulos proximais íntegros, seta amarela: túbulos proximais com membrana citoplasmática rompida, triângulos azuis: vacuolização de túbulos proximais. Aumento = 40X (Barra = 5µm) (n = 6 animais). (C) Morfometria do corpúsculo renal de ratos imaturos (PND15) mensuração de 9 glomérulos (3 por animal) (n = 6 animais). Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. Análise estatística: Teste *t* de Student ***p* < 0,01.

4.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO ROUNDUP® NOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DA FUNÇÃO RENAL EM RATOS IMATUROS (PND15)

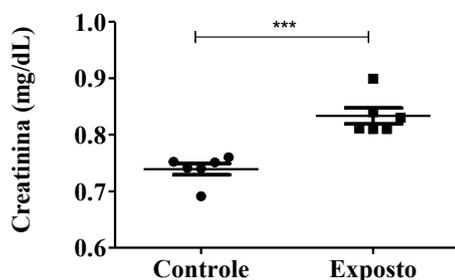
4.2.1 Dosagem de Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrofílica (NGAL) creatinina e ácido úrico no soro de ratos imaturos (PND15) exposto ao herbicida à base de glifosato Roundup®

Através da mensuração dos níveis de NGAL, podemos avaliar alterações precoces na função renal com a presença de lesões do néfron. Neste contexto, nossos resultados demonstram aumento médio de 11% (**p*<0,05) na dosagem de NGAL quando comparado ao grupo controle, como demonstra a Figura 22(A). Avaliamos a dosagem de creatinina (Figura 22B) observou-se um aumento significativo de 15,08% (***p*<0,001) nos animais expostos ao glifosato em relação ao grupo controle, o que pode sugerir redução ou perda da função renal. As concentrações de ácido úrico não foram alteradas pela exposição ao HBG (Figura 22C) a excreção renal desse metabólito parece estar mantida.

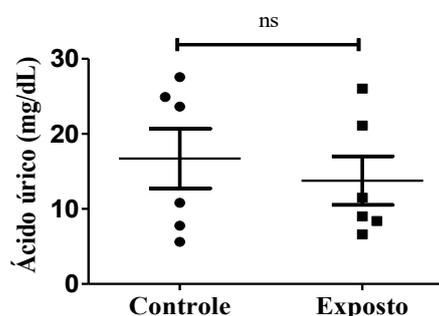
Figura 21 - Dosagem de Lipocaína Associada à Gelatinase Neutrofílica (NGAL) no soro de ratos imaturos. (A)



(B)



(C)



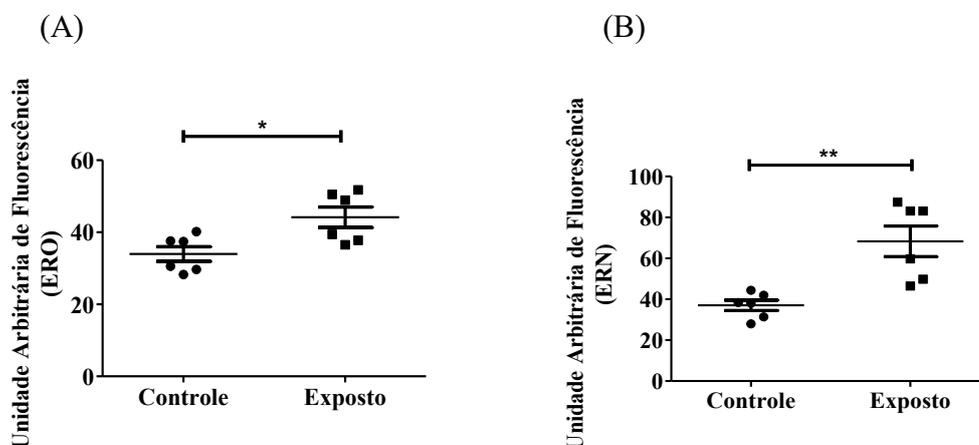
Legenda: Níveis de Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrófila (NGAL) (A) creatinina (B) e ácido úrico (C) no soro de ratos imaturos (PND15) exposto ao herbicida à base glifosato Roundup®. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. (n = 06). Análise estatística: Teste *t* de Student. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ comparado com controle.

4.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NO ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO RENAL DE RATOS IMATUROS (PND15)

4.3.1 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base glifosato Roundup®

As EROs foram mensuradas para verificar uma possível indução de estresse oxidativo. Observou-se que o grupo tratado teve um aumento significativo na formação de EROs, 19% (* $p < 0,05$) quando comparado ao controle, como demonstra a Figura 23(A). A formação de ERNs foi investigada com intuito avaliar e corroborar com o indicador anterior uma possível indução de estresse oxidativo no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao HBG. Na Figura 23(B) observou-se que os animais do grupo tratado (expostos ao glifosato), obtiveram aumento de 43% (** $p < 0,01$) na formação e ERNs quando comparado ao grupo controle, apresentando assim, diferença significativa.

Figura 22 - Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base de glifosato Roundup®.

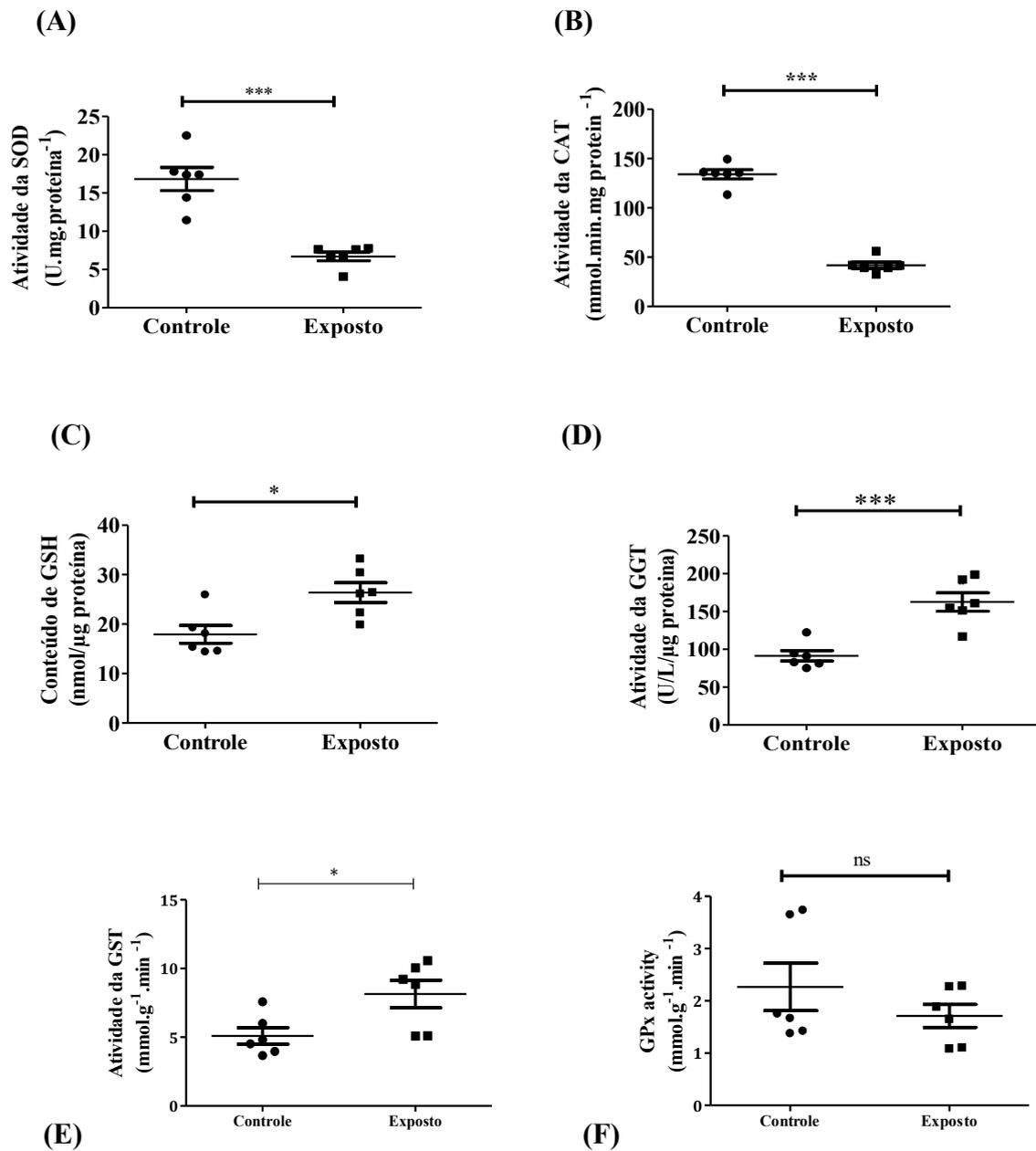


Legenda: Formação de espécies reativas de oxigênio (A) e nitrogênio (B) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base de glifosato Roundup®. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M., (n=6). Análise estatística: Teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

4.3.2 Atividade das enzimas antioxidantes e conteúdo de glutathiona no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base glifosato Roundup®

Para avaliar resposta antioxidante no tecido renal de ratos imaturos expostos ao herbicida à base de glifosato Roundup® nos avaliamos as atividades enzimáticas e o conteúdo de glutathiona. Os resultados apresentados na Figura 24(A), demonstram a redução significativa de 61% (** $p < 0,01$) na atividade da SOD no grupo tratado quando comparado ao grupo controle. O mesmo perfil citado anteriormente foi apresentado pela enzima catalase, demonstrando uma redução de 68% (** $p < 0,01$) quando comparamos o grupo tratado ao grupo controle (Figura 24 B). A análise do tripeptídeo GSH no grupo tratado obteve aumento significativo de 13% (* $p < 0,05$) no seu conteúdo quando comparado ao grupo controle, além disso, a enzima GGT, também apresentou aumento de 75% (** $p < 0,001$) de sua atividade quando comparamos com o grupo controle, como demonstra os dados apresentados na Figura 24(C-D), respectivamente. O grupo tratado apresentou um aumento significativo de 62,5% (* $p < 0,05$) da atividade da enzima glutathiona s-transferase quando comparamos com grupo controle (Figura 24E), enquanto que ambos os grupos não apresentaram alteração na atividade da enzima GPx (Figura 24F).

Figura 23 - Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GGT, GTS, GPX e do conteúdo do tripeptídeo GSH no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base de glifosato-Roundup®

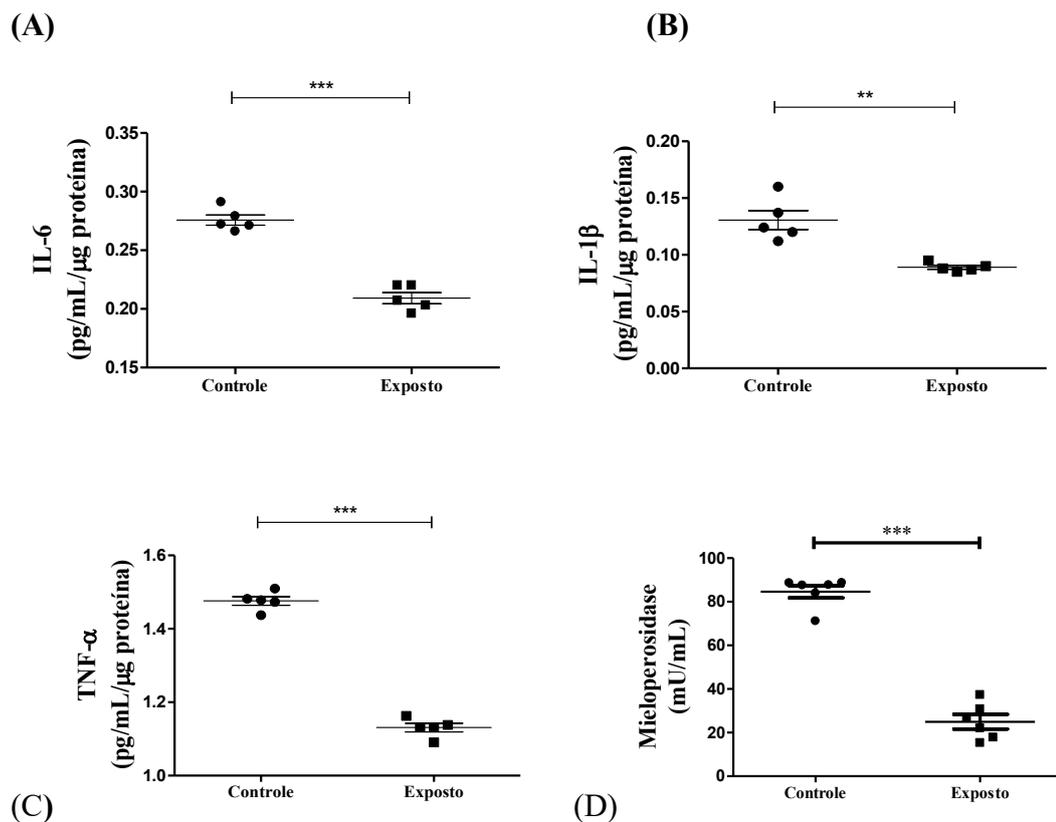


Legenda: Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A); catalase (CAT) (B); (GGT) gama glutamiltransferase (D), do Conteúdo de GSH (C), GST(E), GPX(F) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base de glifosato Roundup®. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M., (n=6). Análise estatística: Teste *t* de Student. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

4.4 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO NAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS IL-6, IL-1 β , FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α) E ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) NO TECIDO RENAL DE RATOS IMATUROS(PND15)

Com objetivo de avaliar a presença de resposta inflamatória e possíveis alterações no tecido renal de ratos imaturos expostos ao HBG, foram determinadas as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Os resultados demonstram redução no conteúdo da IL-6, IL-1 β , TNF- α , bem como na atividade da enzima mieloperoxidase nos grupos expostos ao HBG, sendo esta redução de 25% (**p < 0,001), 32% (**p < 0,01), 23% (**p < 0,001) e 29,5% (**p < 0,001), respectivamente (Figura 25A-D).

Figura 24 - Citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a atividade da enzima mieloperoxidase no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base de glifosato-Roundup®.

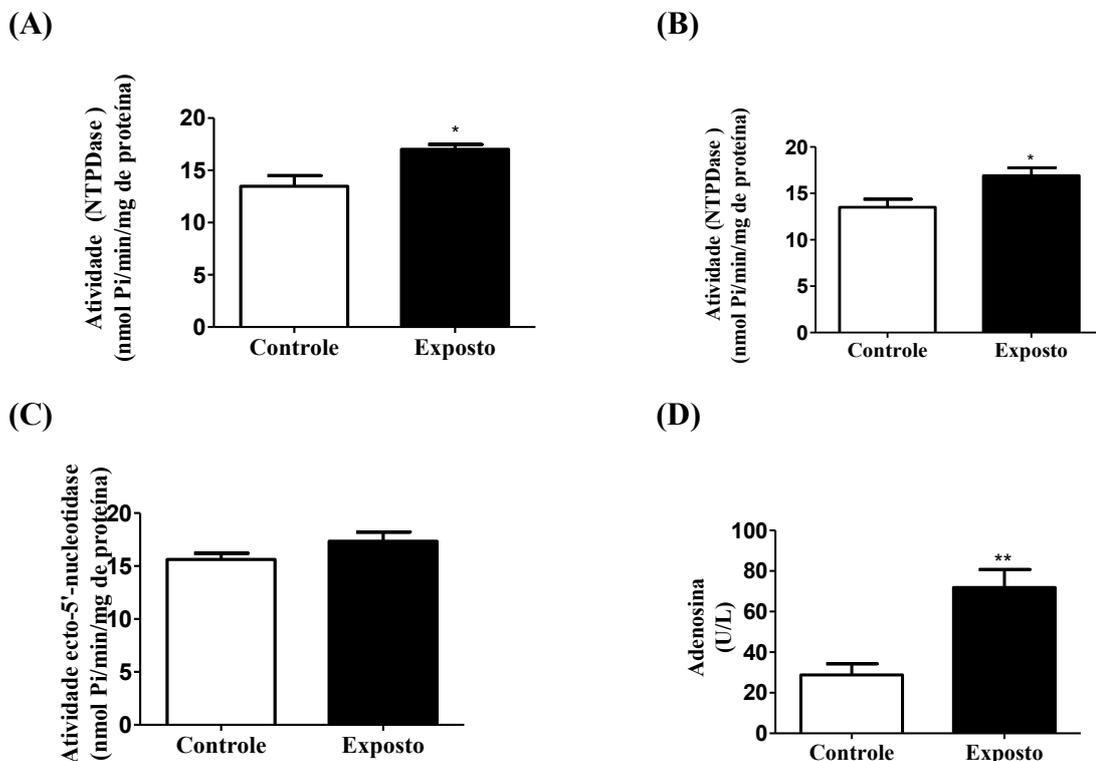


Legenda: Citocinas pró-inflamatórias IL-6(A), IL-1 β (B) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (C) e atividade da enzima mieloperoxidase (D) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base de glifosato Roundup®. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. (n = 5). Análise estatística: Teste t de Student. * p < 0,01 ***p < 0,001 comparado com controle.

4.5 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO ROUNDUP® NO TECIDO RENAL DE RATOS IMATUROS (PND15) NA HIDRÓLISE TRIFOSFATO DE ADENOSINA (ATP)

A sinalização purinérgica atua na fisiologia renal pela ativação de receptores P1 e P2 presentes no néfron, na vasculatura renal, nas células mesangiais e nos podócitos. Para avaliar a presença de lesões renais, avaliou-se os impactos da exposição perinatal ao HBG sobre a hidrólise do ATP intracelular. Durante a lesão de tecidos renais, o ATP intracelular é liberado como um sinal de padrão molecular associado ao dano nas lesões renais (Monaghan; Bailey; Unwin, 2021). Observou-se aumento na atividade da ecto-NTPDase no tecido renal de filhotes expostos ao HBG durante o período perinatal (Figura 26B). A atividade da ecto-5'-nucleotidase no tecido renal da prole não foi alterada pela exposição perinatal ao HBG (Figura 26C). A Figura 26(D) mostra que a exposição ao HBG aumenta a atividade da ADA (149%; $**p < 0,01$), sugerindo aumento na desaminação da Ado quando comparada ao grupo controle.

Figura 25 - Atividade das ectoenzimas purinérgicas na hidrólise do ATP, ADP, AMP e desaminação da adenosina (ADO) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base glifosato Roundup®

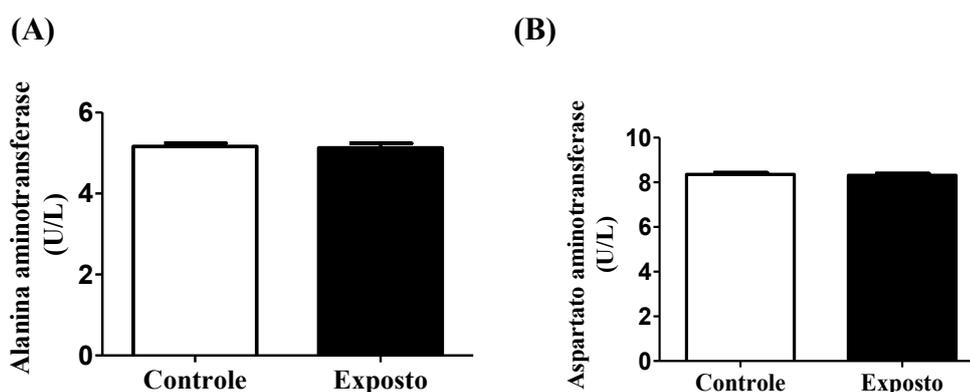


Legenda: Atividade das ectoenzimas purinérgicas (A) NTPDase, (B) NTPDase, (C) ecto-5'-nucleotidase(D) Adenosina desaminase no tecido renal de ratos imaturos (PND15) expostos ao herbicida à base de glifosato Roundup®. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. (n = 07). Análise estatística: Teste *t* de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

4.6 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO ROUNDUP® NO TECIDO RENAL DE RATOS IMATUROS (PND15) NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS AMINOTRANSFERASES (ALT E AST)

Avaliou-se as enzimas intracelulares ALT e AST que estão presentes no rim e são responsáveis pela interconversão e transferência de grupamentos amino entre aminoácidos e alfa-cetoácidos. A Figura 27(A-B) demonstra que não há diferença significativa na atividade das enzimas ALT e da AST entre o grupo controle e o exposto ao HBG. Os valores médios do grupo controle foi de $5,12 \pm 0,11$ e o valor do grupo tratado foi de $5,16 \pm 0,07$ para ALT e no grupo controle foi de $8,35 \pm 0,08$ e o valor do grupo tratado foi de $8,31 \pm 0,08$ para AST, demonstrando não haver diferença significativa entre os grupos.

Figura 26 - Atividade das enzimas da alanina aminotransferase (ALT) e atividade da aspartato aminotransferase (AST) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) exposto ao herbicida à base de glifosato-Roundup®



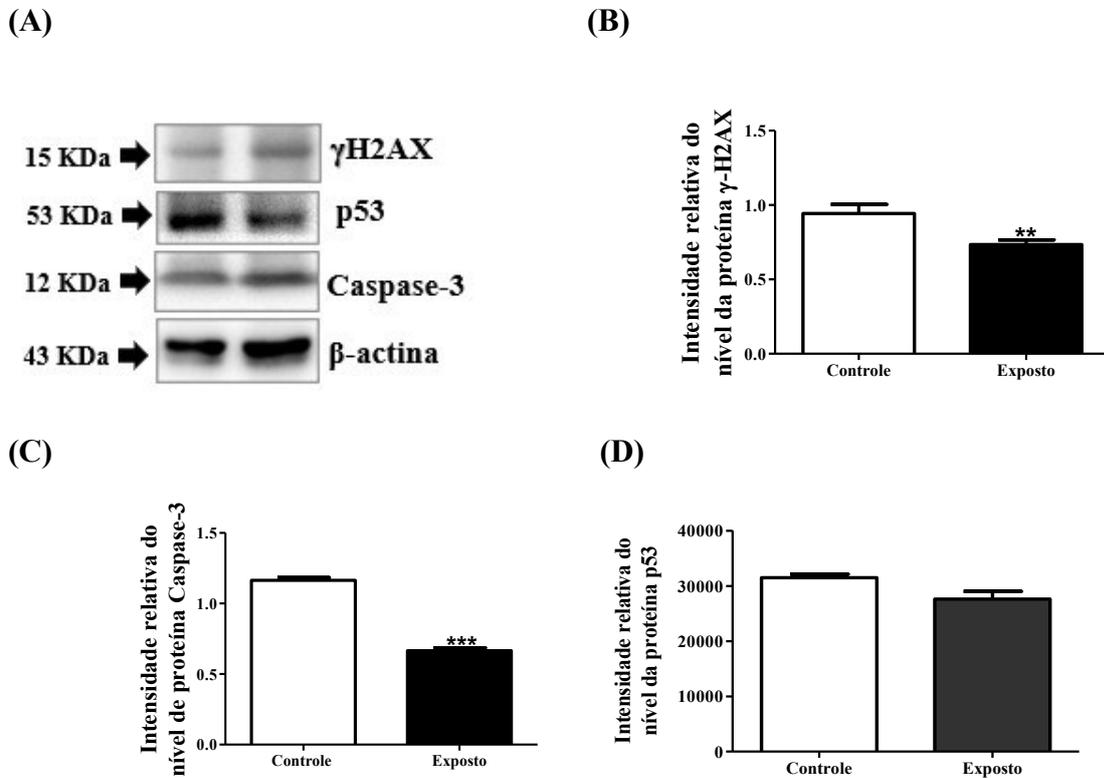
Legenda: Atividade das enzimas (A) atividade da alanina aminotransferase (ALT) e (B) atividade da aspartato aminotransferase (AST) no tecido renal de ratos imaturos (PND15) exposto ao herbicida à base de glifosato Roundup®. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. (n = 06). Análise estatística: Teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

4.7 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO ROUNDUP® NOS NÍVEIS DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MORTE CELULAR, DANO AO DNA E ESTRESSE OXIDATIVO NO TECIDO RENAL DE RATOS IMATUROS (PND15)

4.7.1 Expressão das proteínas γ H2AX, p53, caspase 3 no tecido renal de ratos imaturos expostos ao herbicida à base de glifosato-Roundup®

Para avaliar os possíveis danos ao DNA induzidos pela exposição perinatal ao HBG nas células renais, foi analisada a expressão da proteína γ H2AX, um indicativo de quebra na dupla fita do DNA que atua como um sensor de dano quando fosforilado. Na Figura 28(A-B) o grupo exposto ao HBG apresentou níveis de γ H2AX no grupo controle de $0,94\pm 0,03$ e no grupo tratado $0,73\pm 0,01$ com redução de 22,09% (** $p < 0,01$) no grupo tratado em relação ao grupo controle. No desenvolvimento da lesão renal aguda a proteína p53 sinaliza a morte das células tubulares, nessa lesão celular e no caso de ineficiência do reparo o ciclo celular é imediatamente bloqueado e desencadeia-se a apoptose, pelo aumento da fosforilação da proteína p53. Na Figura 28(A e D), os dados demonstram que não há diferença significativa nos níveis dessa proteína do grupo controle em comparação com o grupo tratado com HBG. As vias apoptóticas estão presentes nos processos de isquemia e reperfusão renal onde há mudanças morfológicas nos túbulos proximais, incluindo perda de polaridade, perda da borda em escova resultando na morte celular, para elucidar o processo foi avaliado os níveis de caspase 3 conforme a Figura 28(A e C) com valores do controle $1,16\pm 0,01$ e tratado $0,66\pm 0,01$, os níveis dessa proteína foram reduzidos significativamente em 43,11% (** $p < 0,001$) no grupo tratado em comparação com o grupo controle.

Figura 27 - Níveis das proteínas γ H2AX, p53, caspase 3 no tecido renal de ratos imaturos expostos ao herbicida à base de glifosato-Roundup®

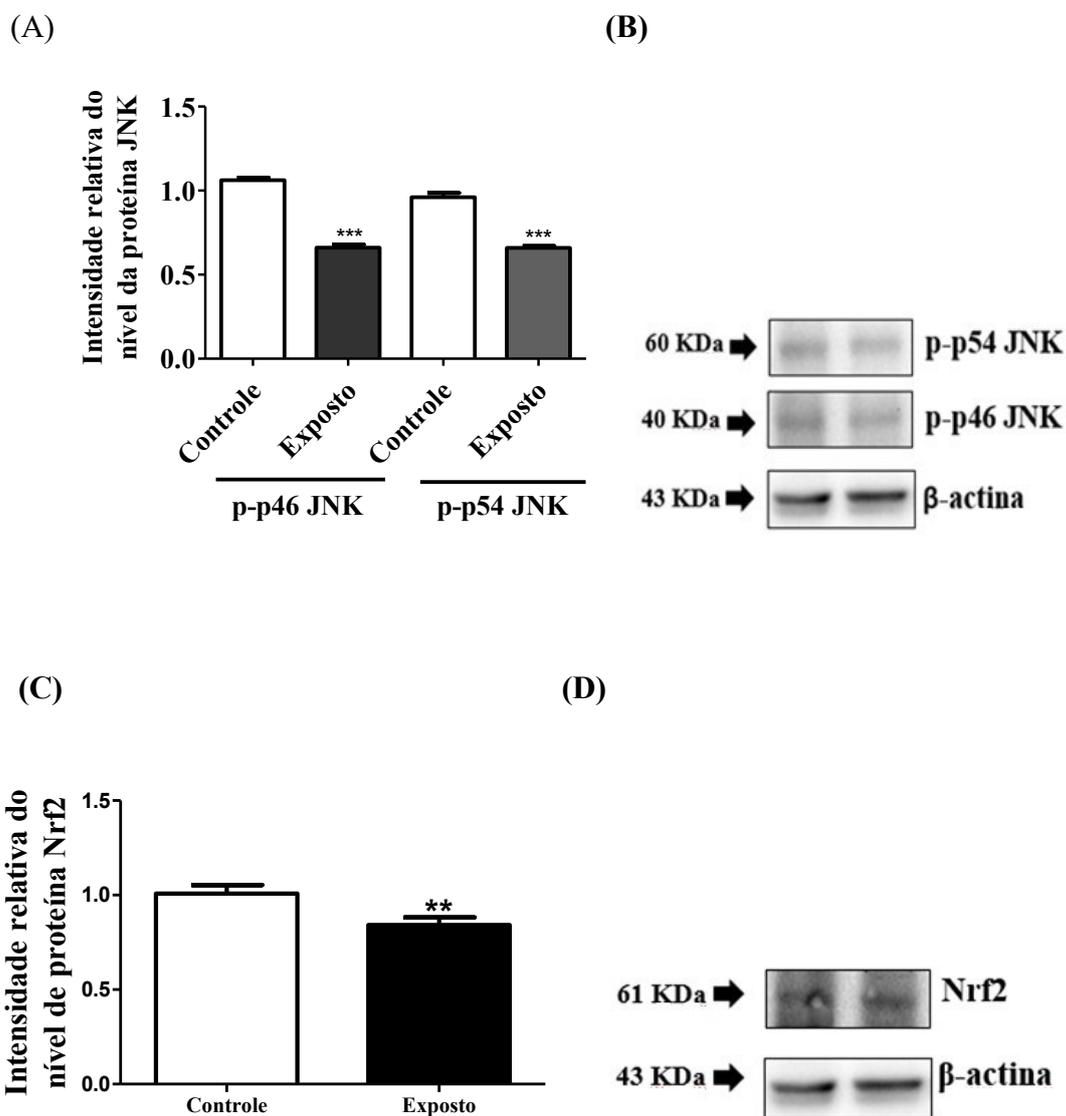


Legenda: Efeito da exposição *in vivo* em tecido renal de ratos imaturos (15 dias de vida) ao herbicida à base de glifosato Roundup® na expressão das proteínas γ H2AX, p53, caspase 3. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. Análise estatística: Teste t de Student ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado com controle.

A JNK (cinase c-Jun N-terminal) é uma proteína da família de serina/treonina cinases. A MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) ativa a transdução de sinais de proliferação celular, diferenciação, migração e apoptose celular. Nas células glomerulares, durante a insuficiência renal aguda e crônica sua ativação sinaliza para vias de transcrição de mediadores pró-inflamatórios, estresse oxidativo, fatores pró-fibróticos e apoptose (Grynberg; Ma; Paterson, 2017). De acordo com a Figura 29(A-B), observamos uma redução significativa de p-p46, no grupo controle $1,062 \pm 0,01$ e no tratado com $0,66 \pm 0,01$ com redução de 38,68% (***) $p < 0,001$) e p-p54 no grupo controle $0,96 \pm 0,02$ e no tratado com $0,65 \pm 0,01$ com redução 31,58% (***) $p < 0,001$) do grupo tratado em comparação com o grupo controle. Para analisar a via de sinalização de genes de defesa antioxidante, avaliamos o fator de transcrição antioxidante Nrf2 está presente nas células tubulares renais com nefroprotetor contra agressões

locais, quando há estresse oxidativo Nrf2 induz a expressão de genes antioxidantes que fazem a citoproteção local evitando danos nas células tubulares promovendo uma resposta antioxidante. De acordo com a Figura 29(C-D), os níveis de Nrf2 no grupo controle $1,00 \pm 0,02$ e no tratado com $0,84 \pm 0,02$ estão reduzidos significativamente em 17% (** $p < 0,01$) no grupo exposto ao HBG quando comparado com o grupo controle.

Figura 28 - Níveis das proteínas p-p54 JNK, p-p46 JNK, Nrf2 no tecido renal de ratos imaturos expostos ao herbicida glifosato-Roundup®



Legenda: Efeito da exposição *in vivo* em tecido renal de ratos imaturos (PNP15) ao Herbicida à base de glifosato Roundup® na expressão das proteínas p-p54 JNK, p-p46 JNK, Nrf2. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. Análise estatística: Teste *t* de Student. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado com controle.

5 DISCUSSÃO

O uso exacerbado do glifosato preocupa as autoridades sanitárias quanto aos riscos à saúde pública como desenvolvimento de câncer, doença renal crônica, doenças respiratórias e doenças dermatológicas (Jayasumana; Gunatilake; Senanayake, 2014; Camacho; Mejía, 2017). Estudos tem demonstrado que as comunidades agrícolas apresentam de Nefrite Intersticial Crônica relacionada a pulverização e contaminação do solo por agrotóxicos (Jayasumana *et al.*, 2017). O presente estudo buscou compreender se a exposição perinatal ao HBG pode desencadear efeitos renais precoces durante o desenvolvimento intrauterino e a lactação. Para avaliar os efeitos do HBG no sistema renal foram utilizados ratos com 15 dias de vida. Cabe destacar que os modelos de toxicidade renal que afetam a nefrogênese e a maturação renal em roedores são compreendidos entre o 11º dia de prenhez e o 15º dia após o nascimento, não diferenças sexuais no processo, sendo que nesse período pré- e pós-natal o rim está susceptível a exposição de produtos químicos nefrotóxicos (Seely, 2017).

A exposição perinatal ao HBG ocasionou em redução significativa na massa corporal e renal da prole, sugerindo que o herbicida alterou o desenvolvimento e crescimento dos animais. A redução no crescimento dos órgãos e tecidos pode ser indicativo de retardo no desenvolvimento intrauterino. Corroborando esta hipótese, na análise histomorfométricos observou-se diminuição no tamanho da área do tufo glomerular/vasculatura renal conjuntamente com atrofia do glomérulo nos animais expostos ao herbicida (Figura 21C). Deficiências nutricionais maternas entre o oitavo e vigésimo dia gestacional resultam no decréscimo do tamanho e no número de néfrons da prole (Zoetis; Hurtt, 2003). Estudos em humanos demonstram que a redução do peso intrauterino está associada a redução do tamanho renal e a redução do número de néfrons. Indivíduos com baixo peso ao nascer apresentam redução no tamanho do rim e redução de néfrons com uma tendência na vida adulta a desenvolver hipertensão arterial e doença renal pela baixa na taxa de filtração glomerular (Merlet-Benichou *et al.*, 1994; Brenner *et al.*, 1994; Bagby, 2009; Nüsken *et al.*, 2018).

A exposição ao herbicida Roundup® causou baixo peso ao nascer nos animais e a nível estrutural alterações morfológicas no tecido renal de ratos imaturos foram observadas nos animais tratados. Parvez e colaboradores (2018) investigaram mulheres grávidas na zona rural e detectaram níveis elevados de glifosato na urina e na água de beber e diferentemente dos nossos achados não observaram correlação com redução no percentil do peso ao nascer, porém

houve uma redução no período gestacional. Estudos de exposição em doses aceitáveis ao glifosato em ratos adultos também causaram redução do peso corporal e peso relativo dos rins (Tang *et al.*, 2017).

Os rins após o nascimento são marcados por mudanças funcionais fisiológicas para adaptação à vida extrauterina e progressão para a função renal adulta. Os animais nascem funcionalmente imaturos no que diz respeito à capacidade fisiológica renal é importante ao reconhecer que estão susceptíveis a efeitos adversos da toxicidade de drogas em curto prazo. Nos rins imaturos os mecanismos do fluxo sanguíneo renal, a taxa de filtração glomerular (TFG), secreção e absorção tubular, manutenção do equilíbrio ácido-base e concentração de urina estão reduzidos (Seely, 2017). Nesse momento os níveis de transportadores de ânions orgânicos que são necessários para ajudar na eliminação de drogas e toxinas estão diminuídos. Portanto, a imaturidade funcional expõe rins imaturos a agentes tóxicos como o glifosato diminuindo a depuração e capacidade de desintoxicar seus metabólitos. No aspecto de maturação funcional a filtração glomerular é responsável pela manutenção do equilíbrio ácido-base e pelo controle da função tubular através da reabsorção da reabsorção de bicarbonato e secreção de íons H^+ na urina e pelo volume urinário (Zoetis; Hurtt, 2003; Tang *et al.*, 2017). Nossos achados histológicos demonstram a presença de danos glomerulares.

Os tecidos renais dos animais expostos conforme apresentado na Figura 21 (A-B), sofreram alterações na histoarquitetura celular com a perda do espaço de Bowman, atrofia e colapso dos glomérulos renais, vacuolização e rompimento da membrana citoplasmática nos túbulos proximais, alterações que podem gerar e perda capacidade de filtração glomerular. Dedek e colaboradores (2018) em seus achados histológicos na exposição ao glifosato em ratos a dose 248.4 mg/kg por doze semanas identificaram a necrose das células tubulares. Ratos adultos expostos ao glifosato a 0,7mg/l na água de beber tiveram alterações histológicas como dano no espaço de Bowman, achado semelhante ao nosso estudo (Larsen *et al.*, 2012). Nos mamíferos o glifosato não é metabolizado de forma eficiente e é excretado integralmente no sistema renal. Estudos de exposição por vinte e quatro meses ao Roundup® em ratos com doses aceitáveis na água de beber 0,01 p.p.m causaram nefropatia crônica e lesões renais agudas (Séralini *et al.*, 2014; Mesnage *et al.*, 2015; Myers *et al.*, 2016).

No intuito de correlacionar as alterações histomorfológicas e verificar alterações na função renal pela toxicidade do herbicida, investigamos se há lesão renal aguda nos animais, usamos o marcador bioquímico precoce a concentração de NGAL uma proteína formada por

expressão aumentada de genes na fase precoce na insuficiência renal aguda (IRA) (Kumar, 2018). Os dados na Figura 22A demonstram aumento nas concentrações de NGAL no plasma de ratos expostos ao HBG, sugerindo lesão tubular precoce, que é uma causa de doenças renais agudas. Um estudo de exposição de ratos por doze semanas ao Roundup® com dose 284.4 mg/Kg de peso detectou elevação na concentração de NGAL no plasma corroborando nossos achados, indicando lesão tubular e causa de insuficiência renal aguda associada a exposição a agentes tóxicos como os herbicidas (Dedeke *et al.*, 2018). Qiu e colaboradores (2022) investigaram os efeitos do HBG em rins de leitões expostos ao Roundup® nas concentrações de 40 mg/kg por 35 dias, encontrando níveis de NGAL no plasma aumentados, corroborando nossos resultados que demonstram a nefrotoxicidade do glifosato nos rins. Em humanos, o nível elevado de NGAL tem valor prognóstico clínico de diálise e mortalidade por doenças renais. (Kumar, 2018; Dedeke *et al.*, 2018). O dano renal é consolidado pelo aumento dos níveis séricos de creatinina, como mostram nossos resultados na creatinina (Figura 22 B), que nos animais expostos está elevada significativamente 15,08% (**p < 0,001) em relação ao grupo controle o que pode sugerir redução ou perda da função renal. A creatinina é o produto da degradação do fosfato de creatina e é excretada via renal, os níveis de creatinina sérica são marcadores bioquímicos da taxa de filtração glomerular, quando há danos ao rim ou perda da função renal os níveis de creatinina estão elevados (Wunnapuk *et al.*, 2014; Dedeke *et al.*, 2018). De acordo com os resultados experimentais parciais concluímos que a exposição ao herbicida à base de glifosato altera morfológicamente a arquitetura glomerular, levando a lesão renal aguda, caracterizando o glifosato como agente nefrotóxico no período de desenvolvimento intrauterino e pós-natal.

A exposição perinatal ao herbicida causou danos às estruturas glomerulares e alterou os marcadores bioquímicos da função renal, para avaliar os possíveis mecanismos de dano celular, verificamos que a hidrólise do ATP extracelular pode ser um dos possíveis mecanismos de sinalização nas alterações glomerulares em nível histológico. Quando temos altos níveis de ATP intracelular ele é liberado para o espaço extracelular em condições hipóxicas, inflamação ou lesão aguda. A sinalização purinérgica atua na fisiologia renal pela ativação de receptores P1 e P2 presentes no néfron, na vasculatura renal, nas células mesangiais e podócitos. Durante a lesão de tecidos renais o ATP intracelular é liberado como um sinal de padrão molecular associado ao dano renal (Solini; Usuelli; Fiorina, 2015; Monaghan; Bailey; Unwin, 2020). Nosso estudo investigou o efeito da exposição perinatal ao HBG na hidrólise do ATP e do ADP

pela atividade da NTPDase1 (CD39). Os resultados mostraram aumento na atividade enzimática da NTPDase1 nos tecidos renais dos filhotes expostos ao herbicida em relação ao controle (Figura 26B). A atividade da ecto-5'-nucleotidase (CD73), determinada pela hidrólise do substrato AMP não foi alterada pela exposição ao agrotóxico (Figura 26C). A atividade da ADA aumentou significativamente no tecido renal dos animais expostos ao HBG (Figura 26D). No rim, a adenosina regula a liberação de renina, a taxa de filtração glomerular (TFG) e tônus vascular renal. A adenosina atua em funções biológicas pela ativação de quatro receptores purinérgicos acoplados à proteína G, que incluem a adenosina A1, A2A, A2B e A3 (Garrido *et al.*, 2019). A adenosina está presente em baixas concentrações no espaço pericelular dos rins. A concentração de adenosina está aumentada nos estados inflamatórios, na hipóxia, principalmente pela hidrólise do ATP que é liberado nas lesões celulares, portanto, a elevação na concentração de adenosina ocorre durante os insultos patológicos renais (Yap ; Lee , 2012; Roberts *et al.*, 2014). Nos resultados sugerem a elevação da concentração de adenosina e de inosina nos grupos expostos ao herbicida, sugerindo que alguma lesão renal está presente no grupo exposto. Geralmente as lesões podem alterar o metabolismo com aumento da demanda energética renal, o rim sintetiza glicose a partir de aminoácidos, lactato e piruvato via gliconeogênese. A sinalização da adenosina está presente na progressão da fibrose renal é um fator importante para a doença renal crônica, que se caracteriza principalmente pela perda da arquitetura renal (Yap; Lee, 2012; Roberts *et al.*, 2014).

Outro aspecto importante a nível renal é o metabolismo de degradação de aminoácidos. Para tal, investigamos a atividade das enzimas aminotransferases (ALT e AST) os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo exposto ao herbicida Roundup®, os valores médios do grupo controle foi de $5,12 \pm 0,11$ e o valor do grupo tratado foi de $5,16 \pm 0,07$ para ALT e no grupo controle foi de $8,35 \pm 0,08$ e o valor do grupo tratado foi de $8,31 \pm 0,08$ para AST na Figura 27(A-B). A degradação de aminoácidos envolve a eliminação do grupo amina (desaminação) intrarrenal e incorporação da amônia e produção de ureia e posterior excreção urinária e conversão do esqueleto carbônico em intermediários metabólicos para produção de energia. A desaminação da maior parte dos aminoácidos envolve uma transaminação prévia, que consiste na transferência do seu grupo amina para um alfa-cetoácido, produzindo o aminoácido correspondente ao alfa-cetoácido e o alfa-cetoácido correspondente ao aminoácido original. Geralmente o aceitador do grupo amina é o alfa-cetoglutarato, que é convertido em glutamato (Vinay *et al.*, 1986). A função renal demanda

substratos para produção de energia, o aumento da atividade de enzimas como aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT) são indicadores de mobilização de aminoácidos para demanda energética renal e podem estar elevadas durante a disfunção renal (Kumar *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2020).

A literatura relata que a toxicidade dos herbicidas pode estar relacionada à indução de estresse oxidativo e ao acúmulo de radicais livres na célula. O estresse oxidativo aumentado é um possível mecanismo de toxicidade dos xenobióticos e é prejudicial às células por causar desordem nas vias metabólicas (Kwiatkowska; Bugumila; Bukowska, 2014). Nosso estudo demonstrou um aumento significativo na formação de EROs 19% (* $p < 0,05$) e ERNs 43% (** $p < 0,01$) respectivamente grupo exposto ao herbicida quando comparado ao grupo controle como consta na Figura 23(A-B). Os nossos dados corroboram o aumento significativo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em estudos em ratos após exposição intraperitoneal de 269.9 mg/kg de Roundup e 10mg/kg de Glifosato (El-Shenawy, 2009). Um estudo de Oliveira e colaboradores (2022) demonstra a capacidade do glifosato em aumentar o estresse oxidativo, os resultados são semelhantes aos nossos, pois o glifosato parece ser um potente agente oxidante neste período de exposição, independente da dose. O desequilíbrio na geração excessiva de espécies reativas e no sistema enzimático é descrito na exposição a agrotóxicos, uma das principais causas de dano tecidual e aceleração da progressão da doença renal. Os xenobióticos podem aumentar a produção de EROs, portanto, induzem o estresse oxidativo e nitrosativo. O desequilíbrio na geração excessiva de espécies reativas e no sistema enzimático é descrito na exposição a agrotóxicos, uma das principais causas de dano tecidual (Astiz *et al.*, 2009; El-Shenawy, 2009; Kwiatkowska; Bugumila; Bukowska, 2014). A disfunção mitocondrial pode levar a processos de morte celular por apoptose (Mohamed *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020). No rim o excesso de EROs prejudica homeostase celular causando estresse oxidativo que desencadeia vasoconstrição, alteração da permeabilidade da membrana basal glomerular com dano tecidual seguido de morte celular, inflamação e fibrose. Assim, o estresse oxidativo é considerado fator agravante no início e progressão de lesão renal aguda e doenças renal crônica como a nefropatia diabética (Ratliff *et al.*, 2016; Nezu; Suzuki, 2020). O estresse oxidativo gerado pelas mitocôndrias desempenha um papel vital na lesão renal (Schieber; Chandel, 2014; Ratliff *et al.*, 2016). Neste contexto, o sistema de defesa antioxidante é fundamental para prevenir a progressão da doença renal, quando avaliamos a atividade das enzimática do sistema antioxidante os resultados apresentados na Figura 24(A), demonstram a

redução significativa de 61% (** $p < 0,01$) na atividade da SOD no grupo tratado quando comparado ao grupo controle. O mesmo perfil citado anteriormente foi apresentado pela enzima catalase, demonstrando uma redução de 68% (** $p < 0,01$) (Figura 24 B). A redução nas atividades da SOD e da CAT durante a exposição perinatal sugere um estado de insulto oxidativo e perda capacidade de detoxificar as EROs e ERNs. Consequentemente, A GPx Figura 24(F) apresentou tendência a diminuir sua atividade, pois o peróxido de hidrogênio gerado pela SOD é um substrato da GPx, que gera como produto H_2O_2 . A redução da atividade SOD, catalase e do conteúdo glutaciona ocorre na nefropatia em ratos, nossos achados tem perfil semelhante, podendo ser indicativo que alguma nefropatia na prole. A enzima GST tem atividade aumentada, indicando uma tentativa de desintoxicar o glifosato. A GST usa o GSH como cofator para remover vários e compostos xenobióticos, nossos resultados demonstram que o GSH está sendo solicitado pela GST para remover o xenobiótico, demonstrando um estado de toxicidade renal pelo glifosato (Araújo; Wilcox, 2014; Halliwell; Gutteridge, 2007). Os estudos de Tang e colaboradores (2017) encontraram perfil semelhante com redução significativa da SOD no tecido renal de ratos exposto ao herbicida a base de glifosato, sugerindo dano renal. A exposição ao Roundup suprimiu as atividades da superóxido dismutase (SOD) no rim de peixes expostos por 96 h em concentrações de 2,5 a 20 mg L⁻¹ (Lushchak *et al.*, 2009). Um estudo de exposição em ratos ao glifosato por gavagem durante 35 dias em doses de 50 e 500mg reduziu a atividade da SOD significativamente (Tang *et al.*, 2020). Um trabalho publicado por nosso grupo demonstra que a exposição perinatal ao herbicida à base de glifosato (HBG) causou uma redução na atividade de enzimas antioxidantes no fígado de descendentes submetidos ao glifosato na água de beber (Rieg *et al.*, 2022). As primeiras enzimas de defesa contra o estresse oxidativo são as isoformas da superóxido dismutase (SOD). A isoforma SOD1 é responsável por até 80% da atividade SOD total no rim de mamíferos e, portanto, a atividade reduzida é um fator importante para o aumento do estresse oxidativo (Ratliff *et al.*, 2016; Bhargava; Schellmannzhou, 2017).

A catalase tem expressão elevada no rim e converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e/ou água e reduz EROs. A deficiência de catalase por disfunção do peroxissoma altera o metabolismo de lipídeos em ratos com nefropatia diabética com acúmulo de EROs, um efeito que leva ao comprometimento funcional das mitocôndrias (Hwang *et al.*, 2012). No rim a glutaciona é catalisada pela enzima gama-glutamil transpeptidase, que transfere de um grupamento gama-glutamil da glutaciona para formar aminoácidos como substratos energéticos.

fonte de energia. Para atividade renal. Um dos principais substratos formados na transpeptidação é a cisteilglicina um peptídeo facilmente clivado nos segmentos dos glomérulos que serve como substrato energético para reabsorção de íons na manutenção do equilíbrio ácido-base (Rego *et al.*, 2020). A análise do conteúdo de GSH apresentou aumento significativo de 13% (* $p < 0,05$) no seu conteúdo quando comparado ao grupo controle na Figura 24(C). A administração intraperitoneal em ratos em dose ultrabaixa 10mg/kg por três semanas também causou aumento significativo da GSH (Astiz; Alaniz; Marra, 2009). Estudos de exposição ao glifosato detectaram que a glutathione é elevada após exposição prolongada a oxidantes (El-Shenawy, 2009; Slaninova *et al.*, 2009; Mesnage *et al.*, 2017, Rieg *et al.*, 2022). Uma das principais funções da glutathione é a detoxificação de xenobióticos, reduzindo o estresse oxidativo causa de danos a proteínas, lipídeos e DNA. Para manter os níveis de GSH a biossíntese é realizada pela enzima γ -glutamyl transpeptidase (GGT) na monocamada externa da membrana celular e remove os grupamentos γ -glutamyl da GSH do meio extracelular, gerando o dipeptídeo cisteína-glicina para posterior metabolização e reabsorção. A síntese intracelular de GSH depende de um constante fluxo de seus aminoácidos precursores (Halliwell; Gutteridge, 2007). Nos animais, a atividade enzima GGT, apresentou aumento de 75% (** $p < 0,001$) de sua atividade quando comparamos com o grupo controle, como demonstra a Figura 24(D). A gama-glutamyl transferase (GGT) é enzima presente no túbulo proximal região metabolicamente ativa com intensa atividade energética pela reabsorção de eletrólitos. Está envolvida no transporte de aminoácidos e peptídeos. O aumento na produção e excreção da GGT urinária pode ser indicativo de disfunção tubular renal do herbicida a base de glifosato. Estudos de toxicidade com administração de ouro e tiomalato de sódio em a ratos Wistar causou dano tubular agudo com extravasamento da enzima GGT e aumento da excreção urinária, porém a filtração glomerular foi mantida (Waring; Moonie, 2011). Em concordância com os resultados acima mencionados, o conteúdo do fator nuclear-eritróide 2 (Nrf2) foi significativamente reduzido quando comparado ao controle Figura 29(C) e D. O fator Nrf2 regula e coordena a indução de vários genes que codificam várias enzimas desintoxicantes e vários antioxidantes, como a Glutathione e GST, neste caso o Nrf2 desempenha um papel importante contra o estresse oxidativo e promovendo atividade anti-inflamatória (Zhang, 2006; Li *et al.*, 2008). O fator de transcrição antioxidante Nrf2 também está presente nas células tubulares renais que realizam citoproteção local, evitando danos às células tubulares e mantém a homeostase do tecido renal (Nezu; Suzuki, 2020). Portanto, parece que há uma redução nas

defesas antioxidantes por inibição da via de Nrf2 devido a possíveis alterações epigenéticas causadas pela exposição perinatal. Concluindo parcialmente que houve estresse oxidativo com ativação das defesas antioxidantes, porém a longo prazo há esgotamento da resposta antioxidante, o que gera dano oxidativo a estruturas celulares como lipídeos, proteínas e DNA, fatores desencadeadores da alteração da função renal e lesão glomerular aguda.

Com objetivo de avaliar a presença de resposta inflamatória no tecido renal de ratos imaturos expostos ao herbicida à base de glifosato Roundup® avaliamos as citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β , Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a atividade da enzima mieloperoxidase. Nossos resultados demonstram redução no conteúdo da IL-6, IL-1 β e TNF- α e atividade da enzima mieloperoxidase nos grupos tratados. Os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão reduzidos, o herbicida atua na supressão da resposta inflamatória aguda no tecido renal. O glifosato passa pela barreira placentária e altera a resposta inata durante desenvolvimento pré-natal. A interleucina-6 (IL-6) regula as respostas imunes inata e adaptativa e tornou-se um alvo importante para a intervenção clínica em muitas condições pró-inflamatórias. A redução das citocinas está relacionada a redução dos níveis de Nrf2 nos animais expostos, estudos tem demonstrado que Nrf2 a inibe a transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 em modelos de inflamação em ratos (Kobayashi *et al.*, 2016). Os resultados podem estar diretamente relacionados à exposição ao glifosato e às alterações epigenéticas sofridas pelos órgãos (Bukowska *et al.*, 2022). Os distúrbios epigenéticos causam um aumento significativo da expressão de TET (ten-onze-translocation) no rim, responsável pela desmetilação do DNA, interferindo no silenciamento ou não de genes importantes relacionados ao desenvolvimento de diabetes e doença renal crônica (Liling *et al.*, 2018; Larsen *et al.*, 2022). Surpreendentemente, IL-1 β , TNF- α e mieloperoxidase tiveram seu conteúdo e atividade (mieloperoxidase) reduzidos, demonstrando a capacidade do HBG de suprimir a resposta imune. Buchenauer e colaboradores (2022) demonstraram que a exposição materna a baixas doses de glifosato produziu descendentes com resposta imune reduzida, em particular, a redução da inflamação foi observada através da redução de citocinas relevantes para a asma, demonstrando que o sistema imunológico pode ser perturbado por agrotóxicos. Alguns agrotóxicos, como atrazina e malathion, atuam como imunotóxicos e a exposição crônica em baixas doses pode interferir e suprimir funções imunológicas importantes (Corsini *et al.*, 2013; Mokarizadeh *et al.*, 2015; Taghavian *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2020). A avaliação de segmentos de intestino de leitões desmamados expostos a dieta 10 a 40mg/Kg de glifosato durante trinta e

cendo dias não alterou os níveis citocinas pró-inflamatórias intestinais (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em leitões (Qiu *et al.*, 2022). A exposição a agrotóxicos pode alterar o sistema imunológico, porém, a ocorrência de distúrbios imunológicos depende da dose e do tempo de exposição aos agrotóxicos (Taghavian *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2020). Neste cenário a proteína quinase N-terminal c-Jun (JNK) medeia importantes funções celulares de transdução de sinal para proliferação celular, diferenciação, migração e apoptose celular. A JNK responde a um amplo espectro de insultos ao estresse e respostas pró-inflamatórias, além de funções neuronais, ações do sistema imunológico e desenvolvimento embrionário, por meio da expressão gênica, morte celular e vias de sobrevivência (Zeke *et al.*, 2016; Grynberg; Ma; Paterson, 2017). A Caspase 3 desempenha papéis importantes na apoptose, bem como nas respostas inflamatórias e sua deficiência funcional seria crítica para a morte celular e para o sistema imunológico. Curiosamente, camundongos deficientes em caspase3 demonstram um fenótipo único associado a anormalidades autoimunes também foram descobertos (Suzuki *et al.*, 2020). Observamos a redução na expressão de Caspase 3 e uma diminuição significativa de JNK no grupo exposto ao herbicida à base de glifosato Roundup® em relação ao grupo controle, os dados obtidos representam as vias reduzidas dos mediadores pró-inflamatórios, corroborando os achados da redução no conteúdo de IL-6, IL-1 β e TNF- α , mostrando redução da resposta imune na exposição perinatal ao herbicida à base de glifosato Roundup®. Na inflamação, a via da JNK promove a resposta inflamatória nos leucócitos pelo mecanismo primário de pela ativação do fator de transcrição AP-1, JNK pode fosforilar c-Jun e fazer a dimerização de c-Fos para AP-1 para transcrever genes da resposta inflamatória, incluindo as citocinas TNF- α e quimiocinas CCL2 e moléculas de adesão VCAM-1/CD106 (Grynberg; Ma; Paterson, 2017). Um estudo demonstrou uma redução significativa no número de linfócitos nos parâmetros hematológicos de filhotes expostos ao herbicida à base de glifosato durante o período perinatal (Rieg *et al.*, 2022). Uma segunda fosforilação da JNK ativa o fator 2 (ATF-2) que transcreve genes contribuem na resposta inflamatória. A via da JNK ativa Linfócitos T, os subtipos T helper (Th1) e (Th2) (Yu *et al.*, 2014).

A sinalização de JNK pode contribuir para a fibrose renal induzindo a apoptose e a inflamação, no entanto, o bloqueio da via JNK com um inibidor seletivo de quinase (CC-930) ou um peptídeo baseado em JIP1 não protegeu o rim e causou um aumento de danos podócitos (Ijaz *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2011; Grynberg; Ma; Paterson, 2017). É importante enfatizar que em um modelo de tumor pulmonar, JNK pode ser importante para restringir a carga tumoral

promovendo a apoptose induzida por Ras, ou seja, JNK tem uma função supressora de tumor consistente, uma vez que a perda de função se correlaciona com o desenvolvimento tumoral agressivo e metástase em câncer humano (Whitmarsh; Davis, 2007). Os animais expostos demonstram danos estruturais no tecido renal, a via JNK foi significativamente reduzida em animais expostos ao HBG, não prevenindo os danos causados pelo HBG, aumentando assim a probabilidade de desenvolvimento do tumor nesses animais (Tournier, 2013). Concluindo que a resposta inflamatória é suprimida durante a exposição perinatal ao herbicida Roundup®.

JNK são importantes para a ativação de diferentes vias, uma das quais é a apoptose celular. A histona H2AX representada pela isoforma γ H2AX representa de 2% a 25% do total de histonas expressas pelas células que realizam a manutenção da estabilidade genômica. A Histona γ H2AX é um substrato JNK com um sítio de fosforilação na Serina 139, quando fosforilada é denominada de γ H2AX. Estudo publicado relata que o mecanismo de sinalização da apoptose do JNK ocorre com a fosforilação do H2AX em um sítio não canônico essencial para a fragmentação do DNA (Sluss; Davis, 2006). A ativação dessa via ocorre com a translocação da JNK para o núcleo, onde encontra seu substrato H2AX, levando a célula induzida à morte. A ação de JNK contribui para a ativação de fatores de reparo de danos ao DNA por meio da fosforilação de H2AX em S139 no estágio inicial do insulto genômico. Quando o dano não é reparado e a ativação do JNK é prolongada, o resultado é a apoptose celular. Nossos resultados mostram uma redução nos níveis de JNK e também uma redução nos níveis de γ H2AX. Os danos ao DNA das células renais foram analisados pelos níveis de γ H2AX indicando a quebra na dupla fita do DNA. Os danos exógenos podem ocorrer quando as células são expostas a agentes químicos como os agrotóxicos podem causar a quebra na dupla fita do DNA celular, inibindo assim, a síntese de proteínas gerando instabilidade genômica (Mah, Lj; El-Osta; Karagiannis, 2010; Podhorecka, *et al.*, 2010; Hama *et al.*, 2021). Nesse contexto, nossos resultados da via de apoptose JNK também mostraram redução da proteína p53 e da caspase-3. Estudos recentes têm evidências de modificação epigenética induzida pelo glifosato in vivo, incluindo metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas e expressão diferencial de RNAs não codificantes, com genes fortemente afetados no fígado sendo semelhantes aos alterados nos rins. (Mesnage *et al.*, 2022). Alterações gênicas através da metilação do DNA e dos promotores TP53 foram descritas em altas concentrações e também em concentrações muito mais baixas do herbicida à base de glifosato Roundup®, demonstrando interferência no nível genômico e proteico (Kiatkowska *et al.*, 2017; Woźniak *et al.*, 2020a).

Processos epigenéticos podem levar ao silenciamento/ativação da expressão gênica, “imprinting” genômico e desenvolvimento de patologias (Carvalho *et al.*, 2018; Hemmatzadeh *et al.*, 2020; Li; Lei; Sun,2023).

A proteína p53 ativa genes de transcrição em lesões tubulares renais, tendo como função regular o reparo do DNA danificado e no caso de ineficiência do reparo o ciclo celular é imediatamente bloqueado e então desencadeia-se a apoptose, pelo aumento da fosforilação da proteína p53. No desenvolvimento da lesão renal aguda a p53 é uma proteína de sinalização para morte das células tubulares. Durante fenômenos de isquemia e reperfusão, a hipóxia tende a causar insuficiência renal aguda (Tang *et al.*, 2019). A expressão p53 avaliou dano ao DNA, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os estudos têm demonstrado que o glifosato isolado e as formulações adjuvantes alteraram a permeabilidade das membranas de forma inespecífica causando danos às proteínas, lipídeos e DNA (Peixoto, 2005; Dedeker *et al.*, 2018).

Reis *et al.* (2022), demonstram que o HBG induz um perfil neuronal mais imaturo e uma alteração no processo de diferenciação das células gliais em neurônios maduros. Esses efeitos reduziram os níveis de caspase-3, indicando que mesmo concentrações subtóxicas de HBG induziram prejuízos na diferenciação de células neuronais. Nesta situação, a perda da capacidade de ativar a morte celular pode ser uma função importante para o desenvolvimento do tumor e metástase (Whitmarsh; Davis, 2007). Concluímos que a deficiência de CASP3, além do envelhecimento, desenvolve as lesões glomerulares características e esses achados enfatizam a importância da deficiência de CASP3 como um potencial fator causador de doenças renais imunoassociadas (Suzuki *et al.*, 2020). Conseqüentemente, com a redução dos níveis de JNK, γ H2AX e p53, a caspase-3 também foi reduzida, demonstrando a redução da via de sinalização de dano ao DNA, reparo do DNA e morte celular.

6 CONCLUSÃO

A exposição perinatal ao HBG afetou o crescimento (peso e tamanho) dos animais e dos rins, além de alterar histomorfologicamente a estrutura glomerular no período de desenvolvimento intrauterino e pós-natal. Os resultados mostram redução da função renal, sugerindo o glifosato como potencialmente nefrotóxico. Marcadores bioquímicos de função renal sugerem lesão renal aguda, com a associação da via de sinalização purinérgica evidenciando danos no tecido renal. Os mecanismos de nefrotoxicidade associados ao HBG parecem estar relacionadas à indução do estresse oxidativo, imunossupressão e inibição de vias de reparo do DNA e morte celular programada. Em conjunto, esses resultados indicam que a exposição perinatal ao HBG pode causar danos significativos ao tecido e à função renal em ratos imaturos. Os dados sugerem um impacto negativo na morfologia renal, na função tecidual, no equilíbrio redox e na integridade do DNA, bem como na regulação de vias de sinalização celular e apoptose. Esses eventos podem, de alguma forma, estar envolvidos no desenvolvimento de alterações na função renal ou até insuficiência renal aguda. Ressalta-se a importância da vigilância e da regulamentação rigorosa da exposição a agrotóxicos contendo glifosato, especialmente em grupos populacionais mais vulneráveis, como crianças e mulheres gestantes, bem como a saúde animal. Mais estudos são necessários para compreender completamente os mecanismos subjacentes a essas alterações e para avaliar os possíveis impactos a longo prazo na saúde renal.

7 PERSPECTIVAS

Apoiados nos resultados do presente estudo, as perspectivas para este estudo são promissoras, considerando a necessidade de investigar ainda mais os impactos da exposição ao HBG durante o desenvolvimento:

- Estudos de longo prazo: Realizar estudos de acompanhamento a longo prazo para avaliar os efeitos crônicos da exposição ao HBG sobre o desenvolvimento renal, a função renal e a saúde geral dos animais, o que permitiria uma compreensão mais profunda dos impactos do HBG a longo prazo.
 - Mecanismos celulares e moleculares: Realizar estudos genômicos adicionais para elucidar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos danos renais causados pela exposição ao HBG, incluindo a regulação de genes e proteínas envolvidas.
 - Interação com outros fatores: Investigar possíveis interações entre a exposição ao HBG e outros fatores ambientais, como dieta, para compreender melhor os impactos combinados na saúde renal.
 - Estudos em humanos: Ampliar a pesquisa para incluir estudos em humanos, especialmente em populações com históricos de exposição a herbicidas à base de glifosato.
 - Educação e conscientização: Promover a conscientização sobre os potenciais riscos da exposição a agrotóxicos, especialmente para populações vulneráveis, como crianças e gestantes.
 - Colaboração interdisciplinar: buscar a colaboração entre pesquisadores das áreas de toxicologia, saúde pública, biologia e medicina, bem como membros da sociedade para uma abordagem abrangente na compreensão e mitigação dos riscos associados à exposição ao HBG.
- Essas perspectivas podem ajudar a direcionar futuras pesquisas e esforços para entender melhor os impactos da exposição ao glifosato e, em última análise, tomar medidas para proteger a saúde e o bem-estar das populações em risco.

REFERÊNCIAS

- ACQUAVELLA, J. F. *et al.* Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. **Environ Health Perspect.**, v. 112, n. 3, p. 321-6, 2004.
- ALATAŞ, Ö. *et al.* Beneficial effects of allopurinol on glutathione levels and glutathione peroxidase activity in rat ischaemic acute renal failure. **The Journal of international medical research**, v. 24, n. 1, p. 33–39, 1996.
- ANDRIGHETTI, M. S. *et al.* Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 5, p. 1643–1653, 2014.
- ARAUJO, M.; WILCOX, C. S. Oxidative Stress in Hypertension: Role of the Kidney. **Antioxid Redox Signal.**, v. 20, n. 1, p. 74–101, 2014.
- ASTIZ, M.; ALANIZ, M. & MARRA, C. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.28, p. 465-473, 2009.
- AYOOLA, S. O. Histopathological Effects of Glyphosate on Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). **J. Agric. & Environ. Sci**, v. 4, n. 3, p. 362–367, 2008.
- BAGBY, S. P. Developmental Origins of Renal Disease: Should Nephron Protection Begin at Birth? **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, n. 1, p. 10–13, 2009.
- BAILEY, M. A. *et al.* Axial distribution and characterization of basolateral P2Y receptors along the rat renal tubule. **Kidney international**, v. 58, n. 5, p. 1893–1901, 2000.
- BARBOSA, K. B. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARON, L. *et al.* The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. **Cell Death and Disease**, v. 6, 2015.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BARRY, G. F. *et al.* Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. **World Patent**, WO 92/04449., 1994.
- BASTOS, R. M. R. *et al.* Hiperuricemia: Um Marcador para Doença Renal Crônica Pré-Clinica? **J Bras Nefrol**, v. 31, n. 1, p. 32–38, 2009.

BEURET, C. J.; ZIRULNIK, F.; GIMÉNEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 19, n. 4, p. 501–504, 2005.

BERTRAM, J.F. Estimating glomerular number: why we do it and how. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 40, n. 11, p. 785-8, 2013.

BHARGAVA, P.; SCHNELLMANN, R. G. Mitochondrial energetics in the kidney. **Nat Rev Nephrol.** v.10, p.629-646, 2017.

BOBULESCU, I. A.; MOE, O. W. Luminal Na (+)/H (+) exchange in the proximal tubule. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v. 458, n. 1, p. 5–21, 2009.

BOMBARDI, L. M. Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia. São Paulo: FFLCH-USP, 2017.

BONVENTRE JV. Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair. **Contrib Nephrol.**, v. 165, p. 9-17, 2010.

BORON, W. F.; BOULPAEP, E. L. Organization of the Urinary System. In: **Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach**. 2. ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, p. 754–57, 2009.

BOVERIS, A. *et al.* Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 227, n. 2, p. 534–541, 1983.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyti. Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRANDAO-BURCH, A. *et al.* The P2X7 Receptor is an Important Regulator of Extracellular ATP Levels. **Frontiers in endocrinology**, v. 3, n. 3, 2012.

BRASIL; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE; IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em: 20 jan. 2022.

BRADBERRY, S.M.; PROUDFOOT, A.T.; VALE, J.A. Poisoning due to chlorophenoxy herbicides. **Toxicol Rev.**, v. 23, n. 2, p. 65-73, 2004.

BRENNER B.M.; CHERTOW G.M. Congenital Oligonephropathy and the Etiology of Adult Hypertension and Progressive Renal Injury. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 23, n. 2, p. 171–175, 1994.

BUKOWSKA, B.; WOŹNIAK, E.; SICIŃSKA, P.; MOKRA, K.; MICHAŁOWICZ, J. Glyphosate disturbs various epigenetic processes in vitro and in vivo – A mini review. **Science of the Total Environment**, v. 851, p. 158259, 2022.

BUCHENAUER, L. *et al.* Glyphosate differentially affects the allergic immune response across generations in mice. **Science of the Total Environment**, v. 850, p. 157973, 2022.

BUTCHERINE, P. *et al.* The risk of neonicotinoid exposure to shrimp aquaculture. **Chemosphere**, v. 217, p. 329–348, 2019.

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.

CAMPOS, E. B. P. DE; YOSHIDA, W. B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 4, p. 357–366, 2004.

CASTRO, L. T. S. *et al.* Biomarcadores no diagnóstico precoce da injúria renal aguda. **Enciclopédia Biosfera**, v.13 n.23; p. 216, 2016.

CASTRO H. Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine. **Acta Physiol (Oxf)**. v.189, n.1, p.3-14,2007.

CATTANI D, *et al.* Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**. v. 320, p.34-45,2014.

CATTANI, D. *et al.* Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, p. 67–80, 2017.

CATTANI, D. *et al.* Effects of Perinatal Exposure to a Glyphosate-Based Herbicide on Melatonin Levels and Oxidative Brain Damage in Adult Male Rats. **Antioxidants** v.12, p.1825,2023.

CARVALHO, S.*et al.* Prognostic value of histone marks H3K27me3 and H3K9me3 and modifying enzymes EZH2, SETDB1 and LSD-1 in colorectal cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.144, n.11, p. 2127–2137,2018

CHAN, C. M. *et al.* Localization of P2X1 purinoceptors by autoradiography and immunohistochemistry in rat kidneys. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 274, n. 4 43-4, 1998.

CHANDER, P. N. *et al.* Nephropathy in Zucker diabetic fat rat is associated with oxidative and nitrosative stress: prevention by chronic therapy with a peroxynitrite scavenger ebselen. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 15, n. 9, p. 2391–2403, 2004.

COLLEEN, R. R.; NAVDEEP, S. C. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. **Annu Rev Cancer Biol.** v. 1, p. 79-98, 2017.

CORSINI, E., SOKOOTI, M., GALLI, C. L., MORETTO, A., & COLOSIO, C. (2013). Pesticide induced immunotoxicity in humans: A comprehensive review of the existing evidence. **Toxicology**, v. 307, p. 123–135, 2013.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. **Quím. Nova**, v. 28, n. 6, 2005.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier/Guanabara Koogan, 2008.

DAENEN, K. *et al.* Oxidative stress in chronic kidney disease. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)**, v. 34, n. 6, p. 975–991, 2019.

DALMARCO, E. M. **Análise da atividade antiinflamatória do metotrexato e da ciclosporina a, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos**. Florianópolis: Universidade de Santa Catarina, 2003.

DEDEKE GA, OWAGBORIAYE FO, ADEMOLU KO, OLUJIMI OO, ALADESIDA AA. 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.

DEVINE, M.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. Inhibition of amino acid biosynthesis. In: **Physiology of herbicide action**. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, p. 441, 1993.

OLIVEIRA, M. A. L. *et al.* Perinatal exposure to glyphosate-based herbicides induced neurodevelopmental behaviors impairments and increased oxidative stress in the prefrontal cortex and hippocampus in offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 82, n. 6, p. 528–538, 2022.

DILL, G. M. *et al.* Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In: NANDULA, V. K. (Ed.). **Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management**. John Wiley & Sons, p. 1–34, 2010.

DIMKE, H.; HOENDEROP, J. G.; BINDELS, R. J. Hereditary tubular transport disorders: implications for renal handling of Ca²⁺ and Mg²⁺. **Clinical science (London, England: 1979)**, v. 118, n. 1, p. 1–18, 2009.

DWYER, K. M.; KISHORE, B. K.; ROBSON, S. C. Conversion of extracellular ATP into adenosine: a master switch in renal health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 9, p. 509–524, 2020.

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

FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2021. The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cb4474en>.

FIORINO, E. *et al.* Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*. **Environmental Science and Pollution Research** 2018 25:9, v. 25, n. 9, p. 8542–8549, 2018.

FIOROTTI, CÍNTIA; CARDIN, ERIC GUSTAVO; COLOGNESE, S. A. Fronteiras da ilegalidade. **Revista Geo Pantanal**, v. 15, n. 28, p. 61–77, 2020.

FISSELL, W. H.; MINER, J. H. What Is the Glomerular Ultrafiltration Barrier? **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 29, n. 9, p. 2262–2264, 2018.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. Assay of glutathione peroxidase. **Methods of Enzymology**, v. 105, p. 114–121, 1984.

FLUEGGE, K. R.; FLUEGGE, K. R. Glyphosate Use Predicts ADHD Hospital Discharges in the Healthcare Cost and Utilization Project Net (HCUPnet): A Two-Way Fixed-Effects Analysis. **PloS one**, v. 10, n. 8, 2015.

FORTES, C. *et al.* Occupational Exposure to Pesticides With Occupational Sun Exposure Increases the Risk for Cutaneous Melanoma. **Journal of occupational and environmental medicine**, v. 58, n. 4, p. 370–375, 2016.

FREITAS, A. D; REGINO, J. E. B. A legislação para a quantidade permitida de agrotóxicos na água: os casos do brasil e da união europeia. **Informe Econômico**, v 41, n. 2, p 132-146,2020.

FRY, A. C.; KARET, F. E. Inherited renal acidoses. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 22, n. 3, p. 202–211, 2007.

GARRIDO, W. *et al.* Blockade of the Adenosine A₃ Receptor Attenuates Caspase 1 Activation in Renal Tubule Epithelial Cells and Decreases Interleukins IL-1 β and IL-18 in Diabetic Rats. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, 2019.

GAUR, H.; BHARGAVA, A. Investigation of Toxicity Induced by Chemicals and Their Mechanisms Using Zebrafish Vertebrate Animal Model. **Indian Institute of Technology Hyderabad**. Telangana, India, 2019.

GIUSTI, G. Adenosine deaminase. In: BERGMAYER, H. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. New York, NY: Academic Press, p. 1092–1099, 1974.

GIUSTI, G. GALANTI, B. Colorimetric method. In HU Berg-meyer, **Methods of Enzymatic Analysis**, 3rd ed., Verlag Chemie, Weinheim, p. 315-323, 1984.

GOBETTO, M.N. *et al.* Fetal and postnatal zinc restriction: sex differences in the renal renin-angiotensin system of newborn and adult Wistar rats. **J Nutr Biochem.**, v. 81, p. 108385, 2020.

GONSALEZ, S.R. *et al.* Inappropriate activity of local renin-angiotensin-aldosterone system during high salt intake: impact on the cardio-renal axis. **Brazilian Journal of Nephrology**, v.40, n. 2, p170-178, 2018.

GRYNBERG, K.; MA, F. Y.; NIKOLIC-PATERSON, D. J. The JNK Signaling Pathway in Renal Fibrosis. **Frontiers in physiology**, v. 8, n. oct, 2017.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? **Biochemical and biophysical research communications**, v. 502, n. 2, p. 183–186, 2018.

GUYTON, A.C. e Hall J.E.– **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Elsevier. 13^a ed., 2017.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione-S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

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? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York, NY: Oxford University Press, 2007.

HAMA, T. *et al.* DNA damage is overcome by TRIP13 overexpression during cisplatin nephrotoxicity. **JCI insight**, v. 6, n. 22, 2021.

HAVASI, A.; BORKAN, S.C. Apoptosis and acute kidney injury. **Kidney Int.**, v. 80, n. 1, p. 29-40, 2011.

HEMMATZADEH, M. *et al.* MicroRNAs: Small molecules with a large impact on pre-eclampsia. **J Cell Physiol.**, v. 235, p. 3235–3248, 2020.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, n.12, p.770-6,2000.

HÉRITIER, L. *et al.* Oxidative stress induced by glyphosate-based herbicide on freshwater turtles. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 12, p. 3343–3350, 2017.

HERRMANN, K. M. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 907, 1995.

HIETANEN, E.; LINNAINMAA, K.; VAINIO, H. Effects of Phenoxyherbicides and Glyphosate on the Hepatic and Intestinal Biotransformation Activities in the Rat. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 53, n. 2, p. 103–112, 1983.

HOOPMAN, A.; NORTH, H.; RAJAMOCHAN, A.; BOWSER, J. Toxicity assessment of glyphosate on honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa [abstract]. **Society for Integrative & Comparative Biology (SCIB) Annual Meeting**. Anais. San Francisco, CA: 2018.

HUTTON, H. L. *et al.* The NLRP3 inflammasome in kidney disease and autoimmunity. **Nephrology (Carlton, Vic.)**, v. 21, n. 9, p. 736–744, 2016.

HWANG, I. *et al.* Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. **Diabetes**, v. 61, n. 3, p. 728–38, 2012.

IJAZ, A.; TEJADA, T.; CATANUTO, P.; XIA, X.; ELLIOT, S. J.; LENZ, O.; FORNONI, A. Inhibition of C-jun N-terminal kinase improves insulin sensitivity but worsens albuminuria in experimental diabetes. **Kidney International**, v. 75, n. 4, p. 381–388, 2009.

ISHIMOTO, Y. *et al.* Physiological and pathophysiological role of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in the kidney. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 45, n. 11, p. 1097–1105, 2018.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, 2009.

JAYASUMANA C, GUNATILAKE S, SENANAYAKE P. Glyphosate, hard water and nephrotoxic metals: are they the culprits behind the epidemic of chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 2, p. 2125–47, 2014.

JAYASUMANA, C. *et al.* Chronic interstitial nephritis in agricultural communities: a worldwide epidemic with social, occupational and environmental determinants. **Nephrol Dial Transplant**, v. 32.n. 2, p234–241,2017.

JEONG, S. Y.; SEOL, D. W. The role of mitochondria in apoptosis. **BMB reports**, v. 41, n. 1, p. 11–22, 2008.

JORSARAEI, S. G. *et al.* Immunotoxicity effects of carbaryl in vivo and in vitro. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v. 38, n. 3, p. 838–44, 2014.

JIRAUNGKOORSKUL, W. *et al.* Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology**, v. 18, n. 4, p. 260–267, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAPLAN A, SZABO LL, O. K. **Clinical Chemistry: Interpretation and Techniques**. Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 1988.

KWIATKOWSKA, M., *et al.* DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). **Food and Chemical Toxicology**, v.105, p. 93–98,2017.

KELLY, K. J. *et al.* P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 14, n. 1, p. 128–138, 2003.

KOBAYASHI E H, *et al.* Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. **Nat Commun**. v. 23, n.7, p 1624,2016.

KONDERA *et al.* Effect of glyphosate-based herbicide on hematological and hemopoietic parameters in common carp (*Cyprinus carpio* L). **Fish Physiol Biochem**, v.44, n.3, p1011-1018,2018.

KRÜGER, M. *et al.* Field investigations of glyphosate in urine of Danish dairy cows. **J Environ Anal Toxicol**, v. 3, n. 5, p. 100-186, 2013.

KRUSE, N. D.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da EPSPs: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 1, n. 2, p. 139–146, 2000.

KUBSAD, D. *et al.* Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations: Generational Toxicology. **Sci Rep**, v.9, p 6372,2019.

KUMAR, V. *et al.* Modulation of key enzymes of glycolysis, gluconeogenesis, amino acid catabolism, and TCA cycle of the tropical freshwater fish *Labeo rohita* fed gelatinized and non-gelatinized starch diet. **Fish Physiol Biochem**, v. 36, n. 3, p. 491-499,2010.

KUMAR, S. Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury. **Kidney Int.**, v. 93, n. 1, p. 27-40, 2018.

KUNZ, A.; DIRNAGL, U.; MERGENTHALER, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. **Best practice & research. Clinical anaesthesiology**, v. 24, n. 4, p. 495–509, 2010.

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

- KWIATKOWSKA, M. *et al.* DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 105, p. 93–98, 2017.
- 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.811-8, 2012.
- LARSEN, K.; CHRISTENSEN, T. B.; HOJBERG, O.; SØRENSEN, M. T. Exposure of pigs to glyphosate affects gene-specific DNA methylation and gene expression. **Toxicology Reports**, v. 9, p. 298–310, 2022.
- LARSSON L, APERIA A, WILTON P. Effect of normal development on compensatory renal growth. **Kidney Int.**, v.18, n. 1, p. 29-35, 1980.
- LILING, Y. *et al.* Effect of TET2 on the pathogenesis of diabetic nephropathy through activation of transforming growth factor β 1 expression via DNA demethylation. **Life Sciences**, v. 207, p. 127–137, 2018.
- LI, S; LEI, Z.; SUN, T. The role of microRNAs in neurodegenerative diseases: a review. **Cell Biol Toxicol.** v.39, n.1, p. 53-83,2023.
- LI, W., *et al.* Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF κ B-inflammatory response and elicits apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, v.76 n.11, p. 1485–1489,2008.
- LI, P. K. T.; BURDMANN, E. A.; MEHTA, R. L. Acute kidney injury: global health alert. **Internal medicine journal**, v. 43, n. 3, p. 223–226, 2013.
- LI, X.; ZHENG, S.; WU, G. Amino Acid Metabolism in the Kidneys: Nutritional and Physiological Significance. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1265, p. 71–95, 2020.
- LIM, A. K. H. *et al.* Evaluation of JNK Blockade as an Early Intervention Treatment for Type 1 Diabetic Nephropathy in Hypertensive Rats. **American Journal of Nephrology**, v. 34, n. 4, p. 337–346, 2011.
- LOPES, H. J. J. BAPTISTA, J. M. A. SOUSA, M. O. Método Direto Para Dosagem de Creatinina: Modificação do Método de Heinegard e Tiderstrom. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 16, n. 2, p. 17–24, 1984.
- LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, n. 1, p.265-75,1951.
- LUNKES, G. I. *et al.* Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, n. 4, p. 189–194, 15 fev. 2003.

LUSHCHAK, O. V. *et al.* Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v. 76, n. 7, p. 932-937, 2009.

MA, Q.; HE, X. Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of Nrf2. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 4, p. 1055–1081, 2012.

MA, X. *et al.* Probucol Protects Against Contrast-Induced Acute Kidney Injury via the Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 (ERK1/2)/JNK-Caspase 3 Pathway in Diabetic Rats. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 25, p. 1038–1045, 2019.

MAH, L. J.; EL-OSTA, A.; KARAGIANNIS, T. C. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. **Leukemia**, v. 24, n. 4, p. 679–686, 2010.

MANSOUR, S.G. *et al.* Biomarkers for the detection of renal fibrosis and prediction of renal outcomes: a systematic review. **BMC Nephrol.**, v. 18, n. 1, p. 72, 2017.

MAUNDRELL, K. *et al.* Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 40, p. 25238–25242, 1997.

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. *et al.* 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. 1, p. 1–15, 2017.

MESNAGE, R. *et al.* Comparative Toxicogenomic of Glyphosate and Roundup Herbicides by Mammalian Stem Cell-Based Genotoxicity Assays and Molecular Profiling in Sprague-Dawley Rats. **Toxicological Sciences**, 186(1), 83–101, 2022.

MESTRE, A, P. *et al.* Effects of cypermethrin (pyrethroid), glyphosate and chlorpyrifos (organophosphorus) on the endocrine and immune system of *Salvator merianae* (Argentine tegu). **Ecotoxicol Environ Saf**, v 169, n. 3, p 61-67,2019.

MESNAGE, R. *et al.* Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, v.84, p.133-153,2015.

MERLET-BÉNICHOU, C., GILBERT, T., MUFFAT-JOLY, M. *et al.* Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. **Pediatr Nephrol.**, v. 8, p. 175–180, 1994.

MYERS, J.P. *et al.* Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. **Environ Health**, v.17, p 1-13,2016.

MIGLIORINI, A. *et al.* The danger control concept in kidney disease: mesangial cells. **Journal of nephrology**, v. 26, n. 3, p. 437–449, 2013.

MILIĆ, M. *et al.* Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate. **Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju**, v. 69, n. 2, p. 154–168, 2018.

MINK, P.J, *et al.* Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: a review. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 63, n. 8, p 440-52,2012.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170–3175, 1972.

MCMAHON, B.A; KOYNER, J.L.; MURRAY PT. Urinary glutathione S-transferases in the pathogenesis and diagnostic evaluation of acute kidney injury following cardiac surgery: a critical review. **Curr Opin Crit Care**, v.16, n.6. p.550-555,2010.

MOHAMED F. *et al.* Mechanism-specific injury biomarkers predict nephrotoxicity early following glyphosate surfactant herbicide (GPSH) poisoning. **Toxicol Lett**, v..258, n. 6, p.:1-10,2016.

MONTANARI, Tatiana. **Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas** .3. ed. Porto Alegre,2016.

MOKARIZADEH, A., FARYABI, M. R., REZVANFAR, M. A., & ABDOLLAHI, M. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 25, n. 4, p. 258–278, 2015.

MONAGHAN, M. L. T.; BAILEY, M. A.; UNWIN, R. J. Purinergic signalling in the kidney: In physiology and disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 187, p. 114389, 2021.

MORAES, R. F. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. TD 2506 ed. Brasília: IPEA, 2019.

NACANO, B.R.M, CONVENTO, M.B, OLIVEIRA, A.S, CASTINO R, CASTINO B, RAZVICKAS, C.V, BONDAN E, BORGES, F.T. Effects of glyphosate herbicide ingestion on kidney function in rats on a balanced diet. **J Bras Nefrol**. Dec,2023.

NEZU, M.; SUZUKI, N.; YAMAMOTO, M. Targeting the KEAP1-Nrf2 System to Prevent Kidney Disease Progression. **American Journal of Nephrology**, v. 45, n. 6, p. 473–483, 2017.

NEZU, M.; SUZUKI, N. Roles of Nrf2 in Protecting the Kidney from Oxidative Damage. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 8, p. 2951, 2020.

NIOI, P. *et al.* The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 24, p. 10895–10906, 15 dez. 2005.

NISSIM I. Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes. **Am J Physiol.** v.277, n.4, p.493-497, 1999.

NÜSKEN, E., DÖTSCH, J., WEBER, L. T., & NÜSKEN, K.-D. Developmental Programming of Renal Function and Re-Programming Approaches. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, 2018.

OCTAVIANO, Carolina. Muito além da tecnologia: os impactos da Revolução Verde. **Com Ciência**, Campinas, n. 120, 2010. Disponível em http://comciencia.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-76542010000600006&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 08 nov. 2023.

OTSUKI, A. *et al.* Unique cistrome defined as CsMBE is strictly required for Nrf2-sMaf heterodimer function in cytoprotection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 91, p. 45–57, 2016.

PANZACCHI, S. *et al.* The Ramazzini Institute 13-week study on glyphosate-based herbicides at human-equivalent dose in Sprague Dawley rats: study design and first in-life endpoints evaluation. **Environ Health.**, v. 17, n. 1, p. 52, 2018.

PARIKH, C. R.; MANSOUR, S. G. Perspective on Clinical Application of Biomarkers in AKI. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 28, n. 6, p. 1677–1685, 2017.

PEIXOTO F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p.1115-22,2005.

PELAEZ, V.; TERRA, F. H. B.; DA SILVA, L. R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, v. 36, n. 1, p. 27-48, 2010.

PERES, L. A. B. *et al.* Biomarcadores da injúria renal aguda. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 35, n.3, p 229–236,2013.

PERES, L.; CUNHA JUNIOR, A.D. da Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: mecanismos moleculares. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 35, n.4, p. 332–340,2013.

PARVEZ, S. *et al.* Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: a prospective Indiana birth cohort study. **Environ Health**, v 17., n.3, p.1-12,2018.

PATTERSON, K.I. *et al.* Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. **Biochem J.** v. 418, n.3, p. 475-89,2009.

PILLA, C.; EMANUELLI, T.; FRASSETTO, S. S. *et al.* ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225–230, 1996.

PODHORECKA, M.; SKLADANOWSKI, A.; BOZKO, P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. **Journal of nucleic acids**, 2010.

- QIU, S. *et al.* Toxic effects of glyphosate on intestinal morphology, antioxidant capacity and barrier function in weaned piglets. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 187, 2020.
- QIU, S.; LIU, Y.; GAO, Y. *et al.* Response of the nuclear xenobiotic receptors to alleviate glyphosate-based herbicide-induced nephrotoxicity in weaned piglets. **Environ Sci Pollut Res.**, v. 29, p. 2707–2717, 2022.
- RAO, T. S. *et al.* Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723–741, 1993.
- RATLIFF, B.B.; ABDULMAHDI, W.; PAWAR, R.; WOLIN, M.S. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 25, n. 3, p. 119-46, 2016.
- RIEG, C. E. H., *et al.* Perinatal exposure to a glyphosate pesticide formulation induces offspring liver damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.454, p. 116245,2022.
- REGO, F.G.De Moraes., *et al.* Caracterização dos distúrbios da regulação ácido-base: uma abordagem didática e intuitiva..**Rev. bras. anal. Clin**, v.52, n. 4, p. 337-345, 2020.
- REIS, L. *et al.* Glyphosate-based herbicide induces long-lasting impairment in neuronal and glial differentiation. **Environmental Toxicology**, v. 37, n. 8, p. 2044–2057, 2022.
- RITEAU, N. *et al.* ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. **Cell death & disease**, v. 3, n. 10, 2012.
- ROBERTS, V. S. *et al.* The role of adenosine receptors A2A and A2B signaling in renal fibrosis. **Kidney International**, v. 86, n.4, p. 685–692,2014.
- ROUTH, R.; MCCARTHY, K.; WELBOURNE, T. Troglitazone inhibits glutamine metabolism in rat mesangial cells. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 282, n. 1, 2002.
- ROY, A.; AL-BATAINEH, M. M.; PASTOR-SOLER, N. M. Collecting duct intercalated cell function and regulation. **Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN**, v. 10, n. 2, p. 305–324, 2015.
- SAKAKI, H. *et al.* Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y11 receptor. **PLoS one**, v. 8, n. 4, 2013.
- SÁNCHEZ-BAYO, F. *et al.* Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. **Environment international**, v. 89–90, p. 7–11, 2016.
- SCHIEBER, M.; CHANDEL, N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr Biol.**, v. 24, n. 10, p. R453-62, 2014.
- SLUSS, H.K.; DAVIS, R.J. H2AX is a target of the JNK signaling pathway that is required for apoptotic DNA fragmentation. **Mol Cell** v. 21, n. 23, p.152-3,2006.

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.

SEELY, J. C. A brief review of kidney development, maturation, developmental abnormalities, and drug toxicity: juvenile animal relevancy. **Journal of toxicologic pathology**, v. 30, n. 2, p. 125–133, 2017.

SEKINE, H. *et al.* The Mediator Subunit MED16 Transduces Nrf2-Activating Signals into Antioxidant Gene Expression. **Molecular and cellular biology**, v. 36, n. 3, p. 407–420, 2015.

SÉRALINI, G. E. *et al.* Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Environ Sci Eur**, v. 26, n. 14, 2014.

SIES, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, v 7, p.122-126,2018.

SIEGEL, N. J.; DEVARAJAN, P.; VAN WHY, S. Renal cell injury: metabolic and structural alterations. **Pediatric research**, v. 36, n. 2, p. 129–136, 1994.

SIMON, N.; HERTIG, A. Alteration of Fatty Acid Oxidation in Tubular Epithelial Cells: From Acute Kidney Injury to Renal Fibrogenesis. **Frontiers in medicine**, v. 2, n. 8., 2015.

STEVENS, M.; OLTEAN, S. Assessment of Kidney Function in Mouse Models of Glomerular Disease. **Journal of Visualized Experiments**, v. 136, 2018.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329–337, 2007.

SOLINI, A; USUELLI, V; FIORINA, P. The dark side of extracellular ATP in kidney diseases. **J Am Soc Nephrol**, v.26, n.5, p.1007-16,2015.

STRUGER, J; THOMPSON, D; STAZNIK, B; MARTIN, P; MCDANIEL, T; MARVIN, C; Occurrence of glyphosate in surface waters of Southern Ontario. **Bull Environ Contam Toxicol**. v.80. n. 4, p. 378-84,2008.

SUZUKI, T. *et al.* Immune-associated renal disease found in caspase 3-deficient mice. **Cell Tissue Res**, v.379, p. 323–335,2020.

TAGHAVIAN, F.; VAEZI, G.; ABDOLLAHI, M.; MALEKIRAD, A. A. Comparative Toxicological Study between Exposed and Non-Exposed Farmers to Organophosphorus Pesticides. **Cell Journal**, v. 18, n. 1, p. 89–96, 2016.

TANASE, D. M. *et al.* The Predictive Role of the Biomarker Kidney Molecule-1 (KIM-1) in Acute Kidney Injury (AKI) Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, 2019.

TANG, J. *et al.* Ion Imbalance Is Involved in the Mechanisms of Liver Oxidative Damage in Rats Exposed to Glyphosate. **Front Physiol**, v. 19, n.8, p.1083,2017.

TANG, C. *et al.* P53 in kidney injury and repair: Mechanism and therapeutic potentials. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 195, p. 5–12, 2019.

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. 114129, 2020.

TOURNIER, C. The 2 Faces of JNK Signaling in Cancer. **Genes & Cancer**, v.4, n. 9-10, p. 397–400, 2013.

TORSONI, M. A.; VIANA, R. I.; OGO, S. H. Sulphydryl groups and their relation to the antioxidant enzymes of chelonian red blood cells. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 46, n. 1, p. 147–156, 1998.

TRASANDE, L. *et al.* Glyphosate exposures and kidney injury biomarkers in infants and young children. **Environ Pollut**, v..256, p. 113334,2020.

VALAVANIDIS, A. Glyphosate, the Most Widely Used Herbicide. Health and safety issues. Why scientists differ in their evaluation of its adverse health effects. 2018. Disponível em: <www.chem-tox-ecotox.org/ScientificReviews>. Acesso em: 28 jan. 2022.

VAN BRUGGEN, A.H. *et al.* Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Sci Total Environ**, n.3, p-616-617,2018.

VASKO, R. *et al.* Endothelial peroxisomal dysfunction and impaired pexophagy promotes oxidative damage in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 3, p. 211–230, 2013.

VINAY P, LEMIEUX G, GOUGOUX A, HALPERIN M. Regulation of glutamine metabolism in dog kidney in vivo. **Kidney Int.** v 29, n 1, p 68-79, 1986.

WANG, S.-T. *et al.* Biochemical and molecular roles of nutrients methionine and cysteine affect glutathione level, glutathione-related enzyme activities and the expression of glutathione s-transferase isozymes in rat hepatocytes. **Biochemical and Molecular Roles of Nutrients**, v. 127, p. 2135–2141, 1997.

WARING, W. S.; MOONIE, A. Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury. **Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)**, v. 49, n. 8, p. 720–728, 2011.

WASUNG, M. E.; CHAWLA, L. S.; MADERO, M. Biomarkers of renal function, which and when? **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 438, p. 350–357, 2015.

WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R. J. Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3172-84, 2007.

WILLIAMS, A. L.; WATSON, R. E.; DESESSO, J. M. Developmental and Reproductive Outcomes in Humans and Animals After Glyphosate Exposure: A Critical Analysis. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 15, n. 1, p. 39–96, 2012.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, v. 31, n. 2 Pt 1, p. 117–165, 2000.

WHO - 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: 20 jan. 2022.

WOŹNIAK, E. *et al.* Glyphosate affects methylation in the promoter regions of selected tumor suppressors as well as expression of major cell cycle and apoptosis drivers in PBMCs (in vitro study). **Toxicology in Vitro**, v. 63, p. 104736, 2020a.

WOŹNIAK, E. *et al.* The selected epigenetic effects of aminomethylphosphonic acid, a primary metabolite of glyphosate on human peripheral blood mononuclear cells (in vitro). **Toxicology in Vitro**, v. 66, p. 104878, 2020b.

WUNNAPUK, K. *et al.* 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.

XIANG, H. *et al.* Role of Inflammasomes in Kidney Diseases via Both Canonical and Non-canonical Pathways. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, 2020.

YANG, S. *et al.* Metabolic responses in *Scophthalmus maximus* kidney subjected to thermal stress. **Fish Shellfish Immuno**, v. 103, n.8, p 37-46, 2020.

YAP, S. C.; THOMAS LEE, H. Adenosine and protection from acute kidney injury. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 21, n. 1, p. 24–32, 2012.

YOUNES-IBRAHIM, M. Células mesangiais: protagonistas ou coadjuvantes da função renal? **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 4, n. 35, p. 248–249, 2013.

YU, T. *et al.* The regulatory role of activating transcription factor 2 in inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

YUAN, C. H.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3831–3850, 2012.

ZANCHI, M.M, MARINS, K., ZAMONER A. Could pesticide exposure be implicated in the high incidence rates of depression, anxiety and suicide in farmers? A systematic review. **Environ Pollut.** V.15 p 331,2023

ZEKE, A.; MISHEVA, M.; REMÉNYI, A.; BOGOYEVITCH, M. A. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 80, n. 3, p. 793–835, 2016.

ZHANG, D.D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. **Drug Metab Rev.**, v. 38, n. 4, p. 769-89, 2006.

ZHANG, C. *et al.* Molecular Basis for Endocrine Disruption by Pesticides Targeting Aromatase and Estrogen Receptor. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 16, p. 5664, 2020.

ZHAO, J. H. Mesangial Cells and Renal Fibrosis. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1165, p. 165–194, 2019.

ZHOU, Y. *et al.* UCP2 attenuates apoptosis of tubular epithelial cells in renal ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 313, n. 4, p. F926–F937, 2017.

ZOETIS, T.; HURTT, M. E. Species comparison of anatomical and functional renal development. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.**, v. 68, n. 2, p. 111-20, 2003.