

KELLY LOUISE THIEL

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE
ROUNDUP TRANSORB® EM LINHAGENS DE CÉLULAS DE
GLIOBLASTOMA**

CANOAS, 2023.

UNIVERSIDADE LA SALLE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO
HUMANO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE ROUNDUP
TRANSORB® EM LINHAGENS DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Humano da Universidade La Salle – Canoas/RS para obtenção do título de Mestre.

KELLY LOUISE THIEL

Orientadora: Prof^a Dr^a Fernanda Rabaioli da Silva

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Juliana da Silva

CANOAS, 2023.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T431i Thiel, Kelly Louise.
Investigação da atividade citotóxica e genotóxica de Roundup
Transorb® em linhagens de células de Glioblastoma [manuscrito] / Kelly
Louise Thiel – 2023.
61 f.; 30 cm.

Dissertação (mestrado em Saúde e Desenvolvimento Humano) –
Universidade La Salle, Canoas, 2023.

“Orientação: Profa. Dra. Fernanda Rabaioli da Silva”.

“Coorientador: Profa. Dra. Juliana da Silva

1. Glifosato. 2. Herbicida. 3. Neurotoxicidade. 4. Carcinógeno I. Silva,
Fernanda Rabaioli. II. Silva, Juliana da. III. Título.

CDU: 57

KELLY LOUISE THIE

Dissertação aprovada para obtenção do título de mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Humano, da Universidade La Salle.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Leticia Hilário Garcia
Universidade La Salle, Canoas/RS

Profa. Dra. Liciane Fernandes Medeiros
Universidade La Salle, Canoas/RS

Profa. Dra. Paula Rohr
Hospital de Câncer de Barretos, Instituto de Ensino e Pesquisa

Profa. Dra. Juliana da Silva
Coorientadora - Universidade La Salle, Canoas/RS

Profa. Dra. Fernanda Rabaoli da Silva
Orientadora - Universidade La Salle, Canoas/RS

Área de concentração: Saúde e Desenvolvimento Humano
Curso: Mestrado em Saúde e Desenvolvimento Humano

Canoas, 29 de março de 2023.

RESUMO

O glifosato é um herbicida de amplo espectro utilizado nas principais culturas agrícolas. Este agente pode causar contaminação ambiental em solos, águas superficiais e subterrâneas, sendo citado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), como um provável carcinógeno humano. A p53 é conhecida como proteína supressora tumoral, atuando como um regulador chave da resposta celular ao estresse e aos danos ao DNA. Por isso, mutações no gene *TP53*, codificador da p53, são alterações genéticas comuns encontradas em vários tipos de câncer. Entre as diversas formulações do glifosato utilizadas no Rio Grande do Sul (RS, Brasil) se destaca a de nome comercial Roundup Transorb® (RT). Considerando o uso intenso do glifosato no RS e a falta de conhecimento dos efeitos e mecanismos celulares e moleculares desta formulação, este estudo teve por objetivo avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do RT em duas linhagens celulares de glioblastomas: U87MG (proficiente para p53) e U251MG (mutante para p53), bem como prospectar as principais proteínas envolvidas à exposição ao RT no sistema nervoso utilizando a Biologia de Sistemas. Também objetivou-se criar um produto técnico baseado no Ensaio Cometa, a fim de padronizar por meio de um protocolo audiovisual. Para a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade o Ensaio Cometa foi utilizado. Para mineração dos dados ferramentas de bioinformática como o STRING 11.0 e STITCH 5.0 foram utilizadas, servindo como base para o desenho das redes binárias no programa Cytoscape 3.6.0. Das análises dos testes *in vitro* verificamos a diminuição da viabilidade celular em doses a partir de 10 ppm, dose considerada segura pela ANVISA e CODEX. Danos ao DNA foram observados pelo Ensaio Cometa em concentrações a partir de 10 e 30 ppm para as linhagens U251MG e U87MG, respectivamente. Observou-se também apoptose tanto em células proficientes quanto nas mutantes para TP53. A citotoxicidade e genotoxicidade foram observadas em ambas linhagens celulares de maneira dose-dependente de RT. A rede gerada com a biologia de sistemas mostrou que a presença de p53 é um aliado para a regulação de processos biológicos de regulação da apoptose neural. Por fim, o produto técnico desenvolvido é um protocolo audiovisual do Ensaio Cometa disponível no canal do YouTube da Mutagen-Brasil.

Palavras-chave: glifosato, herbicida, neurotoxicidade, carcinógeno.

DEDICATÓRIA

À minha avó Nair, que cursou um ano letivo do ensino fundamental e leu tantos livros quanto encontrou no seu caminho. À minha mãe Neiva, que não pôde terminar seus estudos, mas que me fez uma pessoa encantada com a ciência e a natureza, incentivando sempre a estudar.

“Juntas, serão uma força.” Bertha Lutz

AGRADECIMENTOS

Considero que sou uma privilegiada por estar rodeada de pessoas que tanto admiro e me inspiro. Por isso, quero agradecer primeiramente à minha família, especialmente minha mãe Neiva e meu companheiro de vida, Bruno Guimarães. Muito obrigada pelo incentivo e força de sempre. Obrigada também às minhas amigas Fernanda Felipe, Viviane Ferronato, Raquele Marin e Aline Miranda por vibrarem com as minhas conquistas. Amo todos vocês.

Talvez não existam palavras para agradecer às minhas orientadoras Fernanda Rabaioli da Silva e Juliana da Silva, duas mulheres incríveis que tive o privilégio de conhecer na Universidade, mas que levo como fonte de inspiração para a vida. Obrigada pelo apoio, orientação e por terem me incentivado a continuar, mesmo diante da pandemia, mesmo diante do problema de saúde que tive.

Devo um agradecimento especial também aos colegas Iuri Marques de Oliveira, Júlia Vanini e João Antônio Pêgas Henriques, que me ajudaram tanto nos experimentos de bancada no laboratório da UFRGS. Muito obrigada Micaele Wolfarth pela pesquisa com a Biologia de Sistemas na Universidade La Salle. Muito obrigada Enaile Serpa e Malu Siqueira Borges pelo apoio e paciência junto ao laboratório da ULBRA.

Agradeço também à professora Vanessa Moraes de Andrade e aos colegas Schellen Kindermann e Otávio Possamai da UNESC, que nos auxiliaram na elaboração do protocolo audiovisual, assim como no olhar atento e carinhoso do nosso videomaker Luan Cardoso, que captou as minúcias de cada processo.

Agradeço de coração a todos que fizeram este trabalho possível.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Para esse trabalho contamos com o auxílio dos laboratórios:

- Laboratório de Genética Toxicológica vinculado ao Programa de Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA);
- Laboratório do Departamento de Biofísica vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFRGS) e Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFCSPA);
- Laboratório de Biomedicina Translacional vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC);
- Associação Brasileira de Mutagênese e Genômica Ambiental - Mutagen Brasil.

A pesquisa foi desenvolvida com o incentivo da Bolsa Institucional da Universidade La Salle, Canoas/RS.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Herbicidas à base de glifosato na agricultura	13
1.2	Glifosato, herbicidas à base de glifosato e a neurotoxicidade	14
1.3	A relação da proteína p53 com <i>Roundup Transorb®</i>	19
1.4	Glifosato e estudos <i>in vitro</i>	20
1.5	Biologia de Sistemas	22
2	Justificativa	25
3	Objetivos	26
3.1	Objetivo geral	26
3.2	Objetivos específicos	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	Herbicida à base de glifosato: <i>Roundup Transorb®</i>	27
4.2	2727	
4.3	27Roundup Transorb®	28
4.4	Ensaio de viabilidade celular	28
4.4.1	Medida da atividade da desidrogenase mitocondrial (técnica MTT)	28
4.4.1.1	Ensaio de formação de colônias (29 30)	
4.5	Ensaio Cometa	31
4.6	Análise estatística	31
4.7	Biologia de Sistemas	32
4.7.1	Construção da rede de interações	32
4.7.2	Análise da modularidade	32
4.7.3	Análise da ontologia gênica	32
4.7.4	Análise da centralidade	33
4.7.5	Diagrama de Venn	33

4.7.6 Análise da função ds <i>hub</i> -gargalos e a relação com neurotoxicidade e instabilidade genética	33
4.7.7 Produto Técnico: Protocolo audiovisual de Ensaio Cometa 3335	
5 RESULTADOS	36
5.1 Resultados testes <i>in vitro</i>	36
5.2 Resultados dos testes <i>in silico</i>	39
5.3 Resultado do Produto Técnico	46
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	56
8 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Os efeitos dos poluentes ambientais, sejam eles na forma de aerossol, material particulado, insumo químico agrícola, dejetos líquido e sólido ou expurgo foram transformando a qualidade do ar, do solo e das águas, sendo encontrados resíduos destes compostos e subcompostos em toda a cadeia trófica. Segundo o Dossiê da ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva e ABA – Associação Brasileira de Agroecologia (2018), o Brasil é um dos líderes no consumo de agrotóxicos quando comparado aos demais países do mundo, sendo que há inúmeras possibilidades de desenvolvimento de um modelo de agricultura capaz de evitar doenças, tendo em vista sua alta biodiversidade, em especial, de organismos ecologicamente importantes ao sistema agrícola.

Nos últimos 30 anos, o aperfeiçoamento da tecnologia dos produtores rurais brasileiros conseguiu aumentar significativamente a produção de cereais. Contudo, este aumento está diretamente relacionado com a dependência de agrotóxicos e fertilizantes químicos de forma a suportar tamanha a demanda por alimentos e expansão populacional (DECKER, 2015; DUARTE et al., 2022).

O glifosato é o ingrediente ativo da categoria de herbicida mais utilizado no mundo e o alvo de muitas pesquisas, mesmo assim a sua ação precisa de maior investigação pois há divergências em relação à periculosidade de algumas formulações (PINTO et al., 2020; TRAVLOS et al., 2017; WOZNIAK et al., 2017; DAL BÓ et al., 2022). Evidências têm sido apresentadas em relação ao potencial carcinogênico deste herbicida em estudos com experimentação animal (IARC, 2017). Por outro lado, agências consideram o glifosato pouco tóxico ou improvável de causar danos agudos em humanos (ANVISA, 2021), ou concluem que não existem riscos ambientais ou ocupacionais (USEPA, 2020).

Contudo, pesquisas vêm dando ênfase à capacidade do glifosato em causar efeitos deletérios à saúde humana decorrentes da exposição contínua, o que, de está associada a doenças como o câncer, doenças do sistema digestório, endócrino e reprodutor, e as neuropatias (MESNAGE et al., 2015, WOZNIAK et al., 2017; DAL BÓ et al., 2022). Embora não haja consenso sobre a sua toxicidade, a EFSA (Autoridade Europeia para Segurança Alimentar) orienta que a Dose Diária

Aceitável (ADI) é de 0,5 mg/kg de peso corporal por dia, sendo o Nível Aceitável de Exposição Ocupacional (AOEL) é de 0,1 mg/kg de peso corporal por dia, os mesmos parâmetros adotados pela Nota Técnica 12/2020 (ANVISA, 2020).

Já para o Codex Alimentarius, o programa conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e da Organização Mundial da Saúde, é considerado o limite máximo de resíduos de 20 mg/kg de glifosato em alimentos, quanto a ANVISA considera seguro 10 mg/kg (ANVISA, 2022), o equivalente a 10 partes por milhão.

Estudos sugerem que a exposição a agrotóxicos, cada vez mais presentes nos processos produtivos, pode levar a uma diversidade de alterações bioquímicas que podem estar correlacionadas com a instabilidade genômica e ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (MEGGS, 2003; DE OLIVEIRA et al., 2019; DUARTE et al., 2022). Além do impacto aos neurônios, células de suporte do sistema nervoso, as células da glia, também são sensíveis à exposição ao glifosato.

Sabe-se que a exposição ocupacional aos pesticidas conduz a danos oxidativos, aumentando o risco da incidência de doença de Parkinson e doença de Alzheimer, por exemplo, e também pode acelerar a neurodegeneração relacionada com o envelhecimento (WANG et al., 2006; PENG et al., 2007; HAYDEN et al., 2010). A mistura complexa de defensivos agrícolas é muitas vezes baseada em elementos inorgânicos, que tendem a perder elétrons e produzir espécies reativas de oxigênio, possibilitando a reação com o DNA e induzindo a alterações no DNA nuclear e mitocondrial (DE OLIVEIRA et al., 2019).

Além disso, os herbicidas à base de glifosato possuem capacidade de persistência no ambiente, tornando-se poluentes orgânicos, demonstrando ser desreguladores endócrinos em linhagens *in vivo*, estando envolvidos em tumorigênese da tireoide (DAL BÓ et al., 2022)

A exposição a muitos xenobióticos, incluindo os produtos químicos agrícolas, compromete a integridade do genoma por meio de dano oxidativo ao DNA (FILHO et al., 2013; WOZNIAK et al., 2020). O estresse oxidativo gerado, caracterizado por uma intensa sobrecarga de radicais livres, pode ser nocivo tanto às estruturas celulares como ao material genético (GOMES, 2007; TELESIL, 2008), fazendo com

que o processo de eliminação de células danificadas entre em desequilíbrio, podendo aumentar o risco de desenvolvimento de tumores (DE OLIVEIRA et al., 2019). Apesar do aumento do estresse oxidativo, da indução de resposta inflamatória e da instabilidade genômica induzida pela exposição ao glifosato, os dados referentes à indução de câncer são controversos (WILLIAMS et al., 2000; REUTERS, 2011; KOLLER et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2019). Estudos apontam que indivíduos expostos a herbicidas à base de glifosato apresentaram risco duas vezes maior de desenvolver diferentes tipos de mielomas, um tipo de câncer de medula óssea, do que os não-expostos (REUTERS, 2011). Uma associação entre linfoma não-Hodgkin e exposição à glifosato também foi observada (IARC, 2017; WOZNIAK et al., 2020). No que se refere à ação mutagênica do glifosato, aumento das quebras de fita de DNA, na frequência de micronúcleos e encurtamento telomérico foram observados em trabalhadores expostos (revisado em PINTO et al. 2020).

Constitutivamente, os mecanismos de reparo de dano ao DNA lidam com baixos níveis de lesão genômica e minimizam os efeitos prejudiciais de tais agentes. Contudo, um aumento no dano ao DNA acima do limite, ativa múltiplas vias de sinalização que protegem contra instabilidade genômica e restringe o crescimento de células aberrantes em resposta ao estresse genotóxico, sendo a proteína p53 um componente central destas vias (PIMENTA et al., 2013).

Os testes *in vitro* são métodos alternativos importantes que oferecem várias vantagens sobre os métodos tradicionais *in vivo*, incluindo condições controladas do teste, alto nível de padronização, redução na variabilidade entre os experimentos, ausência de efeitos sistêmicos, baixo custo, pequena quantidade de material necessário, menor quantidade de resíduos tóxicos e redução da necessidade do uso de animais (ARAÚJO et al., 2014). Os resultados experimentais sugerem que a análise de genotoxicidade *in vitro* pode servir como um importante indicador dos riscos de exposição ocupacional e ambiental aos agrotóxicos (JAMIL et al., 2004; ÜNDEĞER & BAÇARAN, 2005; DAS et al., 2007).

Aliados aos experimentos *in vitro*, alguns modelos *in silico* têm sido utilizados com o intuito de investigar o efeito do composto químico em células/tecidos, norteando a investigação experimental. A Biologia de Sistemas relaciona as partes

individuais de um sistema através de representações gráficas por conjuntos de nós e conectores, que se ligam entre si. Os nós podem representar indivíduos, proteínas ou até mesmo genes, enquanto os conectores representam ligações entre cada par de nós, essa demonstração gráfica é chamada de rede (POLONI et al., 2014). As redes podem ser um mecanismo muito útil para o entendimento das características químicas fundamentais dos processos biológicos, pela visualização de um pequeno conjunto de dados gerados por meio de experimentos controlados. Por isso, iremos utilizar essas ferramentas se comunicando entre si.

1.1 Herbicida à base de glifosato na agricultura

Atualmente, inúmeros estudos envolvendo patologias, transtornos e síndromes indicam a forte influência da exposição química ambiental, como a agroquímicos, desde acontecimentos pré-natais até à vida adulta, além de fatores como predisposição genética, etnia, gênero e estilo de vida (SANCHEZ et al., 2015; POSAR & VISCONTI, 2017; DE OLIVEIRA et al., 2019). Nisso, vale ressaltar a importância das alterações promovidas pelo ser humano ao longo das civilizações, através da transformação do ambiente natural de acordo com as suas necessidades. O crescimento demográfico trouxe a expansão também da agricultura e da pecuária extensiva, além de grandes indústrias como aporte à população humana (DUARTE et al., 2022).

O glifosato é o ingrediente ativo da categoria herbicida com amplo espectro utilizado nas principais culturas agrícolas (DECKER, 2015; SANCHEZ et al., 2015; TRAVLOS et al., 2017; DAL BÓ et al., 2022). Após a aplicação, a contaminação humana pode se dar pela via ocupacional, alimentar ou ambiental. Populações expostas a agroquímicos de forma crônica e aguda podem sofrer um comprometimento na saúde com a manifestação de doenças neurodegenerativas (MEGGS, 2003; DE OLIVEIRA et al., 2019).

Segundo a ficha técnica da Companhia Ambiental de São Paulo (CETESB, 2022), após a absorção do glifosato pela planta-alvo, a degradação ocorre por microrganismos presentes na água e no solo, liberando dióxido de carbono, possuindo meia-vida de até 130 dias. Apesar da companhia afirmar que não há

bioacumulação em organismos aquáticos, estudos têm demonstrado efeitos doses-dependente da concentração em 24 horas (FILHO et al., 2013; SANCHEZ et al., 2015), inclusive estando presente em diferentes concentrações em alimentos, águas subterrâneas e urina humana (DAL BÓ et al., 2022).

Decker (2015) cita que as plantas são geneticamente tratadas para serem resistentes ao glifosato com a introdução do gene CP4-EPSPS. Segundo dados da Campanha Permanente contra os agrotóxicos, a área plantada de transgênicos subiu de 3 para 44,2 milhões de hectares entre 2003 e 2015. O crescimento possivelmente possui correlação com o uso de plantas geneticamente homogêneas, que favorece o aumento de patógenos e pragas, e o uso exacerbado de agroquímicos, em um ciclo vicioso e epidêmico (GASNIER et al., 2009; DECKER, 2015).

Os herbicidas à base de glifosato lideram, mundialmente, a venda de agrotóxicos, sendo utilizados como pré e pós emergentes nas culturas (DECKER, 2015). O glifosato é citado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer como sendo um provável carcinógeno humano, embora outras agências o considerem pouco provável de causar câncer (CETESB, 2022), incluindo a própria ANVISA em sua Nota Técnica 12/2020. Entre as diversas formulações do glifosato utilizadas no Rio Grande do Sul (RS, Brasil), se destaca a de nome comercial Roundup Transorb® (RT). Estudos anteriores demonstraram toxicidade sinérgica em formulações à base de glifosato, ou seja, potencialização dos efeitos tóxicos em razão da combinação de mais de uma substância ou fator, podendo ocasionar dano mais grave do que isoladamente (BENACHOUR E SÉRALINI, 2009; DECKER, 2015; KWIATKWSKA et al., 2017; LUACES et al., 2017; DAL BÓ, 2022).

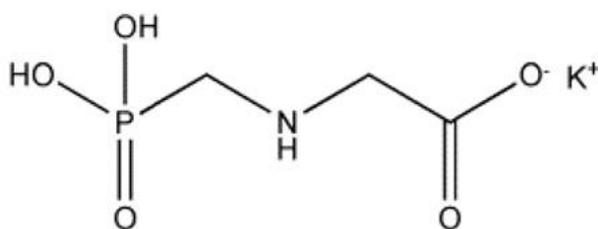
1.2 Glifosato, herbicidas à base de glifosato e a neurotoxicidade

A eficácia dos herbicidas está diretamente relacionada à capacidade de entrar em contato com a planta, por meio da pulverização direcionada, ser absorvida pela cutícula das suas folhas e, mover-se dentro da planta sem perder seu efeito tóxico até o local de ação (TRAVLOS et al., 2017). A temperatura do ar, a intensidade luminosa e a espécie-alvo também são fatores importantes para a

eficácia da ação dos herbicidas, embora a adição de adjuvantes/surfactantes seja cada vez mais necessária nas formulações à base de glifosato. Isso porque a eficácia contra espécies de plantas consideradas daninhas tem diminuído em virtude da resistência desses organismos ao controle químico (TRAVLOS et al., 2017).

As formulações são desenvolvidas com glifosato nas formas de sal de potássio, diamônio, isopropilamina, trimetilsul visando, desta forma, melhorar a penetração e a eficácia em ervas daninhas. Porém, independente do surfactante, o glifosato apresenta potencial tóxico o qual pode estar associado ao desenvolvimento de câncer (FILHO et al., 2013). Essas formulações tendem a gerar um processo que modifica a formação e o impacto das gotas bem como a sua retenção na superfície foliar, espalhando e cobrindo a planta com o produto (TRAVLOS et al., 2017).

A formulação RT utilizada em grande escala no Brasil apresenta formulação com sal de potássio, que confere maior solubilidade em comparação ao sal de isopropilamina (HANSON, 2020). Segundo o fabricante, o produto é ideal para climas tropicais, tendo em vista sua rápida ação com menor risco de perda por chuva após uma hora de aplicação. A Fig. 1 apresenta a formulação em que o glifosato com carga negativa fraca juntamente com o sal se liga a uma base com carga positiva formando o ácido de glifosato. No momento da ação, quem irá se ligar à enzima alvo da planta é o ácido de glifosato, causando o efeito herbicida, uma solução estável e solúvel.



Glyphosate-potassium salt

Figura 1 - Formulação dos herbicidas à base de glifosato com sal de potássio.

Fonte: <https://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=25903>

O glifosato é um composto sintético com semelhanças com o grupo funcional da glicina: um grupo amina e outro, carboxila, ligados ao mesmo átomo de carbono, conforme verifica-se na composição de RT: sal de potássio de N-(fosfometil)glicina, ácido de N-(fosfometil)glicina e outros. O glifosato possui igualmente um grupo fosfometil adicionado ao grupo amina da glicina, que confere as propriedades herbicidas. Já a glicina é um aminoácido não essencial que atua na síntese de proteínas e desempenha funções biológicas no corpo humano, como por exemplo, de neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, tanto por isso que ela é usada em processos industriais de produção de fármacos, alimentos e produtos químicos. Entretanto, a glicina em certa medida pode acarretar em ação neurotóxica, pois resulta na ativação de receptores glutamatérgicos (COSTA et al., 2003), estando associada ao desenvolvimento de doenças como Alzheimer, Parkinson, entre outras (KWIATKOWSKA et al., 2017). Diversos fatores demonstram que existe um importante papel da ativação excessiva dos receptores glutamatérgicos na indução de morte neuronal e neurodegeneração. Sabe-se também que a subclasse de receptores ionotrópicos para glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) é a subclasse mais seletiva e efetiva para mediar os danos neurodegenerativos.

A superativação destes receptores acarreta em aumento no influxo de Ca^{2+} e, níveis elevados anormais deste íon, são responsáveis pelo fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica, que leva ao estresse oxidativo, ao dano mitocondrial e consequente morte celular (FAN et al., 2007; WANG, et al., 2010). Além do impacto aos neurônios, estudos apontam que as células de suporte do sistema nervoso, as células da glia, também são sensíveis à exposição aos herbicidas à base de glifosato. Szepanowski et al. (2019) observaram aumento no processo inflamatório em culturas de células de Schwann expostas à formulação à base de glifosato, sugerindo uma associação com as neuropatias desmielinizantes. Importante destacar que a neurotoxicidade pode ser compreendida pela capacidade de uma substância em causar efeito lesivo ao sistema nervoso. Estudos vêm sugerindo que a exposição a agrotóxicos pode levar a inúmeras alterações bioquímicas que podem estar associadas à gênese de doenças neurodegenerativas (MEGGS, 2003).

O Sistema Nervoso Central (SNC) (Fig. 3) possui três áreas principais: cérebro, cerebelo e tronco cerebral, com diferentes células e funções importantes. As células da glia são as de suporte do cérebro, sendo que os gliomas são as células que desenvolveram tumores. No presente trabalho, optamos por linhagens de células de glioblastoma, provenientes de crescimento tumoral de células da glia chamadas de astrócitos, para avaliar a neurotoxicidade associada ao RT.

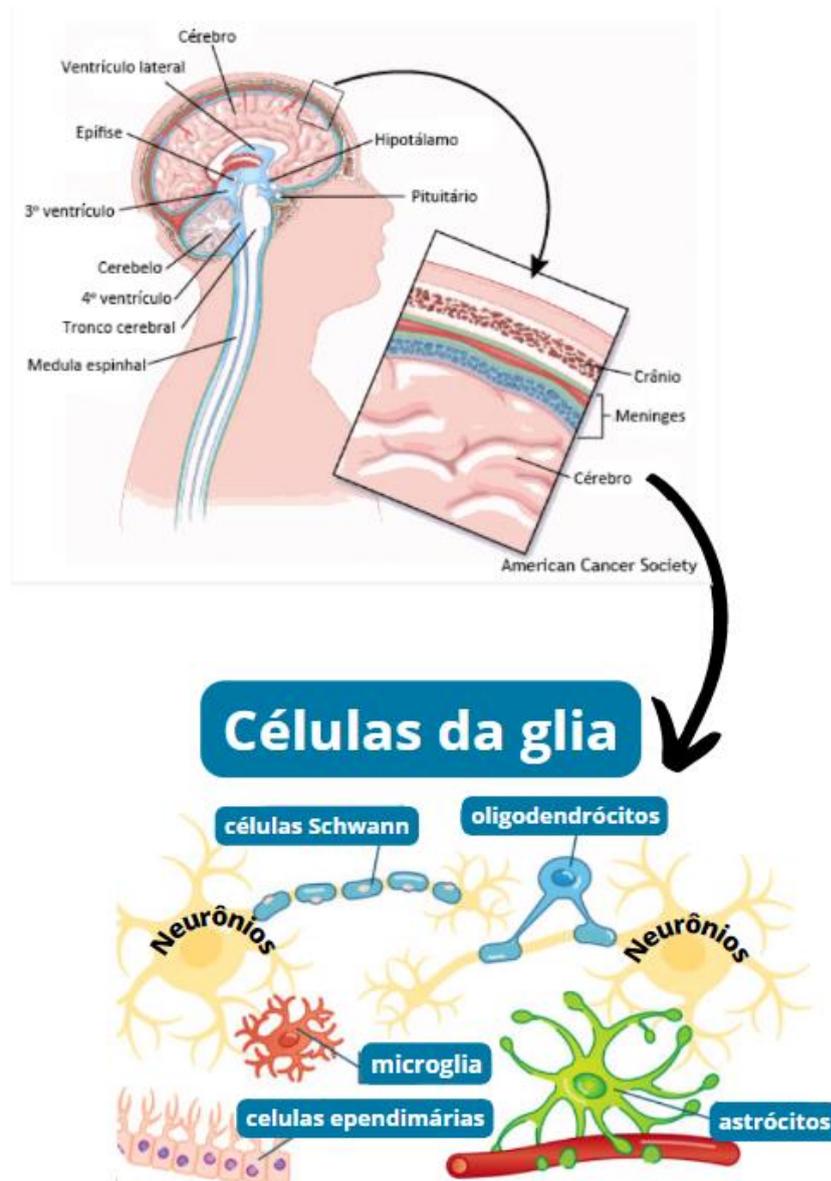


Figura 3 - Sistema nervoso central e as células da glia. Adaptado de: ONCOGUIA, 2015.

Importante mencionar que a presença de radicais livres acontece em condições fisiológicas normais do metabolismo celular aeróbio e durante a redução do oxigênio são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido, hidroxiperoxila e hidroxila. Algumas determinadas substâncias estimulam o aumento da produção dessas moléculas. Em função dos seus elétrons desemparelhados, os radicais livres podem oxidar compostos como proteínas, DNA e lipídios ao reduzir seus elétrons, podendo gerar mutações que desfavorecem a regulação do ciclo celular, ativando a apoptose (GOMES, 2007; TELESIL, 2008; DE OLIVEIRA et al., 2019; DAL BÓ et al., 2022).

1.3 A relação da proteína p53 com RT

Uma proteína que tem um papel importante no ciclo celular é a p53, que é codificada pelo gene *TP53*. Esse gene, conhecido como “guardião do genoma”, é de suma importância nos processos de carcinogênese, sendo que quando mutado, é o gene mais frequente em cânceres humanos (PIMENTA et al., 2013; SILVA et al., 2015). Por isso, a p53 é conhecida como supressora tumoral: uma vez codificada é capaz de induzir à parada do ciclo celular e à apoptose. Entretanto, herbicidas à base de glifosato são capazes de diminuir a expressão do gene *TP53*, alterando o padrão de metilação deste gene (WOZNIAK et al., 2020), promovendo a desregulação da expressão gênica, afetando a estabilidade do genoma e, ocasionando desregulação endócrina (BENACHOUR E SÉRALINI, 2009; DAL BÓ et al., 2022) entre outros.

Sabe-se que a função da p53 é estendida além do ciclo celular e da sinalização apoptótica, impactando diversos processos biológicos adicionais, incluindo senescência, manutenção do tamanho telomérico, reparo de DNA e metabolismo, controlando a integridade do genoma diante dos danos celulares. Além disso, o estresse e cofatores de transcrição podem influenciar a interação direta entre p53 e o reparo de DNA (PIMENTA et al., 2013). Inclusive estudos têm verificado que o dobramento incorreto da proteína p53 pode ocasionar tanto perda quanto ganho de funções (PETRONILHO et al., 2021), afetando o papel neuroprotetor, estando envolvida em doenças neurodegenerativas como Mal de

Parkinson, Alzheimer e esclerose amiotrófica (TAO et al., 2018; PETRONILHO et al., 2021). A desregulação da p53, portanto, é capaz de prejudicar o papel de regulação da apoptose em neurônios do sistema dopaminérgicos, por exemplo (TAO et al., 2018).

Existem alguns estudos que abordam a relação entre o RT e p53. Mesnage et al. (2013) mostrou que os adjuvantes etoxilados do Roundup (incluindo o RT) são tóxicos para as células humanas e podem induzir a morte celular. Os autores sugerem que o efeito tóxico pode estar relacionado à inibição da via do p53. Zhang et al. (2020) demonstrou que o RT pode induzir a morte celular em células endoteliais do cordão umbilical humano por meio de danos mitocondriais, estresse do retículo endoplasmático e inativação do gene *TP53*. Ainda outros autores, como Sheng et al. (2020) apresentam resultados relacionando o RT à morte celular em células de câncer de pulmão A549 por meio da ativação da via da proteína p53. Assim, diferentes estudos indicam que herbicidas à base de glifosato como a linha Roundup pode afetar a expressão do gene supressor tumoral p53 em diferentes linhagens celulares, sugerindo ainda que este pode induzir morte celular por meio da inibição da via mediada por p53 e induzir estresse oxidativo e inflamação nessas células (MESNAGE et al., 2017; ZHANG et al., 2019; RICHARD et al., 2020; GUEDES et al., 2021).

Por isso, neste estudo usamos linhagens celulares proficientes para p53, executando suas funções de maneira esperada, mas também optamos por usar células deficientes para p53, aquelas que podem ter suas funções apresentando falhas. Desta forma, a avaliação da instabilidade genética com linhagens deficientes em p53 propicia uma avaliação de alterações em vias metabólicas, podendo apresentar resultados diferenciados quanto aos mecanismos envolvidos na resposta celular à exposição ao glifosato comparado às linhagens proficientes em experimentos *in vitro*.

1.4 Glifosato e os estudos *in vitro*

Muitas classes de pesticidas, como os herbicidas à base de glifosato, têm potencial neurotóxico. Culturas de células derivadas de tecido do sistema nervoso

mostraram ser ferramentas importantes para elucidar os mecanismos celulares e moleculares do desenvolvimento e da função do sistema nervoso, e têm sido usadas para entender o mecanismo de ação de produtos químicos neurotóxicos (JANG et al., 2014). Estudos *in vitro*, usando linhagens de células tumorais, têm sido usadas e fornecem *insights* relevantes no entendimento da toxicidade de pesticidas (JIA & MISRA, 2007; MANÃS et al., 2009; RICH et al., 2012).

As propriedades genotóxicas com diferentes concentrações de herbicidas com glifosato foram investigadas em linhagens derivadas de células humanas, sendo que os estudos foram positivos para o Ensaio Cometa (WILLIAMS et al., 2000). Resultados positivos também foram observados em duas linhagens de células de mamíferos expostas ao glifosato durante 4 horas, em concentrações de 0,68 - 1,10 mg/mL (células GM38 - células humanas de fibroblasto normais) e 0,80 - 1,10 mg/mL (células HT1080 - células humanas de fibrossarcoma) (MONROY et al., 2005). Utilizando linfócitos humanos foram encontrados resultados positivos para o ensaio Cometa, em células expostas ao glifosato em concentrações de até 580 mg/mL durante 4 h (MLADINIC et al., 2009).

O glifosato foi testado adicionalmente em linhagens humanas, incluindo fibrossarcoma, células de hepatoma e queratinócitos, e em todos eles, os efeitos foram vistos apenas em doses mais elevadas (GEHIN et al., 2005; MONROY et al., 2005; RICHARD et al., 2005; GASNIER et al., 2009). Alguns resultados mostram que a formulação de RT é, em geral, mais citotóxica que o glifosato (BENACHOUR et al., 2007; BENACHOUR E SÉRALINI, 2009; GASNIER et al., 2009; KOLLER et al., 2012). Das diversas formulações de *Roundup*, o glifosato está presente, servindo de base e sendo adicionado surfactantes de polioxietileno amina (POEA) e outros em concentrações particulares (KOLLER et al., 2012).

Kier e Kirkland (2013) apresenta uma revisão sistemática das evidências de genotoxicidade do herbicida glifosato e de suas formulações comerciais à base de glifosato. Os autores analisaram 53 estudos publicados na literatura científica, que avaliaram o potencial genotóxico do glifosato em diversas linhagens celulares e em diferentes sistemas de teste *in vitro* e *in vivo*. Os autores concluem que, embora alguns estudos apontem para possíveis efeitos genotóxicos do glifosato, a maioria das evidências não sugere que o herbicida seja genotóxico ou mutagênico em

níveis relevantes para a saúde humana. Eles destacam, no entanto, que a genotoxicidade de formulações comerciais à base de glifosato pode ser diferente da do glifosato puro e que a avaliação da segurança dessas formulações deve levar em consideração suas impurezas e aditivos. Os autores enfatizam que a avaliação da genotoxicidade é apenas uma das etapas da avaliação toxicológica de um produto químico e que outras informações, como a toxicidade aguda e crônica, a carcinogenicidade, a neurotoxicidade e a ecotoxicidade, também devem ser consideradas na avaliação do risco à saúde humana e ao meio ambiente.

Wlisenburger (2021), em sua revisão sobre evidências de que o Roundup é uma causa de linfoma Não-Hodgkin, cita estudos em que indivíduos expostos a pesticidas à base de glifosato tiveram aumento do risco de 41% para o desenvolvimento deste tipo de linfoma. Uma revisão publicada no jornal *Carcinogenesis* em 2018 apresenta evidências científicas sobre o potencial risco de câncer associado ao uso de herbicidas à base de glifosato, particularmente após a decisão da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) em classificar o glifosato como "provavelmente carcinogênico para os seres humanos" em 2015.

O referido artigo examina as possíveis vias biológicas pelas quais o glifosato pode causar câncer, incluindo sua capacidade de danificar o DNA, perturbar as vias metabólicas e imunológicas, e aumentar a proliferação celular. Os autores também discutem as políticas públicas relacionadas ao uso de herbicidas à base de glifosato, incluindo a regulamentação e a rotulagem, e abordam as lacunas nas pesquisas sobre o tema. No geral, o artigo sugere que há evidências suficientes para justificar preocupações sobre o potencial risco de câncer associado ao uso de herbicidas à base de glifosato, e destaca a importância de abordar essas preocupações por meio de políticas públicas mais rigorosas e pesquisas adicionais (Davoren e Schiestl, 2018).

1.5 Biologia de Sistemas

Muitas pesquisas têm associado ferramentas distintas de investigação para compreender a complexidade da exposição ambiental/ocupacional. Alguns

modelos *in silico*, em especial a Biologia de Sistemas, têm contribuído no entendimento das vias moleculares importantes na resposta à exposição a agrotóxicos (DE OLIVEIRA et al. 2019, KAHL et al., 2016).

De Oliveira et al. (2019), utilizaram Biologia de Sistemas em seu estudo envolvendo a exposição a pesticidas. Foi verificado que em *Saccharomyces cerevisiae*, a proteína CDK1 ficou em evidência na rede, sendo que a mesma pode atuar na via de sinalização de recrutamento da telomerase, regulando o tempo de alongamento dos telômeros. A exposição crônica a produtos químicos cancerígenos tem sido associada a telômeros alongados, conferindo instabilidade genômica, podendo desencadear em processos inflamatórios e de morte celular (De OLIVEIRA et al., 2019). Interessantemente, Wozniak et al (2020) citam que formulações de Roundup, não glifosato isolado, pode alterar o ciclo celular de células embrionárias de ouriço-do-mar devido justamente à ativação retardada do complexo CDK1, agindo à jusante da proteína p53.

Também utilizando a Biologia de Sistemas, Kahl et al. (2016), avaliaram os bioprocessos oriundos da interação entre a exposição à mistura complexa de compostos químicos de pesticidas utilizados no cultivo do tabaco mais nicotina com as proteínas associadas à manutenção do tamanho telomérico em fulmicultores. A rede proteína-pesticida gerada demonstrou em uma subrede, por exemplo, que a AKT1 ficou evidenciada. A AKT1 participa da síntese proteica e apoptose, sendo que a desregulação desta proteína pode atuar degradando e reduzindo os níveis de p53. Esse processo poderia, então, influenciar a ubiquitinação das proteínas teloméricas, aumentando a modificação pós-traducional (KAHL et al., 2016).

Desta forma, a compreensão da Biologia de Sistemas é de suma relevância, sendo que ela está atrelada à linguagem chamada de Teoria dos Grafos, que oferece a possibilidade de abstrações matemáticas necessárias à descrição dos diferentes níveis de complexidade de um organismo. Ou seja, o grafo nada mais é do que um conjunto de nós e linhas que conectam os nós, compondo a base da Biologia de Sistemas que é uma rede de interações (BONATTO, 2014). A Quimio-biologia de Sistemas, um ramo da Biologia de Sistemas, associa compostos químicos (drogas, poluentes, entre outros) à rede de interação proteína-proteína. Ela, da mesma forma, utiliza o formato de interação dos nós e vértices, analisando

a interação entre os compostos químicos e as proteínas, na busca de identificar nesta interação os principais alvos proteicos expostos a apenas uma substância ou a misturas complexas.

Assim, devido à complexidade, os modelos computacionais ajudam a entender os mecanismos moleculares e a prever os impactos de perturbações, tais como exposição à xenobióticos, nos sistemas biológicos (FELTES, 2013). Neste caso, as redes de interação compostos químicos e proteínas envolvidas na resposta à exposição ao RT, poderão elucidar os possíveis caminhos moleculares relacionados ao comprometimento fisiológico dos organismos e auxiliar no entendimento dos processos biológicos envolvidos nas respostas obtidas a partir dos experimentos *in vitro*.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos mostram que a exposição a agrotóxicos pode levar a uma diversidade de alterações bioquímicas induzindo o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Contudo, os danos e efeitos causados pelo glifosato associados a outras formulações ainda não foram totalmente elucidados. O glifosato é o ingrediente ativo da categoria de herbicida mais utilizado no mundo e o alvo de muitas pesquisas, mesmo assim há divergências em relação à periculosidade de algumas formulações. Evidências têm sido apresentadas em relação ao seu potencial carcinogênico, mas agências consideram o glifosato pouco tóxico ou improvável de causar danos agudos em humanos, ou ainda concluem que não existem riscos ambientais ou ocupacionais. Portanto, o presente trabalho busca gerar conhecimento referente aos processos envolvidos na toxicidade celular e a interação das substâncias químicas do Roundup Transorb® - RT, com as linhagens celulares de glioblastoma, destacando o uso de linhagens proficientes e mutantes em *TP53* - um gene que codifica uma proteína central em várias vias moleculares, a p53, incluindo ciclo celular e respostas ao estresse celular.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as respostas celulares mediadas pela exposição ao glifosato formulação RT, em linhagens de glioblastoma, mutante e proficiente para p53. Propor, através da Biologia de Sistemas possíveis vias moleculares associadas a esta exposição, levando em consideração a presença/ausência da p53.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a viabilidade celular em culturas de células tumorais U251MG (mutante para p53) e U87MG (proficiente para p53) frente ao efeito do RT;
- Analisar as alterações morfológicas e indução de apoptose nas linhagens estudadas após a exposição do RT;
- Avaliar a presença de dano ao DNA de células tumorais após exposição ao RT;
- Buscar, por meio de ferramentas da Biologia de Sistemas, as interações físicas diretas ou indiretas existentes entre os compostos presentes na formulação do RT e as proteínas associadas, simulando a presença/deleção do gene *TP53*;
- Propor os prováveis mecanismos envolvidos na resposta a esta exposição em células deficientes e proficientes em p53;
- Elaborar um protocolo audiovisual para a realização do Ensaio Cometa *in vitro* (produto técnico).

4 METODOLOGIA

4.1 Herbicida à base de glifosato: Roundup Transorb

O herbicida à base de glifosato escolhido para o presente estudo foi o RT, conforme a formulação abaixo (Fig. 4).



Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 09306

COMPOSIÇÃO:

Sal de Potássio de N-(phosphonomethyl)glycine (GLIFOSATO).....**588 g/L (58,8 % m/v)**
Equivalente ácido de N-(phosphonomethyl)glycine (GLIFOSATO).....**480 g/L (48,0 % m/v)**
Outros ingredientes.....**739 g/L (73,9 % m/v)**

GRUPO	G	HERBICIDA
--------------	----------	------------------

Figura 4 - Composição do RT. Informações da bula do fabricante.

4.2 Linhagem celular e condições de cultura

Foram utilizadas duas linhagens celulares de glioblastomas U87MG e U251MG, sendo a primeira proficiente para p53 e a segunda, mutante para p53 – proteína relacionada com o desenvolvimento precoce de câncer cerebral. A linhagem celular escolhida trata-se de um tipo celular presente em astrocitomas, classificado como gliomas de grau IV.

As linhagens foram cedidas pelo Prof. Dr. Guido Lenz da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), adquiridas anteriormente da *American Type Culture Collection* (ATCC).

Para a realização do experimento, de acordo com o descrito por Masters & Stacey (2007) com pequenas modificações as células foram descongeladas e mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - Gibco), suplementadas com soro fetal bovino inativado a 10%, glutamina, penicilina 0,2

mg/mL, estreptomicina e preservadas em frascos de cultura de 25cm³ a 37° C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Para a colheita e estabelecimento da cultura, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,4 e incubadas com 0,15% de tripsina – 0,08% EDTA.

As células foram semeadas em meio completo e cultivadas entre 50 e 60% de confluência, dependendo da exposição, antes do tratamento com a substância teste. Todas as linhagens celulares foram testadas regularmente para verificar a contaminação por *Mycoplasma* utilizando o *Mycoplasma Detection Kit Myco Alert Antibodies* (Lonza). Para o experimento, o RT foi diluído em PBS e adicionado ao meio livre de FBS para atingir as diferentes concentrações projetadas: 10, 20, 30, 40 ou 50 ppm. Utilizou-se como concentrações iniciais 10 ppm em virtude do padrão considerado seguro de limite máximo de resíduos de glifosato em alimentos pela ANVISA e, de 20 ppm, conforme o estabelecido pela Codex Alimentarius.

4.3 Definição das concentrações do glifosato (*Roundup Transorb*®)

Com base nos dados da literatura (KOLLER et al., 2012; GRISOLIA et al., 2013; KIER & KIRKLANDI., 2013), teste de viabilidade celular e resultados de citotoxicidade obtidos a partir da técnica do MTT com o RT, foram selecionadas as dosagens para a realização do Ensaio Clonogênico e Ensaio Cometa. Os experimentos foram realizados com réplicas para cada concentração, mais os grupos controles.

4.4 Ensaios de Viabilidade Celular

4.4.1 Medida da atividade da desidrogenase mitocondrial (técnica MTT)

A técnica de MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) é um ensaio quantitativo para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazan, produto formado pela redução de tetrazólio MTT. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da enzima succinato-desidrogenase fornecendo então uma medida de função mitocondrial (Fig. 5).



Figura 5 - Exemplificação do passo-a-passo da técnica do MTT realizada em ambas linhagens celulares.

Seguindo o padrão internacional ISO/EN 10993-5 (2009) e Mosman (1983), com algumas adaptações, as células foram semeadas em placas de 24 poços com densidade de 1×10^4 células/mL e mantidas em incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas para adesão. Após esse período as células foram lavadas com PBS, antes de adicionar 0,5 mL de meio sem soro, contendo sal de tetrazólio MTT 1 mg/mL para cada amostra. Posteriormente à incubação por 3 horas, o sobrenadante foi removido e o produto obtido (formazan) foi dissolvido em 0,5 mL de DMSO, agitado por 10 minutos, para solubilizar os cristais de formazan.

A leitura da absorbância dos cristais de formazan, que é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, foi realizada usando um leitor de microplacas (Perkin Almer-Inspire®, EUA) em 570 nm. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata. A quantificação da atividade citotóxica foi feita através da comparação entre a absorbância dos poços contendo as células tratadas com as diferentes concentrações do RT, com a absorbância dos poços

com células expostas ao meio de cultura DMEM (controle). Os resultados foram expressos como a porcentagem média de absorção em células tratadas quando comparadas ao controle negativo, considerando 100% de viabilidade. A razão IC50 (concentração que inibe o crescimento celular em 50%) também foi calculada. Os critérios de citotoxicidade são avaliados seguindo os padrões da ISO/EN 10993-5 (Quadro 1).

Quadro 1. Determinação da citotoxicidade (ISO 10993-5) através da viabilidade celular

VIABILIDADE CELULAR			
>90%	80 a 89%	50 a 79%	<50%
NÃO CITOTÓXICO	LEVEMENTE CITOTÓXICO	MODERADAMENTE CITOTÓXICO	SEVERAMENTE CITOTÓXICO

4.4.1.1 Ensaio de formação de colônias (Ensaio Clonogênico)

O Ensaio Clonogênico é um teste *in vitro* de sobrevivência celular. Ele se baseia na capacidade de uma única célula de crescer e se tornar uma colônia, detectando assim morte celular reprodutiva, uma vez que ocorre a perda da capacidade de divisão celular. O teste foi realizado para verificar a quantidade de células funcionais nas diferentes condições experimentais.

Para o teste, utilizamos a Norma Internacional ISO/EM 10993-5 (2009) e Franken (2006) com algumas adaptações. Inicialmente, as células foram semeadas em placas de 6 poços a uma concentração de 200 células por poço. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM com PBS por 24 horas umidificada a 37°C, com 5% de CO₂. Posteriormente, foram expostas a diferentes concentrações dos extratos aquosos por 24 horas. Depois do tratamento, o meio de cultura contendo a substância teste foi removido, as células lavadas com PBS e incubadas novamente em meio livre de drogas a 37°C, com 5% de CO₂ por 7 dias. As colônias foram fixadas com etanol e coradas com violeta cristal 0,5%.

As colônias contendo mais de 50 células foram contadas com auxílio de microscópio óptico invertido. A sobrevivência foi calculada como percentual relativo

ao número de colônias do controle negativo, sendo considerado 100%. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

4.5 Ensaio Cometa

As linhagens de células foram subcultivadas e semeadas em placas de cultivo de 12 poços na densidade de 3×10^5 células/mL e incubadas por 24 horas, com diferentes concentrações de extrato de RT para 3 horas em meio livre de FBS. Posteriormente, as células foram lavadas com solução PBS, sendo adicionado o meio de cultura completo por 3 horas. O processamento das amostras foi realizado de acordo com protocolo seguido por Singh et al., (1988) com algumas modificações, seguindo as recomendações do *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (IWGT) e *Minimum Information for Reporting on the Comet Assay* (MIRCA).

A análise procedeu conforme descrito por Vasconcellos et al. (2010), com o material foi visto em microscópio óptico, em aumento de 40x, analisadas 100 células (50 células/lâmina).

O efeito genotóxico de RT nas linhagens celulares foi estimado pelo Índice de Dano (ID), conforme as respectivas classes, sendo observadas as células com contorno circular (núcleos sem danos ao DNA, classe 0) ou em forma de “cometa” (núcleos com dano no DNA, classes 1 a 4). De acordo com o tamanho da cauda, os valores obtidos são de 0 (completamente intacto: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4). O veículo foi usado como controle negativo e o tratamento com MMS a 4×10^{-5} mol/L por 3 horas foi usado como controle positivo. Foi considerado o dano classe 4 como morte celular. O Ensaio Cometa foi detalhado no protocolo audiovisual, o produto técnico desta pesquisa.

4.6 Análise estatística

Os experimentos foram repetidos independentemente em triplicata para cada teste três vezes. Os resultados foram expostos como \pm e desvio padrão (DP), além da análise de variância ANOVA de uma via, seguida por múltiplos de Dunnett (valores de $p < 0,05$ sendo considerados significativos).

4.7 Biologia de Sistemas

4.7.1 Construção da rede de interações

Para a construção da rede os compostos químicos do RT foram prospectados na ferramenta denominada STITCH 5.0, o qual realizou a busca de interações do tipo químico-proteínas para *Homo sapiens*. Já a ferramenta STRING 11.0 foi utilizada para buscar as interações proteína-proteína, utilizando o organismo modelo *Homo sapiens*. Para fins de unir as sub-redes geradas, foi utilizada a ferramenta *Advanced Merge Network* do programa Cytoscape. Uma rede foi unida com a presença da proteína p53 e outra rede foi construída sem a proteína p53.

4.7.2 Análise da modularidade

Nas redes geradas, foi feita uma busca de *clusters* (regiões com alto enriquecimento) a partir do aplicativo *Molecular Complex Detection* (MCODE) no programa Cytoscape 3.9.1. Os *clusters* são complexos proteicos que atuam em um determinado caminho bioquímico ou reação e, por isso, são de extrema relevância no desenvolvimento de um modelo molecular, são regiões fortemente conectadas. Os parâmetros utilizados foram: *loops included*, *degree cutoff 2*, exclusão de nós com apenas uma conexão (opção *haircut* ativada), expansão do *cluster* por uma concha vizinha permitido (opção *fluff* ativada), densidade do nó *cutoff 0.1*, *score* do nó *cutoff 0.2*, *score 2*, profundidade máxima da rede 100. Um *score* do MCODE foi calculado para cada proteína-composto presente nas redes.

4.7.3 Análise da Ontologia Gênica

Para realizar a análise da Ontologia gênica foi utilizado o aplicativo *Biological Network Gene Ontology* (BiNGO), onde é possível analisar as funções de um determinado gene para todos os agrupamentos significativos que foram identificados na análise da modularidade.

4.7.4 Análise de Centralidade

Para analisar a centralidade das redes foi utilizado o aplicativo Centiscape 2.2 no Cytoscape 3.9.1 para que fosse identificado os nós (proteína-composto) que

possuem posições centrais, haja vista o nosso interesse em localizar os elementos mais importantes na topologia geral da rede. As centralidades analisadas foram o grau do nó (*node degree*), que se refere à quantificação de nós adjacentes diretamente conectados a outro nó, além dos intermeabilidade (*betwenness*), os quais se refere ao número de caminhos mais “curtos” que passam por um único nó, possibilitando estimar a relação entre eles (FELTES et al., 2013). Os *hubs* são as proteínas e/ou compostos (nós) com valor elevado de grau de nó ou, melhor dizendo, com uma grande quantia de conexões a outros nós ou *hubs* com menos conexões, já os nós com valor de *betwenness* relativamente altos são os denominados “gargalos” (*bottleneck – hub-gargalo: HG*), devido a sua alta capacidade de interação com outras proteínas ou bioprocessos (FELTES et al., 2013). Assim, os *hubs* são nós fortemente conectados, já os gargalos são nós com maior chance de ligar diferentes *clusters*. Por isso, os hubs-gargalos são tão essenciais na rede e, uma vez perturbados ou removidos, podem desencadear falhas dentro da mesma.

4.7.5 Diagrama de Venn

Para analisar a diferença entre as redes, com e sem p53, em relação à ausência/presença de outras proteínas, conectadas à p53, foi utilizado o aplicativo Diagrama de Venn no Cytoscape 3.9.1.

4.7.6 Análise da função dos *hubs*-gargalos e a relação com neurotoxicidade e instabilidade genética

Para analisar os *hubs*-gargalos foram realizadas pesquisas ao banco de informações do *Human Gene database*, o GeneCards (<http://www.genecards.org>), o qual contém referências sobre os genes humanos e suas respectivas funções, bem como disfunções envolvidas. Também foi utilizado o *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) para avaliar a expressão das proteínas *hub*-gargalo no tecido nervoso.

4.8 Produto Técnico

Todas as etapas do Ensaio Cometa foram gravadas no Laboratório de Biomedicina Translacional do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) em parceria com a professora Dra. Vanessa Moraes de Andrade e a Mutagen-Brasil (<https://www.youtube.com/channel/UCyOLLkKP0-FXumZx3qcqfIQ>).

Posteriormente, o vídeo foi editado com legendas, áudio e figuras para que sirva como material técnico educativo a fim de padronizar e seguir o protocolo. O produto irá contribuir de forma significativa para o desenvolvimento de outras pesquisas, fornecendo, de forma inovadora, a metodologia clara e de fácil acesso. Tal material se justifica principalmente pelo fato de que muitos estudantes tanto de graduação quanto de pós-graduação dos cursos das ciências da saúde não presenciaram ou praticaram testes de bancada, como o Ensaio Cometa. Estudantes estes que se deparam com a necessidade de aplicação do ensaio no momento de realização de algum trabalho de pesquisa por meio de protocolos complexos pouco didáticos presentes em literatura. Diante desta prática complexa, pretende-se maximizar o processo de ensino e aprendizagem em um material pedagógico padronizado e aplicável para a correta execução.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados testes *in vitro*

Para avaliar as propriedades citotóxicas do RT, duas diferentes abordagens foram usadas. As células de glioblastoma U87MG e U251MG cultivadas foram incubadas com várias concentrações de composto por 24 h. A análise do ensaio MTT na Fig. 5 mostrou que o RT diminuiu significativamente a viabilidade celular quando analisado em concentração ≥ 10 ppm de maneira dose-dependente ($p < 0,01$) para ambas as linhagens. Além disso, as células de glioblastoma U251MG foram $\sim 3,7$ vezes mais resistentes do que U87MG para RT considerando os valores de IC50: U251MG (IC50 = 27,2 ppm) > U87MG (IC50 = 7,4 ppm) (Fig. 6).

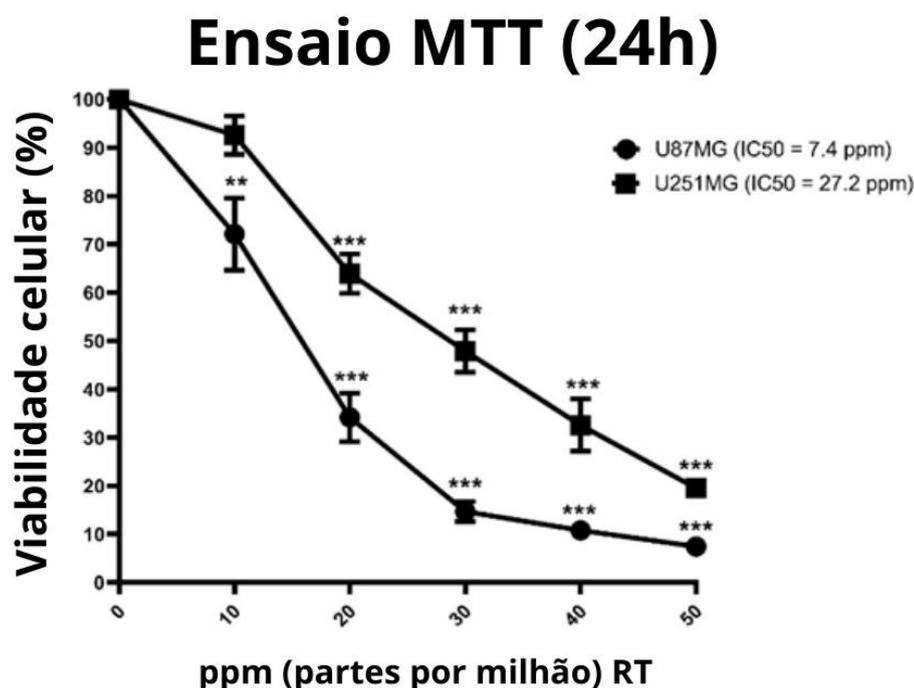


Figura 6 - Citotoxicidade dose-dependente (% de controle negativo) em U87MG e células U251MG conforme determinado pelo ensaio MTT. As células foram tratadas com 0 (controle), 10, 20, 30, 40 ou 50 ppm RT por 24 h. PBS foi usado como controle negativo. Os dados são expressos como média \pm DP, n= 3. Valores significativamente diferente em relação ao controle negativo em ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ /One-way ANOVA Dunnett's - Teste de Comparação Múltipla.

Já na segunda abordagem, os efeitos no crescimento celular foram avaliados pela capacidade de formação de colônias, que diminuíram significativamente na faixa de concentração de 20-50 ppm RT em células de glioblastoma expostas por 24h ($p < 0,01$), quando em comparação com o controle negativo (Fig. 6). Neste ensaio, o U251MG ($IC_{50} = 39,4$ ppm) células de glioblastoma foram ~2,7 vezes mais resistentes que U87MG ($IC_{50} = 14,8$ ppm) para RT (Fig. 7)

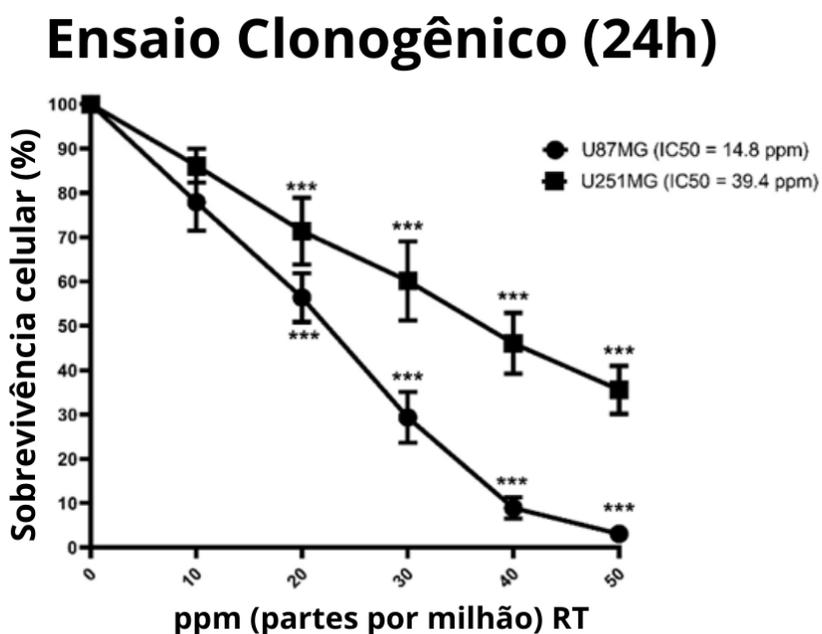


Figura 7 - Citotoxicidade dependente da dose (%) de controle negativo em U87MG e U251MG células conforme determinado pela sobrevivência clonal. As células foram tratadas com 0 (controle), 10, 20, 30, 40 ou 50 ppm Roundup Transorb - RT por 24 hs. O PBS foi usado como controle negativo. Dados são expressos como média \pm DP, $n = 3$. Valores significativamente diferentes em relação ao negativo controle negativo *** $p < 0,001$ /Teste de Comparação Múltipla ANOVA Dunnett de um fator.

Considerando os efeitos citotóxicos do RT observados em células de glioblastoma, foi investigado a capacidade do composto em induzir danos ao DNA. Para este propósito, foi aplicado o Ensaio Cometa. Como mostrado na Fig. 8, RT induziu a um aumento significativo nas quebras da fita de DNA na faixa de concentração de 10-50 ppm para células U251MG ($p < 0,001$) e 30 – 50 ppm para células U87MG ($p < 0,01$). Interessantemente, após exposição ao RT, as células U251MG mostraram um ID maior do que as células U87MG comparadas aos

resultados obtidos com o controle.

Ensaio Cometa

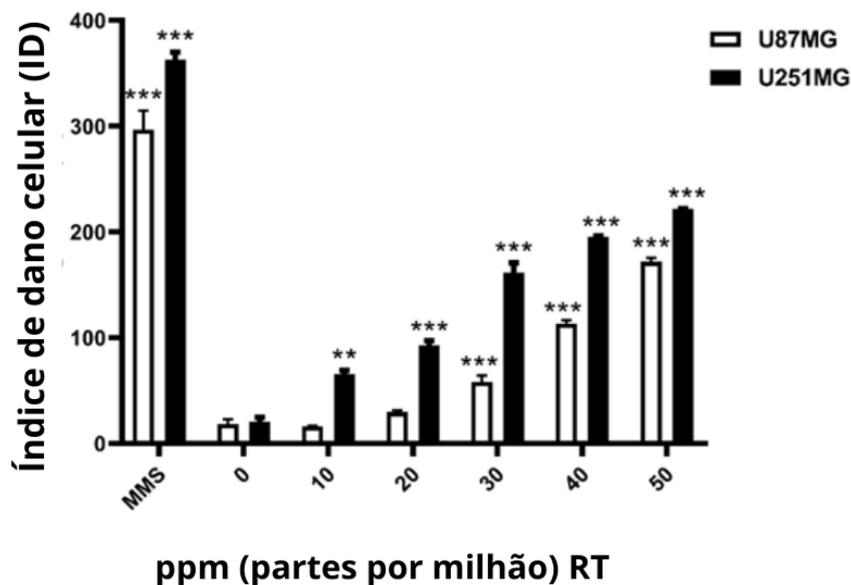


Figura 8 - Danos no DNA induzidos por RT em células U87MG e U251MG conforme avaliado pelo Ensaio Cometa alcalino. As células foram tratadas com 0 (controle), 10, 20, 30, 40 ou 50 ppm RT por 3 hs. O PBS foi usado como controle negativo. Dados são expressos como médias \pm DP, $n = 3$. Valores significativamente diferentes em relação aos não tratados controle ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$ por ANOVA unidirecional com múltiplos de Dunnett - Teste de comparação.

Além disso, para confirmar se a indução de morte celular por RT pode estar relacionada com a indução de apoptose, analisamos a frequência de apoptose pelo ensaio Cometa (Fig. 9). Para isso, foi considerado como apoptose os danos de classe 4. Esta análise mostrou um aumento de células apoptóticas a partir de 30 ppm para U87MG e a 50 ppm para U251MG ($p < 0,05$). Portanto, U87MG mostrou maior frequência de apoptose do que U251MG em relação ao controle.

Apoptose induzida - Ensaio Cometa

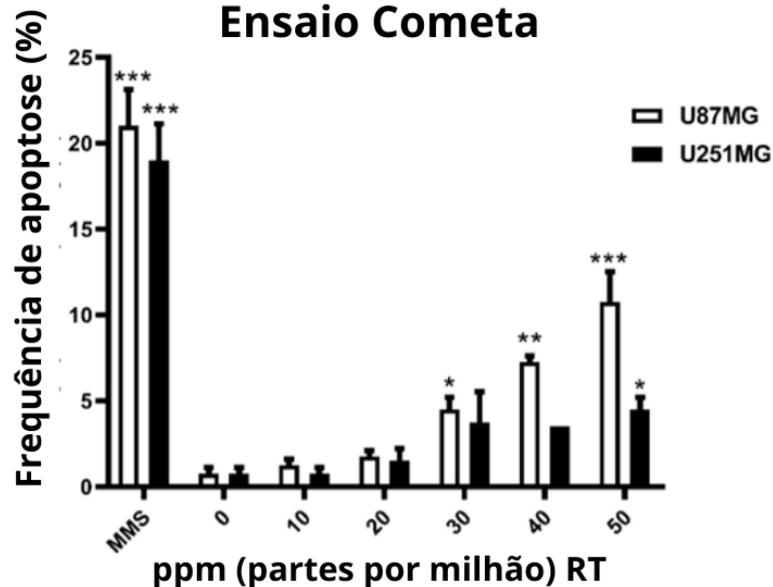


Figura 9 - Apoptose induzida por Roundup transorb - RT em células U87MG e U251MG avaliada pelo Ensaio Cometa alcalino. As células foram tratadas com 0 (controle), 10, 20, 30, 40 ou 50 ppm RT por 3 hs. PBS foi usado como controle negativo. Os dados são expressos como média \pm DP, $n = 3$. Valores significativamente diferente em relação aos não tratados controle, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e *** $p < 0,001$ por ANOVA unidirecional com Dunnett's - Teste de Comparação Múltipla.

5.2 Resultados da teste *in silico*

Foram prospectadas duas redes, uma rede contendo a p53 e outra sem a p53. A rede com p53 gerou 1409 nós e 33764 conectores, o resultado obtido da análise de modularidade foi de 14 *cluster* com *score* > que 10, enquanto que a rede sem p53 gerou 1438 nós e 35096 conectores, a análise de modularidade indicou 13 *clusters*, também com *score* > que 10, e foi analisado a ontologia gênica de cada agrupamento (Tabela 1).

Vale ressaltar que, foram selecionados os 5 *clusters* com maior significância para a rede, sendo excluído o *cluster* 3 de ambas as redes por não apresentar nenhuma função ligada à instabilidade genética ou à neurotoxicidade. Também foi adicionado o *cluster* 9 e 12 por apresentarem dois bioprocessos que não foram encontrados em outro *cluster*, sendo eles: o processo metabólico do xenobiótico e a resposta celular ao estímulo xenobiótico.

Tabela 1 - Bioprocessos provenientes da análise de ontologia gênica de *clusters* da rede com p53 e sem p53 de acordo com os agrupamentos mais relevantes para o trabalho.

CLUSTER	REDE COM TP53	REDE SEM TP53
C1	<ul style="list-style-type: none"> - Reparo de DNA - Respostas a Dano de DNA, transdução de sinal - Pontos de verificação de danos de DNA - Resposta celular ao estresse - Morte celular programada - Regulação da morte celular 	<ul style="list-style-type: none"> - Não apresentou nenhuma função ligada à instabilidade genética ou à neurotoxicidade.
C2	<ul style="list-style-type: none"> - Neurogênese - Resposta ao estresse - Desenvolvimento do sistema nervoso - Regulação da apoptose neural - Diferenciação de neurônios - Morte celular programada - Regulação da morte celular 	<ul style="list-style-type: none"> - Neurogênese - Axonogênese - Resposta ao estresse - Desenvolvimento do sistema nervoso - Diferenciação de neurônios - Morte celular programada - Regulação da morte celular
C4	<ul style="list-style-type: none"> - Resposta ao estresse - Resposta ao dano de DNA, transdução de sinal - Reparo de DNA - Reparo por excisão de nucleotídeos - Ponto de verificação de danos e de integridade do DNA - Morte celular programada - Regulação da morte celular 	<ul style="list-style-type: none"> - Não apresentou nenhuma função ligada à instabilidade genética ou à neurotoxicidade.

C5	<ul style="list-style-type: none"> - Neurogênese - Axonogênese - Resposta ao estímulo de dano ao DNA - Resposta ao estresse - Desenvolvimento do sistema nervoso - Reparo de DNA - Resposta ao dano de DNA, transdução de sinal - Regulação da apoptose neuronal - Diferenciação de neurônios - Morfogênese celular envolvida na diferenciação neuronal - Morte celular programada - Regulação da morte celular 	<ul style="list-style-type: none"> - Neurogênese - Axonogênese - Resposta ao estresse - Desenvolvimento do prosencéfalo - Desenvolvimento do sistema nervoso - Diferenciação de neurônios - Morte celular programada - Regulação da morte celular
C6	<ul style="list-style-type: none"> - Neurogênese - Resposta ao estresse - Resposta ao estímulo de dano ao DNA - Reparo de DNA - Ponto de verificação de danos ao DNA - Ponto de verificação de integridade do DNA - Regulação da apoptose neuronal - Morte celular programada - Regulação da morte celular 	<ul style="list-style-type: none"> - Resposta ao estresse - Transmissão sináptica - Transmissão do impulso nervoso - Morte celular programada - Regulação da morte celular programada
C9	<ul style="list-style-type: none"> - Neurogênese - Axonogênese - Morfogênese celular envolvida na diferenciação neuronal - Diferenciação de neurônios - Resposta celular ao estresse - Resposta ao estímulo de dano ao DNA - Desenvolvimento do sistema nervoso - Reparo de DNA - Regulação da apoptose neuronal - Resposta a danos no DNA. - Morte celular programada - Regulação da morte celular programada 	<ul style="list-style-type: none"> - Processo metabólico xenobiótico - Resposta celular ao estímulo xenobiótico
C12	<ul style="list-style-type: none"> - Processo metabólico xenobiótico - Resposta celular ao estímulo xenobiótico 	<ul style="list-style-type: none"> - Neurogênese - Desenvolvimento do sistema nervoso - Morte celular programada - Regulação da morte celular programada - Resposta ao estresse

A análise da ontologia gênica, observada na tabela 1, indica os principais bioprocessos associados aos *clusters* da rede com e sem p53, salientando os processos ligados à instabilidade genética e a neurotoxicidade. A partir da análise das ontologias gênicas geradas pelas redes é possível observar que somente na rede com p53 foram encontrados bioprocessos ligados ao reparo de DNA, reparo por excisão de nucleotídeos, resposta ao dano e pontos de verificação de integridade do DNA. Também foi a única rede que apresentou regulação da

apoptose neural.

Na rede sem a p53 foram encontrados bioprocessos que não foram encontrados na rede com a p53, sendo eles: desenvolvimento do prosencéfalo, transmissão sináptica e transmissão do impulso nervoso.

Os processos biológicos em comum em ambas as redes são: neurogênese, axonogênese, resposta ao estresse, desenvolvimento do sistema nervoso, diferenciação de neurônios, morte celular programada, regulação da morte celular, processo metabólico de xenobiótico e resposta celular ao estímulo de xenobióticos.

A Fig. 10 mostra o resultado da análise de centralidade da rede com p53, onde o eixo vertical mostra os valores de grau do nó e o eixo horizontal mostra os valores de betweenness (impermeabilidade). As linhas pontilhadas em vermelho representam os valores médios de ambas as centralidades. Os nós acima da média são os *hubs-gargalos*, que são nós que possuem grande importância para a integridade da informação dentro da rede. A análise da centralidade indicou os seguintes hub-gargalos: Potássio, RPS27A, UBB, UBC, UBA52, SRC, *TP53*, RHOA, HSP90AA1, PRKACA e CREBBP.

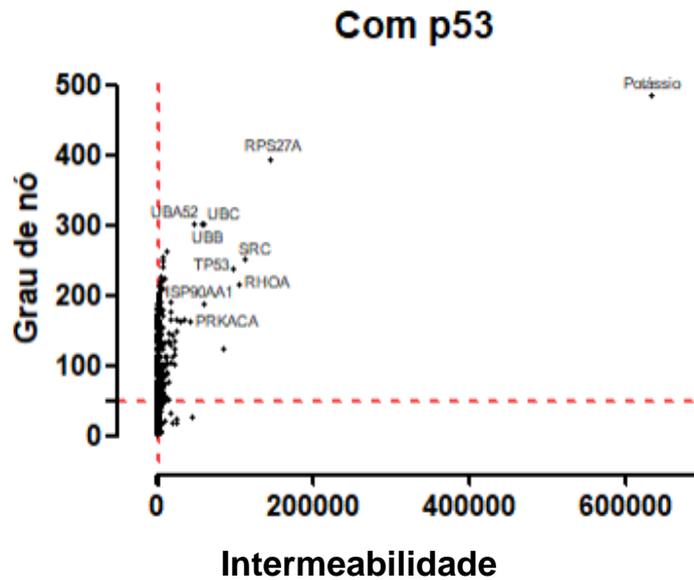


Figura 10 - Resultado da análise do grau de nó e *betwenness* (intermeabilidade) da rede com TP53, mostrando os nós mais importantes da rede a partir de um gráfico de hub-gargalo.

A análise da centralidade indicou os seguintes *hub-gargalos* (Fig. 11): Potássio, RPS27A, SRC, UBA52, RHOA, UBB, UBC, HSP90AA1, EGFR e NEDD8, conforme mostrado abaixo.

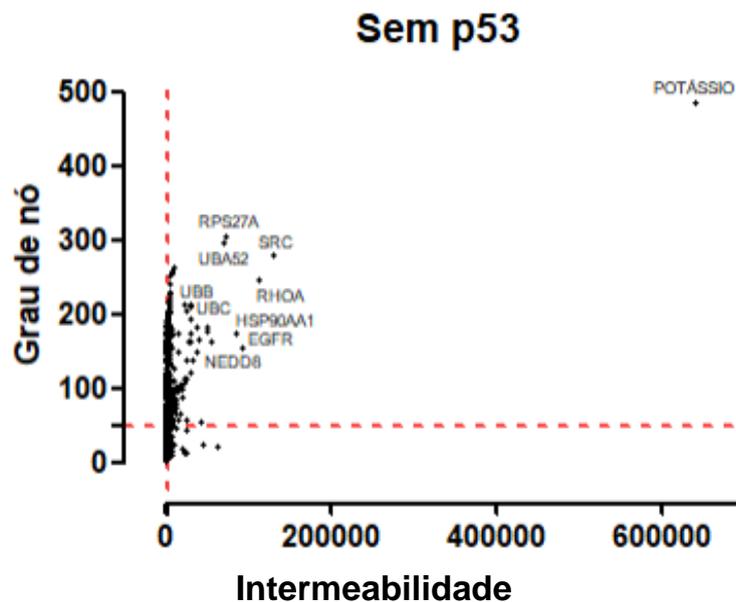


Figura 11 - Resultado da análise do grau de nó e *betwenness* (intermeabilidade) da rede sem p53, mostrando os nós mais importantes da rede a partir de um gráfico de *hub-gargalo*.

Quando comparado a rede com p53 com a rede sem p53, é possível observar que foram encontrados em ambas as redes, os seguintes *hub*-gargalos: Potássio, RPS27A, SRC, RHOA, UBB, UBC, UBA e HSP90AA1. E os *hub*-gargalos que diferiram foram: p53, PRKACA, CREBBP, EGFR e NEDD8.

No resultado do diagrama de Venn, é possível observar que as redes compartilham 1299 em comum, enquanto que a rede com p53 possui 110 proteínas que não são encontradas na rede sem p53 e a rede sem p53 possui 139 proteínas que não são encontradas na rede com p53, como é possível observar na Fig. 12 abaixo.

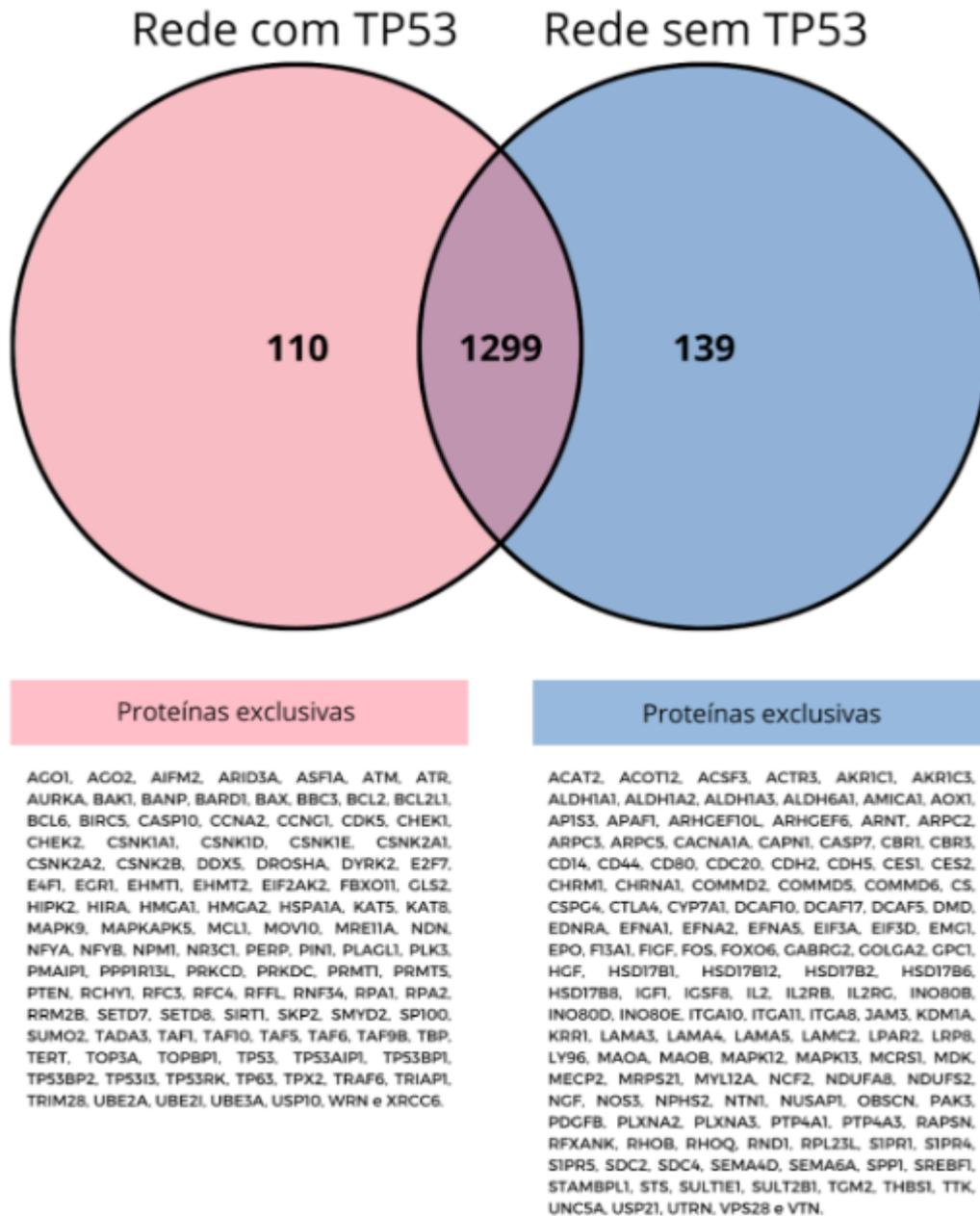


Figura 12 – Resultado do Diagrama de Venn: observação das proteínas exclusivas de cada rede bem como o número de proteínas que são encontradas em ambas redes.

5.3 Resultado do Produto Técnico: Protocolo audiovisual de Ensaio Cometa *in vitro*

Clicando aqui [Protocolo audiovisual](#) você poderá obter acesso ao vídeo, que tem duração de 11 minutos, produzido com o protocolo audiovisual para a replicação do Ensaio Cometa. (<https://drive.google.com/file/d/120p9-l3lmQZnHrWE7zxSn58iTew9q8KO/view?usp=sharing>) (Figuras 13 e 14).



Figura 13 – Bastidores da gravação do Protocolo audiovisual.



Figura 14 – Detalhes da gravação: pipetando amostra de sangue para vídeo.

6 DISCUSSÃO

Os efeitos da exposição humana aos agroquímicos dependem de diferentes mecanismos de ação e de complexas vias de respostas do organismo humano. A dosagem, o tempo e o tipo de exposição ao RT influenciam seus efeitos sobre a saúde de diversos organismos não-alvo, apesar de ter sido desenvolvido para atingir o metabolismo de plantas consideradas daninhas ao cultivo de monoculturas. Desta forma, o uso de herbicidas constitui um problema de saúde pública que gera conflitos socioambientais ao passo em que a demanda produtiva exige o controle na produção, armazenamento e comercialização, mas tem se mostrado tóxico para o ser humano e para o ambiente (DE OLIVEIRA et al., 2019).

Neste estudo, optamos pelo uso de duas linhagens celulares distintas, além de mutantes e proficientes para p53, devido às diferentes capacidades de reparo após a exposição aos danos no DNA. Enquanto as mutantes são instáveis e mais suscetíveis à proliferação excessiva, inclusive para a formação tumoral, as proficientes são capazes de corrigir danos como os decorrentes da exposição a agentes mutagênicos, como agrotóxicos.

Com RT verificamos a diminuição da viabilidade celular nas doses a partir de 10 ppm, tanto nas células U87MG quanto nas U251MG. Importante mencionar que a ANVISA considera seguro o limite máximo de 10 mg/kg, o equivalente a 10 ppm, de resíduos de glifosato em alimentos. Ou seja, a população está exposta à contaminação alimentar dos resíduos deste agroquímico que apresentou citotoxicidade.

Também verificou-se que RT foi severamente tóxico nas dosagens de 30, 40 e 50 ppm, demonstrando citotoxicidade em 24h. Ou seja, demonstrou-se que essas células não conseguiram manter sua integridade diante da capacidade deste herbicida em causar dano ou morte celular. Quanto à capacidade de formação de colônias, observou-se que a atividade foi reduzida de maneira dose-dependente em ambas as linhagens. O ensaio clonogênico é útil para mensurar a capacidade das células de sobreviverem, proliferarem e formarem colônia visível em meio de cultura. Outros estudos também observaram citotoxicidade e redução da viabilidade celular em células expostas à herbicida à base de glifosato (FILHO et al., 2013;

DAL BÓ et al., 2022).

Entretanto, as células mutantes para p53 parecem ser mais resistentes à citotoxicidade, a exemplo da U251MG, linhagem que apresentou um comportamento mais resistente frente à exposição ao RT. Tal resultado pode estar relacionado com o fato de que células mutantes para p53 podem ser menos sensíveis ao estresse celular, contribuindo para a resistência à citotoxicidade. Dal Bó et al. (2022), em seu estudo, também verificaram resultados semelhantes, embora tenham testado a formulação Roundup Original. Eles verificaram que células de carcinoma papilífero da tireoide humana apresentaram uma maior resistência à apoptose.

Anteriormente, Benachour e Seralini (2009) já haviam testado formulações de à base de glifosato em células placentárias, verificando que o glifosato aliado à ação de adjuvantes, mudam a permeabilidade celular humana, amplificando a toxicidade por meio de apoptose e necrose. Os autores também citam que células derivadas de carcinoma podem apresentar membranas mais resistentes, tendo em vista que adquiriram a capacidade de excretar xenobióticos. Nossos resultados, aliados aos referidos estudos, parecem indicar que RT pode desempenhar um papel no aumento da incidência de nódulos e cânceres à medida em que a exposição pode ocasionar falhas no sistema de reparo celular, modulando a progressão do ciclo celular.

A exposição a pesticidas e fertilizantes tende a induzir ao processo de morte celular de modo a eliminar as células danificadas, mas um desequilíbrio neste mecanismo pode aumentar o risco de desenvolvimento de tumores (FILHO et al., 2017). Inclusive, trabalhos têm mostrado que linhagens mutantes para a TP53, como no caso da U251MG, a proliferação celular tende a ser induzida pela exposição ao glifosato e a herbicidas à base de glifosato, já que as células tumorais são instáveis e altamente proliferativas (revisado em Dal Bó et al., 2022).

Por outro lado, a viabilidade celular pode apresentar apoptose com resposta não-monotônica, com efeitos realmente significativos nas primeiras 24 horas, mas que se estabilizam em 48 horas (DAL BÓ et al., 2022), podendo sugerir que vias complexas ativem mecanismos de sobrevivência ou porque as células apoptóticas

já foram eliminadas, deixando apenas as resistentes à apoptose.

No presente estudo, verificamos que na dose de 30 ppm de RT nas células U87MG ocorreu maior frequência de apoptose. Nesta linhagem celular, as células eram proficientes para p53, podendo, esta proteína, atuar no sistema de reparo induzindo a apoptose ou interrompendo a divisão celular diante de um estresse como a exposição ao agroquímico RT. Estudos prévios mostram que o herbicida à base de glifosato induz apoptose como forma de reparar o dano celular, entretanto, dependendo da dose, herbicidas à base de glifosato podem agir silenciando *TP53*, ocasionando a perda da função supressora tumoral (WOZNIAK et al., 2020).

Já com as células U251MG, mutantes para p53, o aumento de apoptóticas se deu com a dose de 50 ppm de RT. Nesta linhagem, somente na maior concentração houve indução da apoptose. A deleção do gene *TP53* pode estar tornando-as mais resistentes, pois a p53, sua proteína codificada, possui um papel no metabolismo celular, incluindo o próprio ciclo celular. Wozniak et al. (2020) observaram alteração no perfil de metilação em todas as concentrações testadas com glifosato em sangue periférico, aumentando as ilhas de CpG do promotor do gene *TP53*, o que significa dizer que houve o silenciamento da transcrição do gene em resposta à hipermetilação do DNA.

Kwiatkowska et al. (2017) avaliando os efeitos de glifosato quanto aos danos ao DNA pelo Ensaio Cometa em linfócitos humanos de sangue periférico, também já haviam verificado aumento da metilação do promotor de *TP53*, em resposta à exposição ao glifosato, sendo que a hipermetilação é um padrão genético frequentemente observado em cânceres humanos. Contudo, a Nota Técnica 12 de 2020 da ANVISA não considera esse estudo como evidência de mutagenicidade para justificar a classificação do agroquímico como cancerígeno humano. Primeiramente, porque o estudo foi realizado com poucos voluntários e com faixa etária muito ampla: idades entre 18 e 55 anos, sendo que a Diretriz OECD 487 considera válidos estudos com jovens de até 35 anos. Esse estudo também foi questionado pelo fato de realizar o Ensaio Cometa, que apesar de evidenciar efeito genotóxico, pode ser considerado como transitório tendo em vista a possibilidade de poder ser corrigido e, talvez, não causar mutagenicidade.

Importante mencionar que da mesma forma, outros sistemas de proteção do organismo humano também podem ser acometidos. A proteína p53 está diretamente ligada às respostas frente ao estresse celular decorrente da exposição química, influenciando nos mecanismos de resposta como a indução à apoptose, modulação da progressão do ciclo celular, tolerância ao dano e indução de reparo ao DNA (PIMENTA et al., 2013; SILVA et al., 2015). Considerando essa função neuroprotetora, diversos estudos citam alterações na p53 associadas a danos neuronais e a perda do papel de prevenção do câncer (PIMENTA et al., 2013; TAO et al., 2017; PETRONILHO et al., 2021).

Pelo Ensaio Cometa foi observado a indução de dano ao DNA nas linhagens de glioblastoma, sendo a linhagem U251MG mais suscetível ao dano causado pela exposição ao RT. Sabe-se que os danos visualizados no Ensaio Cometa, são aqueles que ainda podem ser corrigidos após a lesão, definindo o composto como citotóxico ou genotóxico. Considerando que o sistema de correção falhe, é possível que haja a indução à apoptose como forma de limpeza celular ou à necrose, um processo inflamatório, que pode levar a um processo patológico como o desenvolvimento de câncer. Se em células U87MG, linhagem proficiente para p53, verificou-se que o sistema de reparo conseguiu ser mais efetivo induzindo células com dano à apoptose, nas células U251MG, a suscetibilidade ao dano não pôde ser corrigida, levando à proliferação celular aumentada. Contudo, para provar a mutagenicidade de RT se faz necessário realizar teste de micronúcleos.

As análises, *in silico*, das redes de interação de proteínas com os compostos do RT também mostraram diferença entre a rede proficiente e deficiente em p53. O uso da bioinformática permite compreender as funções biológicas por meio de ferramentas da biologia de sistemas, sendo considerada um instrumento adicional e relevante para os profissionais da área da saúde (ARAÚJO, 2014), sendo possível várias inferências com base científica.

De forma geral, a interação com o glifosato potássico ficou associado com mecanismos importantes ligados à instabilidade genética e a neurotoxicidade, contudo a rede com a p53 agrupou diferentes proteínas e mais processos biológicos ligados à instabilidade genética foram encontrados. Sabe-se que durante a divisão celular, a p53 faz uma conferência procurando por eventuais mutações

na sequência do código genético. Encontrando erro, a p53 dá início a uma cascata de reações visando impedir que a célula entre em mitose e complete a divisão celular. Para tentar corrigir a mutação, proteínas de reparo são ativadas ou há a indução da morte celular (WEISENBURGER, 2021). Curiosamente, na análise *in vitro*, as células proficientes para p53 (linhagem U87MG) responderam a exposição ao RT com uma maior frequência de células apoptóticas e menor frequência de dano ao DNA, ao mesmo tempo em que a análise *in silico* apresentou bioprocessos associados à regulação da apoptose e reparo de DNA na rede contendo p53.

Com isso, a rede com p53 apresentou importantes bioprocessos como: reparo de DNA, reparo por excisão de nucleotídeos, resposta ao dano e pontos de verificação de integridade do DNA. Também foi a única rede que apresentou regulação da apoptose neural. Os *clusters* mais significativos da rede apresentavam processos biológicos ligados à instabilidade genética e a neurotoxicidade, diferentemente da rede sem p53 que não apresenta processos biológicos relacionado ao reparo de DNA e quando comparado com a outra rede, a qual possui dois *clusters* que não apresentou nenhuma função ligada à instabilidade genética ou à neurotoxicidade. Além disso, é possível notar que há maiores processos biológicos nos *clusters* da rede com p53 quando comparado com a rede sem p53, o que denota a importância da proteína para evitar processos patológicos ligados a doenças neuronais.

Outrossim, estudos mostram que o glifosato bem como herbicidas à base de glifosato afetam a metilação nas regiões promotoras, diminuindo a expressão do gene *TP53* (WOZNIAK et al., 2020), que está ligado à regulação do ciclo celular e à apoptose, conforme mencionado anteriormente. A diminuição de genes supressores de tumor, pode favorecer o desenvolvimento e a progressão do câncer (PIMENTA et al., 2013; WOZNIAK et al., 2020). Mostrando que pessoas com a exclusão, silenciamento ou mutação do gene *TP53* podem estar mais suscetíveis ao glifosato e conseqüentemente no processo de tumorigênese. A exemplo do resultado do Ensaio Cometa, o qual demonstrou maior índice de dano em células da linhagem U251MG, mutantes para p53.

Weisenburger (2021) também cita estudos em que os autores encontraram danos ao DNA, metilação do promotor de *TP53* em células sanguíneas, além de

efeitos epigenéticos em doses baixas (0,5µM) de glifosato com hipermetilação do gene *TP53*. Ou seja, ao silenciar um gene que realiza o controle de apoptose e divisão celular, como o *TP53*, oncogenes podem ser ativados, podendo induzir ao desenvolvimento de cânceres. O mesmo autor realizou uma revisão bibliográfica citando a relação entre a exposição a glifosato e agroquímicos à base do mesmo com o desenvolvimento de linfoma de não-Hodgkin, um tipo de câncer de sangue com origem no sistema linfático. Em seus achados, concluiu que vários estudos epidemiológicos fornecem uma ampla evidência para associar a exposição aguda e crônica a um risco aumentado para linfoma de não-Hodgkin, inclusive cita pesquisas em que verificaram danos genotóxicos aos leucócitos e linfócitos do sangue em indivíduos expostos no ambiente pulverizado com agrotóxicos à base de glifosato. A exposição a produtos químicos é considerada um fator de risco para esse tipo de câncer, sendo que as células de defesa tipo B, T ou natural Killers são as afetadas.

Na análise de centralidade de ambas as redes, RHOA e SRC apareceram como *hub*-gargalos. No entanto, quando observado o resultado a partir do Diagrama de Venn, verifica-se que na rede sem p53 há a presença de diferentes proteínas da família RHO. Vale ressaltar que a p53 impede a ativação de RhoA (XIA & LAND, 2007; BARATIUS, 2020). Sendo assim, a deleção do gene *TP53* pode estar ligado ao recrutamento de outras proteínas da família RHO na rede sem p53 em resposta à exposição ao RT.

A família de proteínas homólogas Ras (Rho) é um membro da superfamília Ras de pequenas proteínas GTPases. As GTPases são proteínas monoméricas e funcionam como interruptores moleculares que ligam ou desligam as vias de transdução de sinal em resposta a estímulos químicos ou mecânicos (Heasman & Ridley, 2005). Os componentes desta família estão relacionados ao controle de inúmeros bioprocessos como, por exemplo, remodelamento do citoesqueleto, migração, adesão, endocitose, progressão do ciclo celular e oncogênese. As RhoA também estão relacionados a vários aspectos do desenvolvimento neuronal e ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e tumores humanos (ORGAZ et al., 2014).

Por isso, as atividades do *TP53* estão intimamente associadas com a ativação de RhoA, podendo regular negativamente a expressão RhoA (BARATIUS, 2020). Quando há a perda de função da p53 e o RasV12 está ativado, há a motilidade celular, característica associada à progressão do câncer para malignidade. A p53 impede a ativação de RhoA e, portanto, a indução da motilidade celular por RasV12 (XIA & LAND, 2007). Observando os genes exclusivos da rede sem TP53, pode-se constatar uma maior agregação de proteínas da família Rho, quando comparado com os genes da rede com *TP53*.

Na análise de centralidade da rede com p53, o gene *TP53* apareceu como *hub-gargalo*, reiterando a importância deste nó para comunicação e estabilidade da rede. Sendo que esse gene é o de maior importância nos processos de carcinogênese e é ativado em respostas a sinais de dano celular, sendo codificador de uma proteína supressora de tumor, que quando codificada, é capaz de induzir a parada do ciclo celular e apoptose. De todo o genoma humano, *TP53* é o gene mutado com maior frequência em cânceres e também por essa razão utilizamos as linhagens celulares com e sem mutação, visando o comparativo.

Por tudo isso, desenvolvemos o modelo molecular abaixo (Fig. 15) de modo a elucidar as vias envolvidas como resposta ao estresse causado pela exposição química de células de glioblastoma frente à fórmula RT.

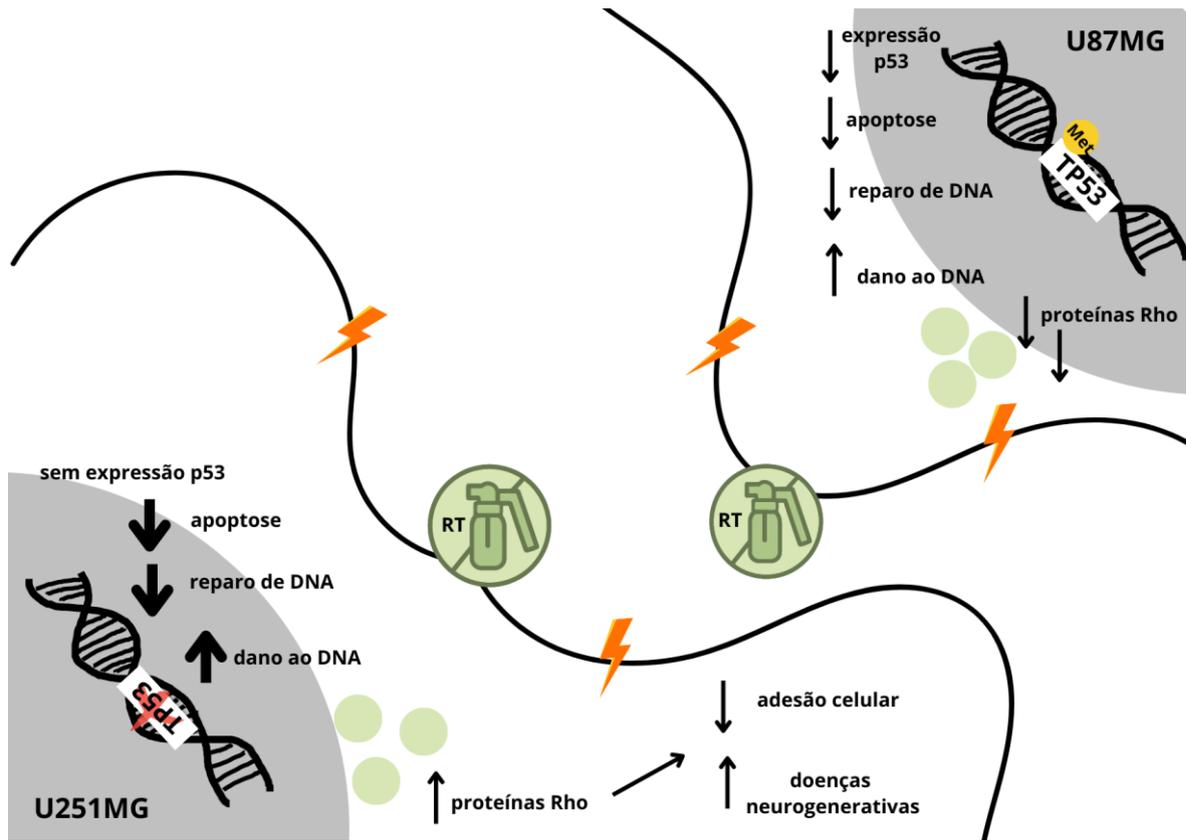


Figura 15 - Modelo molecular, baseada da Biologia de Sistemas, da resposta celular de linhagens proficientes e mutantes para p53 expostas a RT. Acima: As células U87MG, proficientes para p53, sofrem metilação no gene pela exposição à RT e diminui sua expressão. Com a expressão de *TP53* diminuída, mecanismos de apoptose e de reparo serão menos eficientes e como consequência dano ao DNA será observado. Já nas células sem *TP53*, a deleção do gene prejudicará ainda mais o mecanismo de apoptose e o reparo ao DNA e o dano de DNA será mais intenso. Ainda, sem p53 outras proteínas serão recrutadas, como as proteínas da família Rho, que causa alteração na motilidade da célula e a torna mais suscetível a doenças neurodegenerativas.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho verificaram que a formulação à base de glifosato RT é citotóxica. Em doses a partir de 10 ppm, para ambas linhagens celulares, o teste de MTT demonstrou citotoxicidade dependente de dose. Considerando a citotoxicidade encontrada, verificamos que o composto é capaz de induzir danos ao DNA por meio do Ensaio Cometa alcalino. Com esse teste, ficou evidente o dano em doses a partir de 10 ppm para a linhagem U251MG e a partir de 30 ppm para a linhagem U87MG. Também verificou-se com o Ensaio Cometa que a morte celular em resposta à exposição ao RT está relacionada com a apoptose, apresentando frequência de células apoptóticas em doses a partir de 30 ppm para U87MG e a partir de 50 ppm para U251MG, comprovando a citotoxicidade.

Com relação à Biologia de Sistemas, a interação entre glifosato potássico ficou associada com mecanismos importantes ligados à instabilidade genética e à neurotoxicidade. Verificamos proteínas como p53, RhoA, UBB, UBC, UBA, entre outras. A rede gerada com a presença de p53 apresentou bioprocessos relacionados ao reparo de DNA, resposta ao dano e pontos de verificação de integridade do DNA. Além disso, somente nesta rede, mostrou-se a presença de regulação da apoptose neural. Enquanto isso, a rede sem p53 não apresentou processos biológicos associados ao reparo de DNA, inclusive com clusters que sequer apresentaram funções relacionadas à instabilidade genética ou à neurotoxicidade.

Por tudo isso, esse trabalho confirmou a importância da integridade do gene *TP53* para proteção ao organismo de pessoas expostas a RT. Esse gene, assim como outros supressores de tumor, é importante nos processos de carcinogênese, sendo ativado em resposta a sinais de dano celular. Sem eles, a indução da parada do ciclo celular e apoptose fica prejudicada, podendo causar instabilidade genômica e proliferação celular, processos associados à tumorigênese.

Mais estudos são necessários para avaliar a dose-dependente aliado ao fator tempo de exposição superior a 24 horas bem como seus possíveis efeitos

de bioacumulação no organismo humano. Adicionalmente, é interessante testar a formulação RT e comparar com o uso apenas dos surfactantes. Além disso, o teste de micronúcleos poderá verificar a possível mutagenicidade da formulação.

Por fim, o produto técnico desenvolvido será um serviço didático e gratuito disponível na internet ao alcance de estudantes e profissionais que queiram desenvolver o Ensaio Cometa. Novos produtos como este, incluindo outros testes, são importantes visando aliar a pesquisa técnica com tecnologia.

8 REFERÊNCIAS

- ANVISA, Nota Técnica 12/2020, Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5344168/Nota+T%C3%A9cnica+Final+-+Reavalia%C3%A7%C3%A3o+do+Glifosato.pdf/9f513821-c4e5-4be3-a538-ef1947034272>.
- ANVISA, ANVISA reavalia glifosato e descarta risco de câncer pelo consumo de alimentos, 2022. Nota técnica 12/2020/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5344168/Nota+T%C3%A9cnica+Final+-+Reavalia%C3%A7%C3%A3o+do+Glifosato.pdf/9f513821-c4e5-4be3-a538-ef1947034272>.
- ARAÚJO G.L.D., CAMPOS M.A.A., VALENTE M.A.S., SILVA S.C.T., FRANCA F.D., CHAVES M.M., TAGLIATI C.A. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. *Braz. J. Pharm. Sci*, 50:55–62, 2014.
- BADER, G.D.; HOGUE, C.W. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *Bioinformatics*, v. 4, p. 2, 2009.
- BARATIUS, N. P53 in RhoA regulation. *Revista Wiley*. v. 77, n. 5-6, p. 197-201, 2020. DOI: 10.1002/cm.21604
- BENACHOUR, N.; SERALINI, G. E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical Research Toxicology*. v. 22. n. 1. p. 97-105. 2009.
- BENACHOUR, N.; SIPAHUTAR, H.; MOSLEMI, S.; GASNIER, C.; TRAVERT, C.; SERALINI, G. E. Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 53. n. 1. p. 126-33. 2007.
- BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCWAAB, S.Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.K.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; MARQUEZ, M.; HARTMANN, A. p.o.t.F.I.W.o.G.T. In Vivo Comet Assay Workgroup, Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutat Res*, 627 (2007) 31-35.
- BONATTO, D. *Biologia de Sistêmica*. Porto Alegre, Brasil, p. 1-30, 2014.
- DAVOREN, M.J.; SCHIESTL, R.H. Glyphosate-based herbicides and cancer risk: a post-IARC decision review of potential mechanisms, policy and avenues of research. *Carcinogenesis*, Volume 39, Issue 10, October 2018, Pages 1207–1215, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy105>.
- COSTA, M.; GONÇALVES, L.; BARBOSA, E. Alterações de neuroimagem no parkinsonismo: estudo de cinco casos. *Arquivos de Neuro-Pesquiatria*. v. 61. n. 2B, 2003.
- CETESB, 2022. Ficha de informação toxicológica. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2022/02/Glifosato.pdf>
- DAL BÓ, I.F.; TEIXEIRA, E.S.; RABI, L.T.; PERES, K.C.; NASCIMENTO, M.; CHIAMOLERA, M.I.; MÁXIMO, V.; BUFALO, N.E.; WARD, L.S. Alternation between toxic and proliferative effects of Roundup on human thyroid cells at different concentrations. *Frontiers in Endocrinology* 13:904437

- DAS P.P., SHAIK A.P., JAMIL K. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: *in-vitro* studies on human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol. Ind. Health*, 23:449–458, 2007.
- DE OLIVEIRA, A.; et al. Investigation of pesticide exposure by genotoxicological, biochemical, genetic polymorphic and *in silico* analysis. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY*, v. 179, p. 135-142, 2019.
- DECKER, N. Avaliação das propriedades citotóxicas e mutagênicas do herbicida Roundup Transorb® *in vitro*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde. Universidade Luterana do Brasil. Canoas, Rio Grande do Sul, 2015.
- DENG, W.; HAO, Q.; VADGAMA, J.; WU, Y. Wild-Type TP53 Predicts Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. *J Cancer Sci Clin Ther*. 2021 Mar 18; 5(1): 134–153.
- DUARTE, L.E.; DELGADO, F.; LEO, N.C.D.; BERTONE, L., ALVAREZ, M.F.; MONTICO, S.; OLIVA, A. Mortalidad por cáncer, arsénico y nitratos en aguas de consumo y superficies sembradas en Argetina. *Rev. Panam Publica*. 2022; 46 e 129. Spanish. Published online 2022 aug 30.
- FAN, M.M.; RAYMOND, L.A. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Progress Neurobiology*. v. 81. p. 272-93, 2007.
- FELTES, B.C. Estudo da atuação de substâncias de abuso durante o desenvolvimento embrionário por meio da química-biologia de sistemas. 2013.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. v. 2. n. 5. p. 1084-1104. 2007.
- FILHO, J.S.; SOUSA, C.N.; SILVA, C.C.; MORAIS, S.M.T.; GRISOLA, C.K. Mutagenicity and Genotoxicity in Gill Erythrocyte Cells of *Poecilia reticulata* Exposed to a Glyphosate Formulation. Springer Science Business, Nova York, 2013.
- FRANKEN N.A.; RODERMOND H.M.; STAP J; HAVEMAN J.; VAN BREE C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature Protocols*. v. 1. n. 5. p. 2315-19. 2006.
- GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M.C.;SERALINI, G.E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*. v. 262. n. 2. p. 184-91. 2009.
- GEHIN, A.; GUILLAUME, Y.C.; MILLET, J.; GUYON, C.; NICOD, L. Vitamins C and E reverse effect of herbicide-induced toxicity on human epidermal cells HaCaT: a biochemometric approach. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 288. n. 2. p. 219-26. 2005.
- GUEDES, CL.; STACHURSKI, F.; DE SOUZA, CM.; DA SILVA, EF., GUEDES, TA.; CÔRREA, RX.; TORRES, IL.; DA SILVA, J. Glyphosate-based herbicide induces oxidative stress, inflammation and p53 gene deregulation in HepG2 cells. *Chemosphere*. 2021 Mar;263(Pt 1):127923. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127923. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32957273.
- GOMES, F.S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. *Revista de Nutrição*. Campinas. v. 20. n. 5. p. 537-48, 2007.
- GRISOLIA, C.K.; SOUZA, F.J.; SOUSA, C.C.; DA SILVA, C.C.; DE SABÓIA, S.M. Mutagenicity and genotoxicity in gill erythrocyte cells of *Poecilia reticulata* exposed to a glyphosate formulation. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. v. 91. n. 5. p. 583-87. 2013.

- HAYDEN, K.M.; NORTON, M.C.; DARCEY, D.; OSTBYE, T.; ZANDI, P.P.; BREITNER, J. C.; WELSH-BOHMER, K.A. Cache County Study Investigators. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. *Neurology*. v. 74. p. 1524-30. 2010.
- HANSON, B. Glyphosate formulations - what's the diff (and what's a salt)? Published on: December 20. Disponível em: <https://ucanr.edu/blogs/UCDWeedScience/index.cfm>
- HEASMAN, S.J. RIDLEY, A.J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 690-701. outubro de 2008. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(9):690-701. DOI:10.1038/nrm2476
- IARC, 2017. Some organophosphate insecticides and herbicides. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans.
- ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Terceira edição. 2009.
- JAMIL K., SHAIK A.P., MAHBOOB M., KRISHNA D. Effect of organophosphorus and organochlorine pesticides (monochrotophos, chlorpyrifos, dimethoate, and endosulfan) on human lymphocytes *in-vitro*. *Drug Chem. Toxicol*, 27:133–144, 2004.
- JANG, Y., KIM, J.E., JEONG, S.H., & CHO, M.H. Towards strategic approaches in alternative tests for pesticide safety. *Toxicological research*, 30(3), 159-168, 2014.
- JIA, Z.; MISRA, H.P. Exposure to mixtures of endosulfan and zineb induces apoptotic and necrotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells, *in vitro*. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, v. 27, n. 5, p. 434-446, 2007.
- KAHL, V. F. S. ; da Silva, Juliana ; SILVA, F.R. Influence of exposure to pesticides on telomere length in tobacco farmers: A biology system approach. *MUTATION RESEARCH-FUNDAMENTAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF MUTAGENESIS*, v. 791-792, p. 19-26, 2016.
- KIER, L.D.; KIRKLAND, D.J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. *Critical Reviews in Toxicology*. v. 43. n. 4. p. 283-315. 2013.
- KOLLER, V.J.; FURHACKER, M.; NERSESYAN, A.; MISIK, M.; EISENBAUER, M.; KNASMULLER, S. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Archives of Toxicology*. v. 86. n. 5. p. 805-1, 2012.
- KWIATKOWSKA, M.; RESZKA, E.; WOZNIAK, K.; JABIONSKA, E.; MICHALOWICZ, J. UKOWSKA, B. DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cell (in vitro study). *Food and Chemical Toxicology* 105 (2017) 93-98.
- LUACES, J.P.; ROSSI, L.F.; CHIRINO, M.G.; BROWNE, M.; MERANI, M.S.; Genotoxic effects of Roundup Full II® on lymphocytes of *Chaetophractus villosus* (Xenarthra, Mammalia): In vitro studies. *PLoS ONE* 12(8): e0182911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182911>. Publicado: 17 de agosto de 2017.
- MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, v. 21, p. 3448-3449, 2005.

- MASTERS, J.R.; STACEY, G.N. Changing medium and passaging cell lines, *Nat Protoc*, 2 (2007) 2276-2284. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.319>
- MAÑAS, F.; PERALTA, L.; RAVIOLO, J.; OVANDO, H. G.; WEYERS A.; UGNIA, L.; CID, M.G. Genotoxicity of Glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 28. n. 1. p. 37–41, 2009.
- MEGGS, W.J. Permanent paralysis at sites of dermal exposure to chlorpyrifos. *Journal of toxicology. Clinical toxicology*. v. 41. n. 6. p. 883-86, 2003.
- MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SERALINI, GE. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*. 2013; 313(2-3):122-8.
- MESNAGE R., DEFARGE N., SPIROUX V.J., SÉRALINI G.E. Potential toxic effects of glyphosate an its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem Toxicol*, 84:133-153, 2015.
- MESNAGE, R.; ANTONIOU, MN. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. *Environ Health*. 2017 Nov 28;16(1):97. doi: 10.1186/s12940-017-0306-1. PMID: 29183471
- MONROY, C.M.; CORTES, A.C.; SICARD, D.M.; RESTREPO, H.G. Cytotoxicity and genotoxicity of human cells exposed in vitro to glyphosate. *Biomedica*. v. 25. p. 335-45. 2005.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods*, 65 (1983) 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- ONCOGUIA, 2015. Disponível em: [http://www.oncoguia.org.br/conteudo/o-sistema-nervoso-central/881/176/#:~:text=O%20sistema%20nervoso%20central%20\(SNC,de%200a%C3%A7%C3%B5es%20e%20respostas%20adequadas](http://www.oncoguia.org.br/conteudo/o-sistema-nervoso-central/881/176/#:~:text=O%20sistema%20nervoso%20central%20(SNC,de%200a%C3%A7%C3%B5es%20e%20respostas%20adequadas).
- ORGAZ, J.L.; HERRAIZ, C.; SANZ-MORENO, V. Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases*. 2014;5:e29019.
- PENG, J.; PENG, L.; STEVENSON, F.F.; DOCTROWS, S.; ANDERSEN, J.K. Iron and Paraquat synergistic environmental risk factors in sporadic Parkinson's disease accelerate age-related neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience*. v. 27. n. 26. p. 6914-22, 2007.
- PETRONILHO, E.C.; PEDROTE, M.M. et al. Phase separation of p53 precedes aggregation and is affect by oncogenic mutation and ligands. *Chem. Sci.*, 2021, 12, 7334–7349
- PIMENTA, Vanessa de Sousa Cruz et al. Papel da proteína p53 na proliferação neoplásica. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 2013 1992
- PINTO, B.G et al. Occupational exposure to pesticides: Genetic danger to farmworkers and manufacturing workers—A meta-analytical review. *Science of the Total Environment*, p. 141382, 2020.
- POLONI, J.F, et al. *Biologia de Sistemas*. In: VERLI, Hugo. *Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular*. Porto Alegre, Brasil: Sbbq, Cap. 6. p. 1-282, 2014.
- POSAR, A.; VISCONTI, P. Austim in 2016: the need for answers. *Jornal de Pediatria (Rio J)*. 2017; 93(2): 111-119.

- REUTERS. Roundup: Cancer Cause or Crucial For Food Production? The HuffingtonPost. Disponível em: http://www.huffingtonpost.com/2011/04/11/round-up-cancer-cause_n_847423.html.
- RICHARD, S. et al. Glyphosate-based herbicides and cancer risk: a post-IARC decision review of potential mechanisms, policy and avenues of research. *Carcinogenesis*. 2020 Apr 1;41(4):441-455. doi: 10.1093/carcin/bgaa012. PMID: 32170928.
- RICH, J.D.; GABRIEL, S.M.; SCHULTZ-NORTON, J.R. *In vitro* effects of herbicides and insecticides on human breast cells. *International Scholarly Research Notices*, v. 2012, 2012.
- SANCHEZ, J.A.A.; JUNIOR, A.S.V.; CORCINI, C.D.; PRIMEL, E.G.; KLEIN, D.; MARTINS, C.M.G. Efeitos comparativos de herbicidas à base de glifosato sobre parâmetros oxidativos e qualidade espermática no peixe estuarino *Jenysia multidentata*. Programa de pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS, 2015.
- SHENG, Y.; XU, Y.; XU, Y. et al. DNA damage response is involved in Roundup-induced apoptosis through p53 expression in A549 lung cancer cells. *Chem Biol Interact*. 2020; 315:108886.
- SCARDONI, G.; PETTERLINI, M.; LAUDANNA, C. Analyzing biological network parameters with CentiScaPe. *Bioinformatics*, v. 25(21), p. 2857-2859, 2009.
- SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175 (1988) 184-191.
- SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N.S.; WANG, J.T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, v. 13, p. 2498-2504, 2003.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 175: 184 – 91, 1988.
- SZEPANOWSKI, F.; KLEINSCHNITZ, C.; STETTNER, M. Glyphosate-based herbicide: a risk factor for demyelinating conditions of the peripheral nervous system?. *Neural regeneration research*, v. 14, n. 12, p. 2079, 2019.
- SZKLARCZYK, D et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, v. 47, n. D1, p. D607-D613, 2019.
- SZKLARCZYK, D et al. STITCH 5: augmenting protein–chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic acids research*, v. 44, n. D1, p. D380-D384, 2016.
- TAO, L.; KIM, P.P.; GREIG, N.H.; LUO, Y. Dopaminergic neuron-specific deletion of p53 gene attenuates methamphetamine neurotoxicity. *Neurotox Res*. 2017 aug; 32(2): 2018-230.
- TELESIL, M.; MACHADO, F.A. A influência do exercício físico e dos sistemas antioxidantes na formação de radicais livres no organismo humano. *Revista de Saúde e Biologia. Campo Mourão*. v. 3. n. 1. p. 40-49. 2008.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, H.; KOBAYASHI, Y.; MIYAMAE, E.; ROJAS, J.C.; RYU, Y.F.; SASAKI, Single cell

- gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ Mol Mutagen*, 35 (2000) 206-221.
- TRAVLOS, I.; CHEIMONA, N.; BILIALIS, D. Glyphosate efficacy of different salt formulation and adjuvant additives on various weeds. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 105, July 2017, pages 93-98.
- ÜNDEĞER Ü., BAÇARAN N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes *in vitro*: induction of DNA damage. *Arch. Toxicol.* 79:169–176, 2005.
- USEPA, U.S.E.P.A, 2020. Glyphosate Interim Registration Review Decision Case Number 0178 January 2020.
- VASCONCELLOS, M.C.; MOURA, D.J; ROSA, R.M.; MACHADO, M.S.; GUECHEVA, T.N.; VILELA, I.; IMMICH, B.F.; MONTENEGRO, R.C.; FONSECA, A.M.; LEMOS, T.L.; MORAES, M.E.; SAFFI, J.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; HENRIQUES, J.A. Evaluation of the cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1,4 o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L, *Arch Toxicol*, 84 (2010) 799-810.
- WANG, X.; MICHAELIS, E.K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*. v. 2. n. 12, 2010.
- WANG, X.F.; LI, S.; CHOU, A.P.; BRONSTEIN, J.M. Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. v. 23. n. 1. p.198-205, 2006.
- WEISENBURGER, D.D. A review and update with perspective of evidence that the herbicide glyphosate (Roundup) is a cause of non-hodgkin lymphoma. *Clin Lymphoma myeloma leuk.* 2021 sep; 21(9): 621-630.
- 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 Pharmacology*. v. 31. n. 2. p. 117-65, 2000.
- WOZNIAK, E.; RESZKA, E.; JABLONSKA, E.; BALCERCZYK, M.; BUKOWSKA. 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*, vol. 63, March 2020, 104736.
- Xia, M., & Land, H. (2007). Tumor suppressor p53 restricts Ras stimulation of RhoA and cancer cell motility. *Nature structural & molecular biology*, 14(3), 215-223.
- ZHANG, J.; YIN, Y.; ZHANG, Y., DENG, Y.; JI, J. Glyphosate induces cell death through inhibition of p53-mediated pathway in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019 Sep;71:103212. doi: 10.1016/j.etap.2019.103212. Epub 2019 Jun 26. PMID: 31295627.
- ZHANG, J.; LI, L.; TANG, S., et al. Glyphosate induces apoptosis and autophagy in human umbilical vein endothelial cells through mitochondrial damage, endoplasmic reticulum stress, and p53 activation. *Environ Pollut.* 2020; 267:115478.