

Carla Elise Heinz Rieg

**CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO MATERNA À
FORMULAÇÃO COMERCIAL CONTENDO GLIFOSATO NOS
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS EM
FÍGADO E SANGUE PERIFÉRICO DE RATOS IMATUROS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rieg, Carla Elise Heinz
Consequências da exposição materna à formulação comercial
contendo glifosato nos parâmetros bioquímicos e morfológicos
em fígado e sangue periférico de ratos imaturos / Carla
Elise Heinz Rieg ; orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de
Souza - Florianópolis, SC, 2016.
122 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Roundup®. 3. Estresse oxidativo. 4.
Hepatotoxicidade. 5. Ferro. I. Pacheco de Souza , Ariane
Zamoner. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

“Consequências da exposição materna à formulação comercial contendo glifosato nos parâmetros bioquímicos e morfológicos em fígado e sangue periférico de ratos imaturos”

POR

Carla Elise Heinz Rieg

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



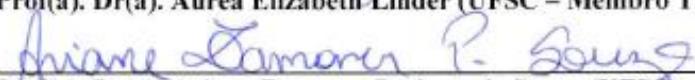
Prof(a). Dr(a). Cláudia Maria Oliveira Simões (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Maria Cláudia Santos da Silva (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Aurea Elizabeth Linder (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza (UFSC – Orientador(a))

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2016.

Dedico esta dissertação aos meus pais Hilma Heinz Rieg e Silvino Rieg, pelo incentivo aos estudos e pelo amor inesgotável.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Hilma Heinz Rieg e Silvino Rieg por serem os responsáveis pela minha educação, por sempre a valorizarem como algo fundamental à vida. Vocês dedicaram parte de suas vidas para proporcionar um futuro melhor a nós, seus filhos. Obrigada por tudo.

Ao meu irmão Carlos Alexandre Rieg por estar presente na minha vida nos últimos anos em que vivemos longe de nossos pais.

À minha orientadora prof^a. Dr^a. Ariane Zamoner Pacheco de Souza pela amizade, confiança ao abrir as portas do seu laboratório desde a minha graduação, oportunidade de realizar a iniciação científica e o mestrado, por poder contar com os seus ensinamentos, paciência, carinho e atenção. Obrigada por tornar possível a execução e a concretização deste trabalho.

À prof^a Dr^a. Fátima R. M. B. Silva por conceder a estrutura laboratorial e apoio para alguns experimentos.

À prof^a Dr^a Viviane M. Woehl pelo auxílio nas técnicas histológicas.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade na avaliação desta dissertação.

À Nathália Napolini e Vitória Cenci, pelo carinho, amizade, aprendizado profissional e pessoal compartilhado, pelas boas risadas e pela preciosa ajuda nos experimentos. À Vera Cavalli pelos seus ensinamentos e por toda a sua calma desde quando eu fazia iniciação científica, pela amizade e por sempre estar disposta a ajudar o próximo. À Daiane Cattani pelos conhecimentos transmitidos e pela assistência nos experimentos. À Camila Andrade pela alegria contagiante, amizade e companheirismo. Ao Eduardo Benedetti pela sua disposição em sanar minhas dúvidas a respeito de alguns experimentos do estresse oxidativo.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular – LaBioSignal: Patrícia Cesconetto, Juliana Domingues, Luiza de Lima e Marcelo Tizon, pelos bons momentos vividos no laboratório e pelo auxílio em alguns experimentos.

Ao meu namorado Fábio Pegoraro por todo amor, incentivo, apoio e compreensão nos momentos de minha ausência.

A todos aqui não mencionados e que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia – PGFAR por ter oportunizado a realização deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro, em especial à CAPES pela bolsa concedida.

“Um sonho não se torna realidade através da magia; leva suor, determinação e trabalho duro”.
(Colin Powell)

RESUMO

Este estudo investigou os efeitos da exposição materna ao glifosato-Roundup® em diferentes parâmetros bioquímicos em fígado e soro de ratos imaturos. Ratas Wistar prenhas foram expostas a 1% de Roundup® (0,36% de glifosato) na água de beber a partir do 5º dia gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade, sendo que os animais controles receberam apenas água durante o mesmo período. Os resultados obtidos demonstraram que a exposição crônica ao glifosato-Roundup® diminuiu a massa do fígado e aumentou o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no órgão. A formulação comercial contendo glifosato foi capaz de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) no fígado dos filhotes. A indução de estresse oxidativo no fígado da prole foi confirmada pela depleção de glutathiona reduzida (GSH) e aumento na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de carbonilação de proteínas. Além disso, a exposição ao pesticida alterou o sistema de defesa antioxidante enzimático ao aumentar a atividade da catalase (CAT), glutathiona-redutase (GR), glutathiona-S-transferase (GST) e γ -glutamyl transferase (GGT), inibir a atividade da superóxido dismutase (SOD) e da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), sem modificar a atividade da glutathiona-peroxidase (GPx) em fígado de ratos imaturos. A exposição crônica ao glifosato-Roundup® também estimulou a atividade das aminotransferases hepáticas, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). O aumento na concentração de ferro hepático e sérico, bem como na capacidade de ligação de ferro sérico, juntamente com a diminuição na concentração de transferrina no soro dos ratos indicaram acúmulo de ferro total no corpo dos filhotes expostos ao herbicida. Estes dados sugerem que o glifosato-Roundup® pode induzir um processo de hemocromatose secundária associada ao aumento nas concentrações de íons Fe^{2+} levando, conseqüentemente, à geração de EROs. Além disso, observou-se hepatotoxicidade induzida por glifosato-Roundup® devido à elevação na atividade sérica da GGT, ALT e AST, marcadores periféricos de dano ao fígado. No entanto, a morfologia hepática não foi afetada pela exposição ao pesticida. Acredita-se que isso ocorra devido à alta capacidade regenerativa do fígado. Os dados do presente estudo sugerem que a exposição ao Roundup® pode comprometer diferentes vias metabólicas no fígado,

induzir estresse oxidativo e hepatotoxicidade, sem alterar a morfologia hepática.

Palavras-chave: Roundup®. Estresse oxidativo. Hepatotoxicidade. Ferro.

ABSTRACT

This study investigated the effects of maternal exposure to glyphosate-Roundup® in different biochemical parameters in serum and liver of immature rats. Female Wistar rats were exposed to 1% glyphosate-Roundup® (0.36% glyphosate) in drinking water from gestation day 5 and continually up to lactation day 15. Experiments were carried out with 15-day-old pups. Results showed that chronic exposure to glyphosate-Roundup® decreased liver mass and increased $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx in hepatic cells. The commercial formulation containing glyphosate was able to cause reactive oxygen species (ROS) in the offspring liver. Roundup® decreased the levels of reduced glutathione (GSH) and increased the amounts of thiobarbituric reactive species (TBARS) and protein carbonyl, characterizing oxidative damage. Also, exposure to the pesticide stimulated the activity of catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) and γ -glutamyl transferase (GGT), while the activities of superoxide-dismutase (SOD) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) were inhibited without modifying the activity of glutathione peroxidase (GPx) in pup liver. The chronic exposure to glyphosate-Roundup® also led to the induction of hepatic alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities. Iron overload was demonstrated by its increased concentration observed in hepatic tissue, as well as in serum from glyphosate-Roundup® exposed animals, which was associated with the increased total iron-binding capacity of serum and decreased serum transferrin levels. These events increased the total amount of iron in the body of the offspring, suggesting secondary hemochromatosis and, probably, increased Fe^{2+} ion concentration in the body of animals in such a way this event might lead to the formation of ROS. Moreover, hepatotoxicity was attested by the elevation in serum GGT, ALT and AST activities, biomarkers of hepatic damage. However, the liver histology was unaffected by pesticide exposure, probably due to the high regenerative capacity of the liver. The data of this study suggest that exposure to Roundup® might compromise different metabolic pathways in the liver, inducing oxidative stress and hepatotoxicity, without changing the liver histology.

Keywords: Roundup®. Oxidative stress. Hepatotoxicity. Iron.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do glifosato.....	30
Figura 2. Mecanismo de ação do glifosato.....	32
Figura 3. Comparação entre o consumo total dos agrotóxicos e do herbicida glifosato no Brasil (2010-2013).....	34
Figura 4. Arquitetura hepática microscópica.....	40
Figura 5. Estrutura tridimensional do ácino hepático.	42
Figura 6. Representação esquemática das fases de biotransformação...	45
Figura 7. Representação esquemática do papel das aminotransferases no fígado	46
Figura 8. Representação esquemática da formação das principais EROs e as defesas antioxidantes combatendo as espécies reativas.	56
Figura 9. Possíveis alvos do Roundup® em fígado de ratos imaturos. .	57
Figura 10. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na massa do fígado de ratos imaturos.	69
Figura 11. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fígado de ratos imaturos.	70
Figura 12. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em fígado de ratos imaturos.....	70
Figura 13. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® no conteúdo de TBARS (A) e proteína carbonilada (B) em fígado de ratos imaturos.....	71
Figura 14. Efeitos da exposição pré- e pós-gestacional ao Roundup® na atividade das enzimas: (A) superóxido dismutase (SOD) e (B) catalase (CAT) em fígado de ratos imaturos.....	72
Figura 15. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na atividade da glutatona peroxidase (GPx) em fígado de ratos imaturos.	73

Figura 16. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® no conteúdo de glutatona reduzida (GSH) em fígado de ratos imaturos. .	74
Figura 17. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na atividade das enzimas: (A) glutatona redutase (GR) e (B) glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em fígado de ratos imaturos.....	74
Figura 18. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na atividade da enzima glutatona-S-transferase (GST) em fígado de ratos imaturos.	75
Figura 19. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na atividade da enzima γ -glutamil transferase (GGT) em fígado de ratos imaturos.	75
Figura 20. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em fígado de ratos imaturos.....	76
Figura 21. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na atividade das enzimas: (A) alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e (B) γ -glutamil transferase (GGT) em soro de ratos imaturos.....	77
Figura 22. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na concentração de proteínas totais no soro de ratos imaturos.	78
Figura 23. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na morfologia hepática de ratos imaturos.	78
Figura 24. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na concentração de ferro hepático (A) e de ferro sérico (B) em ratos imaturos.	79
Figura 25. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na concentração de transferrina (A) e na capacidade de ligação total de ferro (B) em soro de ratos imaturos.	80
Figura 26. Mecanismo de hepatotoxicidade proposto para o Roundup® em fígado e soro de ratos imaturos.	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
CLLF	Capacidade latente de ligação de ferro
CTLF	Capacidade total de ligação de ferro
CYP	Citocromo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQ	Diquat
DTNB	Ácido 2-nitrobenzoico
DTPA	Ácido 2-etilenotriaminopentacético
EPSPS	Enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
GGT	γ -glutamil transferase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
HOO [•]	Radical hidroperoxil
LDH	Lactato desidrogenase
LPO	Lipoperoxidacão
MDA	Malondialdeído
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NO [•]	Óxido nítrico
NO ₂ [•]	Radical dióxido de nitrogênio
O ₂ ^{-•}	Radical ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
[•] OH	Radical hidroxila

ONOO ⁻	Peroxinitrito
PC	Proteína carbonilada
POEA	Polioxietilenoamino
PPB	Partes por bilhão
PPM	Partes por milhão
RE	Retículo endoplasmático
RL	Radical livre
RO [•]	Radical alcóxil
ROO [•]	Radical peróxil
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
t-BuOOH	Tert-butilhidroperóxido
TCA	Ácido tricloroacético
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
3.1	AGROTÓXICOS	27
3.1.1	Herbicida glifosato-Roundup®	30
3.1.1.2	Ação do glifosato-Roundup® no sistema hepático	38
3.2	FÍGADO	39
3.2.1	Biotransformação de xenobióticos	43
3.3	FUNÇÕES DAS AMINOTRANSFERASES NO FÍGADO	45
3.4	CÁLCIO COMO UMA MOLÉCULA SINALIZADORA NO TECIDO HEPÁTICO	47
3.5	ESTRESSE OXIDATIVO	49
3.5.1	Radicais livres e espécies reativas de oxigênio	49
3.5.1.1	Mecanismo de geração de espécies reativas de oxigênio	50
3.6	DANO OXIDATIVO E O FÍGADO	51
3.7	MECANISMO DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO TECIDO HEPÁTICO	52
4	HIPÓTESE	57
5	MATERIAIS E MÉTODOS	59
5.1	REAGENTES	59
5.2	ANIMAIS	59
5.3	TRATAMENTO COM ROUNDUP®	59
5.4	INFLUXO DE ⁴⁵ Ca ²⁺	60
5.5	CONTEÚDO DE GLUTATIONA REDUZIDA	60
5.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	61
5.6.1	γ -glutamil transferase (GGT)	61
5.6.2	Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST)	61
5.6.3	Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)	62
5.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	62
5.7.1	Superóxido dismutase (SOD)	62
5.7.2	Catalase (CAT)	63
5.7.3	Glutaciona peroxidase (GPx)	63
5.7.4	Glutaciona redutase (GR)	63
5.7.5	Glutaciona-S-transferase (GST)	64

5.8	DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS.....	64
5.8.1	Proteína carbonilada (PC)	64
5.8.2	Lipoperoxidação (TBARS).....	65
5.9	DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	65
5.10	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO	66
5.11	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRANSFERRINA SÉRICA	66
5.12	CAPACIDADE TOTAL DE LIGAÇÃO DE FERRO (CTLF)	66
5.13	HISTOLOGIA HEPÁTICA	67
5.14	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA	67
5.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
6	RESULTADOS.....	69
6.1	AVALIAÇÃO DA MASSA DO FÍGADO DA PROLE EXPOSTA AO ROUNDUP® DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO	69
6.2	ENVOLVIMENTO DO CÁLCIO NO MECANISMO DE TOXICIDADE INDUZIDO PELO ROUNDUP® EM FÍGADO DE RATOS IMATUROS	69
6.3	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO HERBICIDA ROUNDUP® NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM FÍGADO DE RATOS DE 15 DIAS DE IDADE.....	70
6.4	CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ROUNDUP® SOBRE OS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS A LÍPIDOS E PROTEÍNAS EM FÍGADO DE RATOS IMATUROS	71
6.6	ESTUDO DA AÇÃO DA FORMULAÇÃO COMERCIAL ROUNDUP® NA ATIVIDADE DAS AMINOTRANSFERASES EM FÍGADO DE RATOS IMATUROS	76
6.7	MARCADORES PERIFÉRICOS DE HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR EXPOSIÇÃO MATERNA AO ROUNDUP®	76
6.8	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ROUNDUP® NA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NO SORO DE RATOS DE 15 DIAS DE IDADE	77
6.9	AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA HEPÁTICA DA PROLE EXPOSTA AO ROUNDUP® DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO	78
6.10	CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ROUNDUP® NO ARMAZENAMENTO E NO TRANSPORTE DE FERRO EM RATOS IMATUROS	79
7	DISCUSSÃO	81
7.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91

8	CONCLUSÕES.....	93
9	PERSPECTIVAS.....	95
	REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

As atividades agrícolas são realizadas pelo ser humano há mais de dez mil anos. Porém, o uso intensivo de defensivos agrícolas iniciou-se após a 2ª Guerra Mundial, onde as indústrias químicas que abasteciam a indústria bélica começaram a incentivar o uso de agrotóxicos na agricultura para eliminação de pragas e doenças nas culturas. Assim, políticas foram implantadas no mundo todo para a expansão desse mercado (ANDRADES; GANIMI, 2007).

O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos pelo sétimo ano consecutivo. Desde 2011, o país alcançou um número superior a quatrocentas mil toneladas de ingredientes ativos utilizados por ano (ANVISA, 2012; IBAMA, 2014).

O uso exacerbado de agrotóxicos nos processos de produção agrícola levou ao contato, direto ou indireto, do ser humano com os agentes químicos. Esse contato está relacionado com a exposição ocupacional, a ingestão de produtos expostos aos agroquímicos e à contaminação da biota de áreas próximas a plantações agrícolas. Desse modo, houve o desequilíbrio do ecossistema, o qual causou o desenvolvimento de diversas doenças aos habitantes dessas regiões (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003; PERES et al., 2005).

A incidência de câncer de próstata, mama, ovário (KOIFMAN et al., 2002), o desenvolvimento de doenças neurológicas, renais, respiratórias e hepáticas (LONDRES, 2011) é maior em agricultores do que na população geral, o que provavelmente está associada à utilização crescente de agrotóxicos pelos mesmos. Dessa forma, as enfermidades causadas pela exposição aos agroquímicos caracterizam um grande problema de saúde pública (RIO GRANDE DO SUL, 2008).

O fígado é potencialmente suscetível aos agrotóxicos, visto que é o primeiro órgão a ter contato com a maioria dos xenobióticos, por ter a função de detoxificar as substâncias químicas estranhas ao organismo, e desse modo, a maior parte dos compostos quando metabolizados pelo fígado são inativados e excretados do corpo. No entanto, outros podem ser convertidos em substâncias potencialmente tóxicas ao tecido hepático; além do fato de que a formação da bile e a sua movimentação pelo trato gastrointestinal é capaz de concentrar os xenobióticos, uma vez que essas substâncias podem ser reabsorvidas e transportadas novamente para o fígado, pela circulação hepática, levando ao aumento da concentração de xenobióticos no órgão (HODGSON, 2010).

Roundup®, agrotóxico contendo glifosato como ingrediente ativo, é o herbicida mais utilizado no Brasil e no mundo (MODESTO;

MARTINEZ, 2010; BØNH et al., 2014). O uso intensivo de glifosato nas lavouras está associado ao seu baixo custo, ao fácil acesso à compra e por ser considerado ambientalmente seguro, devido à sua rápida degradação no solo. Além disso, alguns estudos sugerem que o pesticida não apresenta riscos à saúde humana e animal devido ao mecanismo de ação proposto, onde o herbicida agiria inibindo a biossíntese de aminoácidos aromáticos, uma via bioquímica presente apenas em plantas e alguns microrganismos (GIMSING et al., 2004; POLLEGIONI; SCHONBRUNN; SIEHL, 2011; WILLIAMS; WATSON; DESESSO, 2012). Por outro lado, diversos estudos têm demonstrado o potencial efeito tóxico de formulações herbicidas à base de glifosato em diferentes sistemas biológicos, incluindo células de placenta humana (BENACHOUR; SERÁLINI, 2009), embriões de vertebrados (PAGANELLI et al., 2010), testículos de ratos (DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013) e células hipocámpais (CATTANI et al., 2014).

Embora o fígado seja um dos principais órgãos afetados pelo contato com os xenobióticos, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos dos agrotóxicos sobre o tecido hepático, bem como no sangue periférico, em particular, de ratos imaturos expostos ao glifosato-Roundup® durante a gestação e amamentação. Desse modo, neste estudo se pretende demonstrar alterações provocadas pela exposição materna ao Roundup® sobre diferentes parâmetros bioquímicos, morfológicos e de dano oxidativo em fígado e soro da prole de ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos envolvidos na toxicidade, após exposição materna ao herbicida glifosato-Roundup® durante a gestação e aleitamento na indução de estresse oxidativo, assim como nas alterações bioquímicas e morfológicas em tecido hepático e sangue periférico de ratos imaturos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

→Estudar as consequências da exposição ao Roundup® no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fígado de ratos imaturos;

→Verificar os efeitos do herbicida Roundup® nas concentrações de GSH, TBARS e proteína carbonilada em tecido hepático;

→ Investigar a possível formação de EROs em fígado de filhotes expostos de forma crônica ao Roundup®;

→Avaliar os efeitos do Roundup® na atividade das enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes, SOD, CAT, GPx, GR, G6PD, GST e GGT em células hepáticas de ratos de 15 dias de idade;

→Investigar as consequências do pesticida na atividade das aminotransferases (AST e ALT) em tecido hepático;

→Verificar os possíveis efeitos hepatotóxicos de Roundup® ao analisar a atividade da GGT, AST e ALT no soro de ratos imaturos;

→Avaliar as consequências da exposição ao Roundup® na concentração de ferro hepático e ferro sérico em ratos de 15 dias de idade;

→Estudar os efeitos do Roundup® na capacidade de ligação total de ferro, na concentração de transferrina e de proteínas totais em soro;

→Investigar possíveis mudanças histológicas no tecido hepático dos ratos imaturos expostos ao Roundup®.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 AGROTÓXICOS

Nos últimos anos houve uma enorme disseminação do uso de agrotóxicos no Brasil. Desde 2008, o país tornou-se o maior consumidor mundial desses agroquímicos. As vendas globais dos agentes químicos, entre 2000 e 2010, cresceram 93%, enquanto as vendas brasileiras avançaram 190% (ANVISA, 2012). Em 2010, o mercado nacional movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões. Em 2011 houve um aumento de 16,3% das vendas, alcançando US\$ 8,5 bilhões, no ano seguinte, chegou a US\$ 9,7 bilhões. E em 2013, o consumo de agrotóxicos alavancou em 18%, representando o valor de US\$ 11,5 bilhões (ANVISA, 2012; SINDIVEG NEWS, 2014b).

Comercializaram-se no Brasil 495.764,55 toneladas de ingredientes ativos no ano de 2013, um aumento de 28,9% em comparação a 2010, que obteve o uso de 384.501,28 toneladas (IBAMA, 2014). O país também é o maior importador de agrotóxicos do mundo desde 2012 (FIOCRUZ, 2014), de modo que o território nacional adquiriu do exterior 22% (108.861,57 toneladas) dos ingredientes ativos que consumiu em 2013. Entre 2010 e 2013, a importação cresceu 92%, números que justificam o Brasil estar nesse patamar internacional (IBAMA, 2014).

As maiores concentrações da utilização de agroquímicos estão em regiões brasileiras com elevada intensidade de monoculturas de soja, milho, cana, cítricos, algodão e arroz. Nessas regiões prevalece o agronegócio (municípios da região Centro-Oeste, Sudeste e Sul) (BOMBARDI, 2011). Desse modo, o líder em aplicação de tecnologia no campo em 2013 foi Mato Grosso (21%), seguido de São Paulo (14%) e Paraná (12%). Esses três estados juntos correspondem a quase metade do consumo de agrotóxicos do país (IBAMA, 2014; SINDIVEG NEWS, 2014b).

Na safra de 2013, no Brasil, foram plantados 66,4 milhões de hectares de lavoura temporária (cultura com pequeno intervalo de tempo, geralmente inferior a um ano, que após a colheita é preciso plantar novamente para produzir) e 8,1 milhões de hectares de lavouras permanente (culturas de longa duração, que permitem colheitas sucessivas, sem necessidade de novo plantio), o que correspondem a cerca de 74,5 milhões de hectares utilizados para o plantio. Sendo que cerca de 1 bilhão de litros (produtos formulados) de agrotóxicos foram

pulverizados nessas lavouras, com uma média de uso de 13,4 litros por hectare (IBGE, 2010; IBGE, 2013; FIOCRUZ, 2014; IBAMA, 2014).

Com a aplicação exagerada de produtos químicos nas lavouras, os agrotóxicos contaminam o meio ambiente e as pessoas que vivem nele, com severos impactos na saúde pública relacionada a enfermidades e intoxicações causadas pela exposição ao agente químico aos agricultores. Além de impactos na segurança alimentar e nutricional da população por ingerir a água e os alimentos contaminados (CARNEIRO et al., 2012).

Segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), no ano de 2011, ocorreram no Brasil 11.106 intoxicações por agrotóxicos, que correspondem a cerca de 30,9 casos por dia ou um a cada aproximadamente 47 minutos. As principais circunstâncias de intoxicações eram tentativas de suicídio (41%), acidente individual (38%) e ocupacional (12%). Nesse mesmo período, 146 indivíduos foram a óbito por contaminação promovida pelos agentes químicos, no qual a maior parte das pessoas tentou suicídio (89%) (SINITOX, 2014).

Ainda, acredita-se que para cada notificação de intoxicação por agrotóxico, haja outros 50 casos não mencionados (ILO, 2005). É importante salientar que uma grande vulnerabilidade do Brasil é a subnotificação das intoxicações por agroquímicos, além da fragilidade relacionada ao controle e monitoramento do uso dos compostos químicos em território nacional, sendo um aspecto importante a ser considerado nos processos de registro e reavaliação desses produtos (AUGUSTO et al., 2012).

Os agrotóxicos podem permanecer como resíduos remanescentes nos alimentos, sendo a ingestão de alimentos contendo agentes químicos uma das principais vias de exposição humana a esses compostos (MELLO, 1999). Segundo o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA, 2012) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013), cerca de um terço (29%) dos alimentos ingeridos diariamente pelos brasileiros estão contaminados por agrotóxicos. O alimento que mais continha resíduos de agrotóxicos acima do limite considerado aceitável e/ou apresentava ingredientes ativos não autorizados para determinado cultivo foi o morango (59%), seguido do pepino (42%), abacaxi (41%), cenoura (33%) e laranja (28%). Vale ressaltar que o pimentão não foi analisado no último relatório do PARA, no entanto, foi o alimento com maior índice de contaminação por agroquímicos nos últimos anos com 92% e 90% em 2010 e 2011, respectivamente.

Parte dos agrotóxicos utilizados têm a capacidade de se dispersar no ambiente e outra parte de se armazenar no organismo humano, inclusive no leite materno. Os recém-nascidos se alimentam de leite materno de forma quase única até o sexto mês de vida, além de apresentarem o sistema imunológico em formação, assim a ingestão de leite contaminado pode prejudicar a saúde dos mesmos (CARNEIRO et al., 2012).

Uma pesquisa realizada pela Universidade Federal do Mato Grosso, teve a finalidade de determinar a presença de resíduos de agrotóxicos em amostras de leite materno de sessenta e duas mães (n=62) residentes no município de Lucas do Rio Verde (MT), para isso foram pesquisados dez agentes químicos (trifluralina, α -Hexaclorociclohexano ou α -HCH, lindano, aldrim, deltametrina α -endossulfam, p,p'-diclorodifenildicloroetano-DDE, β -endossulfam, cipermetrina e p,p'-diclorodifeniltricloroetano-DDT). Sendo que em todas as amostras estudadas foi encontrado ao menos um tipo de agrotóxico (PALMAS, 2011).

Os produtos agroquímicos podem ter diferentes vias no ambiente. Destacando-se a contaminação dos lençóis freáticos subterrâneos por agrotóxicos a partir de pulverizações aéreas, lixiviação da água e erosão dos solos (FILIZOLA et al., 2002). A contaminação também pode acontecer de forma superficial, em virtude da intercomunicabilidade dos sistemas hídricos, podendo alcançar áreas distantes do local de aplicação da substância química. Logo, a contaminação de um sistema hídrico pode afetar toda a população abastecida pela água contaminada e não apenas a população residente na localidade (VEIGA et al., 2006).

De acordo com o Atlas de Saneamento e Saúde do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), os municípios que anunciaram poluição ou contaminação, por esgoto sanitário, resíduos de agrotóxicos e destinação inadequada de lixo, foram relatados como responsáveis por 72% das incidências de poluição na captação em mananciais superficiais, 54% em poços profundos e 60% em poços rasos (IBGE, 2011).

Outro problema ambiental é a reutilização, descarte ou destino inadequado de embalagens vazias de agrotóxicos (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003). Entre janeiro e abril de 2014, 14.630 toneladas de embalagens vazias de defensivos agrícolas encaminhadas foram removidas do meio ambiente pelo Sistema Campo Limpo (programa criado em 2002 para realizar a logística reserva de embalagens vazias de agrotóxicos no Brasil). Desde 2002 até abril de 2014, o programa já

encaminhou cerca de 290 mil toneladas de embalagens para o destino ambientalmente correto (SINDIVEG NEWS, 2014a).

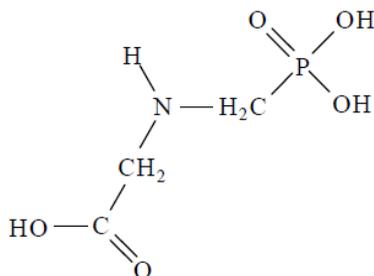
No Brasil, o desconhecimento sobre o manejo adequado dos produtos agroquímicos, o uso concomitante de vários deles utilizados em larga escala e as condições de vida do homem do campo, demonstram a urgência na implementação de ações que objetivem avaliar o impacto dessas substâncias sobre a saúde e o ambiente, em particular nas regiões com elevada atividade agrícola (MEYER, SARCINELLI, MOREIRA, 1999).

3.1.1 Herbicida glifosato-Roundup®

Glifosato é o princípio ativo de alguns dos agrotóxicos mais utilizados a nível mundial (DUKE; POWLES, 2008). A molécula de glifosato foi sintetizada pela primeira vez em 1950 como uma substância farmacêutica em potencial por Henri Martin de Cilag, mas a sua atividade herbicida foi descoberta apenas em 1970 por John E. Franz, cientista da Companhia Monsanto. Em 1974, o glifosato foi patenteado pela Monsanto para uso como herbicida com o nome comercial de Roundup® (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; DUKE; POWLES, 2008).

O glifosato pertence à classe dos organofosforados e ao grupo químico das glicinas substituídas, com o nome químico de N-(fosfonometil)glicina, possui massa molecular relativa de 169,07 g/mol. Apresenta fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ e a sua fórmula estrutural é demonstrada na Figura 1 (ANVISA, 2010; ANDRIGHETTI, 2011; IARC MONOGRAPHS, 2015; MONSANTO, 2015).

Figura 1. Fórmula estrutural do glifosato.



Fonte: IARC MONOGRAPHS, 2015.

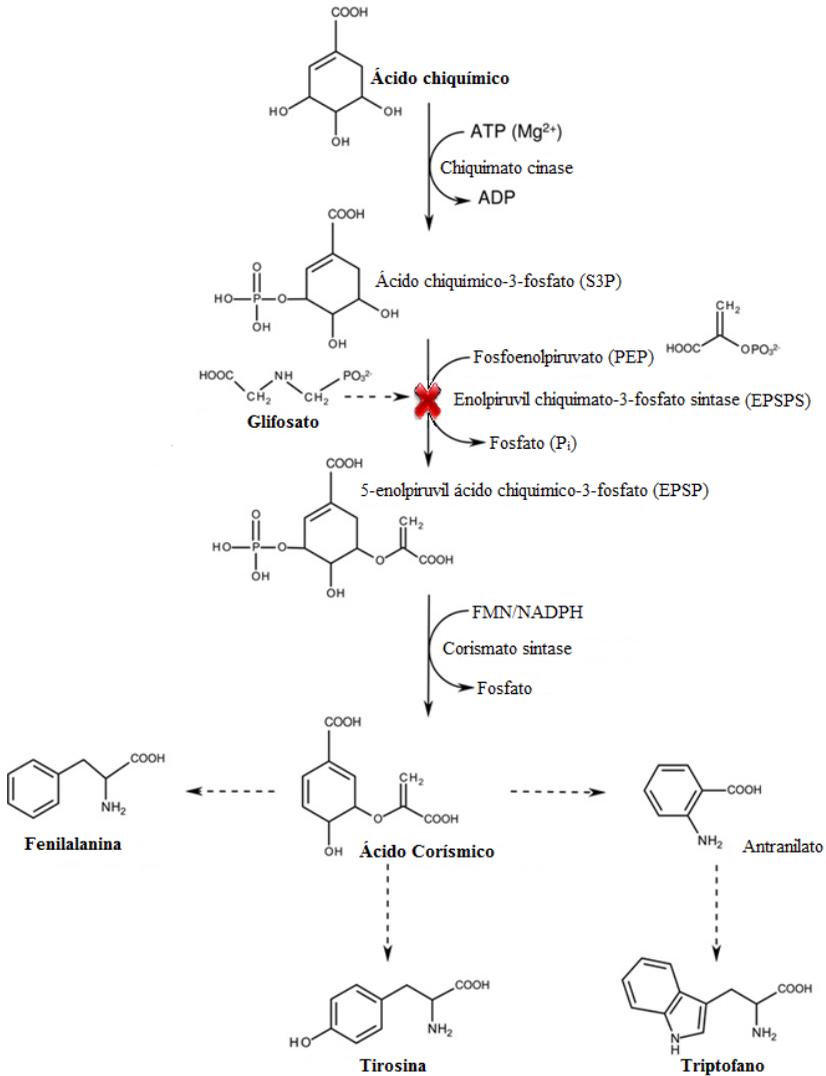
O glifosato é incolor, inodoro, sólido cristalino. Em razão da solubilidade do herbicida ser limitada em água-11,6 g/L a 25°C, ele é formulado como um sal contendo ácido de glifosato desprotonado e um cátion (isopropilamina, amônio ou sódio), tornando a substância mais hidrossolúvel. O glifosato é um herbicida sistêmico, não seletivo, pós-emergente e tem amplo espectro de ação (IARC MONOGRAPHS, 2015).

Com uso agrícola e não-agrícola, o glifosato é largamente utilizado (IARC MONOGRAPHS, 2015). No Brasil, o herbicida é empregado em diversas culturas dentre elas têm-se a de café, cana-de-açúcar, arroz, soja, milho, trigo, feijão, fumo, ameixa, banana, cacau, maçã, pera, pêssego, uva, algodão, mamão, citros, coco, nectarina, pastagem, seringueira, pinus e eucalipto. (AMARANTE JÚNIO et al., 2002; ANVISA, 2010). O glifosato também é amplamente aplicado no ambiente urbano e doméstico para o controle de ervas daninhas em calçadas, jardins, parques e terrenos em geral (GUYTON et al., 2015). Na Califórnia, uma pesquisa realizada com 246 famílias, demonstrou que 14% dos domicílios possuíam pelo menos um produto contendo glifosato (GUHA et al., 2013).

A ação herbicida do glifosato é conferida pela sua capacidade em impedir o crescimento de plantas a partir da interferência com a produção de aminoácidos aromáticos essenciais. O glifosato apresenta como mecanismo de ação a inibição de forma competitiva da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), enzima da via do chiquimato (Figura 2). A atividade da enzima EPSPS desempenha um papel fundamental na produção do intermediário corismato, necessário para a biossíntese dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano (STEINRUCKEN; AMRHEIN, 1980; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000). A inibição na biossíntese desses aminoácidos ocasionada pelo glifosato afeta a síntese proteica levando a morte das células vegetais (WILLIAMS; WATSON; DESESSO, 2012). Considerando-se que essa via biossintética está presente apenas em plantas, bem como fungos e algumas bactérias (POLLEGIONI; SCHONBRUNN; SIEHL, 2011), sugeriu-se que o uso do glifosato nas lavouras seria seguro e inofensivo para os mamíferos, inclusive para os seres humanos (WILLIAMS; WATSON; DESESSO, 2012). No entanto, diversos estudos demonstram que a exposição à herbicidas contendo glifosato apresenta toxicidade para diversos tipos celulares de diferentes espécies, incluindo células de placenta humana (BENACHOUR; SERÁLINI, 2009), embriões de vertebrados (PAGANELLI et al., 2010),

testículos de ratos (DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013), células hipocâmpais (CATTANI et al., 2014), entre outros.

Figura 2. Mecanismo de ação do glifosato.



Fonte: Adaptado de Pollegioni, Schonbrunn e Siehl (2011).

A formulação Roundup® contém em sua composição glifosato (sal de isopropilamina de glifosato) como ingrediente ativo, polioxietilamina (POEA) como surfactante predominante na fórmula comercial e outras substâncias que são consideradas inertes, usadas para auxiliar na estabilidade e penetração do pesticida na planta (WILLIAMS, KROES; MUNRO, 2000; RELYEA, 2005).

Estudos têm demonstrado que a preparação comercial Roundup® apresenta maior toxicidade em relação ao glifosato de grau analítico, indicando que aditivos na formulação do Roundup® desempenham um sinergismo na toxicidade do agrotóxico (BENACHOUR; SERALINI, 2009; MESNAGE, BERNAY; SERALINI, 2013; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013).

O glifosato é utilizado em mais de 750 diferentes herbicidas, produzido por pelo menos 91 fabricantes distribuídos em 20 países. Além do glifosato ser registrado para uso em pelo menos 130 países (DILL et al., 2010; FARM CHEMICALS INTERNATIONAL, 2015; GUYTON et al., 2015). Vale ressaltar que o Roundup® é o herbicida mais utilizado no Brasil e no mundo (MODESTO; MARTINEZ, 2010; BØNH et al., 2014; IARC MONOGRAPHS, 2015).

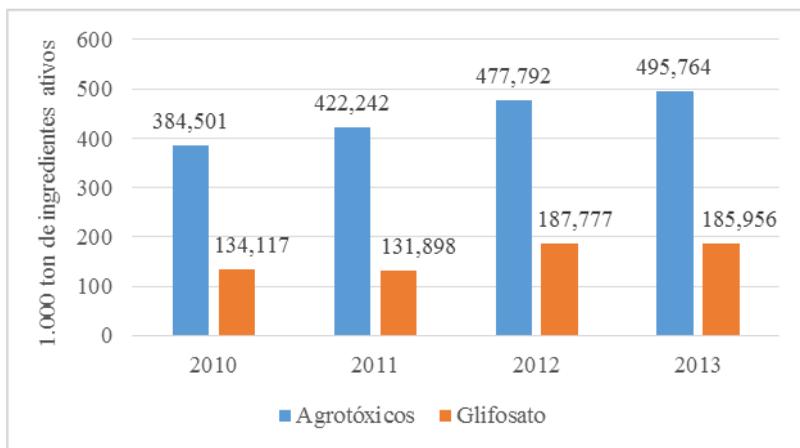
Dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) demonstram que o glifosato ficou em 1º lugar dos princípios ativos mais vendidos em território brasileiro entre 2010 e 2013. O herbicida representou mais de 30% da comercialização total de agrotóxicos em cada um desses anos. Em 2013, foram consumidos 185.956,13 toneladas de glifosato e seus sais, um aumento de 39% em comparação ao ano de 2010, que teve um consumo de 134.117,29 toneladas (Figura 3) (IBAMA, 2014).

Com o surgimento das sementes transgênicas, acreditava-se que as lavouras demandariam menor uso de agrotóxicos. Entretanto, houve um considerável aumento do uso dos mesmos. O elevado plantio de soja transgênica em solos brasileiros tem sido o responsável pelo uso intensivo de glifosato e por um número cada vez maior de ervas daninhas resistentes ao produto, e, portanto, necessitando de mais aplicações do herbicida nas culturas (DUKE; POWLES, 2008; LONDRES, 2011).

A soja transgênica tolerante ao Roundup® representa mais de 50% de todos os transgênicos plantados em nível mundial (LONDRES, 2011; BONNY, 2015). Essa soja foi registrada e comercializada, desde 1996, sob a marca Roundup Ready® (DUKE; POWLES, 2008). A soja resistente ao glifosato foi geneticamente modificada, através da inserção do gene CP4, que codifica uma forma mutante da enzima EPSPS

presente na bactéria *Agrobacterium sp.*, no genoma da planta. Assim, a soja transgênica sintetiza os aminoácidos aromáticos, mesmo após a exposição de Roundup® (BRAKE; EVERSON, 2004; SHANER; LINDENMEYER; OSTLIE; 2012). Dessa forma, nas culturas transgênicas, resistentes ao glifosato (pós-emergentes), o herbicida pode ser aplicado em grande quantidade com o objetivo de remover as ervas daninhas, sem causar danos às plantações (POLLEGIONI; SCHONBRUNN; SIEHL, 2011). Todavia, quanto mais agrotóxicos nas lavouras, mais resíduos nos alimentos. Assim, a Anvisa alterou o limite de resíduos de glifosato em soja de 0,2 partes por milhão (ppm) para 10 ppm, ou seja, houve um aumento de 50 vezes em relação ao limite inicial permitido (LONDRES, 2011). No entanto, a real contaminação dos animais e seres humanos por resíduos de Roundup® em alimentos e água é deficientemente caracterizada (MESNAGE et al., 2015b).

Figura 3. Comparação entre o consumo total dos agrotóxicos e do herbicida glifosato no Brasil (2010-2013).



A figura representa uma expressão gráfica dos dados compilados de consumo total dos agroquímicos e do uso de glifosato em território nacional no período de 2010 a 2013. Os dados apresentados foram obtidos da página da *web* do IBAMA, disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>

Fonte: do Autor.

Conforme a soja transgênica começou a dominar o mercado mundial, os preços das sementes geneticamente modificadas tiveram um

acréscimo de 230%, comparação entre os anos de 2000 a 2010. Desse modo, o valor da semente transgênica ficou relativamente elevado em relação aos custos das sementes não transgênicas e orgânicas (BENBROOK, 2009).

Porém, mesmo com a elevação dos preços, 80% da produtividade de soja no mundo foi a partir de sementes transgênicas no ano de 2014 (BONNY, 2015). No Brasil, cerca de 80% da soja produzida é transgênica, resistente ao Roundup®. Nos Estados Unidos aproximadamente 30 milhões de hectares foram plantados em soja, sendo que 93-94% dessa produção foi a partir de soja Roundup® Ready. Já na Argentina, a semente transgênica correspondeu a quase 100% da soja cultivada (CERDEIRA, et al., 2011; BØNH et al., 2014).

3.1.1.1 Efeitos deletérios da exposição ao glifosato-Roundup® sobre a saúde humana e animal

Intoxicações agudas após a ingestão de formulações à base de glifosato são observadas em casos acidentais ou suicidas. Zouaoui et al. (2013) descreveram 13 casos de envenenamento por glifosato, entre 2002 e 2009, onde os sintomas mais comuns foram ulcerações orofaríngeas, náuseas e vômitos, além de angústia respiratória, arritmia cardíaca, hipercalemia, insuficiência renal, toxicidade hepática e alterações no estado de consciência. Já nos casos de óbito os sintomas comuns foram: choque cardiovascular, parada cardiorrespiratória, perturbação hemodinâmica, coagulação intravascular disseminada e falência múltipla dos órgãos. O estudo também demonstrou a presença de glifosato no sangue dos indivíduos, sendo que as médias das concentrações sanguíneas foram de 61 mg/L em casos leves a moderados e 4146 mg/L em casos fatais. As situações de óbito foram associadas com a elevada dose tomada (500 mL/paciente). Desse modo, mesmo com a baixa toxicidade do glifosato, nos casos de intoxicação aguda, foram relatados danos graves à saúde humana e até casos de morte (SRIBANDITMONGKOL et al., 2012; ZOUAOU et al., 2013).

Além disso, resíduos de glifosato foram encontrados na urina da população urbana europeia. Das 182 amostras, foram quantificadas concentrações detectáveis de glifosato em 44% das amostras de urina. Com um limite de quantificação de 0,15 µg/L, a amostragem obteve uma concentração média de 0,21 µg/L de glifosato (valor máximo de 1,56 µg/L) (MLHB, 2013). Vale ressaltar que esses valores representam

concentrações reais de glifosato em seres humanos que não estão diretamente expostos ao herbicida, mesmo que ainda não se possam mensurar os efeitos sobre a saúde desses indivíduos.

Pesquisadores têm demonstrado que a exposição ao Roundup® causa alterações biológicas resultando em: estresse oxidativo (GEHIN, et al., 2006; EL-SHENAWY, 2009; LARSEN et al., 2012; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013), alteração no ciclo celular (MARC, et al., 2002, 2003, 2004), na cadeia transportadora de elétrons (PEIXOTO, 2005), danos citogenéticos (LUEKEN et al., 2004; MONROY et al., 2005; GASNIER et al., 2009; CLAIR et al., 2012), danos as células hepáticas (BENEDETTI et al., 2004; ÇAGLAR; KOLANKAYA, 2008; EL-SHENAWY, 2009; LARSEN et al., 2014; MESNAGE et al., 2015a), desregulação endócrina (WALSH et al., 2000; RICHARD et al., 2005; BENACHOUR et al., 2007; CLAIR et al., 2012; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013), correlação com doenças neurodegenerativas (ANÁDON et al., 2009; WANG et al., 2011), excitotoxicidade glutamatérgica (CATTANI et al., 2014), fator de risco para o linfoma Não-Hodgkin (SCHINASI; LEON, 2014), para o autismo (NEVISON, 2014; SAMSEL; SENEFF, 2015), entre outros.

A toxicidade do Roundup® foi demonstrada pelos pesquisadores Benachour e Serálini (2009) em três diferentes tipos de células humanas. Quatro formulações à base de glifosato foram testadas em células da veia do cordão umbilical (HUVEC), células embrionárias renais (293) e linhagem celular de placenta (JEG3). As concentrações analisadas do pesticida foram menores do que as recomendadas para o uso na agricultura, sendo que todas as formulações de Roundup® promoveram morte celular em um período de 24 horas. Os mecanismos de morte celular foram a partir de necrose, com liberação de adenilato cinase citosólica e apoptose, por ativação das caspases 3/7, fragmentação de DNA, encolhimento nuclear (picnose) e fragmentação nuclear (cariorrhexe).

Além de efeitos tóxicos em células humanas, Roundup® apresenta potencial efeito teratogênico. Em 2003, Dallegre e colaboradores avaliaram a teratogenicidade do herbicida à base de glifosato em ratos Wistar. As ratas gestantes foram tratadas com glifosato em diferentes dosagens (500, 750 ou 1000 mg/kg) na água de beber do 6º ao 15º dia de gravidez. No 21º dia foi realizada cesariana nessas ratas e os resultados mostraram que 57,3% dos fetos

apresentaram alterações esqueléticas após o tratamento com a dosagem mais elevada de glifosato.

Posteriormente, Paganelli et al. (2010) mostraram que embriões de sapos (*Xenopus laevis*) tratados com uma diluição 1/5000 de herbicida à base de glifosato apresentaram malformações embrionárias. Além disso, concentrações um pouco maiores (1/3500 ou 1/4500) desse agrotóxico também foram suficientes para induzir alterações em embriões de galinha. Portanto, os efeitos do glifosato sobre os primeiros mecanismos de morfogênese em embriões de vertebrados causam preocupações quanto aos achados clínicos em neonatos de populações expostas de forma ocupacional.

Além dos agricultores estarem expostos ao glifosato, a população no geral se expõe de forma indireta ao agente químico, através da ingestão de alimentos ou de águas contaminadas. Mesmo porque em âmbito nacional, não há limites legais estabelecidos para o glifosato em águas (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002).

Um estudo demonstrou as consequências à saúde de ratos tratados com milho transgênico tolerante ao Roundup® e/ou com água potável contendo uma concentração $\geq 0,1$ partes por bilhão (ppb) de Roundup® (equivale a 50 ng/L de glifosato) durante 2 anos. Os resultados revelaram patologias renais graves nos animais expostos ao glifosato, a partir da alimentação e/ou água. As fêmeas apresentaram maior incidência de tumores mamários, e o segundo órgão com maiores disfunções foi a hipófise. Os machos possuíram aumento da congestão hepática e necrose, e aparecimento de tumores palpáveis a partir do 4º mês de tratamento. Também se observou diminuição na sobrevivência dos animais tratados de ambos os sexos (SERÁLINI et al., 2014). Os dados mostram que a exposição crônica ao Roundup® pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer. Dessa forma, esses dados induzem a reflexão se glifosato seria mesmo seguro à saúde humana e animal.

Recentemente, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), vinculada à Organização Mundial de Saúde, classificou o herbicida glifosato como provavelmente cancerígeno para os seres humanos (Grupo 2A). Ou seja, existe uma evidência limitada de carcinogenicidade em humanos e há evidências suficientes de que o glifosato pode causar câncer em animais de laboratório (GUYTON et al., 2015).

No Brasil, as formulações contendo glifosato são classificadas pela Anvisa em classe toxicológica IV (pouco tóxico) e em classe de periculosidade ambiental III (produto perigoso ao meio ambiente). Em 2008, a Anvisa determinou a reavaliação toxicológica dos produtos à base de glifosato, em conjunto com a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A Fundação concluiu que as evidências eram insuficientes para propor o banimento e indicou a necessidade de novos estudos. Todavia, a Anvisa informou que diante da classificação do glifosato pela IARC, a agência procederá com a análise do ingrediente ativo (ANVISA, 2015).

3.1.1.2 Ação do glifosato-Roundup® no sistema hepático

Muitos agentes químicos podem induzir danos nos sistemas biológicos, incluindo o fígado, que é o principal local do organismo para processos de biotransformação e detoxificação dessas substâncias. Inclusive, diversos estudos vêm investigando os efeitos deletérios de glifosato-Roundup® sobre as células hepáticas.

Daruich e colaboradores (2001) avaliaram as consequências da exposição de 0,5% ou 1% glifosato na água de beber em ratas prenhas a partir da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase presentes no fígado. Os resultados demonstraram que a exposição ao agroquímico durante o período gestacional induziu a uma variedade de anormalidades funcionais na atividade enzimática das ratas grávidas e de seus fetos.

Posteriormente, Benedetti et al. (2004) analisaram os efeitos hepáticos em ratos Wistar adultos após o tratamento subcrônico com diferentes concentrações de glifosato-Biocarb® diluídos em água, e demonstraram que baixas doses de glifosato já promovem o extravasamento de enzimas hepáticas intracelulares, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), sugerindo que a exposição ao herbicida causa danos irreparáveis aos hepatócitos. Outro estudo também observou que o tratamento subcrônico com ratos adultos a partir de altas e baixas doses de Roundup® levou a alterações sobre a atividade da ALT, AST e LDH (lactato desidrogenase), indicando toxicidade hepática induzida pelo herbicida (ÇAGLAR; KOLANKAYA, 2008).

Como consequência da intoxicação hepática, Roundup® pode desencadear alterações na atividade de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, como as enzimas pertencentes ao sistema do citocromo P450 (CYP). As enzimas CYP1A1/2 e CYP3A foram inibidas em ratos adultos do sexo masculino a partir de 0,7 ppm de glifosato dissolvidos em água, após exposição de 90 dias (LARSEN et al., 2014). No entanto, as mesmas enzimas CYP1A1/2 e CYP3A tiveram suas atividades aumentadas, após ratos serem expostos por 2 anos a formulações a base de glifosato em concentrações tão baixas quanto 0,1 ppb do herbicida na água potável (SÉRALINI et al., 2014).

Possíveis efeitos tóxicos ao fígado após à exposição ao glifosato e suas formulações também já foram relatados em peixes. O uso intensivo de pesticidas na agricultura pode contaminar o habitat aquático, resultando em desequilíbrio ecológico e podendo causar danos aos organismos não alvos, inclusive peixes de importância comercial (ORUÇ; SEVGILER; UNER, 2004).

Sinhorin e colaboradores (2014) investigaram as consequências da exposição aguda ao Roundup® sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em peixes (*Pseudoplatystoma* sp.). Esses foram expostos a diferentes concentrações do herbicida (2,25, 4,5, 7,5 e 15 a.p mg.L⁻¹) durante 96 horas. Os dados demonstraram aumento na concentração de MDA e de proteína carbonilada no fígado, e uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes hepáticas. Os autores mencionam que TBARS e proteína carbonilada poderiam ser marcadores de danos oxidativos precoces da exposição ao glifosato na espécie de peixe estudada.

Apesar de estudos demonstrarem alterações em enzimas hepáticas, após a exposição ao glifosato-Roundup®, existem dados controversos, além de poucos resultados demonstrando como o glifosato pode induzir toxicidade sobre o tecido hepático de filhotes de ratos após exposição no período gestacional e lactacional.

3.2 FÍGADO

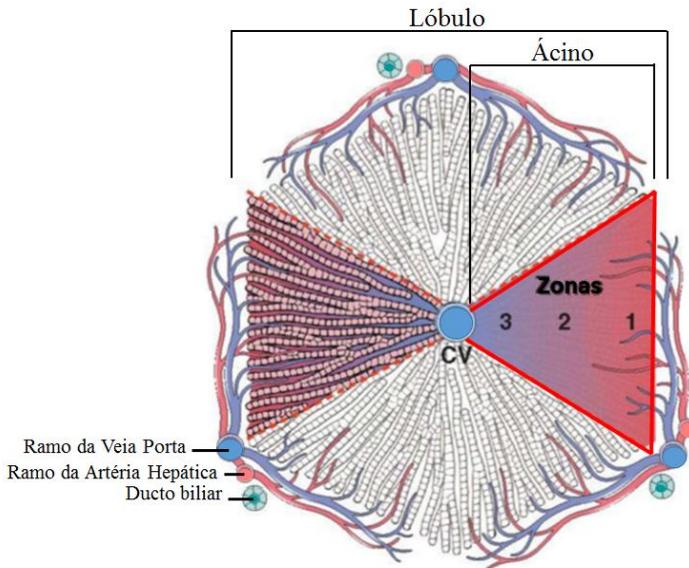
O fígado apresenta um espectro extraordinário de funções, ao ser responsável por manter a homeostasia e as funções fisiológicas do organismo (MARONPOT et al., 2010). Anatomicamente, o fígado é dividido em quatro lobos, tendo como base seu aspecto externo. Os dois

lobos principais são o direito e o esquerdo, na face anterior localiza-se o lobo quadrado e situado na face posterior o lobo caudado (MISDRAJI, 2014).

A circulação sanguínea desse órgão é composta de duas fontes: 25% do fluxo provêm da artéria hepática (enriquecido em oxigênio) e os 75% restantes da veia porta (rica em nutrientes) (ADAMS; EKSTEEN, 2006; COLNOT; PERRET, 2011). Desse modo, o fígado pode controlar quais substâncias absorvidas pelo intestino irão entrar e como entrarão na circulação sistêmica (BARRIT; CHEN; RYCHKOV, 2008).

Do ponto de vista morfológico, o fígado está dividido em lóbulos hexagonais, compostos por uma veia central (também denominada vênula hepática terminal), no centro de cada lóbulo e por tríades portais (ou tratos portais) em três a seis cantos do lóbulo (Figura 4). A tríade portal consiste em um ramo da vênula da veia porta, um ramo da arteríola da artéria hepática e um ducto biliar (TSUNG; GELLEL, 2011; JAESCHKE, 2012).

Figura 4. Arquitetura hepática microscópica.



Fonte: Adaptado de Kumar e colaboradores (2010).

A unidade funcional do fígado é o ácino. A base do ácino é formada por ramos terminais da veia porta e da artéria hepática, que se

estendem a partir da tríade portal e na periferia do ácino encontra-se a vênula hepática terminal. Os ácinos são divididos em três zonas, essas são distintas em relação ao gradiente de componentes sanguíneos. A zona 1 (zona periportal) é a mais próxima da entrada de sangue com alto teor de oxigênio e rica em nutrientes, a zona 2 é a área intermediária e a zona 3 (zona perivenular) recebe sangue com baixas concentrações de oxigênio e poucos nutrientes, sendo adjacente à veia central (CV). Essa heterogeneidade ao longo do ácino gera gradiente de função metabólica e diversidade estrutural ao fígado (KUNTZ; KUNTZ, 2008; JAESCHKE, 2012; MISDRAJI, 2014).

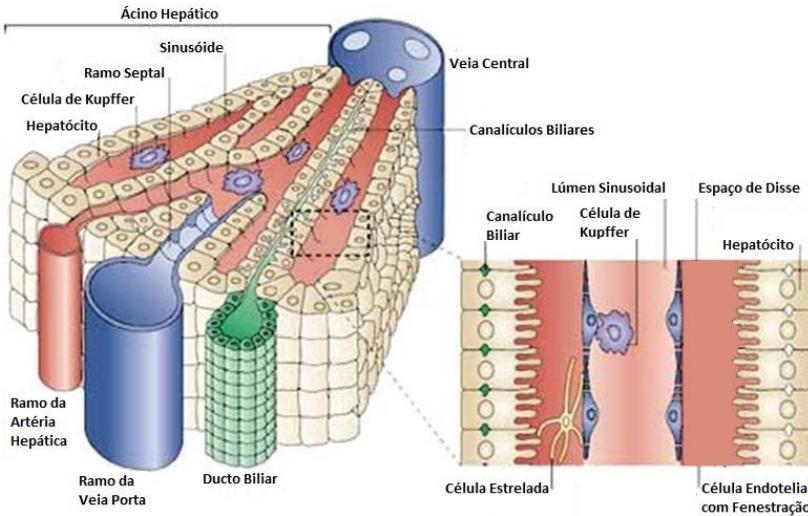
A maior parte do fígado é constituída por hepatócitos ou células parenquimatosas, essas células estão dispostas radialmente a partir de uma veia central com sinusoides separando as placas celulares (Figura 5). Os sinusoides são capilares que transportam o sangue a partir da veia porta e da artéria hepática para a veia central e são revestidos pelas células endoteliais fenestradas, no lúmen sinusoidal estão os macrófagos hepáticos, denominados de células de Kupffer. Entre os hepatócitos e as células endoteliais hepáticas sinusoidais, situa-se um espaço, designado de espaço de Disse, onde se localizam as células estreladas (também nomeadas de células do Ito) (ADAMS; EKSTEEN, 2006; MIZUGUCHI et al., 2011, TSUNG; GELLEL, 2011; ROY-CHOWDHURY; ROY-CHOWDHURY, 2014).

Os hepatócitos compõem 60% da população de células hepáticas e representam 80% do volume total do fígado, essas células são poliédricas e com cerca de 20-30 μm de diâmetro. Os hepatócitos executam a maioria das funções exercidas pelo fígado. Na microscopia eletrônica as células hepáticas mostram-se com um núcleo grande e redondo, rico em organelas citoplasmáticas, incluindo retículo endoplasmático liso e rugoso, e muitas mitocôndrias, além de grânulos densos de glicogênio por todo o citoplasma (SOTO-GUTIERREZ; NAVARRO-ALVAREZ, KOBAYASHI, 2011; ROY-CHOWDHURY; ROY-CHOWDHURY, 2014).

As células epiteliais hepáticas apresentam como característica principal a presença de fenestrações (poros) por toda a célula, formando uma lâmina em peneira. Essas fenestrações possuem diâmetro de 100 nm (seres humanos) e 160 nm (ratos). No entanto, o diâmetro pode variar, uma vez que quanto mais próximo o sinusóide da veia central, maior o número de fenestrações e menor o diâmetro dos poros. A presença de frestas e a falta de membrana basal nas células epiteliais

hepáticas permitem regular a permutação de fluidos e moléculas entre os sinusóides e os hepatócitos (HUEBERT; SHAH, 2010; STOLZ, 2011; JAESCHKE, 2012).

Figura 5. Estrutura tridimensional do ácino hepático.



Fonte: Adaptado de Adams e Eksteen (2006).

As células de Kupffer são os macrófagos residentes do fígado, constituem 80-90% da população total de macrófagos presentes no organismo. A função primordial das células de Kupffer é a fagocitose, sendo as primeiras células do sistema fagocítico a terem contato com substâncias antigênicas oriundas do trato gastrointestinal. Além disso, essas células apresentam as funções de pinocitose; remoção de toxinas, antígenos, complexos anticorpo-antígeno e purinas; e também são fontes de substâncias sinalizadoras (p.ex. citocinas e fatores de crescimento) (KUNTZ; KUNTZ, 2008; STEIB; GERBES, 2010; ROY-CHOWDHURY; ROY-CHOWDHURY, 2014).

As células estreladas hepáticas são também denominadas de células do Ito, células armazenadoras de lipídeos ou lipócitos. Essas células estão envolvidas no metabolismo e armazenamento de retinóides (vitamina A), e acumulam no seu citoplasma gotículas lipídicas ricas em vitamina A. Após um dano hepático crônico, as células estreladas são

ativadas em miofibroblastos. Desse modo, essas células eliminam retinoides e suprarregulam a produção de componentes da matriz extracelular, como colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas de aderência. A ativação das células estreladas desempenha um importante papel na fibrose hepática (KUNTZ; KUNTZ, 2008; MARRA et al., 2010; ROY-CHOWDHURY; ROY-CHOWDHURY, 2014).

Além da diversificação celular, o fígado exerce múltiplas funções, sendo a maioria realizada pelos hepatócitos, e podem-se destacar: metabolismo dos carboidratos (síntese de glicose; armazenamento de glicogênio), metabolismo proteico (formação de aminoácidos não essenciais; síntese de proteínas plasmáticas: albumina, fibrinogênio, globulinas, fatores de coagulação; conversão de amônia em ureia), metabolismo lipídico (produção de colesterol, fosfolipídios e a maioria das lipoproteínas; oxidação de ácidos graxos, conversão do excesso de carboidratos e proteínas em ácidos graxos), armazenamento de vitaminas (vitaminas lipossolúveis: A, D, E e K, ácido fólico e vitamina B₁₂;) e metais (ferro, na forma de ferritina e cobre), formação da bile (importante na emulsificação dos lipídeos pelos sais biliares), excreção de bilirrubina (substância derivada da degradação da hemoglobina), biotransformação de substâncias endógenas (hormônios) e xenobióticos (KUNTZ; KUNTZ, 2008; SOTO-GUTIERREZ; NAVARRO-ALVAREZ, KOBAYASHI, 2011; APPLGATE, 2012).

3.2.1 Biotransformação de xenobióticos

O fígado é o órgão central na biotransformação de xenobióticos do organismo. Roundup® é considerado um xenobiótico por ser um composto químico estranho ao organismo. As principais funções exercidas pelo fígado podem ser modificadas pela exposição de substâncias químicas exógenas, seja pela exposição aguda ou crônica. Como efeito, as células hepáticas expostas a concentrações significantes de substâncias exógenas podem apresentar disfunções hepáticas e até lesões celulares (JAESCHKE, 2012). Desse modo, xenobióticos podem ser definidos com substâncias potencialmente hepatotóxicas (KUNTZ; KUNTZ, 2008).

O termo biotransformação frequentemente se refere à conversão enzimática de substâncias hidrofóbicas em metabólitos hidrossolúveis,

tornando-as mais fáceis de serem excretadas na bile ou urina. Contudo, reações enzimáticas são capazes de transformar determinadas substâncias em espécies químicas altamente reativas que podem induzir dano tecidual indesejado. Isto demonstra que a detoxificação hepática não é igual para todas as substâncias (APTE; KRISHNAMURTHY, 2011).

A maioria das enzimas biotransformadoras de xenobióticos do fígado localizam-se nos hepatócitos. Dessa forma, os hepatócitos são o foco dos sistemas de desintoxicação não só do fígado, mas também de todo o corpo. Sendo que a biotransformação dos compostos químicos exógenos é dividida em fase I e fase II (Figura 6). A fase I ou fase inicial expõem ou inserem grupos polares (tais como -OH, -COOH, -SH ou -NH₂) na substância hidrofóbica, transformando-a mais hidrofílica por meio de enzimas envolvidas em reações de oxidação, hidrólise e redução (KUNTZ; KUNTZ, 2008; APTE; KRISHNAMURTHY, 2011).

No entanto, metabólitos produzidos por reações oxidativas na fase I, podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) que são imensamente tóxicas aos hepatócitos (DiGIULIO et al., 1989). As EROs podem ser neutralizadas pelo sistema antioxidante enzimático ou não enzimático do fígado e caso tenha um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes hepáticas e a produção de espécies reativas de oxigênio é possível que haja estresse oxidativo com conseqüente lesão celular e tecidual (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

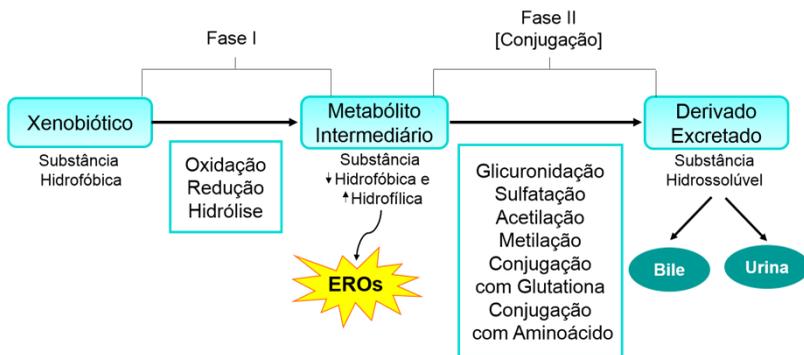
Já na fase II, adiciona-se um resíduo hidrofílico no metabólito produzido na fase I por meio de conjugação com uma substância endógena catalisada por transferases específicas. As reações de conjugação incluem glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com aminoácidos e conjugação com glutathione (KUNTZ; KUNTZ, 2008; APTE; KRISHNAMURTHY, 2011).

Acredita-se que a eliminação do Roundup® possa ser via conjugação com a glutathione reduzida (GSH) através da reação catalisada pela glutathione-S-transferase (GST) para então detoxificar esse xenobiótico. A GSH é o principal antioxidante não enzimático do organismo e o fígado é o órgão mais ativo em sua síntese. Além disso, o fígado é abundante na enzima GST (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A GST é a enzima responsável pela produção do conjugado (GSH/xenobiótico) que posteriormente irá passar por diversos processos

até finalmente o xenobiótico ser excretado pela bile ou urina (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Pesquisadores demonstraram que a exposição ao Roundup® em culturas de células humanas e em tecidos de animais (como ratos e peixes) alteram a GSH e a enzima GST, provavelmente como forma de detoxificação desse composto químico (GEHIN; GUYON; NICOD, 2006; EL-SHENAWY, 2009; MENEZES et al., 2011).

Figura 6. Representação esquemática das fases de biotransformação.



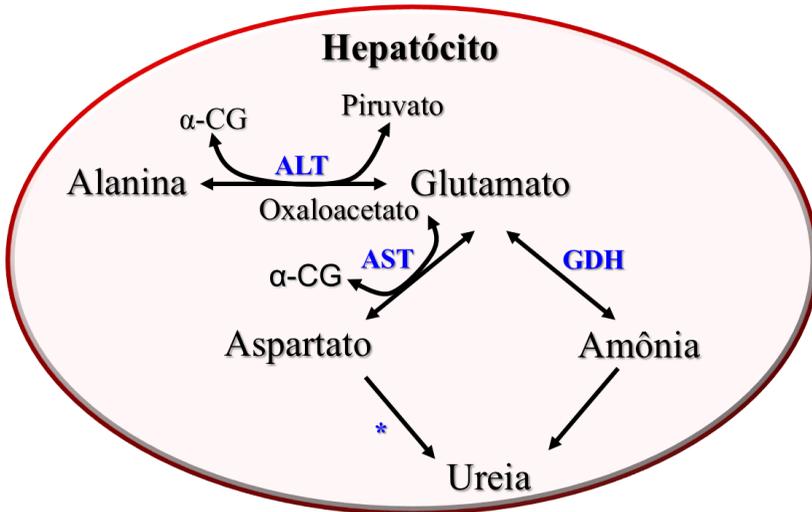
Fonte: do Autor.

3.3 FUNÇÕES DAS AMINOTRANSFERASES NO FÍGADO

No fígado, as aminotransferases são enzimas que desempenham uma importante função no metabolismo dos aminoácidos (BARBOSA et al., 2010b). Essas enzimas catalisam reações nas quais o grupo α -amino de um aminoácido é transferido para o α -cetoglutarato (α -CG), produzindo o α -cetoácido correspondente ao aminoácido e L-glutamato. Assim, o objetivo da transaminação é coletar os grupos amino dos mais diversos aminoácidos e formar apenas um, o L-glutamato (ADEVA et al., 2012).

As reações de transaminação são reversíveis e dependendo do estado energético da célula hepática (Figura 7) (COOPER, 2011), o glutamato funciona como doador de grupos amino para vias de excreção que leva à eliminação de produtos nitrogenados (amônia) ou serve como doador para vias biosintéticas (síntese de ureia) (FELIG, 1973; COOPER, 2011).

Figura 7. Representação esquemática do papel das aminotransferases no fígado



*Enzimas do ciclo da ureia.

Alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e glutamato desidrogenase (GDH) catalisam reações reversíveis no fígado. Portanto, essas enzimas podem agir na síntese ou catabolismo de alanina e aspartato, conforme a necessidade da célula hepática (COOPER, 2011).

Fonte: do Autor.

A amônia (NH_3) em excesso, gerada pelos tecidos extra-hepáticos é transportada para o fígado para posteriormente ser convertida em ureia e então eliminada pelos rins. Como a amônia é muito tóxica ao organismo, a alanina tem papel central de transportador de grupos aminos (NH_3) em uma forma não tóxica dos tecidos periféricos ao fígado (FELIG, 1973).

O glutamato das células extra-hepáticas transfere seu grupo α -amino para o piruvato originando α -cetoglutarato e alanina. A alanina formada é transportada pelo sangue ao fígado. Quando a alanina chega aos hepatócitos, a alanina aminotransferase (ALT) hepática transfere o grupo α -amino da alanina para o α -cetoglutarato, formando piruvato e glutamato (ADEVA et al., 2012). Essa reação acontece já que a amônia não pode participar do ciclo da ureia diretamente a partir de qualquer

aminoácido, mas pode ser doada pelo glutamato. Então, a enzima glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a desaminação do glutamato em α -CG, removendo o grupo amino (NH_3) do glutamato e liberando o para o ciclo da ureia. Enquanto que o esqueleto carbônico da alanina é utilizado na síntese de glicose hepática a partir do piruvato (gliconeogênese) (FELIG, 1973; KUNTZ; KUNTZ, 2008).

A reação inversa ocorre quando existe a necessidade de um determinado aminoácido para uma rota biosintética. Como no caso do grupo α -amino do glutamato ser transferido ao oxaloacetato produzindo α -cetoglutarato e aspartato, em uma reação catalisada pela aspartato aminotransferase (AST) (ADEVA et al., 2012). O aspartato produzido doa o grupo α -amino para o ciclo da ureia que acontece no fígado, dessa forma o aspartato atua como uma fonte de nitrogênio para síntese de ureia, que será excretada do organismo como um metabólito não tóxico (COOPER, 2011). Já o α -CG produzido, pode ser oxidado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA).

A alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) são aminotransferases de interesse clínico. A ALT, exclusivamente citoplasmática e a AST, presente tanto na forma mitocondrial quanto citoplasmática, são enzimas muito ativas no fígado (VROON; ISRAILL, 1990). Assim, quando as aminotransferases são detectadas (com atividade aumentada) no soro tornam-se sugestivas de lesões no fígado, uma vez que extravasam dos hepatócitos lesionados e passam para a corrente sanguínea. Dessa forma, ALT e AST são utilizadas na clínica como marcadores bioquímicos de danos hepáticos (ÇAVUŞOĞLU et al., 2011).

3.4 CÁLCIO COMO UMA MOLÉCULA SINALIZADORA NO TECIDO HEPÁTICO

Ca^{2+} livre intracelular é um segundo mensageiro muito versátil que regula uma grande variedade de funções em todos os tipos de células e tecidos (BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; AMAYA; NATHANSON, 2013). Esse íon é responsável pela conversão de estímulos externos em ações específicas dando origem a respostas biológicas importantes (ZAMONER et al., 2007).

A concentração de cálcio livre no citosol das células é normalmente muito baixa ($\sim 10^{-7}$ M); no entanto, a concentração no

fluido extracelular ($\sim 10^{-3}$ M) e no lúmen do retículo endoplasmático (RE) é alta. Desse modo, há um elevado gradiente que tende a conduzir o Ca^{2+} para o interior do citosol, através da membrana plasmática, bem como a partir da membrana do RE. O RE é a principal reserva de cálcio intracelular, ao passo que as mitocôndrias formam e decodificam sinais celulares de Ca^{2+} , liberando esse íon (ALBERTS et al., 2015).

O aumento na concentração de cálcio intracelular ocorre via canais de Ca^{2+} , que estão divididos em cinco subtipos: dependentes de voltagem, operados pela proteína G, operados por receptores, operados por segundos mensageiros e ativados pela liberação de Ca^{2+} (RÉCASENS; VIGNES, 1995). Enquanto que há pelo menos dois mecanismos que bombeiam cálcio para fora da célula, que são denominados de bomba Ca^{2+} -ATPase e o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, ambos mecanismos vão contra um gradiente de concentração de cálcio (PETERSEN; PETERSEN; KASAI, 1994).

Muitas das funções do fígado são reguladas por aumentos de Ca^{2+} intracelular. Isso inclui tráfego vesicular e contração canalicular, os quais são regulados por cálcio citosólico e participam do controle da secreção biliar (AMAYA; NATHANSON, 2014); metabolismo energético e da glicose ocorrem através da modulação da atividade enzimática reguladora, bem como por alterações na concentração de Ca^{2+} na matriz mitocondrial (BARTLETT et al., 2014); controle do ciclo celular, inclui a modulação da transcrição de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas que regulam a proliferação e morte celular, os quais são regulados por Ca^{2+} nuclear (RODRIGUES et al., 2007; AMAYA; NATHANSON, 2013).

Dessa forma, embora o cálcio seja fundamental à manutenção da vida, um aumento prolongado na concentração intracelular desse íon induz a célula à morte (PRADO, 2001). De tal modo que a desregulação nos mecanismos homeostáticos dependentes da concentração de cálcio podem levar a doenças, como o carcinoma hepatocelular (tumor maligno primário de fígado) (BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; AMAYA; NATHANSON, 2013).

Após expor as principais funções do Ca^{2+} nas células hepáticas, alterações na concentração intracelular desse íon podem estar envolvidas em mecanismos de toxicidade hepática de animais expostos ao glifosato-Roundup®.

3.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre os mecanismos oxidativos e os sistemas de defesa antioxidantes das células (ZHU et al., 2012). Esse desequilíbrio acontece quando as formas reativas de oxigênio são produzidas mais rapidamente do que podem ser neutralizadas pelos mecanismos antioxidantes (SIES, 1991) e/ou a partir da diminuição das defesas antioxidantes. Tal processo pode levar a danos de macromoléculas biológicas e à desregulação da fisiologia e do metabolismo celular (TREVISAN et al., 2001). Essa condição pode contribuir e/ou induzir ao aparecimento de problemas de saúde (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993).

O estresse oxidativo tem sido implicado em várias condições patológicas envolvendo doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, isquemia/reperfusão, bem como no processo de envelhecimento (DHALLA; TEMSAH; NETTICADAN, 2000; SAYRE; SMITH; PERRY, 2001; DALLE-DONNE et al., 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Além disso, estresse oxidativo desempenha uma importante função em muitas doenças relacionadas ao fígado. Em muitos casos, excessivo estresse oxidativo contribui para achados patológicos e progressão de doenças e serve como um indicador de prognóstico de doenças hepáticas (ZHU et al., 2012).

3.5.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio

Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), radical livre (RL) é qualquer átomo, molécula ou fragmento molecular contendo um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica. A presença de elétrons não emparelhados geralmente confere alta reatividade a esse átomo ou molécula, além de possuir uma configuração química que o torna instável com tempo de meia-vida curto.

Os radicais livres, uma vez formados, reagem com outras moléculas a partir de reações de oxi-redução com o intuito de estabilizar a sua configuração eletrônica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os RL cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) e quando centrados nos átomos de nitrogênio são chamados de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (VISIOLI; BORSANI; GALLI; 2000),

essas espécies representam a classe mais importante de radicais gerados em sistemas vivos (VALKO et al., 2004).

As EROs estão disseminadas em dois grupos, as radicalares, dentre essas, as de maior interesse do ponto de vista biológico estão o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), radical hidroperóxil (HOO^{\cdot}) radical peróxil (ROO^{\cdot}) e radical alcóxil (RO^{\cdot}); e as não-radicalares, oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso ($HOCl$). Dentre as ERNs radicalares estão o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o radical dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}) e as espécies não radicalares estão os peroxinitritos ($ONOO^-$) (SÁNCHEZ, 2012).

EROs / ERNs têm a capacidade de apresentar um papel duplo em sistemas biológicos, uma vez que podem ser prejudiciais ou benéficos para o organismo (VALKO et al., 2004). Os efeitos benéficos de EROs envolvem funções fisiológicas em respostas celulares, como na defesa contra agentes infecciosos e na função de inúmeros sistemas de sinalização celular. Além disso, baixas a moderadas concentrações de EROs podem induzir mutações em determinados genes para se adaptar às mudanças ambientais. Entretanto, altas concentrações de EROs são prejudiciais aos sistemas vivos, uma vez que induzem a lesões de células e tecidos normais (POLI et al., 2004; ZHU et al., 2012).

3.5.1.1 Mecanismo de geração de espécies reativas de oxigênio

As EROs podem ser produzidas a partir de substâncias exógenas e endógenas. Dentre as fontes exógenas têm-se: radiações ionizantes (radiação ultravioleta, raios-X e raios gama), poluentes da atmosfera, tabagismo e xenobióticos (VALKO et al., 2006; CASAS-GRAJALES; MURIEL, 2015).

A formação de EROs endógena ocorre principalmente na mitocôndria, através dos produtos intermediários da cadeia respiratória, pela redução incompleta do oxigênio a água (INOUE et al., 2003). Na mitocôndria, na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a enzima citocromo oxidase remove um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo c, oxidando-as e adicionam os quatro elétrons ao oxigênio, promovendo a redução tetravalente do mesmo, para formar água. No entanto, 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias, são reduzidos de forma univalente e geram espécies reativas de oxigênio, com produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KOURY; DONANGELO, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Outro mecanismo endógeno de geração de espécies reativas é a reação de EROs com metais de transição como o ferro e o cobre. Esses íons são muito ativos em reações de oxido-redução. O ciclo redox desses metais promove a reação de Fenton e Haber-Weiss (KOURY; DONANGELO, 2003). Na reação de Fenton ocorre a geração de $\cdot\text{OH}$, por meio da reação do H_2O_2 com esses íons, e na reação de Haber-Weiss, esses íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot-}$, a fim de gerar o $\cdot\text{OH}$ (BARBOSA et al., 2010a). O $\cdot\text{OH}$ é considerado o radical mais reativo presente nos sistemas biológicos, sendo que não existem sequestradores específicos *in vivo* para essa espécie radicalar (SÁNCHEZ, 2012). O ferro é o metal pesado mais abundante no organismo, o Fe^{3+} é transportado no soro pela transferrina e armazenado no tecido ligado a proteína apoferritina, e o conjunto proteína associado ao ferro denomina-se ferritina (ANDREWS, 1999). Desse modo, agentes redutores podem facilitar a redução de Fe^{3+} ligado a proteína e formar Fe^{2+} , que está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas do que o cobre (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As espécies reativas também podem ser formadas a partir de fagócitos ativados em reações inflamatórias, macrófagos (como as células de Kupffer) e neutrófilos, os quais produzem EROs a partir das enzimas NADPH oxidase e mieloperoxidase. Ou ainda, as EROs são produzidas através de reações bioquímicas de oxidação/redução dependentes de O_2 , sendo que diversas enzimas são capazes de produzir espécies parcialmente reduzidas de oxigênio com uma elevada reatividade durante a catálise, dentre elas estão: monoamino oxidase, xantina oxidase, ciclooxigenases e lipooxigenases, óxido nítrico sintase, aminoácido oxidases, orotato redutase e glicose oxidase (SÁNCHEZ, 2012).

3.6 DANO OXIDATIVO E O FÍGADO

O fígado tem papel central na homeostase metabólica, por ser responsável pelo metabolismo, síntese, armazenamento e distribuição de nutrientes (TAUB, 2004). Também é um importante local para a formação de espécies reativas, uma vez que substâncias endógenas ou xenobióticas são metabolizadas nesse órgão (WEBB; TWEDT, 2008).

Desse modo, em condições fisiológicas as células hepáticas funcionam para manter a produção das espécies reativas em equilíbrio e assim evitar lesão tecidual (ZHU et al., 2012). No entanto, em condições patológicas a concentração de EROs aumenta e esse processo pode ser o

mediador de danos nas estruturas celulares do fígado, incluindo oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (VALKO et al., 2006). Danos oxidativos ao fígado têm sido observados após a exposição de ratos ao xenobiótico glifosato-Roundup® (SINHORIN et al., 2014).

Os danos envolvendo a oxidação de lipídeos são denominados de lipoperoxidação (LPO) e podem ser definidos como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares (BENZIE, 1996). A LPO resulta na formação de derivados tóxicos, sendo um dos principais produtos o malondialdeído (MDA) (GROTTO et al., 2007).

Concentração elevada de MDA serve como um indicador dos possíveis danos à membrana das células (PARVEZ; RAISUDDIN, 2005). Além disso, MDA é considerado mutagênico em células de mamífero e carcinogênico em ratos (VALKO et al., 2007).

As espécies reativas também podem causar danos às proteínas, e frequentemente é mensurado pelo aumento da concentração de proteínas carboniladas (PARVEZ; RAISUDDIN, 2005). Grupos carbonil são introduzidos nas proteínas por diversas vias oxidativas (DALLE-DONNE et al., 2006). Dessa forma, proteína carbonilada é utilizada como um biomarcador de dano oxidativo (SÁNCHEZ, 2012).

Modificações nas proteínas endógenas por radicais livres não somente resultam em prejuízo da função celular, mas também excessiva ativação do sistema imune, podendo levar a doenças autoimunes (ORTONA et al., 2008). Diversas transduções de sinais intracelulares dependem da estrutura e função normal das proteínas, e as EROs podem oxidar os aminoácidos contidos nas enzimas, tornando-as inativas ou antigênicas (WEBB; TWEDT, 2008).

Considerando a importância de baixas concentrações das espécies reativas, alterações na concentração de EROs induzem danos a lipídeos e proteínas, sendo as modificações das macromoléculas indicadoras de prognóstico de doenças associadas ao fígado.

3.7 MECANISMO DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO TECIDO HEPÁTICO

Antioxidante é definido como uma substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação à um substrato oxidável, atrasa ou evita significativamente a oxidação do mencionado substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os antioxidantes podem agir por eliminar as espécies reativas ao prevenir a sua geração ou ao reparar os danos causados pelos mesmos (HALLIWELL, 1991). Desse modo, os efeitos nocivos das EROs e ERNs são equilibrados pela ação dos antioxidantes que envolvem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (ZHU et al., 2012).

Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa celular destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx). A SOD está em elevada concentração no fígado, sendo a primeira linha de defesa enzimática. Essa enzima catalisa a dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) altamente reativo em O_2 e em uma espécie menos reativa o H_2O_2 , o qual pode ser metabolizado pelas enzimas CAT ou GPx (MATÉS; PÉREZ-GOMES; NÚNES DE CASTRO, 1999). Ambas as enzimas são abundantes no tecido hepático em relação aos demais tecidos do organismo, no entanto, a CAT apresenta maior atividade no fígado do que a GPx (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A CAT catalisa diretamente a decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio molecular. Enquanto a GPx remove o H_2O_2 utilizando a glutationa reduzida (GSH) como doadora de elétrons. Dessa forma, GPx reduz o H_2O_2 à água ao oxidar duas moléculas de GSH e formar glutationa oxidada (GSSG) (VALKO et al., 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; PANDEY; RIZVI, 2010).

A GSH é o principal antioxidante não enzimático da homeostase intracelular redox e exibe numerosas funções versáteis (CHEN et al., 2013). A glutationa é um tripeptídeo, γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina, formado por glutamato, cisteína e glicina, seu grupo ativo é representado pelo tiol (-SH) do resíduo de cisteína. A GSH é produzida em todos os órgãos, especialmente no fígado. É um tiol não proteico de baixo peso molecular, importante na defesa das células contra o estresse oxidativo (OOKHTENS; KAPLOWITZ, 1998; WU et al., 2004).

As principais funções de proteção da GSH ao combate de danos oxidativos são: age como cofator de enzimas desintoxicantes, assim a GSH pode conjugar uma variedade de compostos endógenos e xenobióticos, resultando na eliminação segura e eficiente dessas substâncias do organismo (RINALDI et al., 2002); participa do transporte de aminoácidos através da membrana plasmática (PASTORE et al., 2003); elimina o radical hidroxila e oxigênio singlete diretamente e desintoxica peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos pela ação catalítica da enzima GPx (ARTHUR, 2000); por fim, GSH é capaz de regenerar antioxidantes não enzimáticos exógenos importantes, tais

como vitaminas C e E, de volta às suas formas ativas (PASTORE et al., 2003).

A capacidade de glutathiona em regenerar os antioxidantes está relacionada com o estado redox do par glutathiona reduzida e glutathiona oxidada (GSH/GSSG) (PASTORE et al., 2003). A taxa intracelular de GSH/GSSG precisa continuamente se manter alta, uma vez que menos de 0,5% se encontra como GSSG (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SÁNCHEZ, 2012). Para isso, a GSSG pode ser secretada da célula e degradada extracelularmente ou GSSG pode ser reduzida a GSH pela ação da enzima glutathiona redutase (GR) utilizando NADPH como doador de elétrons (MASELLA et al., 2005).

Quem fornece os equivalentes redutores (NADPH) para a regeneração da GSH é a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Essa enzima está presente em grandes quantidades nos eritrócitos e em quantidades menores no fígado. A G6PD participa da primeira reação na via das pentoses fosfato, ao catalisar a oxidação de glicose-6-fosfato (G-6-P) a 6-fosfogliconato e reduzir simultaneamente NADP^+ a NADPH (ABD ELLAH; OKADA; YASUDA, 2007). Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, a função antioxidante da GSH fica prejudicada, uma vez que a glutathiona não consegue ser regenerada, causando sérios danos ao metabolismo celular. Desse modo, a G6PD é considerada uma enzima antioxidante coadjuvante (SLEKAR; KOSMAN; CULOTTA, 1996).

Uma enzima que utiliza a GSH como cofator na detoxificação hepática e excreção de xenobióticos e substâncias endógenas é a glutathiona-S-transferase (GST) (WILCE; PARKER; 1994). Ela compreende uma família de enzimas multifuncionais e são particularmente ricas no fígado (BOYER, 1989). A GST catalisa a adição nucleofílica do tiol (-SH) da GSH aos grupos eletrofílicos de compostos orgânicos (xenobióticos e compostos fisiológicos), o que torna os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a excreção do organismo (WILCE; PARKER; 1994). No entanto, em alguns casos os produtos são mais tóxicos que a própria substância inicial (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

A GST atua na estratégia de defesa celular em combate aos xenobióticos. O conjugado GSH/xenobiótico formado após a ação da GST é reconhecido por transportadores específicos e levado para o meio extracelular. No meio extracelular esse conjugado é clivado pela ação da γ -glutamil transferase (GGT) e dipeptidases presentes na porção externa da membrana celular. O glutamato e a glicina livres, derivados da

degradação da GSH, podem ser reabsorvidos da célula e reutilizados na síntese *de novo* da GSH (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

Já o conjugado cisteína/xenobiótico restante pode ser conduzido à circulação ou à bile. E dependendo das características da porção derivada do xenobiótico, esse poderá ser excretado na urina ou passará por metabolização para ser eliminado (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). A GST pode ser utilizada como marcador de dano hepático, sendo mais significativa do que a ALT (ZHU et al., 2012).

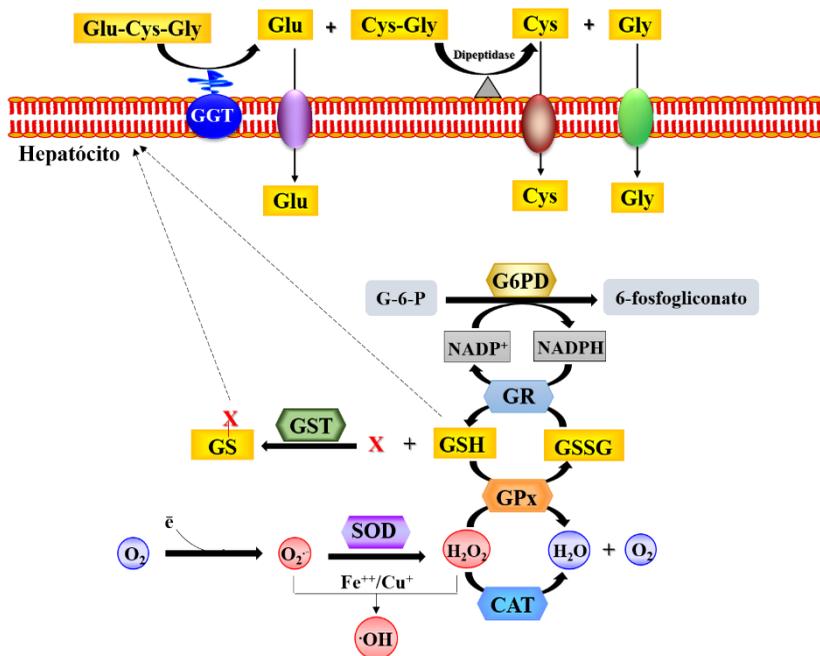
A GGT é amplamente distribuída nos tecidos, especialmente no fígado e nos rins (WHITFIELD, 2001). Ela é a única enzima capaz de iniciar a degradação da GSH extracelular, esse tripeptídeo pode estar conjugado ou não com xenobióticos. Portanto, GGT catalisa a transferência do grupo γ -glutamil da GSH para inúmeros aminoácidos ou peptídeos (DROZDZ et al., 1998; ZHANG et al., 2005). Desse modo, GGT desempenha uma importante função na defesa antioxidante e na detoxificação de xenobióticos (ZHANG; FORMAN, 2009).

Elevadas concentrações de GGT sérica estão correlacionadas com diabetes tipo 2, doença cardiovascular, doença renal crônica e câncer (FRASER et al., 2009; TARGHER, 2009). Além disso, atividade aumentada da GGT no soro é usada na prática clínica como índice de lesão hepática (PRATT; KAPLAN, 2000).

A Figura 8 esquematiza resumidamente a geração das principais EROs e os mecanismos de defesas antioxidantes envolvidos na indução de estresse oxidativo, que podem estar envolvidas no mecanismo de toxicidade de glifosato-Roundup® sobre o tecido hepático. As EROs ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $\cdot OH$) podem ser formadas em consequência da exposição a agentes químicos (como os pesticidas), processos inflamatórios, radiação e por fontes endógenas (como na respiração mitocondrial). O $O_2^{\cdot-}$ formado pode sofrer dismutação espontânea ou enzimática, a partir da atividade da SOD, gerando H_2O_2 . Essa espécie reativa pode ser reduzida a H_2O e O_2 via CAT ou GPx, sendo que essa última utiliza a GSH como doadora de elétrons, produzindo GSSG. A regeneração da GSH é realizada pela GR às custas de NADPH que é disponibilizado pela G6PD, enzima passo-limitante da via das pentoses fosfato. Outra enzima importante é a GST, a qual catalisa a reação de conjugação da GSH com o xenobiótico, protegendo a célula contra os efeitos tóxicos do mesmo. Já a GGT está envolvida na homeostase da GSH por meio da remoção do resíduo γ -glutamil da GSH extracelular conjugada ou não com o xenobiótico. Sendo assim, a atividade da GGT aumenta a

disponibilidade dos aminoácidos para síntese proteica e/ou para a síntese *de novo* da GSH. E, caso as EROs sejam formadas mais rapidamente do que podem ser neutralizadas pelos mecanismos antioxidantes, pode ocorrer acúmulo de H_2O_2 ; esse por sua vez reage com metais de transição como Fe^{++}/Cu^+ e gera o $\cdot OH$ levando à oxidação de lipídeos, proteínas e DNA.

Figura 8. Representação esquemática da formação das principais EROs e as defesas antioxidantes combatendo as espécies reativas.



Glu-Cys-Gly = GSH

X = xenobiótico

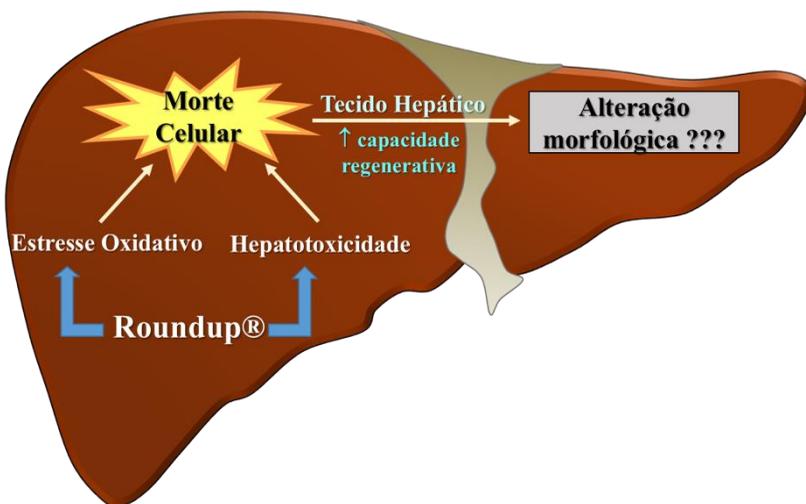
Fonte: do Autor

Antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona reduzida (GSH), glutatona redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD); glutatona-S-transferase (GST); γ-glutamyl transferase (GGT). Espécies reativas: radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); radical hidroxila ($\cdot OH$).

4 HIPÓTESE

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o mecanismo de toxicidade induzida por glifosato em células hipocâmpais (CATTANI et al., 2014) e testiculares (DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013) de ratos em desenvolvimento envolvia a participação de estresse oxidativo. Considerando-se estes achados, a hipótese do presente estudo é de que a exposição materna ao glifosato-Roundup® durante o período gestacional e lactacional levaria a um desequilíbrio entre a geração de EROs e os sistemas de detoxificação dessas espécies acarretando em estresse oxidativo em fígado de ratos imaturos. O estresse oxidativo, acompanhado do aumento no influxo de cálcio intracelular, assim como da elevação nas enzimas marcadoras de dano hepático ocasionariam em hepatotoxicidade e, conseqüente, morte celular. Neste estudo hipotetiza-se ainda que devido à alta capacidade regenerativa do fígado, este seja capaz de se recuperar dos danos induzidos pelo pesticida. A Figura 9 representa esquematicamente os possíveis alvos de toxicidade do pesticida Roundup® nas células hepáticas.

Figura 9. Possíveis alvos do Roundup® em fígado de ratos imaturos.



Fonte: do Autor

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES

O Roundup® foi obtido da empresa Monsanto Company (St Louis, MO, EUA). O cálcio radioativo [$^{45}\text{Ca}^{2+}$]- CaCl_2 (atividade específica 321 KBq/mg Ca^{2+}) foi adquirido da “Du Pont NEN Products” (Boston, EUA), e o líquido de cintilação biodegradável, obteve-se da Optiphase Hisafe III da Perkin Elmer (São Paulo, SP, Brasil). Os reagentes relacionados às determinações de biomarcadores de estresse oxidativo foram adquiridos da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A).

5.2 ANIMAIS

Ratas fêmeas prenhas (linhagem Wistar) foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e expostos a um ciclo claro/escuro 12/12h em sala climatizada com temperatura em 21°C, com ração e água *ad libitum*. Todos os animais foram monitorados e mantidos conforme as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Universidade (CEUA/UFSC#PP00820). As fêmeas gestantes foram colocadas em caixas individuais, de modo que foi padronizado o tamanho da ninhada em 8 filhotes por rata. O dia do parto foi definido como dia 1 de vida dos filhotes, e o dia 15, foi o dia da eutanásia dos animais.

5.3 TRATAMENTO COM ROUNDUP®

Ratas fêmeas Wistar foram expostas a 1% de Roundup® (equivale a 0,36% de glifosato) na água de beber (DARUICH; ZIRULNIK; GIMENEZ, 2001; BEURET; ZIRULNIK; GIMÉNEZ, 2005; CATTANI et al., 2014) a partir do 5º dia gestacional e o tratamento prosseguiu até os filhotes completarem 15 dias de idade, que corresponde ao período imaturo de desenvolvimento. Os animais controles receberam água durante o mesmo período. A concentração escolhida para a exposição *in vivo* foi apoiada na dosagem na qual não

foram observados efeitos adversos para a toxicidade materna ao glifosato, que foi de 1000 mg/kg de massa corporal/dia (WILLIAMS et al., 2000). No dia do experimento, os filhotes foram eutanasiados por decapitação e coletado o sangue e o fígado. O sangue foi coletado sem anticoagulante para obtenção do soro. O fígado, depois de removido foi fatiado e homogeneizado em tampões específicos dependendo da análise bioquímica a ser executada. Todos os experimentos foram realizados utilizando-se o lobo hepático esquerdo.

5.4 INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Fatias de fígado de ratos de 15 dias de idade expostos ou não ao Roundup® durante a gestação e lactação foram pré-incubadas em tampão HBSS (CaCl_2 1,29mM, NaCl 136,9mM, KCl 5,36mM, MgSO_4 0,65mM, Na_2HPO_4) pH 7,4 por 15 min a 37°C. Após, o meio foi trocado por HBSS fresco com 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e o tecido incubado durante 30 min. Depois, o $^{45}\text{Ca}^{2+}$ extracelular foi totalmente lavado com uma solução de cloreto de lantânio (NaCl 127,5 mM, KCl 4,6 mM, MgSO_4 1,2 mM, HEPES 10 mM, Glicose 11 mM, LaCl_3 10 mM) pH 7,3 a 2°C, interrompendo o fluxo de cálcio na preparação (BATRA; SJÖGREN, 1983). Após 10 min, a solução de cloreto de lantânio foi removida e o tecido foi homogeneizado em 250 μL de NaOH 500 mM. Alíquotas de 100 μL do homogeneizado foram adicionados em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, a qual foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). Os resultados foram expressos como pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /mg proteína (ZAMONER et al., 2007).

5.5 CONTEÚDO DE GLUTATIONA REDUZIDA

A concentração de GSH foi determinada de acordo com Beutler e colaboradores (1963), que tem por base a reação da GSH com o DTNB (5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) formando um ânion conjugado, TNB (ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico) que pode ser detectado por absorvância e é proporcional à quantidade inicial de GSH (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009). A concentração de GSH foi mensurada em fígado, seguindo o procedimento, acrescentou-se uma parte de amostra em uma solução de ácido tricloroacético 12% (TCA 12 %, 1:10, m/v).

Após, foi realizada a centrifugação das amostras em 5,000xg por 5 min, então, adicionou-se 10 μ L do sobrenadante em 190 μ L de tampão fosfato 200 mM, pH 8,0. Posteriormente, foi acrescentado 20 μ L de DTNB 2,5 mM diluído em Citrato de Sódio 1%. A absorbância foi mensurada em 412 nm. O conteúdo de GSH foi expresso em mmol/ μ g proteína.

5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Analizou-se a atividade da enzima GGT e das transaminases (ALT e AST) em sangue periférico ao utilizar o soro e em células hepáticas, e determinou-se a atividade da G6PD em fígado. O tecido foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 para a atividade da GGT e em tampão Tris-HCl 200 mM, pH 7,4 para mensurar a atividade das transaminases e da G6PD. Alíquotas das amostras hepáticas foram usadas para verificar a concentração de proteína (LOWRY et al., 1951).

5.6.1 γ -glutamil transferase (GGT)

A GGT foi determinada pela técnica modificada descrita por Orłowsky e Meister (1963), que usa o L- γ - glutamil-p-nitroanilida como substrato e glicilglicina como molécula acceptora, com liberação de p-nitroanilina, a qual é diazotada, gerando um composto final de cor rósea. A absorbância do produto da reação pôde ser medida em 530 nm. A atividade da enzima foi expressa em U/L (soro) ou U/ μ g proteína (tecido).

5.6.2 Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST)

A atividade das enzimas AST e ALT foi verificada a partir de “kits” colorimétricos (Gold® Analisa). Na reação, a alanina aminotransferase (ALT) catalisa a transferência do grupo amina do substrato alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. A aspartato aminotransferase (AST) catalisa a transferência do grupo amina do substrato aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxaloacetato. Ambos, piruvato e oxaloacetato reagem com

a 2-4- dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra, o produto tem absorvância em 505 nm. Os resultados foram expressos em U/L (soro) ou U/ μ g proteína (tecido).

5.6.3 Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

A G6PD foi mensurada a partir da reação, na qual a enzima na presença de NADP⁺ catalisa a oxidação de glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato. O NADPH produzido foi quantificado de modo cinético em um comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram calculados pela avaliação do aumento da densidade óptica por minuto (declínio) da amostra contra o "declínio" da atividade enzimática do padrão de G6PD. A atividade enzimática foi expressa em U/ μ g proteína (tecido).

5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para verificar a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR, GST, bem como avaliar o dano a proteínas e lipídeos como marcadores de estresse oxidativo tecidual (proteína carbonilada-PC e TBARS), fatias de fígado foram pesadas e homogeneizadas em solução contendo tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, 0,1% Triton X-100 e NaCl 150 mM, (1:20 m/v). Após foi centrifugado (5,000xg durante 5 min) o homogeneizado hepático, com o uso do sobrenadante.

5.7.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada conforme o método de Misra e Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo rosa, o adrenocromo, o qual é mensurado em 480 nm. Alíquotas da amostra foram utilizadas a fim de construir uma curva (5, 10, 15, 20, 40 μ L), então se adicionou q.s.p. para 200 μ L de tampão glicina 50 mM, pH 10,2. Após, foram acrescentados 5 μ L de adrenalina 60 mM (pH em torno de 2,0), seguido por leitura cinética durante 10 min. Curvas de 3 a 5 pontos permitiram

avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores de SOD ($\text{USOD.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da velocidade de formação do adrenocromo.

5.7.2 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com a técnica de Aebi (1984), que é fundamentada na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. 200 μL de uma solução de H_2O_2 30% (10 mM) preparada em tampão fosfato 50 mM, pH, 7,0 foi adicionada em 5 μL de sobrenadante. Em seguida, foi analisada a queda da absorbância em um comprimento de onda de 240 nm durante 5 min. Os valores foram expressos em $\text{mmol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

5.7.3 Glutathione peroxidase (GPx)

A atividade GPx foi verificada usando o método descrito por Flohé e Gunzler (1984). O método tem como base a redução de tert-butil hidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisado por GPx, e subsequente regeneração de GSH pela enzima GR com oxidação de NADPH em 340 nm. Assim, a taxa de oxidação de NADPH é proporcional a atividade de GPx na amostra. Para execução do método, 200 μL de um meio de reação contendo tampão fosfato 100 mM, pH 7,0; NADPH; ácido 2-etilenotriaminopentacético (DTPA) 5 mM; glutathione reduzida; glutathione redutase 5U; KCN 50 mM e água destilada foi acrescentado em 5 μL de sobrenadante, logo em seguida foi adicionado 5 μL de t-BuOOH. A reação foi monitorada por leitura cinética durante 3 min. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

5.7.4 Glutathione redutase (GR)

A GR foi determinada segundo o procedimento de Calberg e Mannervik (1985), que mensura a taxa de oxidação de NADPH em 340 nm devido à formação de GSH, a partir de GSSG, pela ação dessa enzima presente na amostra. Para a realização da técnica, 200 μL de um meio de reação contendo tampão fosfato 100 mM, pH 7,0; NADPH;

DTPA 5 mM; glutationa oxidada e água destilada foi acrescentado em 5 μL de sobrenadante. A reação foi monitorada por leitura cinética durante 3 min. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$

5.7.5 Glutationa-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi mensurada segundo o método descrito por Habig e colaboradores (1976). A reação tem como base a capacidade da GST em conjugar GSH ao xenobiótico (substrato), produzindo uma substância detectável em 340 nm, monitorada durante 3 minutos. Uma alíquota de 5 μL de sobrenadante foi acrescentada em 250 μL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. Posteriormente, foram adicionados 5 μL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (substrato) e 5 μL de GSH 0,1 M, nessa sequência, e então realizou-se a leitura cinética. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

5.8 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS

5.8.1 Proteína carbonilada (PC)

Processos oxidativos levam a introdução de grupos carbonil em resíduos de aminoácidos de proteínas, e essas modificações podem ser detectadas usando-se métodos específicos, sendo que um deles é a reação desses grupos com reagentes carbonil-específicos. Desse modo, o dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado pelo método descrito por Levine e colaboradores (1990). Primeiramente, 100 μL de amostra foram acrescentados em 600 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina 10 mM (reagente carbonil clássico) preparado em solução de HCl 2 N, seguido de uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente no escuro, sob agitação contínua. Após, foi adicionado 600 μL de TCA 20 %, com agitação em vórtex e incubação em banho de gelo por 10 min, seguido de centrifugação (5 min a 10,000xg), e então o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado por três vezes consecutivas (centrifugação por 5 min a 10,000xg), com 800 μL de etanol-acetato de etila (1:1 v/v). Por fim, o excesso de etanol-acetato de etila foi removido com auxílio de um cotonete e foram adicionados 600 μL de guanidina 6,0 M preparada em solução de KH_2PO_4 20 mM, pH 2,3, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C com agitação contínua por 1 hora e centrifugação (10,000xg durante 5

min), para posteriormente proceder à leitura a 360 nm. A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al., (1951). A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol/mg de proteína.

5.8.2 Lipoperoxidação (TBARS)

O malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, reage com diversos compostos e produz derivados que são mensuráveis espectrofotometricamente. Um método utilizado para a determinação de MDA consiste na reação dessa substância com o ácido tiobarbitúrico (TBA), ao produzir uma base de Schiff de coloração rosa (BIRD; DRAPER, 1984). Dessa forma, a concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi mensurada ao adicionar 100 µL de sobrenadante em 1 mL de TCA 12%. Após, adicionou-se 900 µL de tampão Tris-HCl 0,06M, pH 7,4 e 1 mL de TBA 0,73%, então as amostras foram levadas para o aquecimento por 1 h a 100°C. Posteriormente, o material foi refrigerado em banho de gelo e centrifugado a 10,000xg por 5 min. A reação colorimétrica foi detectada em 535nm. Alíquotas do homogeneizado hepático foram utilizadas para a análise da concentração de proteínas. Os valores foram expressos como nmol de MDA/µg de proteína.

5.9 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A formação de EROs foi medida utilizando a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA), permeável as células. Esterases celulares hidrolisam a sonda para o não fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), que é retido nas células. Na presença de EROs e peroxidases celulares, H₂DCF é transformada no 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), substância altamente fluorescente (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Fatias de fígado foram homogeneizadas em solução contendo fosfato de sódio 20 mM e KCl 140 mM, pH 7,4, com posterior centrifugação (960xg por 10 min a 4°C). Em placa preta de 96 poços, 10 µL de H₂DCFDA 1 mM (preparado em DMSO e protegido da luz) foram adicionados em 90 µL de sobrenadante, seguido de uma incubação no escuro a 37°C por 30 min. O produto foi detectado em comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm. Os resultados foram

expressos em unidades arbitrárias, sendo os valores corrigidos pela concentração de proteína de cada amostra.

5.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO

A concentração de ferro foi determinada em soro e em fígado. Para isso, o tecido hepático foi pesado e homogeneizado em tampão Tris-HCl 200 mM, pH 7,4 (1:10 m/v). Para a realização da técnica, 50 μ L de soro ou homogeneizado tecidual foram adicionados em 200 μ L de tampão contendo hidroxilamina, pH 4,0. Logo, foram acrescentados 5 μ L de ferrozina com subsequente incubação em banho-maria a 37°C por 10 min. Desse modo, os íons férrico foram dissociados da proteína pela ação do tampão ácido e reduzidos a íons ferroso pela hidroxilamina. Após a adição de ferrozina houve a formação de um complexo cuja absorvância mensurada em 560 nm é proporcional à quantidade de ferro na amostra. Os valores foram expressos em μ g/dL (soro) ou μ g/g de tecido (GOODWIN; MURPHY; GUILLEMETTE, 1966).

5.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRANSFERRINA SÉRICA

A concentração de transferrina foi avaliada em soro a partir de um método imunoturbidimétrico. A metodologia fundamenta-se na adição de anticorpos específicos anti-transferrina na amostra, esses se ligam a transferrina presente no soro e formam um complexo insolúvel, o qual fornece uma turbidez cuja intensidade é detectada em 340 nm, sendo proporcional à quantidade de transferrina sérica.

5.12 CAPACIDADE TOTAL DE LIGAÇÃO DE FERRO (CTLF)

A CTLF foi mensurada no soro, essa medida reflete a concentração máxima de ferro que a transferrina pode ligar quando seus sítios ligadores de ferro estiverem completamente saturados. Para realização da dosagem, uma concentração conhecida de íons ferroso foi incubada com a amostra, esses íons se ligaram especificamente com a transferrina (em condições fisiológicas encontra-se em torno de 30% saturada), assim o padrão de ferro saturou os sítios disponíveis da proteína transportadora. Os íons ferroso em excesso (não ligados) foram medidos através do complexo corado com ferrozina, no comprimento de onda de 560 nm. A diferença entre a quantidade de ferro excedente e a

quantidade total adicionada inicialmente ao soro foi equivalente à quantidade ligada a transferrina, que se denomina, capacidade latente de ligação de ferro (CLLF). Para determinar a capacidade total de ligação de ferro (CTLF), somou-se a CLLF com a concentração de ferro sérica. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/dL}$ (GOODWIN; MURPHY; GUILLEMETTE, 1966).

5.13 HISTOLOGIA HEPÁTICA

Para análise histológica, o fígado foi obtido a partir de animais anestesiados (cloridrato de cetamina:cloridrato de xilazina; 90:15 mg/Kg, respectivamente). As amostras de tecido hepático foram fixadas usando uma solução de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) contendo 10% de formaldeído. Após essas etapas, os tecidos foram lavados, desidratados em etanol, clarificados utilizando-se xileno e incluídos em blocos de parafina. Posteriormente, os tecidos foram seccionados em fatias de 5 μm , corados com hematoxilina e eosina (HE) e avaliados pela microscopia de luz.

5.14 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A concentração de proteínas foi avaliada pelo método de Lowry et al. (1951). Uma curva padrão utilizando a albumina de soro bovino (Sigma®) foi utilizada para calcular a concentração de proteína nas amostras.

5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

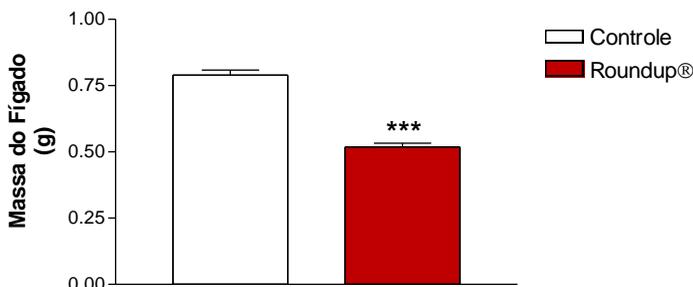
Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações realizadas em triplicata em 3 a 4 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste *t* de Student, utilizando-se o programa INSTAT versão 3.02. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DA MASSA DO FÍGADO DA PROLE EXPOSTA AO ROUNDUP® DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Para verificar se a exposição materna ao Roundup® altera a massa do fígado da prole de ratos, o órgão foi pesado no dia do experimento, quando os animais tinham 15 dias de idade. A Figura 10 mostra diminuição na massa do fígado de ratos expostos ao herbicida durante a gestação e lactação. Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a exposição materna ao pesticida também induz diminuição na massa corporal desses animais (CATTANI et al., 2014).

Figura 10. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na massa do fígado de ratos imaturos.

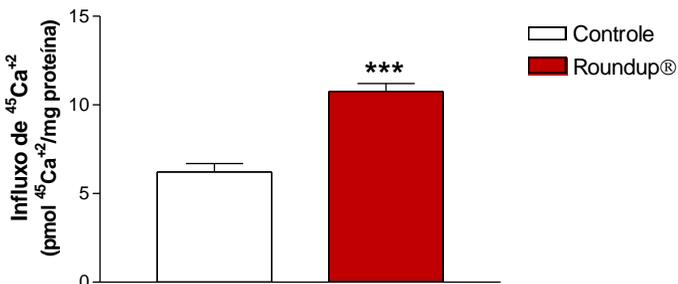


Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. *** $p < 0,001$.

6.2 ENVOLVIMENTO DO CÁLCIO NO MECANISMO DE TOXICIDADE INDUZIDO PELO ROUNDUP® EM FÍGADO DE RATOS IMATUROS

A fim de investigar o efeito de Roundup® no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fatias de fígado dos filhotes, após tratamento *in vivo* com esse pesticida, as fatias do tecido foram incubadas com $0,1 \mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ durante 30 minutos. Como indicado na Figura 11, os resultados mostraram que a exposição materna ao Roundup® causou aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, sugerindo que o herbicida é capaz de induzir toxicidade a partir do aumento das concentrações de Ca^{2+} intracelulares.

Figura 11. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fígado de ratos imaturos.

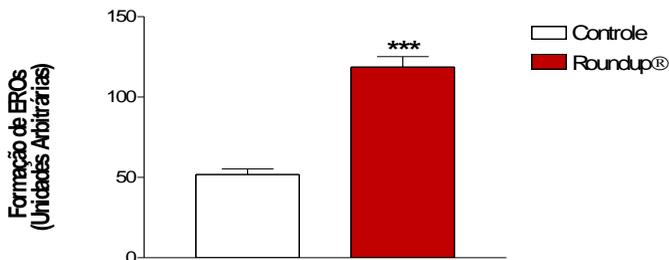


Os resultados foram expressos em pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /mg de proteína como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. *** $p < 0,001$.

6.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO HERBICIDA ROUNDUP® NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM FÍGADO DE RATOS DE 15 DIAS DE IDADE

No intuito de estudar se a exposição ao Roundup® induz a geração de EROs no fígado de ratos imaturos, utilizou-se uma sonda que na presença de espécies reativas de oxigênio torna-se fluorescente. Conforme demonstrado na Figura 12, houve um aumento significativo na formação de EROs no fígado do grupo tratado com Roundup®, quando comparado com o controle.

Figura 12. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em fígado de ratos imaturos.

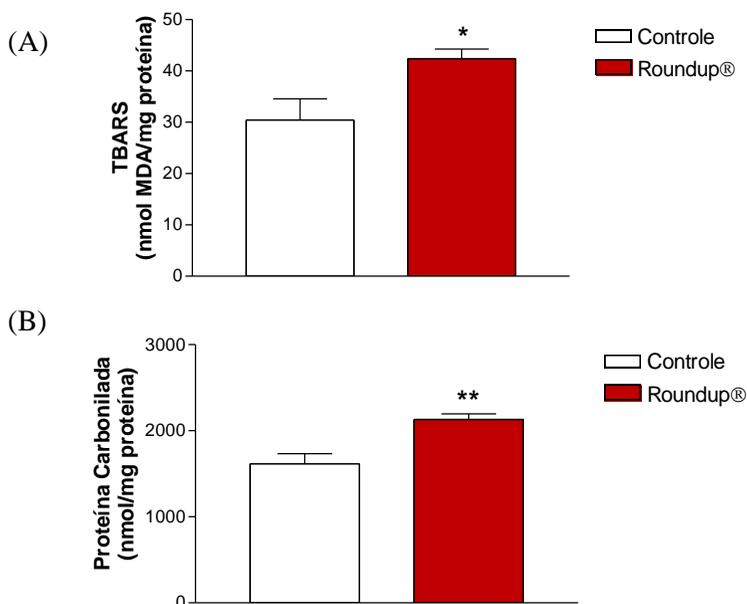


A formação de EROs foi determinada pela oxidação do H_2DCF a DCF. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. *** $p < 0,001$.

6.4 CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ROUNDUP® SOBRE OS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS A LÍPIDOS E PROTEÍNAS EM FÍGADO DE RATOS IMATUROS

Uma vez que o Roundup® estimulou a produção de EROs e essas podem levar a danos de macromoléculas biológicas, verificou-se a indução de estresse oxidativo em fígado de ratos de 15 dias de idade expostos ao pesticida. Os parâmetros analisados foram a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas. Os resultados mostraram concentrações elevadas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Figura 13A), bem como aumento na proteína carbonilada (PC) (Figura 13B) no tecido hepático de ratos expostos à formulação comercial Roundup® em relação aos animais controles. Em conjunto esses dados sugerem fortemente a inferência de estresse oxidativo em fígado da prole após exposição ao Roundup®.

Figura 13. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® no conteúdo de TBARS (A) e proteína carbonilada (B) em fígado de ratos imaturos.



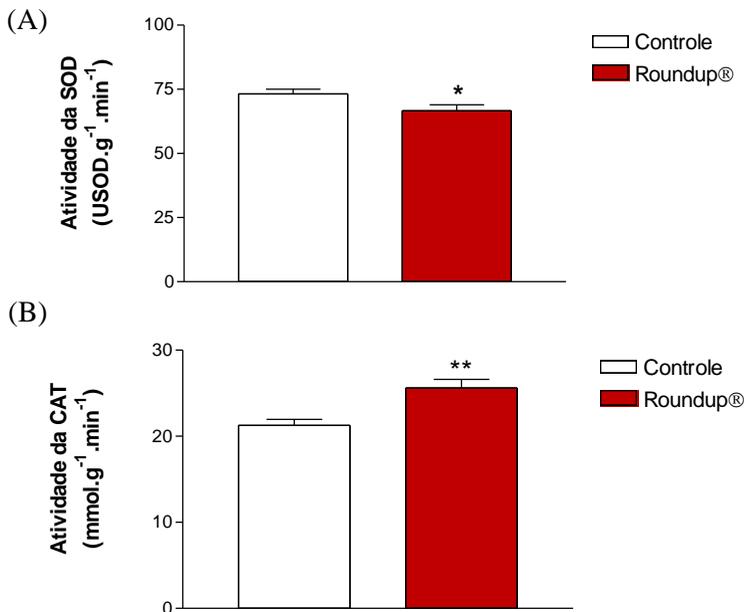
Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6.5 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ROUNDUP® NOS SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTES EM FÍGADO DE RATOS DE 15 DIAS DE IDADE

Para investigar o efeito da exposição materna ao Roundup® nos marcadores bioquímicos relacionados aos sistemas de defesa antioxidantes hepático de ratos imaturos, foram analisadas as atividades enzimáticas da SOD, CAT, GPx, GR, G6PD, GST e GGT, bem como as concentrações de GSH.

A SOD catalisa a destruição do $O_2^{\cdot -}$ produzindo H_2O_2 , esse por sua vez é tóxico para a célula e pode ser eliminado a partir da reação catalisada via CAT. Os resultados indicaram diminuição na atividade da SOD (Figura 14A) associado ao aumento na atividade da CAT (Figura 14B) em fígado de ratos imaturos, após tratamento *in vivo* com Roundup®.

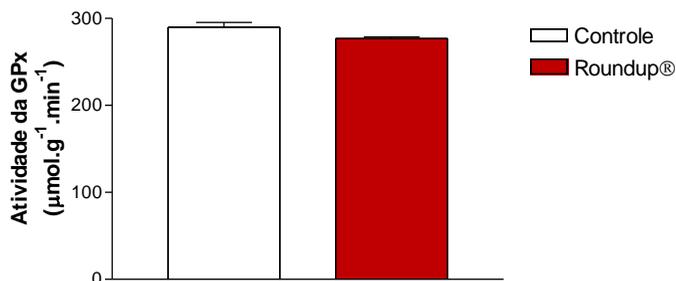
Figura 14. Efeitos da exposição pré- e pós-gestacional ao Roundup® na atividade das enzimas: (A) superóxido dismutase (SOD) e (B) catalase (CAT) em fígado de ratos imaturos.



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Outra enzima importante na detoxificação do H_2O_2 é a GPx, que reduz essa espécie reativa à água, ao utilizar a GSH como cofator da reação e formar GSSG (glutationa oxidada). Conforme demonstrado na Figura 15, a exposição materna ao Roundup® não alterou a atividade da GPx em fígado de filhotes de 15 dias de idade.

Figura 15. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na atividade da glutationa peroxidase (GPx) em fígado de ratos imaturos.

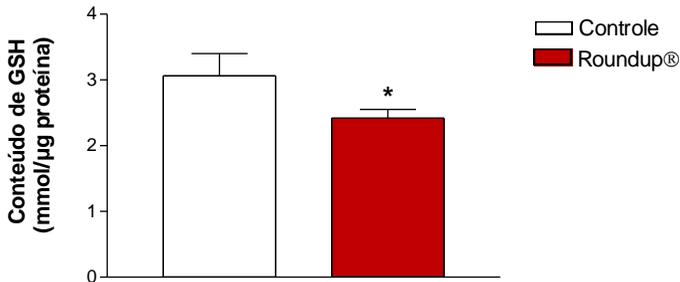


Tratamento *in vivo* com 1% de Roundup® na água de beber durante período gestacional e pós-gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student.

A GSH é o principal antioxidante não enzimático do organismo e apresenta diversas funções de proteção contra os danos oxidativos. A Figura 16 mostra diminuição no conteúdo de GSH em fígado de ratos expostos ao Roundup® durante os períodos gestacional e pós-natal. Esse resultado confirma a participação de eventos oxidativos no mecanismo de toxicidade desse agroquímico.

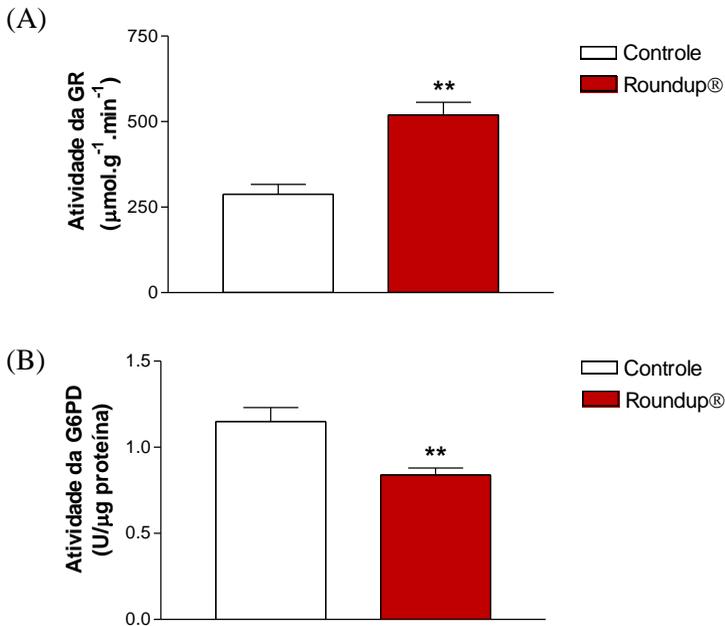
A GR é a enzima responsável pela regeneração da GSSG em GSH, para tal reação acontecer é necessária uma molécula de NADPH, a qual é disponibilizada prioritariamente pela G6PD. Os resultados evidenciaram aumento na atividade da GR (Figura 17A) e em contrapartida diminuição na atividade da G6PD (Figura 17B) em fígado de ratos expostos a formulação comercial Roundup® durante a gestação e lactação em relação aos animais controles.

Figura 16. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® no conteúdo de glutatona reduzida (GSH) em fígado de ratos imaturos.



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$

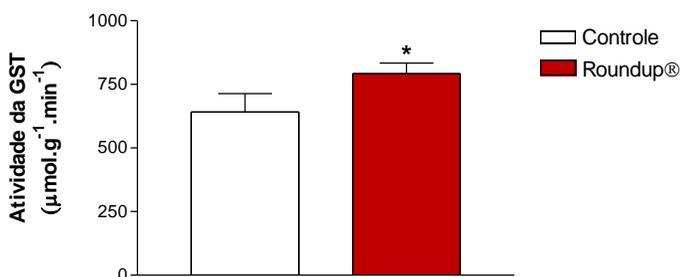
Figura 17. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na atividade das enzimas: (A) glutatona redutase (GR) e (B) glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em fígado de ratos imaturos.



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. ** $p < 0,01$.

A GST catalisa a reação de detoxificação de xenobióticos a partir da conjugação dessas substâncias com a GSH. Como apresentado na Figura 18, a atividade dessa enzima encontra-se aumentada em fígado de ratos imaturos expostos ao Roundup®.

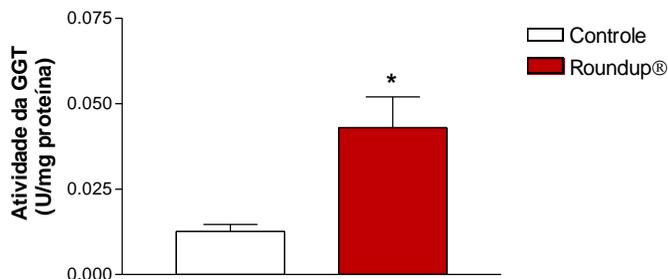
Figura 18. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na atividade da enzima glutationa-S-transferase (GST) em fígado de ratos imaturos.



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

Por fim, considerando-se que a GGT é a principal enzima envolvida no metabolismo da GSH extracelular, foi investigada a consequência do tratamento crônico com Roundup® na atividade dessa enzima no fígado de filhotes de 15 dias de idade. O resultado apontou que a atividade da GGT está elevada no tecido hepático da prole (Figura 19).

Figura 19. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na atividade da γ -glutamil transferase (GGT) em fígado de ratos imaturos.

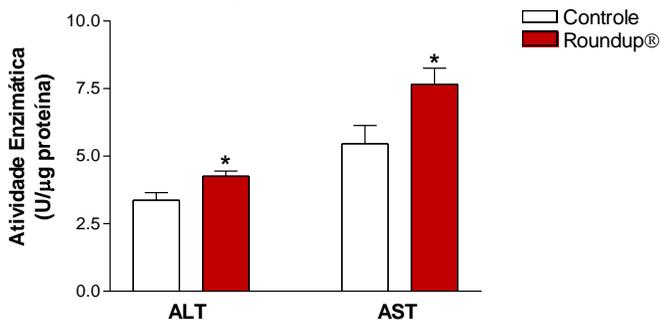


Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

6.6 ESTUDO DA AÇÃO DA FORMULAÇÃO COMERCIAL ROUNDUP® NA ATIVIDADE DAS AMINOTRANSFERASES EM FÍGADO DE RATOS IMATUROS

As enzimas ALT e AST apresentam um papel fundamental no metabolismo dos aminoácidos, essas aminotransferases foram analisadas com o intuito de verificar os efeitos da exposição materna ao Roundup® nas reações de transaminação no fígado dos filhotes. A Figura 20 mostra que ambas as enzimas apresentaram suas atividades aumentadas no tecido hepático no grupo tratado com Roundup®, quando comparado com o controle.

Figura 20. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em fígado de ratos imaturos.



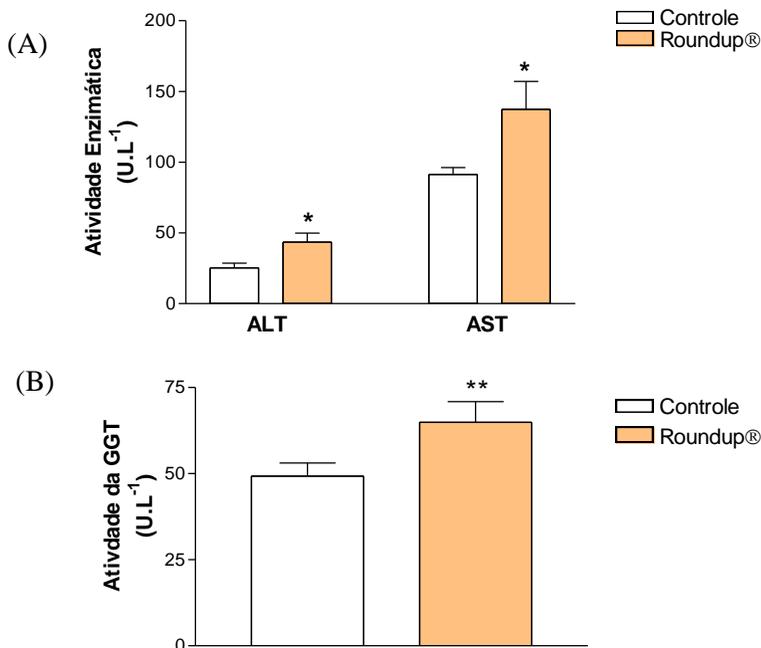
Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

6.7 MARCADORES PERIFÉRICOS DE HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR EXPOSIÇÃO MATERNA AO ROUNDUP®

Quando existe injúria ao fígado, enzimas importantes extravasam das células hepáticas lesionadas e percorrem a circulação sanguínea, sendo detectadas no soro. As consequências ao fígado causadas pela exposição ao Roundup® foram monitoradas por análise quantitativa a partir da atividade da ALT, AST, bem como da GGT, as quais são enzimas utilizadas na prática clínica como marcadores periféricos de lesão hepática. Conforme indicado na Figura 21A e 21B, os resultados evidenciaram hepatotoxicidade induzida pelo pesticida, devido ao aumento na atividade de todas as enzimas estudadas no soro dos ratos

expostos de forma crônica ao Roundup® em relação aos animais controles.

Figura 21. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na atividade das enzimas: (A) alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e (B) γ -glutamyl transferase (GGT) em soro de ratos imaturos.

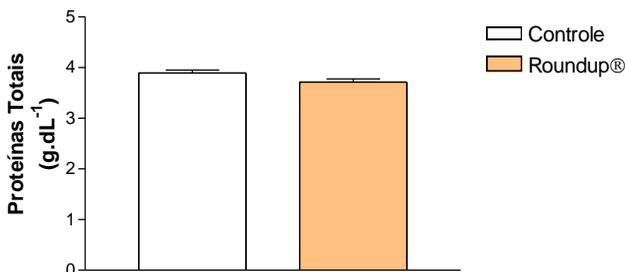


Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6.8 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO ROUNDUP® NA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NO SORO DE RATOS DE 15 DIAS DE IDADE

Considerando-se que a maioria das proteínas totais presentes no soro é sintetizada pelo fígado, foi verificada se a exposição materna ao Roundup® altera a concentração de proteínas no soro da prole, especialmente a albumina, principal proteína sérica. Os resultados mostraram que a exposição à formulação comercial contendo Roundup® não interferiu na produção de proteínas totais no grupo tratado, quando comparado com o controle (Figura 22).

Figura 22. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na concentração de proteínas totais no soro de ratos imaturos.

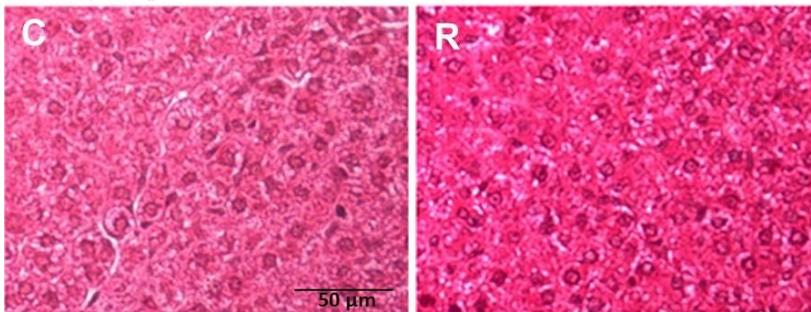


Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student.

6.9 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA HEPÁTICA DA PROLE EXPOSTA AO ROUNDUP® DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

Com o propósito de avaliar se a hepatotoxicidade induzida por Roundup® altera a morfologia do órgão de ratos imaturos, após tratamento *in vivo* com o pesticida, o fígado foi corado com hematoxilina-eosina para análise histológica. Os resultados mostraram que a morfofisiologia do fígado da prole não é modificada pela exposição materna ao Roundup® (Figura 23).

Figura 23. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na morfologia hepática de ratos imaturos.

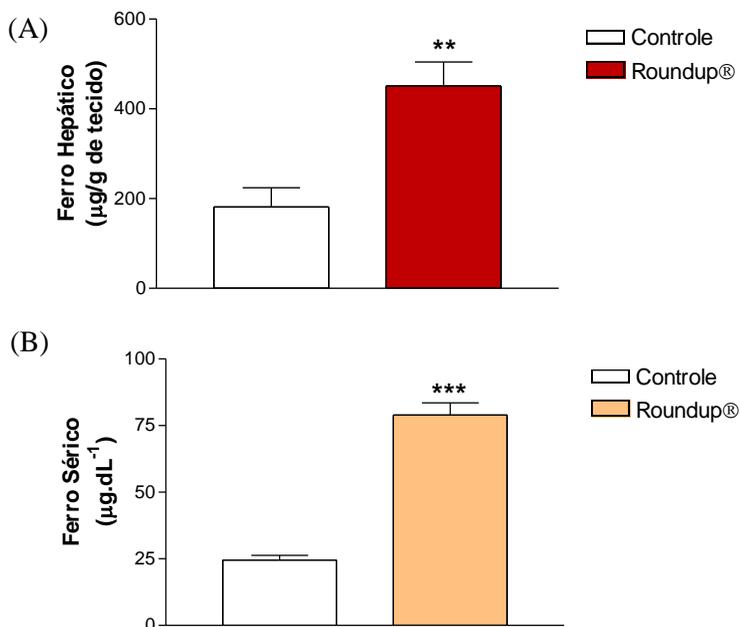


Fotomicrografias representativas de preparações histológicas coradas com hematoxilina-eosina de tecido hepático de ratos controles (C) e tratados com Roundup® (R) durante a gestação e o aleitamento. Aumento = 400X.

6.10 CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ROUNDUP® NO ARMAZENAMENTO E NO TRANSPORTE DE FERRO EM RATOS IMATUROS

Com a finalidade de investigar possíveis alterações nas concentrações de ferro em filhotes expostos ao Roundup® durante os períodos gestacional e pós-natal, avaliou-se a concentração de ferro armazenada no fígado e a concentração desse íon presente no soro dos animais. Os resultados demonstraram aumento na concentração de ferro hepático (Figura 24A) e sérico (Figura 24B) no grupo tratado, quando comparado com o controle, sugerindo possível aumento na quantidade de ferro total no corpo, sendo que o acúmulo desse íon pode ser tóxico ao organismo.

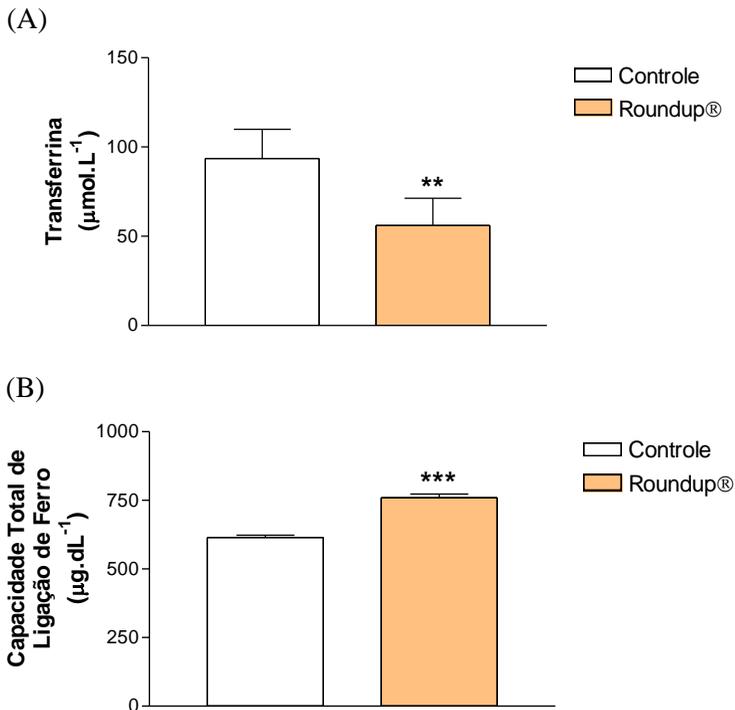
Figura 24. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na concentração de ferro hepático (A) e de ferro sérico (B) em ratos imaturos.



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Com os resultados demonstrados anteriormente, analisou-se a concentração de transferrina, uma proteína transportadora de ferro no soro, a qual é sintetizada no fígado, bem como a capacidade total de ligação de ferro (CTLF) no soro da prole exposta de forma crônica ao Roundup®. Como indicado na Figura 25A e 25B, nota-se respectivamente, uma diminuição na concentração de transferrina sérica associada a uma elevação da CTLF no soro de ratos de 15 dias de idade expostos à formulação comercial Roundup® em relação aos animais controles.

Figura 25. Efeitos da exposição pré e pós-gestacional ao Roundup® na concentração de transferrina (A) e na capacidade de ligação total de ferro (B) em soro de ratos imaturos.



Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, investigaram-se os possíveis efeitos ocasionados pela exposição materna à formulação comercial contendo glifosato em modelo animal *in vivo* no qual as fêmeas foram expostas a 1% de Roundup® na água de beber durante a gestação e lactação até os filhotes completarem 15 dias de idade, a fim de conhecer os alvos de ação envolvidos na toxicidade desse herbicida no fígado e no sangue periférico dos ratos imaturos.

Jobim e colaboradores (2010) realizaram um estudo comparando as taxas de mortalidade do Brasil, Rio Grande do Sul (RS) e microrregião de Ijuí no RS entre os anos 1979 e 2003. Os dados sugeriram maior prevalência de mortalidade por neoplasias na microrregião de Ijuí em comparação ao RS e ao Brasil. Tal estudo demonstrou que a exposição ou contaminação crônica de agrotóxicos nessa microrregião pode estar relacionada a um possível aumento na prevalência da mortalidade de câncer entre trabalhadores rurais.

Curvo, Pignati e Pignatti (2013) elaboraram um estudo da média das séries históricas de morbidade (2000–2005) e mortalidade (2000–2006) por câncer na faixa etária de 0 a 19 anos e o uso de pesticidas nos municípios do Estado de Mato Grosso. Os resultados indicaram que a exposição aos agrotóxicos está associada à morbimortalidade por câncer na população infanto-juvenil.

Mazon e Souza (2015) realizaram um estudo exploratório visando conhecer o panorama geral da exposição ocupacional aos agroquímicos em trabalhadores rurais de municípios do Oeste de Santa Catarina. Das 197 pessoas entrevistadas, a maior parte eram homens (89,95%) que aplicavam os agrotóxicos nas lavouras, desses 48,73% passavam mais de 4 horas expostos aos pesticidas durante uma aplicação, na maioria das vezes sem utilizar nenhum equipamento de proteção individual, sendo que o Roundup® (98,48%) foi o agente químico utilizado de forma predominante nas propriedades rurais.

Lamentavelmente, o uso de agrotóxicos no Brasil vem crescendo de maneira alarmante nos últimos anos. Desde 2008, o país tornou-se o maior consumidor mundial desses agroquímicos (ANVISA, 2012). Roundup®, agrotóxico contendo glifosato como ingrediente ativo, é o herbicida mais popular em uso atualmente na agricultura, além de ser utilizado mundialmente em larga escala (BØNH et al., 2014). Ademais, em março de 2015, a IARC classificou o glifosato como provavelmente cancerígeno para os seres humanos (Grupo 2A). Após diversos estudos

com humanos e animais, o herbicida apontou ser um potencial agente genotóxico (GUYTON et al., 2015).

O resultado do presente estudo mostrou diminuição na massa do fígado da prole exposta ao Roundup® durante a gestação e lactação. Esse dado vai ao encontro com outros achados do nosso grupo de pesquisa, que observaram diminuição significativa na massa corporal dos filhotes de 10 a 15 dias de idade, sem alteração no consumo diário de água, comida, bem como na massa corporal das mães (CATTANI et al., 2014). Com os estudos prévios de Cattani e colaboradores (2014) também foi possível estimar que cada mãe ingere aproximadamente 70 mg de glifosato-Roundup®/Kg de massa corporal/dia. Essa concentração é equivalente a 1/14 dos limites de dosagem na qual não é observado efeito adverso.

Dallegre et al. (2003) revelaram que a exposição de ratas grávidas (entre os dias 6 e 15 de gestação) a 500 mg/kg de Roundup® diluídos na água de beber promovia retardo no desenvolvimento do esqueleto fetal. Outro trabalho mostrou que a exposição materna a 1% de glifosato na água potável, desde o 1º até o 21º dia de gestação resultou na redução da massa corporal das ratas tratadas com glifosato, além de diminuição na massa do fígado das mães. No entanto, não houve diferença significativa na massa corporal nem na massa do órgão dos fetos (BEURET, ZIRULNIK, GIMÉNEZ, 2005). Segundo Chahoud e colaboradores (1999), a perda da massa corporal é um indicador importante de toxicidade, isso demonstra que Roundup® está induzindo toxicidade nos ratos imaturos expostos ao pesticida no período pré e pós-natal.

Um dos efeitos tóxicos promovidos pelo herbicida foi o aumento no influxo de Ca^{2+} intracelular no fígado dos filhotes tratados com Roundup®. Salienta-se que mesmo o cálcio sendo indispensável à vida, concentrações intracelulares elevadas desse íon por um tempo prolongado ocasiona morte à célula (CLAPHAM, 1995). Em trabalhos anteriores também foram relatadas alterações na homeostase do cálcio em diferentes órgãos. Cattani et al. (2014) demonstraram que Roundup® causou elevação de Ca^{2+} em hipocampo de ratos imaturos pela exposição crônica ao agrotóxico. De Liz Oliveira Cavalli e colaboradores (2013) mostraram que a exposição *in vitro* de 36 ppm de Roundup® por 30 mim desencadeou morte celular induzida pelo aumento do influxo de Ca^{2+} em células de Sertoli e testículos de ratos pré-puberes.

O cálcio entra na célula a partir de canais presentes na membrana plasmática após um sinal extracelular ou o íon é liberado dos estoques

contidos no interior de organelas celulares, tais como da mitocôndria e do retículo endoplasmático, em resposta a mensageiros intracelulares. Um desequilíbrio nestes eventos pode conduzir a uma sobrecarga de cálcio, promovendo estresse oxidativo e morte celular (ERMAK; DAVIES, 2010).

Frente a isso, investigou-se a geração de EROs no fígado da prole e foi observado que a exposição materna ao Roundup® induziu a produção de EROs no tecido hepático dos ratos imaturos. Corroborando os resultados, Chaufan, Coalova e Molina (2014) demonstraram aumento na formação de EROs em células HepG2 (hepatoma humano) após tratamento com 40 mg/L de uma formulação comercial à base de glifosato por 24 horas.

Pesticidas podem induzir estresse oxidativo levando à geração de radicais livres e alterações nas defesas antioxidantes ou no sistema de remoção de radicais. Sugere-se que diversos agrotóxicos exerçam seus efeitos biológicos a partir de ataques eletrofílicos a constituintes celulares com produção simultânea de EROs (TUNÇMEN; TÜZMEN, 2007).

Peixoto (2005) observou que Roundup® modifica a bioenergética de mitocôndrias hepáticas isoladas por alterar a cadeia transportadora de elétrons, sendo que o herbicida exerce seus efeitos sobre os complexos I e III. Desse modo, formulações comerciais contendo glifosato podem aumentar a produção do radical ânion superóxido e desencadear estresse oxidativo e respostas antioxidantes (ROMERO et al., 2011).

EROs são substâncias altamente reativas e quando presentes em altas concentrações no organismo provocam danos às macromoléculas biológicas e induzem lesões à células e tecidos normais (POLI et al., 2004; ZHU et al., 2012). Nesse contexto, os filhotes de 15 dias de idade expostos ao Roundup® durante a gestação e lactação apresentaram oxidação em lipídeos e proteínas, representados pela elevação no conteúdo de TBARS e proteína carbonilada no tecido hepático, respectivamente.

Esses achados também foram descritos por Menezes e colaboradores (2011) que relataram aumento na concentração de MDA e de proteína carbonilada no fígado de peixes *Rhamdia quelen* expostos a curto prazo nas concentrações de 0,45 mg/L ou 0,95 mg/L de Roundup®. Os autores citam que um dos mecanismos envolvidos na toxicidade do herbicida é a indução de estresse oxidativo ao promover a geração de radicais livres causando oxidação de macromoléculas. Nossos resultados também estão de acordo com Glusczak et al. (2011) que observaram aumento na liperoxidação (LPO) e carbonilação de

proteínas no tecido hepático de peixes (*Leporinus obtusidens*) tratados em diferentes concentrações (3, 6, 10 ou 20 mg/L) de uma formulação à base de glifosato por 96 horas.

Existem poucos trabalhos acerca dos efeitos de glifosato-Roundup® sobre a concentração de proteína carbonilada em mamíferos e a literatura disponível considera o fígado como o principal local de produção da mesma. Estudos têm sugerido que o teor de carbonilação de proteínas pode ser utilizado como um biomarcador complementar do estresse oxidativo em humanos e outros vertebrados (PEY et al. 2003). Além disso, o aumento na concentração de proteína carbonilada indica que o metabolismo de proteína normal é interrompido, o que resulta no acúmulo de moléculas danificadas (GLUSCZAK et al., 2011).

No entanto, a peroxidação lipídica e a sua relação com os agrotóxicos já é bem elucidada na literatura. De acordo com Hazarika e colaboradores (2003), a LPO pode acontecer devido à interação direta dos organofosforados com a membrana plasmática. Sendo esse um dos mecanismos moleculares associados à toxicidade de diversos pesticidas (KAVITHA; RAO, 2007). Desse modo, aumento na concentração de TBARS foi observado no fígado de ratas grávidas e de seus fetos quando os animais receberam na água de beber uma formulação contendo glifosato durante o período gestacional. Os autores sugerem que a excessiva LPO induzida pela ingestão do herbicida levou a uma sobrecarga dos sistemas de defesa antioxidantes materno e fetal (BEURET, ZIRULNIK, GIMÉNEZ, 2005).

El-Shenawy (2009) demonstrou que Roundup® pode promover lesões irreversíveis ao tecido hepático com a administração intraperitoneal de uma concentração subletal do agrotóxico (269,9 mg/kg) a cada 2 dias, durante uma ou duas semanas em ratos machos adultos. O autor revelou indução de estresse oxidativo devido ao aumento da peroxidação lipídica e da depleção na concentração de GSH no fígado desses animais.

A principal função da GSH é a sua capacidade de proteger as células contra os danos oxidativos causados pelos radicais livres (BUKOWSKA, 2003). Diminuição na concentração de GSH hepática também foi observada no presente estudo, um dos motivos pelos quais houve essa depleção pode ter sido pelo seu uso direto como tripeptídeo redutor das EROs produzidas pelo glifosato-Roundup®, após os filhotes serem expostos de forma crônica ao pesticida.

Çavuşoğlu e colaboradores (2011) observaram diminuição no conteúdo de GSH e aumento na concentração de MDA nos tecidos hepáticos e renais, após administração de uma única dose intraperitoneal

de Roundup® (50 mg/kg) em camundongos Swiss Albinos. Interessantemente, a administração oral de 150 mg/kg do extrato das folhas de *Ginkgo biloba* L. por 8 dias consecutivos foi capaz de reestabelecer significativamente a concentração de GSH, bem como inibir de forma significativa a produção de MDA no fígado e no rim desses animais. Os autores mencionam que o *G. biloba* pode ser um potente protetor contra a toxicidade induzida pelo Roundup® *in vivo*, sendo a sua função protetora dose-dependente.

Outro estudo desenvolvido por Astiz, de Alaniz e Marra (2009b) também mostraram aumento na concentração de TBARS e redução na concentração de GSH em mitocôndrias de fígado, substância nigra e córtex cerebral de ratos expostos a uma mistura de pesticidas. Os animais foram tratados com 15 mg/kg de zineb (fungicida) + 10 mg/kg de glifosato (herbicida) + 15 mg/kg dimetoato (inseticida), 3 vezes por semana durante 5 semanas, por via intraperitoneal. De tal modo, o estudo pôde contribuir para a compreensão das consequências da exposição simultânea a agrotóxicos.

Como uma forma de defesa primária contra as EROs, os organismos têm desenvolvido sistemas de defesa antioxidantes para proteger as células contra esses danos. As enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante, tais como SOD, CAT, GPx, GR e GST podem proteger a célula dos efeitos deletérios dos radicais livres, bem como as enzimas que participam indiretamente desse processo, como a G6PD e a GGT.

Nossos resultados demonstraram inibição na atividade da SOD acompanhados do aumento na atividade da CAT em fígado de ratos imaturos tratados *in vivo* com uma formulação comercial contendo glifosato. A SOD apresenta a função de converter o $O_2^{\cdot-}$ à água e H_2O_2 , uma ERO menos reativa. Com a diminuição na atividade da SOD, deve-se, provavelmente, haver maior concentração de $O_2^{\cdot-}$ no fígado da prole exposta ao Roundup®, sendo que o $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com as macromoléculas intracelulares ou ainda gerar radicais secundários ($^{\cdot}OH$, $ONOO^{\cdot}$) tóxicos à célula.

Astiz, de Alaniz e Marra (2009c) revelaram que o tratamento intraperitoneal com 10 mg/kg de glifosato por 5 semanas em ratos machos foi associado à inibição na atividade da SOD hepática sem alteração nas demais enzimas antioxidantes (CAT, GPx, GR e GST). Por outro lado, Sinhorin e colaboradores (2014) observaram diminuição na atividade da SOD e CAT em fígado de peixes tratados em diferentes concentrações de Roundup® por 96 horas, sendo que determinada concentração do pesticida resultou na morte de 50% dos peixes após o

tempo de exposição. Esses dois trabalhos mostraram resultados diferentes na atividade da CAT do que o obtido neste estudo. Em contrapartida, Glusczak e colaboradores (2011) também demonstraram aumento na atividade da CAT em fígado de piavas expostas a distintas concentrações de uma formulação à base de glifosato durante 96 horas.

No presente estudo, nenhum efeito foi observado na atividade da GPx. Achados semelhantes foram encontrados pelo grupo de pesquisa de Larsen e colaboradores (2012), os quais submetem ratos adultos à exposição ao glifosato (0,7 mg/L ou 7 mg/L) na água de beber, durante 30 ou 90 dias, e verificaram aumento na atividade da GPx hepática apenas nos animais tratados por 90 dias na maior concentração do herbicida, os demais tratamentos não afetaram a atividade dessa enzima. O aumento na atividade enzimática pode ser explicado por uma relação de dose e tempo de exposição.

Não ter diferença significativa na atividade da GPx no fígado dos filhotes tratados com glifosato-Roundup® pode ser justificado pelo aumento na atividade da CAT hepática, uma vez que essa enzima possui maior atividade no fígado do que a GPx (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Outro fator a ser considerado é que mesmo a GPx e a CAT tendo uma sobreposição de substrato, GPx apresenta um Km inferior ao da CAT para o H₂O₂. Desse modo, GPx tem maior afinidade por baixas concentrações de peróxido de hidrogênio do que a CAT (RADÁK, 2010). Frente a isso, sugere-se elevada concentração de H₂O₂ no tecido hepático de ratos expostos ao Roundup® durante a gestação e lactação. Esse aumento de H₂O₂ no fígado pode estar relacionado à dismutação espontânea do O₂^{•-}, bem como o peróxido de hidrogênio é capaz de originar-se de outras fontes que não envolvam a utilização da enzima SOD.

A atividade da GR apresentou-se aumentada nos filhotes tratados com Roundup®. A exposição a concentrações crescentes (10, 15 e 20 mM) de Roundup 3 plus® por 24 horas em linhagens de queratinócitos humanos (HaCaT), demonstraram, curiosamente, aumento na atividade da GR após exposição a 10 mM do herbicida, diminuição na atividade dessa enzima depois do tratamento com 15 mM de Roundup 3 plus®, por outro lado, não houve qualquer alteração na atividade da GR após a exposição a altas concentrações do pesticida (20 mM) (GEHIN; GUYON; NICOD, 2006).

A GR catalisa a redução da glutatona oxidada (GSSG) a sua forma reduzida (GSH) às custas de NADPH, o qual é concedido pela G6PD, isto garante que a GSH esteja na sua forma reduzida e mantenha o estado redox da célula. Todavia, os nossos resultados evidenciaram inibição na atividade da G6PD na prole após exposição materna ao glifosato. Nesse contexto, Daruich, Zirulnik e Gimenez (2001) observaram que a exposição materna a 0,5% de glifosato na água de beber durante os 21 dias de gestação ocasionou diminuição na atividade da G6PD hepática das ratas tratadas com glifosato, enquanto não foram encontradas alterações significativas na atividade da G6PD no fígado dos fetos.

Salienta-se que a diminuição da G6PD induz a redução no fornecimento de NADPH, equivalente redutor fundamental para a atividade da GR. Desse modo, provavelmente o NADPH gerado no fígado dos animais tratados com Roundup® derive de rotas metabólicas alternativas, com o propósito de preservar a atividade da GR.

A GST é uma enzima importante envolvida na conjugação de uma variedade de compostos eletrófilos com substratos endógenos como a GSH, a fim de proteger a célula contra os efeitos dos xenobióticos (WILCE; PARKER; 1994). Neste estudo, verificou-se aumento na atividade da GST no grupo exposto *in vivo* ao Roundup®. Em trabalho anterior, descrito por Larsen e colaboradores (2014) observou-se nenhuma alteração significativa na atividade enzimática da GST em fígado de ratos expostos a uma formulação comercial de glifosato (0,7 mg/L ou 7 mg/L) na água de beber por 90 dias.

Em compensação, Modesto e Martinez (2010) demonstraram que exposição aguda a 10 mg/L de Roundup® por diferentes tempos (6, 24 e 96 h) em peixes (*Prochilodus lineatus*) foi associado ao aumento na atividade da GST no fígado dos animais depois de tratá-los com o herbicida durante 24 h e 96 h. Assim como, Murussi e colaboradores (2015) mostraram elevação na atividade da GST em fígado de peixes (*Rhamdia quelen*) após exposição a 2,5 mg/L de uma formulação comercial à base de glifosato (Orium®) durante 96 horas.

Acredita-se que a detoxificação de Roundup® no organismo dos ratos imaturos expostos ao herbicida seja relacionado à fase II da biotransformação hepática, devido ao aumento na atividade da GST no fígado desses animais, a qual catalisa a conjugação da GSH com o xenobiótico. Isso também pode explicar a depleção de GSH encontrada no fígado dos filhotes. Um mecanismo compensatório para a diminuição

na concentração de GSH pode ter sido o aumento na atividade da GGT hepática observado em nosso estudo. Uma vez que essa enzima é responsável pela degradação extracelular da GSH o que aumenta a disponibilidade de aminoácidos para serem captados pela célula e reutilizados na síntese *de novo* de GSH e assim, repor a concentração da GSH intracelular (ZHANG; FORMAN, 2009).

Nossos resultados mostram claramente que Roundup® leva à geração de EROs, lipoperoxidação e carbonilação de proteínas, depleção de GSH e alteração no sistema de defesa antioxidante enzimático, resultando em estresse oxidativo em fígado de ratos imaturos expostos ao herbicida desde a gestação até a lactação.

A transaminação, reação catalisada por aminotransferases como a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST), é uma das vias principais para síntese e desaminação de aminoácidos, permitindo que haja interconversão entre metabolismo de proteínas e carboidratos durante condições de estresse para atender a alta demanda de energia do organismo (VAN WAARDE; HENEGOUWEN, 1982). Desse modo, ambas as aminotransferases apresentaram suas atividades aumentadas no fígado de ratos de 15 dias de idade expostos ao Roundup®, sugerindo que o pesticida promova alterações metabólicas no tecido hepático. Esses resultados estão de acordo com os achados de Samanta et al. (2014) que observaram elevação na atividade da ALT e da AST no fígado de peixes após exposição a uma formulação de glifosato (17,2 mg/L) durante 30 dias.

A atividade da GGT sérica foi investigada como um biomarcador sensível de dano hepático em caso de agressão pelos toxicantes. Os resultados evidenciaram aumento na atividade da GGT no soro dos ratos expostos de forma crônica ao Roundup®, indicando hepatotoxicidade induzida pelo herbicida. Tais achados também foram descritos por Astiz, de Alaniz e Marra (2009a) os quais relataram aumento na atividade da GGT sérica em ratos Wistar tratados com 10 mg/kg de glifosato via intraperitoneal durante 5 semanas.

Outro trabalho produzido por Jasper e colaboradores (2012) demonstraram que a exposição subaguda a 50 ou 500 mg/kg de glifosato-Roundup® diluídos na água de beber de camundongos Swiss Albinos machos e fêmeas durante um período de 15 dias foi capaz de estimular a atividade da GGT sérica, bem como a atividade da ALT e da AST presentes no soro, em ambas as concentrações estudadas, tanto nos machos quanto nas fêmeas. No entanto, não foram encontradas diferenças consideráveis na histologia do tecido hepático.

Nesse contexto, o presente estudo também observou aumento na atividade das aminotransferases séricas sem alterações histológicas no fígado da prole após exposição materna ao Roundup®. Gholami-Seyedkolaei e colaboradores (2013) revelaram anteriormente um aumento na atividade da ALT e da AST no soro de peixes *Cyprinus carpio* depois de exposição a diferentes concentrações de Roundup® (3,5, 7,0 e 14 ppm) durante 1, 3, 5, 9 e 16 dias, sendo que a maior atividade enzimática de ambas as transaminases foi encontrada após exposição a 14 ppm do herbicida.

Benedetti e colaboradores (2004) também mostraram que o tratamento subcrônico a concentrações crescentes (4,87, 48,7 ou 487,0 mg/kg) de Glifosato-Biocarb® na água de beber a cada 2 dias durante 75 dias em ratos Wistar adultos, aumentou a atividade da ALT no soro dos animais em todas as concentrações estudadas enquanto houve elevação na atividade da AST sérica nas duas maiores concentrações do pesticida. Além disso, foi verificado aumento no número de células de Kupffer nos sinusoides hepáticos no grupo tratado com 487 mg/kg de glifosato, seguido por depósito de tecido conjuntivo, indicando que o Glifosato-Biocarb® alterou a histologia hepática no modelo experimental. Por outro lado, corroborando os resultados do presente estudo, Larsen e colaboradores (2012) não relataram alterações histomorfológicas no fígado de ratos após exposição crônica a uma formulação contendo glifosato numa concentração 10 vezes maior do que a permitida na água para consumo humano (US EPA, 2011).

A maioria das proteínas plasmáticas é produzida pelo fígado. O tratamento com Roundup® não interferiu no conteúdo total de proteínas presentes no soro dos animais expostos durante a gestação e lactação. O mesmo achado foi obtido por El-Shenawy (2009), o qual demonstrou que a exposição à dose subletal de Roundup® durante 15 dias, não afetou significativamente a concentração de proteínas séricas em ratos Wistar adultos. Tizhe e colaboradores (2013) também mostraram que não houve diferença significativa na concentração de proteína total no soro de ratos após exposição oral a baixas concentrações de glifosato (14,4 mg/kg) nem em altas concentrações (375,0 mg/kg) do herbicida.

O ferro é um micronutriente essencial para a homeostase celular. Esse íon é vital para o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA, metabolismo energético e defesa do hospedeiro. É um cofator importante para enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e na fixação do nitrogênio. Nos mamíferos é utilizado principalmente na síntese da hemoglobina nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado (WIJAYANTI; KATZ; IMMENSCHUH, 2004).

No entanto, a capacidade do ferro em perder ou ganhar elétrons permite que esse íon participe de reações geradoras de radicais livres, e caso não seja rigorosamente controlado os RL poderão lesionar os tecidos (TORTI; TORTI, 2013). Dessa forma, é preciso que exista um equilíbrio no metabolismo do ferro, de modo que não haja falta ou excesso do mesmo. Visto que a homeostase possibilita a manutenção das funções celulares essenciais e ao mesmo tempo evita possíveis danos teciduais (BEAUMONT; VAILONT, 2006; DONOVAN; ROY; ANDREWS, 2006).

Frente a isso, nosso estudo demonstrou aumento na concentração de ferro em soro e fígado de ratos após exposição materna ao Roundup®. Whysner e Wang (2001) observaram anteriormente acúmulo de ferro nos hepatócitos de ratos fêmeas e machos da linhagem Sprague Dawley expostos ao pesticida organoclorado Aroclor® durante 26 semanas. Outro estudo desenvolvido por Abe e colaboradores (2006) revelaram que uma dieta rica em ferro (40 ppm ou 320 ppm) por 5 semanas seguida da administração via subcutânea a diferentes concentrações do herbicida Diquat (DQ) (0,05, 0,075 ou 0,1 mmol/kg) horas antes da eutanásia de ratos Fischer-344 foi capaz de induzir hepatotoxicidade nos animais com maior reserva de ferro no fígado, além disso, a sobrevivência após a exposição ao DQ foi correlacionada inversamente com o conteúdo de ferro no órgão, de tal modo que estoques elevados de ferro no organismo resultaram em toxicidade mais severa do DQ sobre os ratos.

A capacidade total de ligação de ferro mostrou-se aumentada enquanto a concentração de transferrina sérica apresentou-se diminuída nos ratos expostos ao Roundup® desde a gestação até o aleitamento. Esses dados corroboram o excesso de ferro observado no organismo desses animais, uma vez que há uma menor quantidade de transferrina no soro para transportar o ferro. Além da transferrina não se encontrar com os seus sítios de ligação ocupados pelo ferro devido a sua maior capacidade total de ligação de ferro, causando o acúmulo desse íon no corpo dos ratos tratados com o herbicida.

O alto teor de ferro no organismo está associado a vários estados patológicos, incluindo as doenças no fígado (YANG et al., 1998; MILMAN et al., 2001), cancerosas (BECKMAN et al., 1999; PARKKILA et al., 2001), desordens neurodegenerativas (SAYRE et al., 2000; BERG et al., 2001), diabetes (PEREZ et al., 2000; ELLERVIK et al., 2001, PARKKILA et al., 2001), anormalidades hormonais

(WILKINSON, 1996) e anormalidades do sistema imune (LI; ZHU; SINGAL, 2000; WALKER; WALKER, 2000).

Normalmente, o ferro quando não utilizado é transportado na forma de Fe^{3+} do soro aos tecidos pela transferrina e armazenado sob a forma de ferritina. Dessa forma, a transferrina previne o organismo dos efeitos tóxicos decorrentes de concentrações elevadas de ferro circulante (Fe^{2+}), bem como a ferritina mantém o excesso de ferro estocado nos tecidos em uma forma relativamente não tóxica (Fe^{3+}) (ANDREWS, 1999; WHYSNER; WANG, 2001).

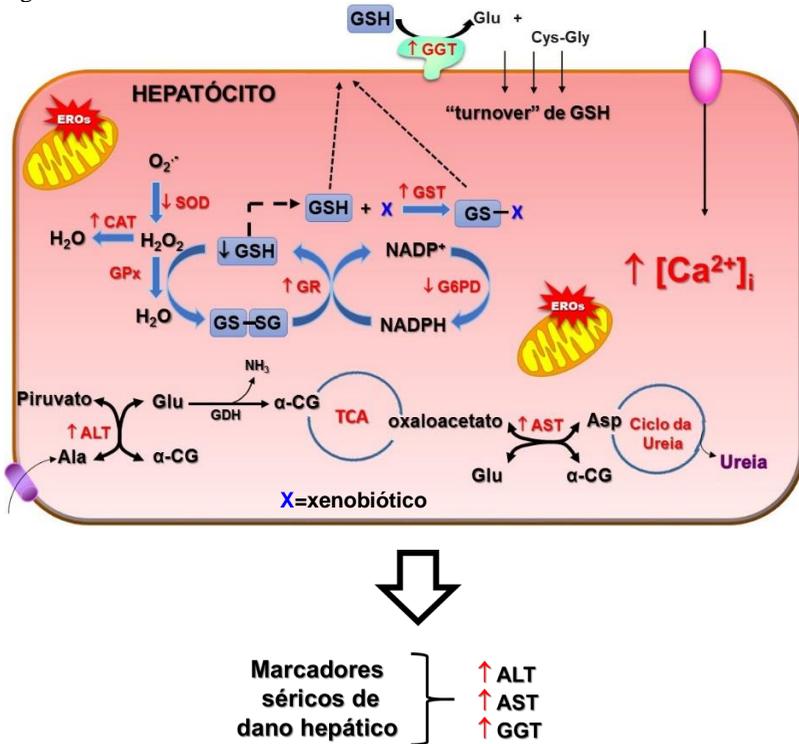
O fígado é o principal local de armazenamento de ferro no corpo, assim o tecido hepático é um importante sítio de toxicidade desse íon durante uma sobrecarga de ferro. Além disso, há uma doença onde o organismo acumula quantidades excessivas de ferro a qual denomina-se hemocromatose (PIETRANGELO, 2016). Desse modo, no presente estudo foi observado depósito de ferro no fígado, aumento de ferro sérico e por fim diminuição na principal proteína de ligação de ferro no soro, a transferrina. Assim, propõe-se que os ratos imaturos expostos ao glifosato-Roundup® apresentem hemocromatose secundária. Ademais, com o conjunto dos dados, observa-se um aumento significativo na quantidade de ferro livre (Fe^{2+}) no tecido hepático, bem como em outros tecidos. Dessa forma, o Fe^{2+} , via reação de Fenton, pode estar induzindo a geração de EROs no corpo dos filhotes pela exposição materna ao Roundup®. Essa hipótese é consistente com o aumento na produção de EROs observada neste estudo.

7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstraram que o herbicida glifosato-Roundup® pode comprometer diferentes vias metabólicas no fígado, pelo aumento na atividade da ALT e AST hepática, enzimas importantes na interconversão entre o metabolismo de proteínas e de carboidratos. A exposição materna ao glifosato-Roundup® aumentou o influxo de Ca^{2+} no fígado, o que pode levar à ruptura da homeostase do cálcio, promovendo estresse oxidativo e, provavelmente, morte celular. Nos animais expostos à formulação contendo glifosato foi detectado aumento na geração de EROs, bem como elevação no conteúdo de TBARS e carbonilação de proteínas, além de alteração na atividade das enzimas antioxidantes e consequente dano oxidativo. A exposição crônica ao glifosato-Roundup® induziu hepatotoxicidade com elevação na atividade sérica das enzimas GGT, ALT e AST, marcadores periféricos de dano hepático. Além disso, observou-se que o tratamento

com Roundup® foi capaz de aumentar a concentração de ferro total no corpo dos ratos imaturos sugerindo hemocromatose secundária e, também aumentou a concentração de ferro livre no organismo dos animais, de modo que o Fe^{2+} , via reação de Fenton, levou à formação de EROs. Estes eventos foram acompanhados de morfologia hepática inalterada. O mecanismo de hepatotoxicidade proposto para o glifosato-Roundup® em fígado e soro de ratos imaturos está representado esquematicamente na Figura 26. O entendimento das ações do Roundup® sobre o organismo de animais poderá fornecer alvos para novas estratégias terapêuticas em prol da melhoria das disfunções celulares potencialmente causadas por esse herbicida.

Figura 26. Mecanismo de hepatotoxicidade proposto para o Roundup® em fígado e soro de ratos imaturos.



Fonte: do Autor.

8 CONCLUSÕES

- O aumento no influxo de Ca^{2+} e a diminuição na massa do fígado induzidos pelo Roundup® revelaram toxicidade desse pesticida à prole de ratos expostos durante a gestação e aleitamento;
- A formulação comercial à base de glifosato promoveu estresse oxidativo ao gerar EROs, situação refletida no aumento da concentração de TBARS e proteína carbonilada no tecido hepático dos filhotes expostos ao herbicida;
- A exposição materna à formulação comercial contendo glifosato alterou os sistemas de defesa antioxidantes ao estimular a atividade das enzimas CAT, GR, GST e GGT, inibir a atividade da SOD e da G6PD, bem como depletar a GSH, sem afetar a atividade da GPx em fígado de ratos de 15 dias de idade expostos ao herbicida durante o período pré e pós-natal;
- A indução na atividade das aminotransferases hepáticas, ALT e AST pela exposição crônica ao glifosato-Roundup® induziu modificações metabólicas importantes no fígado da prole;
- A exposição materna ao herbicida glifosato causou aumento na atividade da GGT, ALT e AST no soro dos ratos imaturos, sugerindo danos às células hepáticas;
- A exposição ao Roundup® não alterou a concentração total de proteínas séricas nem a morfologia hepática dos animais após tratamento *in vivo* com o pesticida;
- O aumento na concentração de ferro hepático, ferro sérico, CTLF, assim como a diminuição na concentração de transferrina sérica induzidos pela exposição ao Roundup® são dados que em conjunto apontam para o acúmulo de ferro no organismo dos filhotes, sugerindo hemocromatose secundária. Além disso, é possível que o excesso de ferro livre no corpo dos animais estimule a geração de EROs.

9 PERSPECTIVAS

Pretende-se dar continuidade a este trabalho, aprofundando os estudos de investigação dos possíveis alvos de ação do glifosato-Roundup® em fígado e sangue periférico de ratos imaturos. Dentre as principais perspectivas, destacam-se:

- Investigar possíveis alterações na concentração de ferritina (sérica e hepática), uma vez que sua concentração sérica se correlaciona com os estoques de ferro total do organismo;
- Avaliar o efeito da exposição materna ao Roundup® na concentração e no metabolismo da vitamina B12 no soro e fígado dos animais expostos ao herbicida, considerando-se o fígado como um órgão importante no armazenamento dessa coenzima;
- Estudar as consequências da formulação contendo glifosato no metabolismo hepático de carboidratos e glicemia;
- Determinar a expressão da proteína Nrf2 em fígado, com o intuito de confirmar o envolvimento dessa via na resposta ao estresse oxidativo gerado pelo herbicida;
- Investigar os parâmetros oxidativos e as vias de sinalização celular em tecido hepático após exposição *in vitro* ao pesticida.

REFERÊNCIAS

- ABD ELLAH, M.R.; OKADA, K.; YASUDA, J. Oxidative stress and bovine liver diseases: Role of glutathione peroxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Jpn J Vet Res.**, v. 54, n. 4, p.163-73, 2007.
- ABE, T.; KINDA, T.; TAKANO, Y.; CHIKAZAWA, S.; HIGUCHI, M.; KAWASAKI, N.; ORINO, K.; WATANABE, K. Relationship between body iron stores and diquat toxicity in male Fischer-344 rats. **Biometals**, v. 19, n.6, p.651-7, 2006.
- ADAMS, D.H.; EKSTEEN, B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. **Nat. Rev. Immunol.** v. 6, n.3, p-244-51, 2006.
- ADEVA, M.M.; SOUTO, G.; BLANCO, N.; DONAPETRY, C. Ammonium metabolism in humans. **Metabolism.**, v. 61, n. 11, p.1495-1511, 2012.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 204, p. 234–254, 1984.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 6 ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2015.
- AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p.589-593, 2002.
- AMAYA, M.J; NATHANSON, M.H. Calcium signaling and the secretory activity of bile duct epithelia. **Cell Calcium**, v .55, n.6, p. 317-324, 2014.
- AMAYA, M.J; NATHANSON, M.H. Calcium signaling in the liver. **Compr Physiol.** v .3, n.1, p. 515-39, 2013.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; MARTINEZ, M.A.; CASTELLANO, V.J.; MARTÍNEZ, M.; MARTIN, M.T.;

NOZAL, M.J.; BERNAL, L.L. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicol Lett.**, v. 190, p. 91–95, 2009.

ANDRADES, T. O; GANIMI, N. R. Revolução verde e a apropriação capitalista. **CES Revista**, v. 21, p. 43-56, 2007.

ANDREWS, N.C. Disorders of iron metabolism. **N Engl J Med.**, v. 341, n. 26, p. 1986-95, 1999.

ANDRIGHETTI, M.S. **Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos cultivados com macieira com diferentes históricos de aplicação deste herbicida**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias Autorizadas, 2010. **G01 – Glifosato**. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4e789280484701079bb2bfbd15bfe28/G01++Glifosato.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 11 set 2015.

ANVISA. **Seminário Anvisa: mercado e regulação de agrotóxicos**, 2012. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b064b7804c1890a395ccd5dc39d59d3e/Semin%C3%A1rio+ANVISA+Mercado+e+Regula%C3%A7%C3%A3o+de+Agrot%C3%B3xicos+2012+%5BSomente+leitura%5D.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 08 set 2015.

ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), relatório de atividades de 2011 e 2012. **Gerência-Geral de Toxicologia 2013**. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/58a5580041a4f6669e579ede61db78cc/Relat%C3%B3rio+PARA+2011-12+-+30_10_13_1.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 09 set. 2015.

ANVISA. **Anvisa esclarece sobre carcinogenicidade de cinco substâncias comercializados no país, 2015**. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+im+prensa/menu++noticias+anos/2015/anvisa+esclarece+sobre+carcinogenicidade+de+cinco+substancias+comercializados+no+pais>. Acesso em: 15 set 2015.

APTE, U.; KRISHNAMURTHY, P. Chapter 11: Detoxification Functions of the Liver. In: MONGA, S.P.S. **Molecular Pathology of Liver Diseases**. New York: Springer, 2011.

ARIS, A.; LEBLANC, S. Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada. **Reprod Toxicol**, v. 31, n. 4, p. 528–33, 2011.

ARTHUR, J.R. The glutathione peroxidases. **Cell Mol Life Sci.**, v. 57, n. 13-14, p. 1825–1835, 2000.

ASTIZ, M., DE ALANIZ, M.J.T., MARRA, C.A. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v.28, n.3, p.465–473, 2009a.

ASTIZ, M., DE ALANIZ, M.J.T., MARRA, C.A. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v.72, n.7, p.2025–2032, 2009b.

ASTIZ, M., DE ALANIZ, M.J.T., MARRA, C.A. The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. **Pestic Biochem Physiol.**, v.94,n. 2-3, p.93–99, 2009c.

AUGUSTO, L. G. S.; CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; FARIA, N. M. X.; BÚRIGO, A. C.; FREITAS, V. M. T.; GUIDUCCI FILHO, E. **Dossiê ABRASCO** – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 2. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R. BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n.4, p. 629-643, 2010a.

BARBOSA, A.A; MÜLLER, E.S.; MORAES, G.H.K.; UMIGI, R.T.; BARRETO, S.L.T.; FERREIRA, R.M. Perfil da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase e biometria do fígado de codornas japonesas. **R. Bras. Zootec.**, v.39, n.2, p.308-312, 2010b.

BARRITT, G.J.; CHEN, J.; RYCHKOV, G.Y. Ca²⁺-permeable channels in the hepatocyte plasma membrane and their roles in hepatocyte physiology. **Biochim Biophys Acta.**, v.1783, n. 5, p. 651-672, 2008.

BARTLETT, P. J.; GASPERS, L.D.; PIEROBON, N.; THOMAS, A.P. Calcium-dependent regulation of glucose homeostasis in the liver. **Cell Calcium**, v. 55, n. 6, p. 306-316, 2014.

BEAUMONT, C.; VAILONT, S. Iron homeostasis. In: BEAUMONT, C.; BERIS, P.; BEUZARD, Y.; BRUGNARA, C. **Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis**. Genova, Italy: Forum Service Editore, 2006.

BECKMAN, L.E.; VAN LANDEGHEM, G.F.; SIKSTROM, C.; WAHLIN, A.; MARKEVARN, B.; HALLMANS, G.; LENNER, P.; ATHLIN, L.; STENLING, R.; BECKMAN, L. Interaction between haemochromatosis and transferrin receptor genes in different neoplastic disorders. **Carcinogenesis**, v. 20, n.7, p.1231-1233, 1999.

BENACHOUR, N.; SERALINI, G.E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, 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. **Arch Environ Contam Toxicol**. v. 53, p. 126-133, 2007.

BENBROOK, C. The magnitude and impacts of the biotech and organic seed price premium. **The Organic Center, 2009**. Disponível em: <https://organic-center.org/reportfiles/SeedPricesExecSummary.pdf>. Acesso em: 16 set. 2015.

BENEDETTI, A.L.; DE LOURDES VITURI, C.; TRENTIN, A.G.; DOMINGUES, M.A.; ALVAREZ-SILVA, M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. **Toxicol Lett.**, v.153, n. 2, p. 227-32, 2004.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v. 47, n.3, p. 233-261, 1996.

- BERG, D.; GERLACH, M.; YODIM, M.B.; DOUBLE, K.L.; ZECCA, L.; RIEDERER, P.; BECKER, G. Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. **J. Neurochem.**, v. 79, n. 2, p. 225-236, 2001.
- BERRIDGE, M.J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 1, n.1, p. 11-21, 2000.
- BEURET, C. J.; ZIRULNIK, F.; GIMÉNEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. **Reprod Toxicol.**, v.19, n. 4, p. 501-504, 2005.
- BEUTLER, E.; DURON O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 61, p. 882–90, 1963.
- BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol**, v. 90, p. 105–10, 1984.
- BOMBARDI, L. M. Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado. **Boletim DATALUTA**, 2011. Disponível em: http://www2.fct.unesp.br/nera/artigodomes/9artigodomes_2011.pdf. Acesso em: 21 jun. 2015.
- BONNY, S. Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: overview and impact. **Environ Manage.** 2015.
- BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.I.; KOCH, O.R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 227, n. 2, p. 534–541, 1983.
- BRAKE, D.G.; EVENSON, D.P. A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development. **Food Chem Toxicol.**, v. 42, p. 29–36, 2004.

BUKOWSKA, B. Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.**, v. 135, n.4, p. 435-441, 2003.

BØHN, T. CUHRA, M.; TRAAVIK, T.; SANDEN, M.; FAGAN, J.; PRIMICERIO, R. Compositional differences in soybeans on the market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. **Food Chem.**, v. 153, p. 207-215, 2014.

ÇAGLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v. 25, p. 57–62, 2008.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymol.**, v. 113, p. 484–490, 1985.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R, M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZZOLO, A.; FARIA, N. M. X.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1.** Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

CASAS-GRAJALES, S.; MURIEL, P. Antioxidants in liver health. **World J Gastrointest Pharmacol Ther.**, v. 6, n. 3, p. 59-72, 2015.

CATTANI, D.; CAVALLI, V. L. L. O.; RIEG, C. E. H.; DOMINGUES, J. T.; DAL-CIM, T.; TASCA, C.; SILVA, F. R. M. B. S.; ZAMONER, A. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320, p. 34-45, 2014.

ÇAVUŞOĞLU, K.; YAPAR, K.; ORUÇ, E.; YALÇIN, E. Protective effect of Ginkgo biloba L. leaf extract against glyphosate toxicity in Swiss albino mice. **J Med Food.**, v. 14, n. 10, p. 1263-72, 2011.

CERDEIRA, A.L.; GAZZIERO, D.L.; DUKE, S.O.; MATALLO, M.B. Agricultural Impacts of Glyphosate-Resistant Soybean Cultivation in South America. **J Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 11, p. 5799–5807, 2011.

CHAHOUD, I.; LIGENSA, A.; DIETZEL, L.; FAQI, A.S. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reprod Toxicol.** v.13, n. 5, p. 375–381, 1999.

CHAUFAN, G.; COALOVA, I. ; MOLINA, M.C.R. Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells differences with its active ingredient. **Int J Toxicol.**, v.33, n.1, p.29-38, 2014.

CHEN, Y.; DONG, H.; THOMPSON, D.C.; SHERTZER, H. G.; NEBERT, D.W.; VASILIOU, V. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. **Food Chem Toxicol.**, v. 60, p. 38-44, 2013.

CLAIR, E.; MESNAGE, R.; TRAVERT, C.; SÉRALINI, G.E. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. **Toxicol in Vitro**, v. 26, n. 2, p. 269-279, 2012.

CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. **Cell**, v. 80, n.2, p. 259-268, 1995.

COLNOT, S; PERRET, C. Chapter 2: Liver zonation. In: MONGA, S.P.S. **Molecular Pathology of Liver Diseases**. New York: Springer, 2011.

COOPER, A.J. ¹³N as a tracer for studying glutamate metabolism. **Neurochem Int.**, v. 59, n. 4, p. 456-464, 2011.

CURVO, H. R. M.; PIGNATI, W. A.; PIGNATTI, M. G. Morbimortalidade por câncer infantojuvenil associada ao uso agrícola de agrotóxicos no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Cad. Saúde Colet.**, v.21, n.1, p. 10-17, 2013.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin. Chem.**, v. 52, n. 4, p. 601–623, 2006.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicol Lett.**, v. 142, n.1-2, p. 45-52, 2003.

DARUICH, J.; ZIRULNIK, F.; GIMENEZ, M.S. Effect of the Herbicide Glyphosate on Enzymatic Activity in Pregnant Rats and Their Fetuses. **Environ. Res. Sec. A.** v. 85, n.3, p. 226-231, 2001.

DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V. L.; CATTANI, D.; HEINZ RIEG, C. E.; PIEROZAN, P.; ZANATTA, L.; BENEDETTI PARISOTTO, E.; WILHELM FILHO, D.; MENA BARRETO SILVA, F. R.; PESSOA-PUREUR, R.; ZAMONER, A. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radic Biol Med.**, v. 65, p. 335–346, 2013.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **J. Hypertens.**, v.18, n.6, p.655–673, 2000.

DI GIULIO, R.T.; WASHBURN, P.C.; WENNING, R.J. WINSTON, G.W.; JEWELL, C.S. Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 8, n. 12, p 1103-1123, 1989.

DILL, G.M.; SAMMONS, R.D.; FENG, P.C.C.; KOHN, F.; KRETZMER, K.; MEHRSHEIKH, A.; BLEEKE, M.; HONEGGER, J.L.; FARMER, D.; WRIGHT, D.; HAUPFEAR, E.A. Chapter 1: Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In: NANDULA, VK. **Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management.** Hoboken (NJ): Wiley, 2010.

DONOVAN, A.; ROY, C.N.; ANDREWS, N.C. The ins and outs of iron homeostasis. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p.115-23, 2006.

DROZDZ, R.; PARMENTIER, C.; HACHAD, H.; LEROY, P.; SIEST, G.; WELLMAN, M. Gamma-glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. **Free Radic Biol Med.**, v. 25, n. 7, p. 786–792, 1998.

DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once in a century herbicide. **Pest Manag Sci.**, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.

ELLERVIK, C.; MANDRUP-POULSEN, T.; NORDESTGAARD, B.G.; LARSEN, L.E.; APPELYARD, M.; FRANDBSEN, M.;

PETERSEN, P.; SCHLICHTING, P.; SAERMARK, T.; TYBJAERGHANSEN, A.; BIRGENS, H. Prevalence of hereditary haemochromatosis in late-onset type 1 diabetes mellitus: a retrospective study. **Lancet.**, v. 358, n. 9291, p. 1405-1409, 2001.

EL-SHENAWY, N.S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 28, n.3, p. 379-385, 2009.

ERMAK, G.; DAVIES, K. J. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. **Mol Immunol.**, v.38, n. 10, p. 713-721, 2001.

FARM CHEMICALS INTERNATIONAL. In: **Crop Protection Database**. Glyphosate. Willoughby (OH): Meister Media Worldwide, 2015. Disponível em: <http://www.farmchemicalsinternational.com/crop-protection-database/#/product/detail/203900/>. Acesso em: 15 set. 2015.

FELIG, P. The glucose-alanine cycle. **Metabolism.**, v. 22, n. 2, p. 179-207, 1973.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FILIZOLA, H.F.; FERRACINI, V.L.; SANS, L.M.A.; GOMES, M.A.F.; FERREIRA, C.J.A. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaíra. **Pesq. agropec. bras.**, v. 37, n. 5, p. 659 -667, 2002.

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz. **Brasil consome 14 agrotóxicos proibidos no mundo, 2014**. Disponível em: <http://redesfito.far.fiocruz.br/index.php/noticias/58-brasil-consome-14-agrotoxicos-proibidos-no-mundo>. Acesso em: 10 set 2015.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, n.1, p. 114-121, 1984.

FRASER, A.; HARRIS, R.; SATTAR, N.; EBRAHIM, S.; DAVEY SMITH, G.; LAWLOR, D.A. Alanine aminotransferase, gamma-glutamyl transferase, and incident diabetes: the British Women's Heart

and Health Study and meta-analysis. **Diabetes Care.**, v. 32, n. 4, p.741-50, 2009.

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. 3, p. 184-191, 2009.

GEHIN, A.; GUYON, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v. 22, p. 27–34, 2006.

GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S.J.; MIRVAGHEFI, A.; FARAHMAND, H.; KOSARI, A.A. Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v.98, p.135-141, 2013.

GLUSCZAK, L.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; MORAES, B.S.; RAABE, A.; DUARTE, M.F.; FONSECA, M.B.; MENEZES, C.C.; VALLADÃO, D.M.S. Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Arch Environ Contam Toxicol.**, v. 61, n.4, p.624–630, 2011.

GOODWIN, J.F.; MURPHY, B.; GUILLEMETTE, M. Direct measurement of serum iron and binding capacity. **Clin Chem.**, v.12, n. 2, p. 47-57, 1966.

GROTTO, D.; SANTA MARIA, L.D.; BOEIRA, S.; VALENTINI, J.; CHARÃO, M.F.; MORO, A.M.; NASCIMENTO, P.C.; V.J. POMBLUM, V.J.; GARCIA, S.C. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 43, n. 2, p.619-624, 2007.

GUHA, N.; WARD, M.H.; GUNIER, R.; COLT, J.S.; LEA, C.S.; BUFFLER, P.A.; METAYER, C. Characterization of residential pesticide use and chemical formulations through self-report and household inventory: the Northern California Childhood Leukemia study. **Environ Health Perspect**, v. 121, n.2, p. 276–82, 2013.

GUYTON, K.Z.; LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; EL GHISSASSI, F.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; SCOCCIANTI, C.; MATTOCK, H.; STRAIF, K. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **Lancet Oncol.**, v. 16, n. 5, p.490-1, 2015.

HABIG, W.H; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, n.1, p.7130–7139, 1976.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **Am J Med.**, v. 91, p. 14S-22S, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4.ed. New York: Oxford University Press. 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**. v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.

HAZARIKA, A.; SARKAR, S.N.; HAJARE, S.; KATARIA, M.; MALIK, J.K. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. **Toxicology.**, v. 185, p.1–8, 2003.

HODGSON E. **A textbook of modern toxicology**. 4 ed. North Carolina: Wiley, 2010.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p.1170-1179, 2008.

HUEBERT, R.C.; SHAH, V.H. Chapter 5: Hepatic sinusoidal endothelial cells. In: DUFOUR, J.F.; CLAVIEN, P.A. **Signaling pathways in liver diseases**. 2 ed. Berlin: Springer, 2010.

IARC MONOGRAPHS-112. **Glyphosate, 2015**. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-02.pdf>. Acesso em: 23 jul 2015.

IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002.** Dados Atualizados: 15/09/2014.

Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>. Acesso em: 08 set 2015.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes.** v. 37, 2010.

Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010_Publicacao_completa.pdf. Acesso em: 09 set 2015.

IBGE. **Altas de saneamento 2011.** Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.shtm. Acesso em: 09 set. 2015.

IBGE. Agricultura. Banco de dados agregados. Pesquisas e tabelas.

Produção agrícola municipal. Última atualização: 2013. Disponível em:

<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo9.asp?e=c&p=PA&z=t&o=11>. Acesso em: 09 set 2015.

INOUE, M.; SATO, E.F.; NISHIKAWA, M.; PARK, A.M.; KIRA, Y.; IMADA, I.; UTSUM, K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Curr Med Chem.**, v. 10, n. 23, p. 2495-2505, 2003.

INTERNATIONAL LABOR ORGANIZATION (ILO). **World Day for Safety and Health at Work: A Background Paper.** In: Focus Programme on SafeWork. Geneva: International Labour Office, The World Health Organization, 2005.

JAESCHKE, H. Cap. 13: Toxicidade hepática pela exposição a xenobióticos. In: KLAASSEN, C.D; WATKINS, J.B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull.** 2 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

JASPER, R.; LOCATELLI, G. O.; PILATI, C.; LOCATELLI, C. Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup. **Interdiscip Toxicol.**, v. 5, n.3, p.133-140, 2012.

JOBIM, P.F.C; NUNES, L. N.; GIUGLIANI, R.; CRUZ, I.B.M. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v.15, n.1, p. 277-288, 2010.

KAVITHA, P.; RAO, J.V. Oxidative stress and locomotor behavior response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 87, p.182–188, 2007.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v.18, n. 2, p. 435-445, 2002.

KOURY J.C, DONANGELO C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr**. v. 16, n. 4, p. 433-41, 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. **Robbins & Cotran**: Patologia- Bases patológicas das doenças. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KUNTZ, E.; KUNTZ, H.D. **Hepatology**: textbook and atlas. 3 ed. Berlin: Springer, 2008.

LARSEN, K.; NAJLE, R.; LIFSCHITZ, A.; MATÉ, M. L.; LANUSSE, C.; VIRKEL, G. L. Effects of sublethal exposure to a glyphosate-based herbicide formulation on metabolic activities of different xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. **Int J Toxicol.**, v. 33, n. 4, p. 307-318, 2014.

LARSEN, K.; NAJLE, R.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v. 34, n. 3, p. 811-818, 2012.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v.186, p.464-478, 1990.

- LI, J.; ZHU, Y.; SINGAL, D.P. HFE gene mutations in patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 27, n.9, p. 2074-2077, 2000.
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida.** Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-267, 1951.
- LUEKEN, A.; JUHL-STRAUSS, U.; KRIEGER, G.; WITTE, I. Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H₂O₂) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. **Toxicol Lett.**, v. 147, p. 35–43, 2004.
- MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BELLÉ, R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. **Biol Cell.**, v. 96, n. 3, p. 245–249, 2004.
- MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BOULBEN, S.; HUREAU, D.; DURAND, G.; BELLÉ, R. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chem Res Toxicol.** v. 15, n. 3, p. 326–331, 2002.
- MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; DURAND, G.; BELLÉ, R. Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. **Environ. Chem. Lett.** v. 1, p. 8–12, 2003.
- MARONPOT, R.R.; YOSHIZAWA, K.; NYSKA, A.; HARADA, T.; FLAKE, G.; MUELLER, G.; SINGH, B.; WARD, J.M. Hepatic enzyme induction: : histopathology **Toxicol Pathol.** v. 38, n. 5, p. 776-795, 2010.
- MARRA, F.; GALASTRI, S.; ALEFFI, S.; PINZANI, M. Chapter 3: Stellate Cells. In: DUFOUR, J.F.; CLAVIEN, P.A. **Signaling pathways in liver diseases.** 2 ed. Berlin: Springer, 2010.
- MASELLA, R.; DI BENEDETTO, R.; VARÌ, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant

compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J Nutr Biochem.**, v. 16, n. 10, p. 577-86, 2005.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; NÚÑEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem**, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.

MAZON, L. M.; SOUZA, A. Z. P. Estudo exploratório entre trabalhadores rurais expostos ocupacionalmente a agrotóxicos. **Rev. Uniandrade**, v. 16, n. 1, p. 31-38, 2015.

MELLO JL. **Avaliação da contaminação por HCH e DDT, dos leites de vaca e humano, provenientes da cidade dos meninos, Duque de Caxias-RJ.** Dissertação de mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

MENEZES, C.C.; FONSECA, M.B.; LORO, V.L.; SANTI, A.; CATTANEO, R.; CLASEN, B.; PRETTO, A.; MORSCH, V.M. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 60, n. 4, p.665–671, 2011.

MESNAGE, R.; ARNO, M.; COSTANZO, M.; MALATESTA, M.; SÉRALINI, G.E.; ANTONIOU, M.N. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. **Environ Health.**, 14:70, 2015a.

MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SÉRALINI, G. E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology**. v. 313, n. 2-3, p. 122-8, 2013.

MESNAGE, R.; DEFARGE, N.; VENDÔMOIS, J. S.; SÉRALINI, G. E. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. **Biomed Res Int**, 2014.

MESNAGE, R.; DEFARGE, N.; VENDÔMOIS, J. S.; SÉRALINI, G. E. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food Chem Toxicol.**, v. 84, p. 133-53, 2015b.

- MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MOREIRA, J. C. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos? **Cad. Saúde Pública**, v.15, n. 4, p.845-850, 1999.
- MILLER, J.K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F.C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **J. Dairy Sci.**, v. 76, n. 9, p. 2812-2823, 1993.
- MILMAN, N.; PEDERSEN, P.; À STEIG, T.; BYG, K.E.; GRAUDAL, N.; FENGER, K. Clinically overt hereditary hemochromatosis in Denmark 1948-1985: epidemiology, factors of significance for long-term survival, and causes of death in 179 patients. **Ann. Hematol.**, v. 80, n.12, p. 737- 744, 2001.
- MISDRAJI.J. Cap. 71: Embriologia, anatomia, histologia e anomalias do desenvolvimento hepático. In: FELDMAN, M.; FRIEDMAN, L.S.; BRANDT, L.J. **Tratado gastrointestinal e doenças do fígado de Sleisenger e Fordtran**. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, 1972.
- MIZUGUCHI, Y.; SPECHT, S.; ISSE, K.; LUNZ III, J.G; DEMETRIS, A. J. Chapter 4: Biliary epithelial cells. In: MONGA, S.P.S. **Molecular Pathology of Liver Diseases**. New York: Springer, 2011.
- MLHB. **Determination of glyphosate residues in human urine samples from 18 European countries**. Bremen: Medical Laboratory of Bremen, 2013. Disponível em: https://www.foeeurope.org/sites/default/files/glyphosate_studyresults_ju ne12.pdf. Acesso em 16 set. 2015.
- MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p.294-299, 2010.
- MONROY, C. M.; CORTÉS, A.C.; SICARD, D.M.; GROOT DE RESTREPO, H. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. **Biomédica**, v. 25, n. 3, p. 335-345, 2005.

MONSANTO. FISPQ - Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. **Roundup® Original**. Disponível em: <http://www.monsanto.com/global/br/produtos/documents/roundup-original-fispq.pdf>. Acesso em: 14 set. 2015.

MURUSSI, C.R.; COSTA, M.D.; LEITEMPERGER, J.W.; GUERRA, L.; RODRIGUES, C.C.R.; MENEZES, C.C.; SEVERO, E.S.; FLORES-LOPES, F.; SALBEGO, J.; LORO, V.L. Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. **Fish Physiol Biochem.**, 2015.

NEVISON, C.D. A comparison of temporal trends in United States autism prevalence to trends in suspected environmental factors. **Environ Health.**, 73:13, 2014

OOKHTENS, M; KAPLOWITZ, N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. **Semin Liver Dis.**, v. 18, n. 4, p. 313-29, 1998.

ORLOWSKI, M.; MEISTER, A. Gamma-glutamyl-p-nitroanilide: a new convenient substrate for determination and study of l- and d-gamma-glutamyltranspeptidase activities. **Biochim Biophys Acta.**, v. 73, p. 679-81, 1963.

ORTONA, E.; MARGUTTI, P.; MATARRESE, P.; FRANCONI, F.; MALORNI, W. Redox state, cell death and autoimmune diseases: a gender perspective. **Autoimmun Rev.**, v. 7, n. 7, p. 579-84, 2008.

ORUÇ, E.O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.**, v. 137, p. 43-51, 2004.

PAGANELLI, A., GNAZZO, V., ACOSTA, H., LÓPEZ, S.L., CARRASCO, A.E. Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. **Chem Res Toxicol.**, v. 23, n. 10, p. 1586–1595, 2010.

PALMA, D. C. A. **Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde-MT**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 3, p. 2-12, 2010.

PARKKILA, S.; NIEMELA, O.; SAVOLAINEN, E.R.; KOISTINEN, P. HFE mutations do not account for transfusional iron overload in patients with acute myeloid leukemia. **Transfusion.**, v. 41, n. 6, p. 828-831, 2001.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 20, p. 112–117, 2005.

PASTORE, A., FEDERICI, G., BERTINI, E., PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin. Chim. Acta.**, v. 333, p. 19–39, 2003.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p. 1115–1122, 2005.

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J.C. **É veneno ou remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003.

PERES, F.; OLIVEIRA-SILVA, J.J.; DELLA-ROSA, H.V.; LUCCA, S.R. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 10, p. 27-37, 2005.

PÉREZ DE NANCLARES, G.; CASTANO, L.; GAZTAMBIDE, S.; BILBAO, J.R.; PI, J.; GONZÁLEZ, M.L.; VÁZQUEZ, J.A. Excess iron storage in patients with type 2 diabetes unrelated to primary hemochromatosis. **N Engl. J. Med.**, v. 343, n. 12, p. 890-891, 2000.

PETERSEN, O.H.; PETERSEN, C.C.H.; KASAI, H. Calcium and hormone action. **Annu Rev Physiol.**, v. 56, p. 297-319, 1994.

PEY, A.; SABORIDO, A.; BLÁZQUEZ, I.; DELGADO, J.; MEGÍAS, A. Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme

activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.87, p.269–277, 2003.

PIETRANGELO, A. Iron and the liver. **Liver Int.**, v. 36, Suppl 1, p.116-23, 2016.

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling, **Curr. Med. Chem.**, v. 11, n. 9, p. 1163–1182, 2004.

POLLEGIONI, L.; SCHONBRUNN, E.; SIEHL, D. Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering. **FEBS J.**, v. 278, n. 16, p.2753-2766, 2011.

PRADO, W.A. Involvement of calcium in pain and antinociception. **Braz J Med Biol Res.** v. 34, n.4, p. 449-461, 2001.

PRATT, D.S.; KAPLAN, M.M. Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients. **N Engl J Med.**, v. 342, n. 17, p. 1266-71, 2000.

RADÁK, Z. **Free Radicals in Exercise and Aging**. Champaign: Human Kinetics, 2010.

RÉCASSENS, M; VIGNES, M. Excitatory amino acid metabotropic receptor subtypes and calcium regulation. **Ann N Y Acad Sci.** v. 10, n. 757, p. 418-29, 1995.

RELYEA, R.A. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. **Arch Environ Contam Toxicol.**, v. 48, n. 3, 351-7, 2005.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. **Environ Health Perspect.**, v. 113, n. 6, p. 716-720, 2005.

RINALDI, R.; ELIASSON, E.; SWEDMARK, S.; MORGENSTERN, R. Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. **Drug Metab Dispos.**, v. 30, n. 10, p. 1053–1058, 2002.

RIO GRANDE DO SUL. Secretária Estadual da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. **Agrotóxicos: impactos à saúde e ao ambiente.** Porto Alegre: CEVS, 2008.

RODRIGUES, M.A.; GOMES, D.A.; LEITE, M.F.; GRANT, W.; ZHANG, L.; LAM, W.; CHENG, Y.C.; BENNETT, A. M.; NATHANSON, M.H. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. **J Biol Chem.** v. 282, n. 23, p. 17061-8, 2007.

ROMERO, D.M.; MOLINA, M.C.R.; JUÁREZ, A.B. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v.74, n.4, p.741–747, 2011.

ROY-CHOWDHURY, N; ROY-CHOWDHURY, J. Cap.72. Fisiologia e metabolismo energético do fígado. In: FELDMAN, M.; FRIEDMAN, L.S.; BRANDT, L.J..**Tratado gastrointestinal e doenças do fígado de Sleisenger e Fordtran. Tratado gastrointestinal e doenças do fígado.** 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

SAMANTA, P.; PAL, S.; MUKHERJEE, A.K.; GHOSH, A.R. Evaluation of Metabolic Enzymes in Response to Excel Mera 71, a Glyphosate-Based Herbicide, and Recovery Pattern in Freshwater Teleostean Fishes. **BioMed Res Int.**, p.1-6, 2014.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. **Surg Neurol Int.**, 6:45, 2015.

SÁNCHEZ, G.M. **Ambiente anti-oxidante/pro-oxidante su impacto medico.** 1 ed . Aracne, 2012.

SAYRE, L.M.; PERRY, G.; ATWOOD, C.S.; SMITH, M.A. The role of metals in neurodegenerative diseases. **Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)**., v. 46, n. 4, p. 731-741, 2000.

SAYRE, L. M.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, n. 7, p. 721–738, 2001.

SCHINASI, L.; LEON, M. E. Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 4, p. 4449-4527, 2014.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte.**, v. 10, n. 4, p. 308-13, 2004.

SÉRALINI, G.E.; CLAIR, E.; MESNAGE, R.; GRESS, S.; DEFARGE, N.; MALATESTA, M.; HENNEQUIN, D.; DE VENDOMOIS, J. Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Environ Sci Eur**, v. 26, p. 1-14, 2014.

SHANER, D.L.; LINDENMEYER, R.B.; OSTLIE, M.H. What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? **Pest Manag Sci.**, v. 68, p. 3-9, 2012.

SIES, H. **Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants**. London: Academic Press, 1991.

SINDIVEG NEWS. 2014a. **Meio ambiente - 14,6 mil toneladas de embalagens vazias de defensivos agrícolas são retiradas do meio ambiente**. 4 ed. Disponível em: <http://www.sindiveg.org.br/noticia.php?ed=4&cod=2404>. Acesso em 10 set 2015.

SINDIVEG NEWS. 2014b. **Sindiveg registra crescimento no setor de defensivos em balanço final de 2013**. 5 ed. Disponível em: <http://www.sindiveg.org.br/noticia.php?ed=5&cod=2416>. Acesso em 10 set 2015.

SINITOX-Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Dados por agentes tóxicos. Agrotóxicos. **Agrotóxicos no geral- 2011 (uso agrícola, doméstico, produtos veterinários e raticidas)**. Dados Atualizados: 04/09/2014. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=403>. Acesso em: 12 set 2015.

SINHORIN, V. D. G.; SINHORIN, A. P.; TEIXEIRA, J. M. S.; MILÉSKEI, K. M. L.; HANSEN, P. C.; MOREIRA, P. S. A.; KAWASHITA, N. H.; BAVIERA, A. M.; LORO, V. L. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidante responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 106, p. 181–187, 2014.

SLEKAR, K. H.; KOSMAN, D. J.; CULOTTA, V. C. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. **J Biol Chem.**, v. 271, n. 46, p. 28831-36. 1996.

SOTO-GUTIERREZ, A.; NAVARRO-ALVAREZ, N.; KOBAYASHI, N. Chapter 3: Hepatocytes. In: MONGA, S.P.S. **Molecular Pathology of Liver Diseases**. New York: Springer, 2011.

SRIBANDITMONGKOL P¹, JUTAVIJITTUM P, PONGRAVEEVONGSA P, WUNNAPUK K, DURONGKADECH P. Pathological and toxicological findings in glyphosate-surfactant herbicide fatality: a case report. **Am J Forensic Med Pathol**, v. 33, n. 3, p. 234-237, 2012.

STEIB, C.J.; GERBES, A.L. Chapter 4: Signaling pathways in liver diseases Kupffer cells. In: DUFOUR, J.F.; CLAVIEN, P.A. **Signaling pathways in liver diseases**. 2 ed. Berlin: Springer, 2010.

STEINRUCKEN, H.C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 94, n. 4, p. 1207–1212, 1980.

STOLZ, D.B. Chapter 7: Sinusoidal endothelial cells. In: MONGA, S.P.S. **Molecular Pathology of Liver Diseases**. New York: Springer, 2011.

TARGHER, G. Elevated serum gamma-glutamyltransferase activity is associated with increased risk of mortality, incident type 2 diabetes, cardiovascular events, chronic kidney disease and cancer: a narrative review. **Clin Chem Lab Med.**, v. 48, n. 2, p. 147-57, 2009.

TAUB R. Liver regeneration: from myth to mechanism. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 5, n.10, p. 836–47, 2004.

TIZHE, E.V.; IBRAHIM, N.D.; FATIHU, M.Y.; IGBOKWE, I.O.; GEORGE, B.D.; AMBALI, S.F.; SHALLANGWA, J.M. Serum biochemical assessment of hepatic and renal functions of rats during oral exposure to glyphosate with zinc. **Comp Clin Path.**, v. 23.p.1043-1050, 2013.

TORTI, S.V.; TORTI, F.M. Iron and cancer: more ore to be mined. **Nat Rev Cancer.**, v. 13, n. 5, p. 342-55, 2013.

TREVISAN, M.; BROWNE, R.; RAM, M.; MUTI, P.; FREUDENHEIM, J.; CAROSELLA, A. M.; ARMSTRONG, D. Correlates of markers of oxidative status in the general population. **Am. J. Epidemiol.**, v. 154, n. 4 p. 348-356, 2001.

TSUNG, A.; GELLER, D.A. Chapter 1: Gross and cellular anatomy of the liver. In: MONGA, S.P.S. **Molecular Pathology of Liver Diseases.** New York: Springer, 2011.

TUNÇMEN, H.; TÜZMEN, M.N. Biochemical effects of pesticide contaminated drinking water on lipid peroxidation and free-radical scavenger. **Hacettepe J. Biol. & Chem.**, v. 35 n. 2, p.111-116, 2007.

US EPA. **2011 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories.** Office of Water U.S. Environmental Protection Agency Washington, 2011.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol Cell Biochem**, v. 266, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 39, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Bio Interact.**, v. 160, n.1, p. 1–40, 2006.

VAN WAARDE, A.; HENEGOUWEN, M.W.B. Nitrogen metabolism in goldfish, *Carassius auratus* (L.). Pathway of aerobic and anaerobic glutamate oxidation in goldfish liver and muscle mitochondria.

Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Comparative Biochemistry, v. 72, n. 1, p. 133–136, 1982.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L.B.E.; FARIA, M.V.C.

Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006.

VISIOLI, F.; BORSANI, L.; GALLI, C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals.

Cardiovasc Res., v. 47, n. 3, p.419–425, 2000.

VROON, D.H.; ISRAILI, Z. Chapter 99: Aminotransferases.

In: WALKER, H.K.; HALL, W.D.; HURST, J.W. **Clinical Methods: the history, physical, and laboratory examinations**. 3 ed. Boston: Butterworths; 1990.

WALKER, E.M.J.; WALKER, S.M. Effects of iron overload on the immune system. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 30, n.4, p. 354-365, 2000.

WALSH, L.P.; MCCORMICK, C.; MARTIN, C.; STOCCO, D.M.

Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environ Health Perspect.**, v. 108, n. 8, p. 769-776, 2000.

WANG, G.; FAN, X.N.; TAN, Y.Y.; CHENG, O.; CHEN, S.

Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate. **Parkinsonism Relat Disord.**, v. 17, n. 6, p. 486–487, 2011.

WEBB, C.; TWEDT, D. Oxidative stress and liver disease. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v. 38, p.125-35, 2008.

WHITFIELD, J.B. Gamma glutamyl transferase. **Crit Rev Clin Lab Sci.**, v. 38, n. 4, p. 263-355, 2001.

WHYSNER, J.; WANG, C.X. Hepatocellular iron accumulation and increased cell proliferation in polychlorinated biphenyl-exposed

Sprague-Dawley rats and the development of hepatocarcinogenesis. **Toxicol Sci.**, v. 62, n. 1, p.36-45, 2001.

WIJAYANTI, N.; KATZ, N.; IMMENSCHUH, S. Biology of heme in health and disease. **Curr Med Chem.** v. 11, n.8, p.981-986, 2004.

WILCE, M.C.J; PARKER, M.W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1205, p. 1-18, 1994.

WILKINSON, H. Haemochromatosis associated with arthritis and hypopituitarism. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 33, p. 171-173, 1996.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regul Toxicol Pharmacol.**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WILLIAMS, A. L.; WATSON, R. E.; DESESSO, J. M. Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev.**, v. 15, n. 1, p.39-96, 2012.

WU, G.; FANG, Y.Z.; YANG, S.; LUPTON, J.R.; TURNER, N.D. Glutathione metabolism and its implications for health. **J Nutr.**, v. 134, n. 3, p. 489-92, 2004.

YANG, Q.; MCDONNELL, S.M.; KHOURY, M.J.; CONO, J.; PARRISH, R.G. Hemochromatosis-associated mortality in the United States from 1979 to 1992: an analysis of Multiple-Cause Mortality Data. **Ann. Intern. Med.**, v. 129, n. 11, p. 946- 953, 1998.

ZAMONER, A.; ROYER, C.; BARRETO, K.P.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neurosci Res**, v. 57, n. 1, p. 98–103, 2007.

ZHANG, H.; DICKINSON, D.A.; LIU, R.M.; FORMAN, H.J. 4-Hydroxynonenal increases γ -glutamyl transpeptidase gene expression

through mitogen-activated protein kinase pathways. **Free Radic Biol Med.**, v. 38, n. 4, p. 463-471, 2005.

ZHANG, H.; FORMAN, H. J. Redox regulation of gamma-glutamyl transpeptidase. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 41, n. 5, p. 509-515, 2009.

ZHU, R.; WANG, Y.; ZHANG, L.; GUO, Q. Oxidative stress and liver disease. **Hepatol Res.** v. 42, n. 8, p. 741-9, 2012.

ZOUAOU, K.; DULAURENT, S.; GAULIER, J.M.; MOESCH, C.; LACHÂTRE, G. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: about 13 cases of acute intoxication. **Forensic Sci Int**, v. 226, n. 1-3, p. e20-e25, 2013.