



## SERÁ O ROUNDUP PREJUDICIAL À TIREOIDE?

**Palavras-Chave:** Tireoide, Glifosato, Desregulador endócrino, citotoxicidade.

**Autores/as:**

Juliana Gabrielle dos Santos da Silva; UNICAMP

Izabela Fernanda Dal' Bó Cruz; UNICAMP

Prof./<sup>a</sup> Dr./<sup>a</sup> Laura Sterian Ward (orientadora); UNICAMP

---

### INTRODUÇÃO:

A tireoide é uma glândula localizada na porção ventral do pescoço, abaixo da cartilagem tireóidea. É responsável pela produção de T3 (tri-iodotironina), T4 (tetra-iodotironina) e calcitonina. Dentre as possíveis disfunções que podem ocorrer na glândula, tem-se o câncer de tireoide, o qual é o mais comum na área da cabeça e pescoço e estima-se que seja o 5º tumor mais frequente entre as mulheres. As causas exatas que levam a este tipo de câncer ainda são desconhecidas. Entretanto, sabe-se que existem fatores de risco que aumentam a propensão para este tipo de câncer, como produtos químicos que podem atuar como desreguladores endócrinos, ou seja, são capazes de gerar alterações no sistema endócrino como o câncer de tireoide.

O herbicida glifosato é um exemplo de desregulador endócrino. O químico é utilizado como substância ativa de diversos herbicidas e representa aproximadamente 76% do total de herbicidas utilizados no país. Estudos sugeriram níveis elevados de TSH, T3 e T4, bem como aumento significativo de hipotireoidismo quando há exposição a essa substância.

### METODOLOGIA:

A linhagem tireoidiana TPC-1 (proveniente de carcinoma papilífero) e Nthy-ori 3-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*), 1% de Penicilina-Streptamicina e 250mg/ml de fungizone. Foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). As células foram expostas ao composto glifosato (*Roundup Original DI®*) (Monsanto) após chegarem em uma confluência de 80%.

Foi utilizado 15 concentrações de *Roundup Original DI®* que variaram de 6,5 µg/l a 6.500 µg/l. Dessas quinze concentrações, foram selecionadas 5 para este trabalho, baseado no projeto de mestrado da aluna ainda em curso, do laboratório GEMOCA Izabela Fernanda Dal' Bó Cruz. Foi escolhido a menor e a maior concentrações (6,5ug/l e 6.500 ug/l), duas referentes aos níveis aceitáveis pela ANVISA (AOEL - 160ug/l e IDA - 830ug/l) e uma concentração que pode ser encontrada ambientalmente (65ug/l).

O ensaio Azul de Tripán é baseado na análise da integridade da membrana celular. As células que apresentam rupturas da membrana absorvem o corante, enquanto células intactas permanecem não coradas. As análises de viabilidade celular, foram realizadas em triplicatas técnica e biológica. Além disso, foi realizada troca do meio RPMI 1640 antes de ocorrer as exposições das células ao químico. Foi utilizado o Azul de Tripán 0,4% (*Sigma-Aldrich*) para a contagem de células mortas por concentração. As células foram colocadas em placas de cultura de 12 poços ( $3,7 \times 10^4$ /poço) e incubadas por 24 horas para adesão celular. Em seguida, as células foram expostas ao glifosato (*Roundup Original DI*<sup>®</sup>) (Monsanto) e a análise foi realizada após 24 e 48 horas. A contagem foi realizada pelo Countess<sup>®</sup> II FL (*Thermo Fisher Scientific*).

O CCK-8 é um ensaio colorimétrico que permite avaliar a viabilidade celular e a citotoxicidade. Para isto, utiliza-se a substância WST-8. Esta sofre biorredução em presença de um transportador de elétrons (1-Metoxi PMS) e forma um corante de formazano que é solúvel em água. Este transportador de elétrons deve ser adicionado nas células junto com a solução e realiza a transferência de um elétron do sal de tetrazólico para um NADPH da célula. Nas mitocôndrias, o sal de tetrazólico é substrato para a enzima desidrogenase que reduz o WST-8 produzindo formazan colorido, neste caso, laranja.

## RESULTADOS:

O resultado obtido no presente estudo demonstrou por meio do teste Azul de Tripán que ocorreu maior mortalidade celular durante a exposição de 24 horas, em relação a 48 horas em ambas as linhagens (gráficos 1 e 2). No caso da Nthy-ori-3-4 (gráfico 1), no período de 24 horas, as maiores mortalidades (53% e 52%) foram observadas nas concentrações mais elevada (6500ug/l) e intermediária (160 ug/l), formando assim um padrão trifásico de resposta. Durante o período de 48 horas, as maiores mortalidades foram observadas na maior concentração (27%) e em 65µg/L (29%).

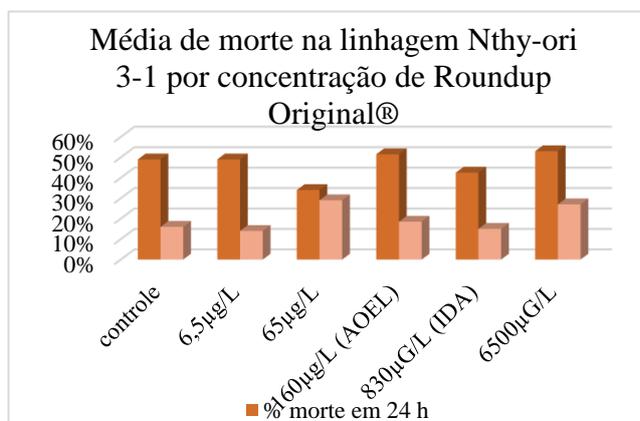


Gráfico 1: Média de morte por concentração, em exposição de 24 e 48 horas

Na linhagem TPC-1 (gráfico 2), as maiores mortalidades (71% e 67%) foram observadas, nas concentrações 65µg/l, encontrada ambientalmente, e 6500µg/l, conferindo um padrão bifásico ao gráfico. Já após 48 horas de exposição, a menor mortalidade (15%) foi encontrada na maior concentração do químico. A maior mortalidade foi observada em concentração ambiental (31%), seguida por controle e AOEL (29%)

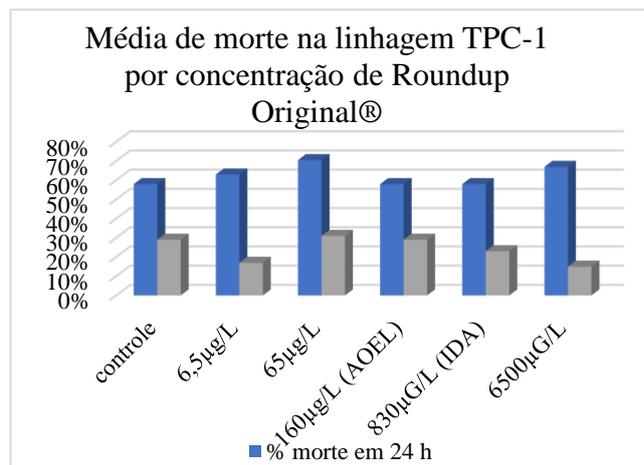


Gráfico 2: Média de morte por concentração, em exposição de 24 e 48 horas

Comparando-se as duas linhagens, observou-se maior mortalidade na TPC-1 em todas as concentrações, com exceção da concentração 6500µg/L em 48 horas.

Relativo ao ensaio CCK-8, o grupo controle representa viabilidade celular de 100%. Portanto, valores superiores a 100% representam crescimento celular e inferiores representam uma redução no número de células viáveis. Na linhagem Nthy-ori 3-1 (gráfico 3) as maiores reduções no número de células viáveis correram na AOEL (74%) e IDA (73%). Após 48 horas de exposição, relativo ao controle, houve redução da viabilidade (valores inferiores a 100%) em todas cinco concentrações, apesar de ocorrer aumento da viabilidade relativo a 24 horas na menor concentração (93%), AOEL (81%) e IDA (87%).

Na linhagem TPC-1 (gráfico 4), ocorreu aumento da viabilidade celular em 6,5µg/L (108%) e na IDA (103%). Nas outras três concentrações, os valores de viabilidade variaram de 91 a 94%. Após 48 horas de exposição, a viabilidade das células expostas a 6500µg/L sofreu o maior aumento quando compara ao período de 24 horas e passou a ser a mesma do grupo controle (100%).

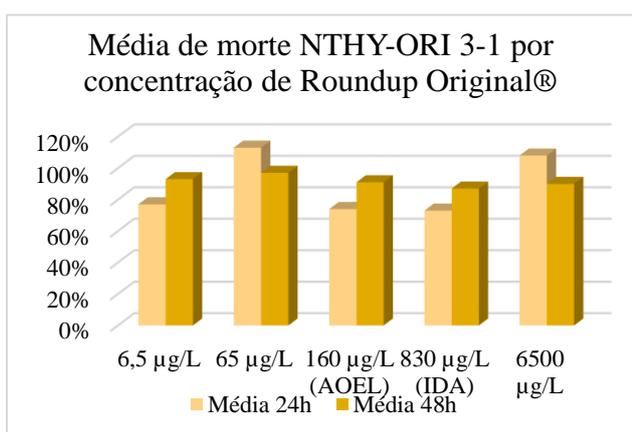


Gráfico 3: Média de morte por concentração, em exposição de 24 e 48 horas na linhagem Nthy-ori 3-1.

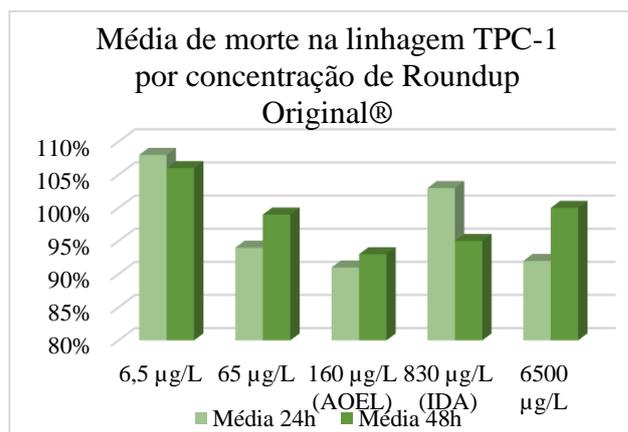


Gráfico 4: Média de morte por concentração, em exposição de 24 e 48 horas na linhagem TPC-1.

Comparando-se as duas linhagens, a maior viabilidade foi observada em TPC-1, exceto na concentração ambiental (24 e 48 horas) e 6500 µg/L (24 horas).

Análises realizadas por microscopia óptica, conforme pode ser observado nas figuras 1, 2, 3 e 4, em algumas células ocorreu redução do volume celular e perda do formato característico, o que pode ser indicativo de morte celular programada. Observou-se também células de volume aumentado e *debris* celulares (fragmentos da célula). Não foi possível observar diferenças significativas na quantidade de células do grupo controle e expostas a diferentes concentrações do químico.

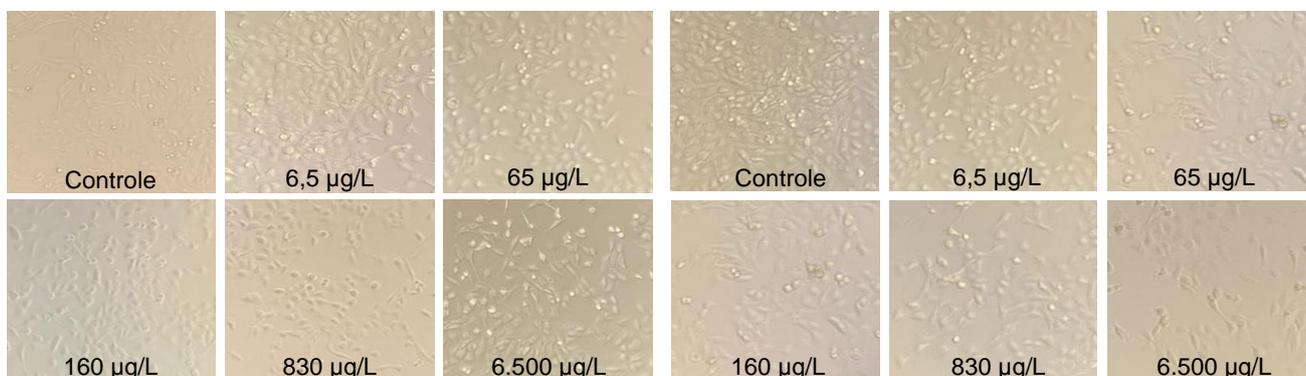


Figura 1: microscopia óptica, aumento 10x. Linhagem Nthy-ori 3-1 exposta 48h ao Roundup

Figura 2: microscopia óptica, aumento 10x. Linhagem Nthy-ori 3-1 exposta 48h ao Roundup

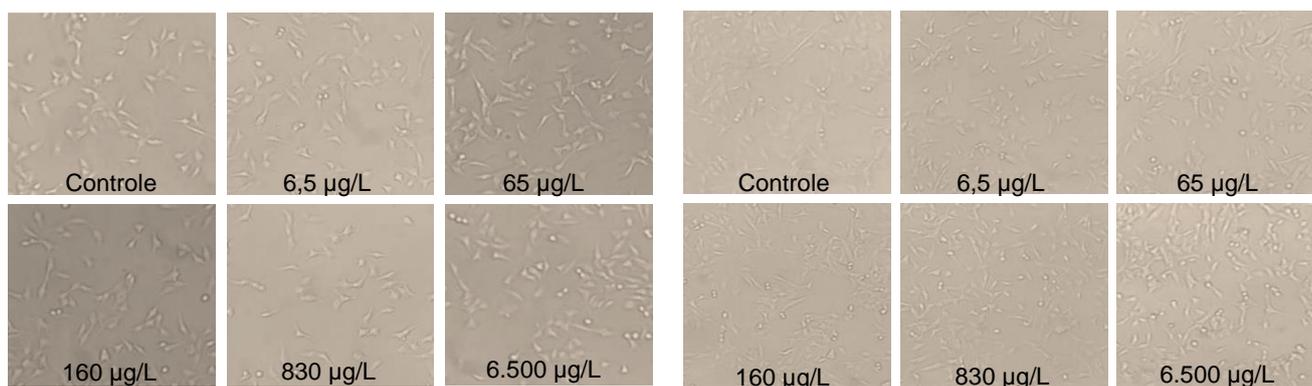


Figura 3: microscopia óptica, aumento 10x. Linhagem TPC-1 exposta 24h ao Roundup

Figura 4: microscopia óptica, aumento 10x. Linhagem TPC-1 exposta 48h ao Roundup

## DISCUSSÃO

A curva dose-resposta não monotônica é característica dos desreguladores endócrinos, isto é, não há uma relação direta entre o aumento das concentrações e resposta do organismo ao químico. Assim, efeitos adversos mais graves não estão necessariamente correlacionados ao aumento da dose. Este achado está de acordo com trabalhos que afirmam que a mortalidade em outros tipos celulares não está relacionada a uma linearidade na concentração do glifosato.

A redução da mortalidade observada após o período de 48 horas pode ser decorrente de processos adaptativos ativados. Estas alterações geram maior capacidade de resistência, de reparo de danos ao DNA e, por fim, se a adaptação não é possível, causam morte celular por mecanismos diversos.

Relativo ao teste CCK-8, comparando-se as linhagens TPC-1 e Nthy-ori 3-1, a maior viabilidade foi observada em TPC-1, com exceção da concentração ambiental (24 e 48 horas) e

6500µg/L (24 horas). Esta linhagem, por ser proveniente de um carcinoma papilífero de tireoide, apresenta mutações, como RET/PTC, que conferem maior resistência à apoptose e morte celular. Além disso, estudos indicaram que a resistência à mortalidade oferecida por linhagens cancerosas, como em hepatócitos e células da mama, pode ser decorrente de uma possível contribuição do químico à atividade carcinogênica.

Estudos *in vitro* demonstraram, em diferentes linhagens celulares humanas, concentrações capazes de causar 50% da mortalidade que variavam de 10<sup>5</sup> µg/L a 10<sup>7</sup> µg/L (9). Portanto, a partir disto, pode-se notar que são necessários concentrações mais elevadas a fim de se observar uma mortalidade mais significativa nas linhagens celulares.

Por fim, as alterações observadas na microscopia óptica provavelmente são decorrentes do ciclo celular normal, pois espera-se que algumas células sejam encontradas em intérfase (fases G1, S há aumento do material genético e do volume celular como um todo e G2), outras em mitose (redução do volume celular ao fim da telófase com formação de duas células filhas) e outras ainda em morte celular programada (redução do volume celular e formação de vesículas que são corpos apoptóticos).

## CONCLUSÕES

A partir do presente estudo, pode-se concluir que o glifosato não apresentou citotoxicidade nos diferentes tempos, concentrações e linhagens analisadas. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar-se a atuação do químico em doses cumulativas e durante períodos e doses maiores de exposição.

## BIBLIOGRAFIA

1. Instituto Nacional de Câncer. Câncer de tireoide. 2020 [acesso em 15 jun 2021]. Disponível em <https://www.inca.gov.br/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios>
2. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA). Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil. Brasília: IBAMA. 2010. 83 p.
3. Gillezeau C, van Gerwen M, Shaffer RM, et al. The evidence of human exposure to glyphosate: a review. *Environ Health*. 2019;18(1):2.
4. Avelar-Freitas BA.; Almeida VG; pinto MCX; Mourão FAG; Massensini AR; Martins-Filho OA; Rocha-Vieira E; Brito-Melo GEA. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2014; 47(4).
5. Chaufan G, Coalova I, Molina M del CR de. Glyphosate Commercial Formulation Causes Cytotoxicity, Oxidative Effects, and Apoptosis on Human Cells: Differences With its Active Ingredient. *International Journal of Toxicology*. 2014;33(1):29-38.
6. Kasuba, V. et al. Effects of low doses of glyphosate on DNA damage, cell proliferation and oxidative stress in the HepG2 cell line (2017). *Environmental Science and Pollution Research*, 24(23), 19267–19281.
7. Saiselet M. Thyroid cancer cell lines: an overview. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3.
8. Székács A and Darvas B (2018) Re-registration Challenges of Glyphosate in the European Union. *Front. Environ. Sci.* 6:78