



Evento: XXX Seminário de Iniciação Científica

## **AVALIAÇÃO DE EFEITOS HEPÁTICOS DA EXPOSIÇÃO À DOSE DE INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL DE GLIFOSATO EM MODELO EXPERIMENTAL <sup>1</sup>**

**HEPATIC EFFECTS OF ACCEPTABLE DAILY INGESTION DOSE OF GLYPHOSATE IN ANIMAL EXPERIMENTAL MODEL 10**

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

<sup>1</sup> Pesquisa desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia, UNIJUÍ

<sup>2</sup> Acadêmica do curso de Medicina - UNIJUÍ, Bolsista PROBIC/FAPERGS

<sup>3</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional - UNIJUÍ

<sup>4</sup> Acadêmica do curso de Medicina - UNIJUÍ

<sup>5</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde - UNIJUÍ

<sup>6</sup> Docente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (UNICRUZ/UNIJUÍ)

<sup>7</sup> Docente dos Programas de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (UNICRUZ/UNIJUÍ) e em Modelagem Matemática e Computacional (UNIJUÍ)

### **INTRODUÇÃO**

O uso de pesticidas repercute na economia mundial uma vez que o auxilia no controle de pragas agrícolas e, assim, promove o aumento da colheita. Entre os principais pesticidas utilizados na lavoura nas últimas décadas estão os herbicidas (VANDENBERG et al, 2017). Entretanto, sabe-se que a presença de herbicida no ambiente induz riscos à saúde de animais e humanos (LARSEN et al, 2014; MILLS; CAUSSY; LOOMBA, 2020). Os pesticidas, quando presentes no solo, podem sofrer infiltração, escoamento e lixiviação, podendo, dessa forma, chegar aos lençóis freáticos, rios, lagos e, conseqüentemente, ao consumo dos animais e do ser humano (SADEGH-ZADEH; WAHID; JALILI, 2017).

A partir de estudos acerca do da presença de pesticidas, como o glifosato, na alimentação humana, a ANVISA, 2018 estipulou a dose de Ingestão Diária Aceitável (IDA), cuja finalidade é determinar a quantidade do ingrediente ativo de Herbicidas à Base de Glifosato (HBG) que pode estar presente no consumo diário sem que haja prejuízo à saúde (ANVISA, 2021).

Estudos com exposição subaguda, subcrônica e subletal ao HBG em ratos wistar demonstraram danos histológicos, bioquímicos e genéticos em órgão de diferentes sistemas (TANG et al, 2017; MESNAGE et al, 2017). As proteínas de choque térmico (HSPs) são chaperonas a qual é associada ao dobramento e na facilitação do transporte de outras



proteínas, o que atribui às HSPs a função marcadores de estresse celular por serem sensíveis a alterações no ambiente intracelular e extracelular, assim como à poluentes ambientais (GOETTEMES-FIORIN et al., 2016; HECK; SCHÖLER; DE BITTENCOURT, 2011).

Dentre os efeitos relatados, a indução ao estresse oxidativo parece ter papel central nos mecanismos de toxicidade celular e tecidual, como CATTANI et al, 2017 verificaram no hipocampo de ratos. Nesse cenário, a segurança da IDA tem sido questionada (VANDENBERG et al, 2017). E, por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição à dose de IDA de HBG altera marcadores de estresse oxidativo e celular no tecido hepático.

## **METODOLOGIA**

Foram utilizados 12 ratos *Wistar*, machos e adultos (3 meses) provenientes do biotério da UNIJUÍ (CEUA 025/2019), com ciclo de claro-escuro de 12 horas, em temperatura ambiente  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com água e ração *ad libitum*. Os animais foram divididos em dois grupos: Controle (CTRL) (n=6) e Glifosato (GLY) (n=6), ambos os grupos receberam ração padrão, e somente o grupo GLY foi exposto a concentração de aproximadamente 0,5 mg/Kg de peso corporal de HBG, calculados a partir da IDA e diluídos na água dos animais no período das 12 semanas de experimento.

A solução Glifosato para exposição foi preparada semanalmente, a partir do HBG Roundup® Original DI, contendo 445 g/L de sal de diamônio de N- fosfonmetil glicina (44,5% m/v, princípio ativo) e 370 g/L do equivalente ácido de N-fosfonometil glicina (37% m/v). Os valores utilizados no cálculo para exposição do grupo GLY à IDA foram referentes ao consumo médio diário hídrico da semana anterior e o peso corporal médio dos animais de cada caixa. Ao final do período de experimento, os animais foram eutanasiados e todos os tecidos foram coletados e armazenados no freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) foi avaliada pelo método da inibição da auto-oxidação do pirogalol(MARKLUND; MARKLUND, 1974). A lipoperoxidação foi avaliada pelo Teste de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) (BUEG; AUST, 1978). A concentração de proteínas foi verificada pela técnica do Bradford (BRADFORD, 1976).

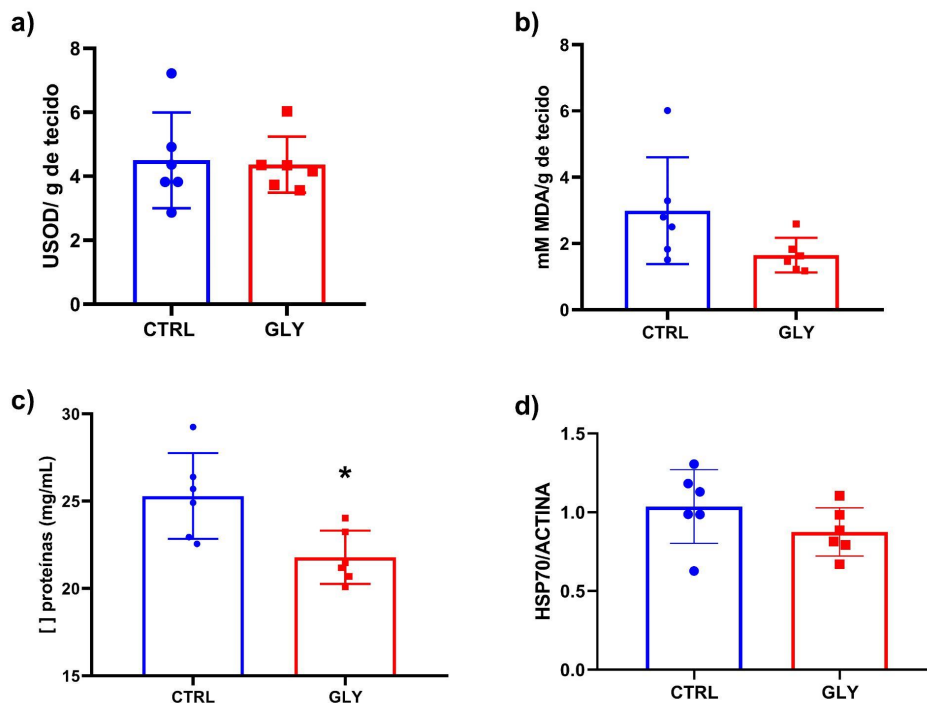
A avaliação da expressão da proteína de Choque Térmico de 70 kDa intracelular (iHSP70) foi realizada pela técnica de Western Blot (LAEMMLI, 1970), em membrana de

fluoreto de polivinilideno (PVDF) e imunodeteção por meio do anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147; diluído 1:1000), e anticorpo monoclonal anti-actina (Sigma A3854; diluído 1:5000) para normalização. Proteínas foram reveladas por quimioluminescência e as imagens referentes às expressões de HSP70 e actina foram quantificadas no programa ImageJ.

Os dados foram analisados pelo software Graphpad Prism 8.0.1, resultados foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão. A normalidade foi verificada por Shapiro-Wilk. Os resultados foram submetidos ao Teste-T não pareado ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais expostos à IDA de HBG tiveram redução na concentração de proteínas hepáticas ( $p = 0,014$ ) (Figura 1c). Entretanto, não houve alterações na lipoperoxidação ( $p = 0,0821$ ), na atividade da SOD ( $p = 0,8495$ ) e nem na expressão de HSP70 ( $p = 0,1893$ ) (Figura 1a, b e d).



**Figura 1.** Marcadores de estresse oxidativo e celular no tecido hepático. (a) Atividade da Superóxido Dismutase ( $p = 0,8495$ ); (b) Lipoperoxidação ( $p = 0,0821$ ); (c) Concentração de proteínas ( $p = 0,014$ ); e (d) Expressão de HSP70 ( $p = 0,1893$ ). CTRL: grupo controle ( $n = 6$ ); GLY: grupo exposto ao HBG ( $n = 6$ ).



Alterações na lipoperoxidação e na atividade da enzima SOD podem indicar supressão do *status redox* e, conseqüentemente, a perda da homeostasia e da integridade celular (GASCHLER; STOCKWELL, 2017; WANG *et al.*, 2018). Em exposições subagudas e subcrônicas, em maiores concentrações e em períodos mais prolongados de exposição, demonstrou-se que há danos oxidativos em células hepáticas (MESNAGE *et al.*, 2017; MILL; MILLS; CAUSSY; LOOMBA, 2020).

As proteínas são responsáveis pela regulação de muitas funções do organismo, como a homeostase celular (LODISH *et al.*, 2014). MESNAGE *et al.*, 2017, demonstraram que a exposição crônica à concentração de 0,01ppm de Roundup em ratos causou alterações proteômicas e metabolômicas do tecido hepático. Neste sentido, as iHSP70 estão diretamente ligadas à regulação da homeostase proteica tecidual e relacionada a citoproteção e efeitos anti-inflamatórios (HECK; SCHÖLER; DE BITTENCOURT, 2011). Embora, Li et al, 2019 tenham demonstrado que a exposição subaguda de peixes à altas concentrações de HBG causam aumento na expressão das HSPs, em nosso estudo, na dose investigada, não observamos alterações na expressão de HSP70 hepática.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os animais expostos à IDA de HBG tiveram redução na concentração de proteínas hepáticas. Entretanto, não houve alterações nos marcadores de estresse oxidativo e celular.

**Palavras-chave:** Agrotóxicos, estresse oxidativo, estresse celular.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica e Tecnológica (PIBIC CNPq, PIBIC UNIJUÍ, PROBIC FAPERGS, PIBIT CNPq, PIBIT UNIJUÍ. PROBIT FAPERGS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsas. Ao Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde e ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUÍ.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica nº 23 de 2021. Apresenta a Nota Técnica Preliminar sobre as conclusões da reavaliação do glifosato [...]. 2018.



- BRADFORD, Marion 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, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, v.52, p.302-309, 1978.
- CATTANI, Daiane 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.
- GASCHLER, Michael M.; STOCKWELL, Brent R. Peroxidação lipídica na morte celular. *Comunicações de pesquisa bioquímica e biofísica*, v. 482, n. 3, pág. 419-425, 2017.
- 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, Thiago Gomes; SCHÖLER, Cinthia Maria; DE BITTENCOURT, Paulo I. Homem. 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, Karen 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.
- LI, Yuanyuan; DING, Weikai; LI, Xiaoyu. Acute exposure of glyphosate-based herbicide induced damages on common carp organs via heat shock proteins-related immune response and oxidative stress. *Toxin Reviews*, 2019.
- LODISH, Harvey et al. *Biologia celular e molecular*. 7. ed. rev. [S. l.]: Artmed, 2014.
- MAGGI, F. et al. The global environmental hazard of glyphosate use, *Science of The Total Environment*, v. 717, 2020.
- MARKLUND, S.; MARKLUNG, 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, p.469-474, 1974.
- MESNAGE, Robin et al. Multiômica revela doença hepática gordurosa não alcoólica em ratos após exposição crônica a uma dose ultrabaixa do herbicida Roundup. *Relatórios científicos*, v. 7, n. 1, pág. 1-15, 2017.
- MILLS, Paulo J.; CAUSSY, Cyrielle; LOOMBA, Rohit. A excreção de glifosato está associada a esteato-hepatite e fibrose hepática avançada em pacientes com doença hepática gordurosa. *Gastroenterologia Clínica e Hepatologia*, v. 18, n. 3, pág. 741-743, 2020.
- SADEGH-ZADEH, Fardin; ABD WAHID, Samsuri; JALILI, Bahi. Sorption, degradation and leaching of pesticides in soils amended with organic matter: A review. *Advances in Environmental Technology*, v. 3, n. 2, p. 119-132, 2017.
- TANG, Juan et al. O desequilíbrio iônico está envolvido nos mecanismos de dano oxidativo hepático em ratos expostos ao glifosato. *Frontiers in Physiology*, v. 8, p. 1083, 2017.
- VANDENBERG, Laura N. et al. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides?. *J Epidemiol Community Health*, v. 71, n. 6, p. 613-618, 2017.
- WANG, Ying et al. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, v. 217, n. 6, p. 1915-1928, 2018.