



ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DO GLIFOSATO SOBRE LINHAGENS CELULARES TIREOIDIANAS

Palavras-Chave: GLÂNDULA TIREOIDE, GLIFOSATO, CITOTOXICIDADE

Autoras:

SARAH DOMINGOS DE OLIVEIRA [FCM-UNICAMP]

IZABELA FERNANDA DAL´BO CRUZ [FCM-UNICAMP]

Profª Drª LAURA STERIAN WARD (orientadora) [FCM-UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

A Glândula Tireoide é a maior glândula endócrina do corpo humano e está envolvida na manutenção da homeostasia e na regulação do consumo de energia. Os hormônios produzidos e secretados por ela são principalmente a triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4), os quais possuem papel fundamental no controle do metabolismo e na atividade celular em múltiplos órgãos-alvo. Contudo, substâncias químicas denominadas desreguladores endócrinos estão presentes em uma grande variedade de compostos ambientais e podem interferir no funcionamento da glândula. Essas substâncias podem provocar a ativação ou inativação de receptores endócrinos, modificar a metilação de DNA e mudar a sensibilização hormonal. Assim, são capazes de influenciar diversos aspectos da viabilidade celular.

Os agrotóxicos constituem o principal grupo de desreguladores endócrinos. E, nesta classe, destacam-se os herbicidas, sendo o glifosato o mais utilizado no mundo. Devido ao seu grande uso nos mais variados setores da agricultura e ambientes urbanos, o químico tem sido amplamente difundido no meio ambiente, o que gera uma preocupação crescente com os danos que esse composto pode causar à saúde humana. Nesse sentido, estuda-se hoje a capacidade de determinadas doses do glifosato interferir nas vias de sinalização endócrina, perturbar a síntese de hormônios endógenos e prejudicar a sobrevivência das células produtoras dessas substâncias.

Sobre a correlação entre o agrotóxico e a Glândula Tireoide, pesquisas epidemiológicas já mostraram relação entre a maior incidência de câncer de tireoide nos Estados Unidos e o aumento do uso de glifosato na agricultura. Também, outros estudos observaram redução dos níveis de T3 e T4 no soro de trabalhadores de estufa expostos ao pesticida. Contudo, ainda são escassos os dados na literatura que se referem aos efeitos do glifosato nas células da glândula. Por isso, o objetivo principal desse estudo foi comparar possíveis efeitos citotóxicos do glifosato nas linhagens celulares tireoidianas Nthy-ori 3-1 e TPC-1.

METODOLOGIA:

Cultura Celular

Os modelos experimentais utilizados foram: duas linhagens derivadas de tireoide humana, a TPC-1 e Nthy-ori 3-1, sendo a TPC-1 proveniente de carcinoma papilífero com translocação RET/PTC e a Nthy-ori 3-1 um controle para a célula neoplásica já que se trata de linhagem derivada de células foliculares tireoidianas normais que mantem várias propriedades e funções. Elas 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 mantidas em estufa a 37°C com 5% de dióxido de carbono.

Glifosato

Parte das células foram expostas ao glifosato (Roundup Original DI®) (Monsanto) nos tempos de 24h e 48h. Foram preparadas cinco concentrações diferentes do químico, que variaram de 6,5 µg/L a 6500 µg/L. Dentre essas cinco concentrações, foram testadas doses como AOEL (Nível Aceitável de Exposição Ocupacional) e IDA (Ingestão Diária Aceitável), presentes na Nota Técnica (Processo nº 25351.056754/2013-17) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que correspondem respectivamente a 160 µg/L e 830 µg/L. As células não expostas constituíram o grupo controle dos experimentos, que foram todos realizados em triplicata técnica e biológica.

Azul de Tripan

Utilizou-se o Azul de Tripan 0,4% (Sigma-Aldrich) para a contagem de células mortas por concentração nos determinados períodos de exposição. Foi feita uma diluição 1:1 da suspensão de células tratadas e uma solução de Azul de Tripan. Dessa solução retirou-se uma alíquota para a realização do cálculo de células mortas pelo Countess® II FL (Thermo Fisher Scientific).

Ensaio Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

A análise da citotoxicidade foi feita por meio do CCK-8. Foram usadas placas de 96 poços contendo 100 µl de meio RPMI 1640 completo e que continham cerca de 5000 cells/well. Após os tempos previstos de exposição ao glifosato, adicionou-se 10 µl da solução de CCK-8, contendo o WST-8 (Water Soluble Tetrazolium Salts), em cada poço. Então, as placas foram deixadas na estufa por 3 horas e, em seguida, a absorbância foi medida a 450nm utilizando-se um leitor de microplaca (ELx808, Biotek, Winooski, VT, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos no teste Azul de Tripan mostraram que a linhagem Nthy-ori 3-1 não ultrapassou 55% de morte nas condições de análise. A linhagem TPC-1, por sua vez, atingiu porcentagens de mortalidade maiores no geral, chegando próximo de 70% em 24 horas de exposição. Contudo, nas duas linhagens, as porcentagens de morte no grupo experimental foram muito parecidas com os resultados obtidos no grupo controle, como representam os Gráficos 1a e 1b.

Outra particularidade observada foi que os resultados não evidenciaram uma relação entre o aumento de concentração do glifosato e a diminuição da viabilidade celular. Ao contrário do esperado, as taxas de mortalidade mais elevadas foram obtidas em sua maioria nas baixas doses. Destacam-se nos Gráficos 1a e 1b os resultados obtidos na segunda menor concentração analisada: 65 µg/L de exposição ao glifosato. Na linhagem TPC-1, a mortalidade das células foi maior nessa dose tanto em 24h como em 48h. Na linhagem Nthy-ori 3-1, também se percebeu um aumento na mortalidade das células nessa concentração após 48 horas de exposição. Já os resultados obtidos nas doses correspondentes à IDA e ao AOEL não se destacaram em relação às demais.

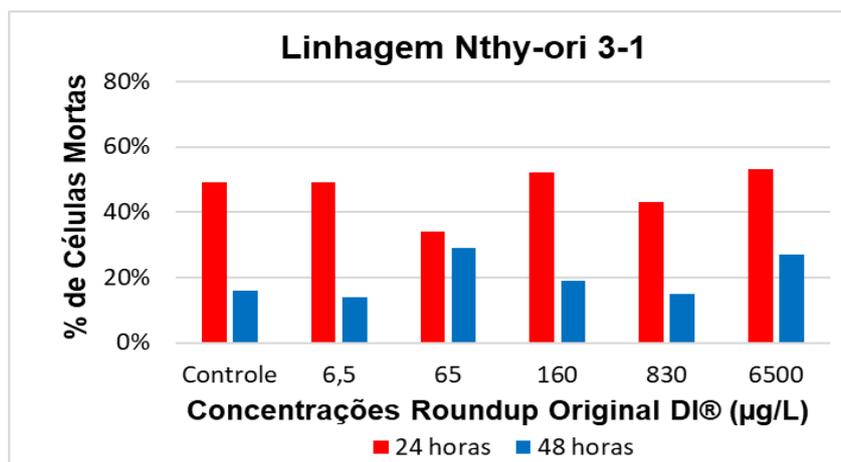


Gráfico 1a: Resultado do Teste Azul de Tripán realizado na Linhagem Nthy-ori 3-1

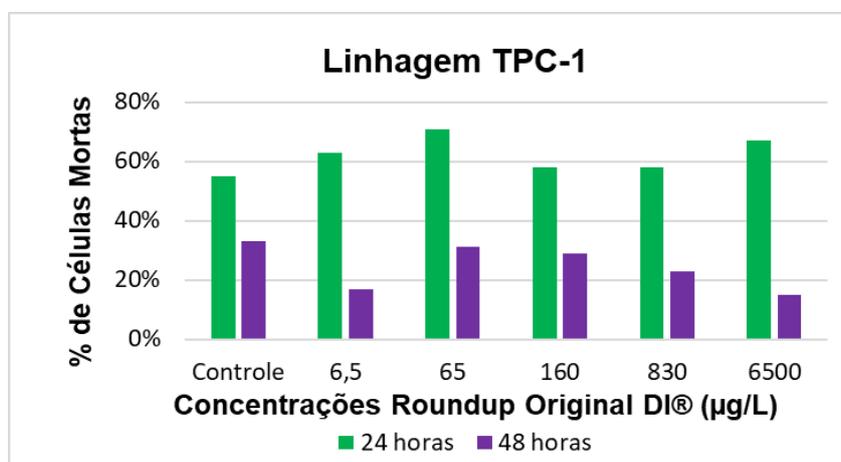


Gráfico 1b: Resultado do teste Azul de Tripán realizado na Linhagem TPC-1

Resultados parecidos já foram descritos na literatura. Diversos artigos têm proposto que os DES desafiam os conceitos tradicionais de toxicologia, em particular o dogma de “a dose faz o veneno”, porque eles podem provocar efeitos em baixas doses que não são observados em doses maiores. Isso significa que não se espera da substância estudada uma curva dose-resposta monotônica, na qual doses mais elevadas têm efeito maior do que doses mais baixas. Ao contrário, o glifosato possivelmente apresenta uma curva dose-reposta não-monotônica. Resultados como

esse são interessantes porque doses pequenas do químico são comumente observadas no ambiente.

Os resultados obtidos no teste Azul de Tripán também evidenciaram que a mortalidade das células analisadas após 48 horas foi menor do que nas analisadas após 24 horas em ambas as linhagens. Em 48 horas, houve uma queda de mortalidade em todas as cinco concentrações analisadas tanto no Gráfico 1a quanto no 1b. Uma hipótese é de que, após 48 horas, a ativação dos mecanismos de reparo de erros do genoma que podem ter sido causados pelo glifosato resultou na maior sobrevivência das células.

Os valores do teste CCK-8, por sua vez, demonstraram que as taxas de viabilidade celular obtidas em todas as condições de análise representadas nos Gráficos 2a e 2b foram superiores à 70%. Inclusive, alguns dos valores obtidos, principalmente no ensaio referente à linhagem TPC-1, foram superiores à 100%. Com isso, tem-se que as linhagens suportaram bem a presença do químico, a ponto de conseguirem permanecer vivas, crescer e se multiplicar até melhor do que o grupo não exposta.

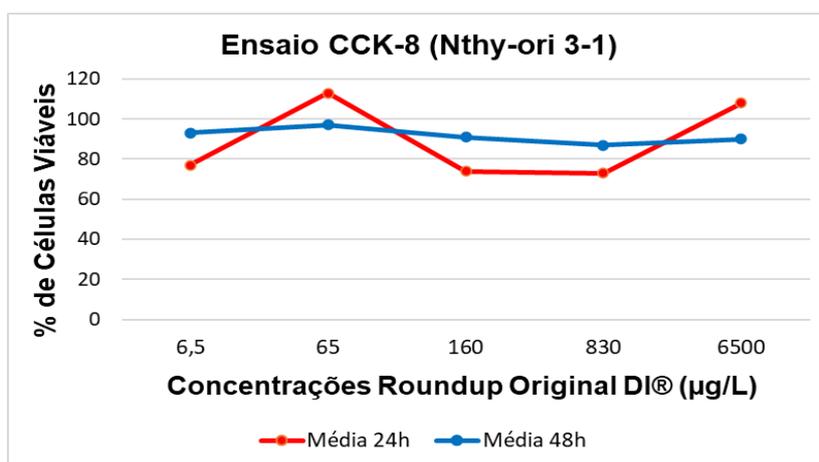


Gráfico 2a: Resultado do Ensaio CCK-8 realizado na Linhagem Nthy-ori 3-1

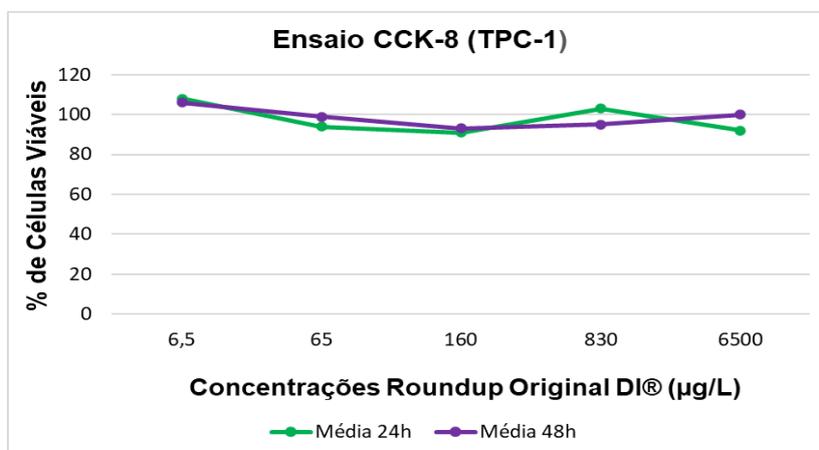


Gráfico 2b: Resultado do Ensaio CCK-8 realizado na Linhagem TPC-1

Vale acrescentar que enquanto as células cresciam nas placas e iam sendo expostas ao glifosato foi realizado uma análise qualitativa de suas morfologias no microscópio óptico com lente de aumento de 10X. No geral, as alterações observadas em ambas as linhagens e tempos de exposição não foram expressivas. Mas foi possível observar a presença de *debris* celulares e de células pequenas e sem brilho.

Os resultados das análises parecem ser diferentes à primeira vista, principalmente os obtidos no teste Azul de Tripán e no ensaio CCK-8. Contudo, os experimentos demonstraram em conjunto que o glifosato não foi citotóxico às linhagens analisadas nas concentrações e tempos estudados. Isso porque apesar das análises morfológicas das células ao microscópio e do teste Azul de Tripán terem evidenciado a ocorrência de morte celular, as porcentagens de morte nas células expostas ao glifosato foram muito parecidas com os resultados obtidos no grupo controle. Além disso, considera-se que um produto é citotóxico se a viabilidade das células expostas a ele for reduzida a 70%. No ensaio CCK-8, todos os resultados obtidos foram acima desse valor.

CONCLUSÕES:

Em conclusão, nossos resultados sugerem que o glifosato (Roundup Original DI®) não é citotóxico às linhagens celulares TPC-1 e Nthy-ori 3-1 nos tempos de exposição e concentrações analisadas.

BIBLIOGRAFIA

- Beynon ME, Pinneri K. **An Overview of the Thyroid Gland and Thyroid-Related Deaths for the Forensic Pathologist.** Acad Forensic Pathol. 2016;6(2):217-236.
- Muñoz JP, Bleak TC, Calaf GM. **Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review.** Chemosphere. 2021;270:128619.
- Swanson NL, Leu A, Abrahamson J, Wallet B. **Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America.** J Organic Systems. 2014;9(2):6-37.
- Piccoli C, Cremonese C, Koifman RJ, Koifman S, Freire C. **Pesticide exposure and thyroid function in an agricultural population in Brazil.** Environ. Res. 2016;151:389–398.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Nota Técnica: Nº 23/2018/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA.** Brasília. 2018.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, et al. **Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses.** Endocr Rev. 2012;33(3):378-455.
- Moustacchi E. **DNA damage and repair: consequences on dose-responses.** Mutat Res. 2000;464(1):35-40.