



## **INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL DE HERBICIDAS À BASE DE GLIFOSATO NÃO ALTERA MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO TECIDO MUSCULAR<sup>1</sup>**

**ACCEPTABLE DAILY INTAKE OF GLYPHOSATE-BASED HERBICIDES DOES NOT CHANGE OXIDATIVE STRESS MARKERS IN MUSCLE TISSUE.**

**Leticia Mariá Cassol Görck<sup>2</sup>, Juliana Furlanetto Pinheiro<sup>3</sup>, Rafaela Quintana Probst<sup>4</sup>, Diovana Gelati de Batista<sup>5</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>6</sup>, Pauline Brendler Goettems Fiorin<sup>7</sup>**

<sup>1</sup> Projeto Institucional desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ).

<sup>2</sup> Acadêmica de Medicina da UNIJUÍ. Bolsista PROBIC FAPERGS. Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

<sup>3</sup> Acadêmica de Medicina da UNIJUÍ. Bolsista PROBIC FAPERGS. Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

<sup>4</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde - UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF).

<sup>5</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional - UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF)

<sup>6</sup> Docente dos Programas de Pós-Graduação em Atenção integral à Saúde (UNICRUZ/UNIJUÍ) e em Modelagem Matemática e Computacional - UNIJUÍ.

<sup>7</sup> Docente dos Programas de Pós-Graduação em Atenção integral à Saúde UNIJUÍ.

### **INTRODUÇÃO**

Os herbicidas à base de glifosato (HBGs) são os agrotóxicos mais utilizados no Brasil e no mundo (TELEKEN et al., 2019). Apesar dos seus diversos efeitos positivos na agricultura, seus compostos ficam acumulados no ar, solo e, como consequência, nos recursos hídricos e alimentos. A exposição prolongada a HBG pode ter efeitos adversos à saúde humana e animal (MOHAMMADI et al., 2021).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a dose de Ingestão Diária Aceitável (IDA) dos HBGs é de 0,5 mg/kg de peso corporal (pc) por dia (ANVISA, 2020). No entanto, alguns estudos em modelos animais, com dosagens semelhantes ou menores do que está, demonstram efeitos nocivos em diversos tecidos, como alterações bioquímicas e oxidativas no fígado (MESNAGE et al., 2017), rins e intestino (LARSEN et al., 2014). Por outro lado, pouco se sabe sobre seus efeitos em tecidos musculares. As proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* - HSP) são proteínas citoprotetoras intracelularmente, possuindo função antioxidante, anti-apoptótica e anti-inflamatória (HECK; SCHÖLER; DE BITTENCOURT, 2011), e são sensíveis à exposição a poluentes ambientais (GOETTEMS-FIORIN et al., 2016). No entanto, os efeitos



dos HBGs sobre a expressão destas proteínas ainda precisam ser elucidados. Nesse cenário, o objetivo deste trabalho foi verificar se a dose de IDA de HBG induz estresse oxidativo e celular no tecido muscular.

## **METODOLOGIA**

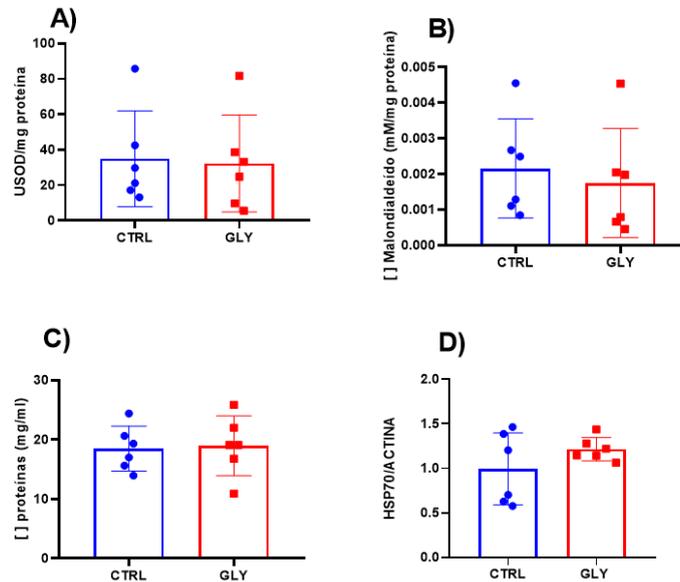
Os resultados que serão apresentados compõem o Subprojeto 2, do projeto “Efeitos de Herbicida à Base de Glifosato: Um Estudo Translacional”, o qual foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIJUÍ, e aprovado conforme o protocolo nº 025-19.

Foram utilizados 12 ratos Wistar, machos adultos, provenientes do biotério da UNIJUÍ, divididos nos grupos controle (CTRL), que recebeu apenas água, e glifosato (GLY), que recebeu a dose de IDA (0,5 mg/kg/dia) via água de consumo. O período de exposição foi de 11 semanas, e cada grupo continha 6 animais, alocados em caixas com 3 animais cada. Foi utilizada uma formulação comercial de HBG (Roundup® Original DI), contendo 445 g/L de sal de diamônio de N- fosfometil glicina (44,5% m/v, princípio ativo) e 370 g/L do equivalente ácido de N-fosfometil glicina (37% m/v).

No final do período experimental, os animais foram eutanasiados, sendo realizada a coleta do músculo gastrocnêmio. O tecido foi congelado e armazenado em freezer para as análises de estresse oxidativo e estresse celular. Para avaliar a lipoperoxidação foi realizada a técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE; AUST, 1978). A atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pelo método da auto-oxidação do piragolol (MARKLUND; MARKLUND, 1974). A concentração de proteínas foi mensurada pelo método de Bradford (1976). A expressão de HSP70 intracelular foi determinada por Western Blot (LAEMMLI, 1970).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Verificamos que a dose de IDA de HBG não induziu alterações na atividade da superóxido dismutase ( $p = 0,869$ ) e nos níveis de peroxidação lipídica ( $p = 0,635$ ) (Figura 1 A, B). Além disso, não houve alterações na concentração de proteínas ( $p = 0,857$ ) e na expressão da HSP70 ( $p = 0,230$ ) (Figura 1 C, D).



**Figura 1:** Gráfico da enzima superóxido dismutase do músculo gastrocnêmio de ratos Wistar, machos adultos, do grupo controle (CTRL) e grupo glifosato (GLY), representado em unidade de superóxido dismutase (USOD) por miligrama (mg) de proteína, com  $p = 0,869$  (A). Gráfico da concentração de malondialdeído (MDA), representado em milimol (mM)/miligrama (mg) de proteína, com  $p = 0,6350$  (B). Gráfico de dosagem de proteínas, representado em miligramas (mg)/mililitros (ml) de proteínas, com  $p = 0,8579$  (C). Gráfico da resposta a proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70), representado em HSP70/actina, com  $p = 0,2305$  (D).

Em estudo realizado com camundongos fêmeas expostas ao Roundup® em uma dose semelhante à utilizada em nosso trabalho, não foram observadas alterações em marcadores de estresse oxidativo e de morte celular nos músculos extensores longos dos dedos e no sóleo (BARBOSA et al., 2021). Em conjunto, nossos resultados e a literatura indicam que o HBG (nas doses estudadas até o momento) não induz estresse celular no tecido muscular.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição ao herbicida à base de glifosato, na dose de IDA, não induz alterações nos marcadores de estresse oxidativo e celular muscular em ratos Wistar. Estes resultados reforçam a necessidade de cuidados quanto à exposição em níveis recomendados pelas agências reguladoras.

**Palavras-chave:** Herbicidas a Base de Glifosato. Estresse oxidativo. Estresse celular. Músculo gastrocnêmio.

## AGRADECIMENTOS:



Agradecimento ao Programa de Iniciação Científica e Tecnológica (PIBIC CNPq, PIBIC UNIJUI, PIBIT CNPq, PIBIT UNIJUI, PROBIT FAPERGS, PROBIC FAPERGS), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, ao PPGAIS e ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF) pela concessão de bolsas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. NOTA TÉCNICA Nº 12 de 2020.

BARBOSA, A. et al. Estudo das fibras musculares dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de fêmeas C57BL/6 expostas ao glifosato durante a prenhez e a lactação. *Einstein (São Paulo)*, v. 19, 2021.

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

BUEGE, A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: *Methods in enzymology*. Academic press, 1978. p. 302-310.

GOETTEMES-FIORIN, P. B. et al. Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development in high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. *Journal of Physiology and Biochemistry*, v. 72, n. 4, p. 643-656, 2016.

HECK, T. G.; SCHÖLER, C. M.; DE BITTENCOURT, P. I. H. HSP70 expression: Does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochemistry and Function*, v. 29, n. 3, p. 215-226, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LARSEN, K. et al. Effects of sublethal exposure to a glyphosate-based herbicide formulation on metabolic activities of different xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. *International journal of toxicology*, v. 33, n. 4, p. 307-318, 2014.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G.. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MESNAGE, R.; ANTONIOU, M. N. Facts and fallacies in the debate on glyphosate toxicity. *Frontiers in public health*, v. 5, p. 316, 2017.

MOHAMMADI, K. et al. A systematic review and meta-analysis of the impacts of glyphosate on the reproductive hormones. *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-12, 2021.

TELEKEN, J. L. et al. Glyphosate-based herbicide exposure during pregnancy and lactation malprograms the male reproductive morphofunction in F1 offspring. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, v. 11, n. 2, p. 146-153, 2019.