



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

IZABELA FERNANDA DAL' BÓ CRUZ

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO DESREGULADOR ENDÓCRINO HERBICIDA
GLIFOSATO (ROUNDUP® ORIGINAL DI) EM LINHAGENS CELULARES
TIREOIDIANAS NORMAIS E TUMORAIS**

CAMPINAS

2022

IZABELA FERNANDA DAL' BÓ CRUZ

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO DESREGULADOR ENDÓCRINO HERBICIDA
GLIFOSATO (ROUNDUP® ORIGINAL DI) EM LINHAGENS CELULARES
TIREOIDIANAS NORMAIS E TUMORAIS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROFESSORA DOUTORA LAURA STERIAN WARD
COORIENTADOR: PROFESSORA DOUTORA MARIA IZABEL CHIAMOLERA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO IZABELA FERNANDA DAL' BÓ CRUZ, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. LAURA STERIAN WARD

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

D15a Dal' Bó Cruz, Izabela Fernanda, 1994-
Avaliação dos efeitos do desregulador endócrino herbicida glifosato
(*Roundup Original DI*) em linhagens celulares tireoidianas normais e tumorais /
Izabela Fernanda Dal' Bó Cruz. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Laura Sterian Ward.
Coorientador: Maria Izabel Chiamolera.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Tireoide. 2. Desreguladores endócrinos. 3. Praguicidas. 4. Viabilidade
celular. 5. Proliferação celular. I. Ward, Laura Sterian, 1956-. II. Chiamolera,
Maria Izabel. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the effects of the endocrine disruptor herbicide
glyphosate (Roundup Original DI) on normal and tumor thyroid cell lines

Palavras-chave em inglês:

Thyroid

Endocrine disruptors

Pesticides

Cell viability

Cell proliferation

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Laura Sterian Ward [Orientador]

Ana Paula Soares Dias Ferreira

Célia Regina Nogueira

Data de defesa: 28-06-2022

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3154-0192>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3419435614050069>

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO/DOCTORADO
IZABELA FERNANDA DAL' BÓ CRUZ – COMO CONSTA NA ATA DE DEFESA**

ORIENTADOR: PROFESSORA DOUTORA LAURA STERIAN WARD

COORIENTADOR: PROFESSORA DOUTORA MARIA IZABEL CHIAMOLERA

MEMBROS TITULARES:

1. PROFA. DRA. LAURA STERIAN WARD

2. PROFA. DRA. ANA PAULA SOARES DIAS FERREIRA

3. PROFA. DRA. CÉLIA REGINA NOGUEIRA

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 28/06/2022

Dedico esta dissertação à minha família: minha mãe, Zélia e meu irmão, Plínio. Obrigada por todo incentivo e apoio em todos os momentos.

Eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, obrigada por guiar meus passos e por todas as graças alcançadas.

A minha mãe, Zélia, meu maior amor e exemplo de vida. Obrigada por ter me apoiado em todas as minhas escolhas, sempre confiar em mim e estar comigo em tudo, desde a graduação até as idas e vindas ao laboratório. Obrigada pelos conselhos, amparo, colo, pelos abraços e beijos, por sempre me mostrar que posso conquistar tudo... Obrigada por não medir esforços para que meus estudos pudessem ser realizados. Sem você eu não teria conseguido. Você é meu tudo, eu te amo demais.

Ao meu irmão, Plínio. Obrigada pelos conselhos, por estar ao meu lado em todos os momentos, pela ajuda, pelo apoio e por sempre me amparar e me deixar calma. Sem você eu não seria a Bela de hoje. Amo muito você!

Ao meu namorado, Yago, pela paciência, compreensão, companheirismo, conselhos e sempre ressaltar minha capacidade. Obrigada por sempre estar comigo, por me ajudar como pôde em todos os momentos e ir trabalhar comigo aos finais de semana no laboratório. Amo muito você!

A minha orientadora, Dra. Laura, obrigada por ter me acolhido e confiado em mim. Sou grata por tudo o que me ensinou.

A minha coorientadora, Dra. Maria Izabel, obrigada por ter aceitado meu convite, pela ajuda e conselho.

A minha companheira e amiga de laboratório, Elisângela. Obrigada por sempre estar comigo e me ajudar em tudo. Obrigada pelas risadas e pelo carinho, sou muito grata pela sua amizade. Está no meu coração.

A todos do Gemoca (que são e que já foram alunos), Elisângela, Matheus, Larissa, Karina, Natássia, Jacqueline, Mariana, Elaine e Rita. Obrigada pelas ajudas, pelos conselhos, pelo aprendizado, pelas risadas e pelas festas do corredor. Sou grata por tudo o que aprendi com vocês.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos (corredor), Helen, Jonathan, Tatiane e Viviane, obrigada pelas trocas de conhecimento, pelas ajudas, pelas risadas e pelas festas. Helen em

especial, obrigada pelo acolhimento, pelo carinho, pelos docinhos e conselhos nas horas em que mais precisei, sou grata demais por ter conhecido alguém como você!

Ao Prof. Dr. José Barreto e Sandra Brambilla, obrigada por abrirem a porta do laboratório para mim, pela ajuda e pela confiança. Sandra, obrigada pelos conselhos, pela ajuda e por todo o carinho. Sou grata por ter te conhecido.

A Dra. Janete Cerutti, obrigada por me receber ao laboratório e pelo carinho. Ao Rodrigo Araldi, muito obrigada pela paciência e por me ensinar alguns experimentos.

A professora Dra. Fernanda Orsi, obrigada por abrir a porta do laboratório e pela confiança.

Ao Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva e ao biólogo Paulo César do LCCP, obrigada por me receberem, por confiarem em mim e disponibilizar o laboratório. Paulo, obrigada pelo carinho e por me ajudar nas horas que precisei, principalmente de final de semana.

Ao meu colega Alexandre Hilário, obrigada por me ajudar com as inúmeras vezes nos experimentos e sempre estar disposto a ajudar. Obrigada por me ouvir, me aconselhar, pela paciência e carinho sempre.

Aos membros da banca avaliadora por se disporem a oferecer seu tempo para contribuírem com a minha formação.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que o trabalho pudesse ser concluído, obrigada.

A comissão de Pós-Graduação em Clínica Médica, pelos serviços prestados durante esses anos de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Obrigada CAPES pelo auxílio financeiro (bolsa de mestrado, processo 88887.465269/2019-00).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio de pesquisa regular, fundamental para a realização desse projeto. Processo nº 2020/02167-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A todos vocês, muito obrigada.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

A incidência de câncer de tireoide (CT) tem aumentado de maneira significativa nas últimas décadas. Os desreguladores endócrinos (DE) participam dos vários fatores que supostamente contribuem para esse aumento por alterarem a homeostase hormonal, causarem disfunção tireoidiana e estarem associados ao aparecimento de bócio e tumores tireoidianos. O glifosato é um herbicida amplamente utilizado que parece ter um efeito de estímulo à proliferação nas células da tireoide. Contudo, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação deste DE nas células tireoidianas. Uma vez que o sistema endócrino responde a baixas concentrações químicas, é essencial determinar os efeitos dos DEs em diferentes concentrações. Portanto, foram avaliados os efeitos na viabilidade celular (com o ensaio de azul de tripan); citotóxicos (pela atividade metabólica de células viáveis – ensaio CCK-8); e efeitos proliferativos (através da incorporação do BrdU) do herbicida Roundup® Original DI em exposições de 24 e 48 horas em linhagens celulares tireoidianas em diferentes concentrações incluindo, AOEL (Nível Aceitável de Exposição Ocupacional) e IDA (Ingestão Diária Aceitável), de acordo com a Nota Técnica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Foram utilizadas duas linhagens de células tireoidianas: a Nthy-ori 3-1 (normal) e a TPC-1 (carcinoma papilífero de tireoide). O azul de tripan mostrou diminuição no número de células viáveis na exposição de 24h em comparação com 48h em ambas as linhagens. Exposição das células Nthy-ori 3-1 e TPC-1 por 24h na concentração AOEL causou a morte de 52% e 58% das células, respectivamente, enquanto IDA resultou em 43% e 58% de morte celular. Após 48h de exposição, AOEL e IDA causaram um número menor de células mortas de Nthy-ori 3-1 (19% e 15%) e TPC-1 (29% e 23%), respectivamente, sugerindo que o efeito tóxico do produto desaparece e/ou ambas as linhagens possuem mecanismos de reparo protetores de exposições mais longas. De fato, o ensaio CCK-8, mostrou que o efeito tóxico era relativamente limitado e, ao contrário, pequenas concentrações de Roundup® Original DI tem efeito proliferativo, ultrapassando os 100% de viabilidade em algumas concentrações: 6,5 µg/L aumentou o número de células Nthy-ori 3-1 e TPC-1 em 24h para 13% e 5% a mais que o controle, respectivamente, e esse efeito estimulador persistiu após 48h. Comprovando o efeito proliferativo do Roundup® Original DI, o ensaio BrdU mostrou importante efeito estimulador de crescimento em ambas as linhagens, mas principalmente sobre TPC-1, mesmo em doses baixas. De fato, a incorporação de BRDU aumentou em 321% após 48h de exposição das Nthy-ori 3-1 a 6,5 µg/L do herbicida e essa mesma concentração aumentou 201% a incorporação em 24h e 208% a incorporação em 48h nas células TPC-1. Em conclusão, esse estudo demonstrou que este herbicida causa morte celular, mas também possui um efeito proliferativo, especialmente na linhagem derivada de carcinoma papilífero (TPC-1).

Palavras-chave: tireoide; desregulador endócrino; praguicidas; viabilidade celular; proliferação celular.

ABSTRACT

The incidence of thyroid cancer (CT) has increased significantly in recent decades. Endocrine disruptors (ED) participate in the various factors that supposedly contribute to this increase by altering hormonal homeostasis, causing thyroid dysfunction and being associated with the appearance of goiter and thyroid tumors. Glyphosate is a widely used herbicide that appears to have a proliferation-stimulating effect on thyroid cells. However, little is known about the mechanism of action of this DE on thyroid cells. Since the endocrine system responds to low chemical concentrations, it is essential to determine the effects of EDs at different concentrations. Therefore, the effects on cell viability were evaluated (with the trypan blue assay); cytotoxic (by the metabolic activity of viable cells – CCK-8 assay); and proliferative effects (through incorporation of BrdU) of Roundup® Original DI herbicide at 24 and 48 hours exposures on thyroid cell lines at different concentrations including, AOEL (Acceptable Occupational Exposure Level) and ADI (Acceptable Daily Intake), according to with the Technical Note of the National Health Surveillance Agency. Two thyroid cell lines were used: Nthy-ori 3-1 (normal) and TPC-1 (papillary thyroid carcinoma). Trypan blue showed a decrease in the number of viable cells at 24h exposure compared to 48h in both strains. Exposure of Nthy-ori 3-1 and TPC-1 cells for 24h at AOEL concentration caused the death of 52% and 58% of the cells, respectively, while IDA resulted in 43% and 58% of cell death. After 48h of exposure, AOEL and IDA caused a lower number of dead cells of Nthy-ori 3-1 (19% and 15%) and TPC-1 (29% and 23%), respectively, suggesting that the toxic effect of the product disappears and/or both strains have repair mechanisms that protect from longer exposures. In fact, the CCK-8 assay showed that the toxic effect was relatively limited and, on the contrary, small concentrations of Roundup® Original DI have a proliferative effect, exceeding 100% viability at some concentrations: 6.5 µg/L increased the number of Nthy-ori 3-1 and TPC-1 cells at 24h to 13% and 5% more than the control, respectively, and this stimulatory effect persisted after 48h. Proving the proliferative effect of Roundup® Original DI, the BrdU assay showed an important growth-stimulating effect in both strains, but mainly on TPC-1, even at low doses. In fact, the incorporation of BRDU increased 321% after 48h of exposure of Nthy-ori 3-1 to 6.5 µg/L of the herbicide and this same concentration increased the incorporation in 24h by 201% and the incorporation in 48h in the cells by 208%. TPC-1. In conclusion, this study demonstrated that this herbicide causes cell death, but also has a proliferative effect, especially in the papillary carcinoma (TPC-1) derived lineage.

Keywords: thyroid; endocrine disruptor; pesticides; cell viability; cell proliferation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020-2022 por sexo.....	15
Figura 2. Esquema da desdiferenciação de células foliculares que originam o câncer de tireoide.....	16
Figura 3. Resumo da incidência do câncer de tireoide.....	17
Quadro 1. Principais fatores de risco associados ao câncer de tireoide.....	17
Figura 4. Representação de algumas das interações de desreguladores endócrinos (DE) e ligantes naturais (LN) na função do receptor.....	19
Quadro 2. Origem de alguns dos desreguladores endócrinos e seus efeitos hormonais.....	20
Tabela 1. Exemplos de vias de exposição aos Desreguladores endócrinos.....	21
Figura 5. Curvas de resposta à dose monotônica e não-monotônica.....	22
Figura 6. Exemplo de como a exposição precoce pode causar alterações celulares que induzem alterações na fisiológicas, e, por fim, maior propensão a doenças no adulto.....	23
Figura 7. Histórico na evolução dos desreguladores endócrinos.....	24
Figura 8. Diferentes pontos onde as substâncias desreguladoras afetam, atrapalhando a função e a ação da tireoide.....	26
Figura 9. Quantidade de agrotóxicos comercializados no Brasil entre 2007-2014.....	27
Figura 10. Classificação dos agrotóxicos mais comercializados no Brasil em 2014.....	28
Quadro 3. Classificação dos agrotóxicos conforme os efeitos à saúde humana.....	28
Figura 11. Categorias toxicológicas, segundo a Resolução RDC nº 294, de 29 de julho de 2019 da Anvisa.....	29
Quadro 4. Classificação da IARC do pesticida glifosato.....	31
Tabela 2. Faixas de concentrações de Roundup® utilizadas no Ensaio Azul de Tripan.....	36
Figura 12. Funcionamento da reação do ensaio CCK-8.....	38
Esquema 1. Disposição do ensaio CCK-8 em placa de 96 poços.....	38
Figura 13. Desenho esquemático refletindo o ciclo celular e o estágio em que ocorre expressão de BrdU.....	40
Gráfico 1. Porcentagem de células TPC-1 mortas após exposição a concentrações crescentes de Roundup® Original DI por 24 h e 48 h, medidas pelo teste de corante azul de tripano.....	42
Gráfico 2. Porcentagem de células Nthy-ori 3-1 mortas após exposição a cinco concentrações crescentes selecionadas de Roundup® Original DI por 24 h e 48 h medidas pelo teste de corante azul de tripano.....	43

Gráfico 3. Comparação da mortalidade celular nas linhagens Nthy-ori 3-1 (a) e TPC-1 (b) após exposição a concentrações crescentes de Roundup® Original DI por 24 h e 48 h pelo teste de corante azul de tripano.....	43
Tabela 3. Porcentagem de mortalidade de células Nthy-ori 3-1 e TPC-1, após exposição ao Roundup® Original DI por 24 h e 48 h, em diferentes concentrações, medida pelo teste de exclusão do azul de tripan. O valor de p, refere-se à comparação entre o número de células mortas expostas ao herbicida e, o número de células controle mortas não expostas.....	44
Gráfico 4. Porcentagem de células vivas da linhagem Nthy-ori 3-1, após exposição a concentrações crescentes de Roundup® Original DI, por 24 h e 48 h, medido pelo ensaio CCK-8.....	45
Gráfico 5. Porcentagem de células vivas da linhagem TPC-1, após exposição a concentrações crescentes de Roundup® Original DI, por 24 h e 48 h, medido pelo ensaio CCK-8.....	46
Gráfico 6. Comparação entre a porcentagem de células viáveis TPC-1 e Nthy-ori 3-1 em 24 h (painel a) e 48 h (painel b) de exposição a diferentes concentrações de Roundup® Original DI usando o ensaio CCK-8.....	46
Tabela 4. Porcentagem de células viáveis Nthy-ori 3-1 e TPC-1 após exposição ao Roundup® Original DI por 24 h e 48 h em diferentes concentrações, medido pelo ensaio CCK-8. O valor de p refere-se à comparação entre o número de células viáveis expostas ao herbicida e o número de células viáveis de controle não expostas.....	47
Tabela 5. Resultados da ANOVA para medidas repetidas comparando o ensaio CCK-8 (% células vivas*) entre tipos de linhagens celulares, concentrações e tempos (n=3).....	47
Gráfico 7. Linhagem Nthy-ori 3-1 tratadas com Roundup® Original DI pelos tempos indicados. A proliferação celular foi medida pelo ensaio BrdU e as leituras de foram corrigidas subtraindo os resultados do branco. Os dados são apresentados como média ± DP.....	48
Gráfico 8. Linhagem TPC-1 tratadas com Roundup® Original DI pelos tempos indicados. A proliferação celular foi medida pelo ensaio BrdU e as leituras de foram corrigidas subtraindo os resultados do branco. Os dados são apresentados como média ± DP.....	48
Tabela 6. Absorbância de BrdU e porcentagem de células Nthy-ori 3-1 e TPC-1 após exposição ao Roundup® Original DI por 24 h e 48 h em diferentes concentrações. O valor de p refere-se à comparação entre a absorbância de BrdU em células expostas ao herbicida e a absorbância em células controle não expostas.....	49
Tabela 7. Resultados da ANOVA para medidas repetidas comparando o ensaio BrdU (absorbância de proliferação celular*) entre tipos de linhagens celulares, concentrações e tempos (n=3).....	49
Figura 13. Características celulares da linhagem Nthy-ori 3-1 após a exposição ao Roundup® Original DI no tempo de 24 horas, comparadas com o controle.....	50
Figura 14. Características celulares da linhagem Nthy-ori 3-1 após a exposição ao Roundup® Original DI no tempo de 48 horas, comparadas com o controle.....	51
Figura 15. Características das células da linhagem TPC-1 após a exposição ao Roundup® Original DI nos tempos de 24 horas, comparadas com o controle.....	52
Figura 16. Características das células da linhagem TPC-1 após a exposição ao Roundup® Original DI nos tempos de 48 horas, comparadas com o controle.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Agrofit	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOEL	Nível Aceitável de Exposição Ocupacional
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
Ctrl	Controle
CT	Câncer de tireoide
CPT	Carcinoma papilífero da tireoide
CFT	Carcinoma folicular da tireoide
CMT	Carcinoma medular da tireoide
CAT	Carcinoma anaplásico da tireoide
CCK-8	Cell Counting Kit-8
DE	Desregulador endócrino
DL50	Dosagem letal 50%
EPA	Environmental Protection Agency
EFSA	European Food Safety Authority
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
GnRH	Hormônio secretor das gonadotrofinas
HBG	Herbicida a base de glifosato
HT	Hormônios tireoidianos
HHT	Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IDA	Ingestão Diária Aceitável
LN	Ligantes naturais
NIEHS	Instituto Nacional de Ciências da Saúde Ambiental
NMDRCs	Curvas não-monotônica de resposta à dose
OMS	Organização Mundial da Saúde
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
SNC	Sistema nervoso central
T3	Triiodotirononina

T4	Tiroxina
TRH	Hormônio tireotrófico
TSH	Tireoestimulante
TPOAb	Anticorpos anti-tireoperoxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Câncer de tireoide.....	16
1.2. Desreguladores endócrinos.....	19
1.2.1. Perspectiva histórica sobre os desreguladores endócrinos.....	24
1.2.2. Desreguladores endócrinos que afetam a função da tireoide.....	26
1.3. Agrotóxicos.....	28
1.3.1. Herbicida glifosato.....	30
1.3.2. Estudos sobre glifosato e tireoide.....	32
1.4. Hipótese.....	34
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivo geral.....	35
2.2. Objetivos Específicos.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Cultura Celular.....	35
3.2. Glifosato (Roundup® Original DI).....	36
3.3. Diluição e escolha das concentrações do Roundup® Original DI.....	36
3.4. Cálculo de diluição para as concentrações ambientais utilizando o livro: “Guyton e Hall: Tratado de Fisiologia Médica - 12ª Edição”.....	36
3.5. Ensaio azul de tripan.....	37
3.6. Ensaio Cell Counting Kit-8 (CCK-8).....	38
3.7. Ensaio de proliferação celular por BrdU.....	40
3.8. Análise Estatística.....	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Ensaio azul de tripan.....	42
4.2. Ensaio CCK-8.....	44
4.3. Ensaio BrdU.....	48
4.4. Morfologia celular.....	51
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de tireoide

O câncer é uma importante questão de saúde pública. É a doença que mais cresce em todo mundo, com incidência de mais de 18 milhões de novos casos e mais de 9,6 milhões de mortes anuais, na mais recente estimativa (1). Já o câncer de tireoide (CT) é a neoplasia endócrina mais comum em todo o mundo, representando 2,3% dos cânceres mundiais diagnosticados (2). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para cada ano do triênio 2020-2022, que, para cada mil habitantes, ocorreriam cerca de 13.780 novos casos de CT, 1.830 casos novos para homens e 11.950 para as mulheres, sendo o 5º câncer mais incidente entre elas no Brasil (3) (Figura 1).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1. Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020-2022 por sexo (3).

O carcinoma da tireoide compreende um grupo de tumores que apresenta propriedades divergentes, classificados por parâmetros clínicos e histológicos, sendo divididos em quatro subtipos: carcinoma papilífero da tireoide (CPT), carcinoma folicular da tireoide (CFT), carcinoma medular da tireoide (CMT) e carcinoma anaplásico da tireoide (CAT) (4, 5). O CPT é o tipo histológico mais frequente, sendo responsável por cerca de 90% dos casos de câncer de tireoide, acometendo principalmente mulheres entre 30 e 50 anos (6, 7). O CFT é uma variante mais agressiva que o tipo CPT e representa cerca de 10 a 15% das neoplasias tireoidianas (8). O CAT acomete principalmente mulheres idosas, representando até 3% dos carcinomas da tireoide (7), enquanto que, o CMT responde por cerca de 3-5% dos CT, podendo ocorrer na forma familiar ou associada à síndrome de neoplasias endócrinas múltiplas, sendo a mais agressiva dos subtipos (9, 10).

A maioria dos tumores da tireoide originam-se de células foliculares e entre 3-5% dos tumores são derivados de células parafoliculares ou, “células C” (5, 11). Os cânceres derivados das células foliculares são fragmentados em carcinoma papilífero bem diferenciado

e carcinoma folicular bem diferenciado, carcinoma pouco diferenciado e carcinoma anaplásico ou, indiferenciado. Além desses subtipos, um tumor benigno que pode ser o iniciador de alguns carcinomas foliculares. Os carcinomas pouco diferenciados e o anaplásico podem ser repetidamente desenvolvidos, visto que, também podem surgir através da desdiferenciação celular (Figura 2) (12) . E o CMT é originado de células parafoliculares (5, 13).

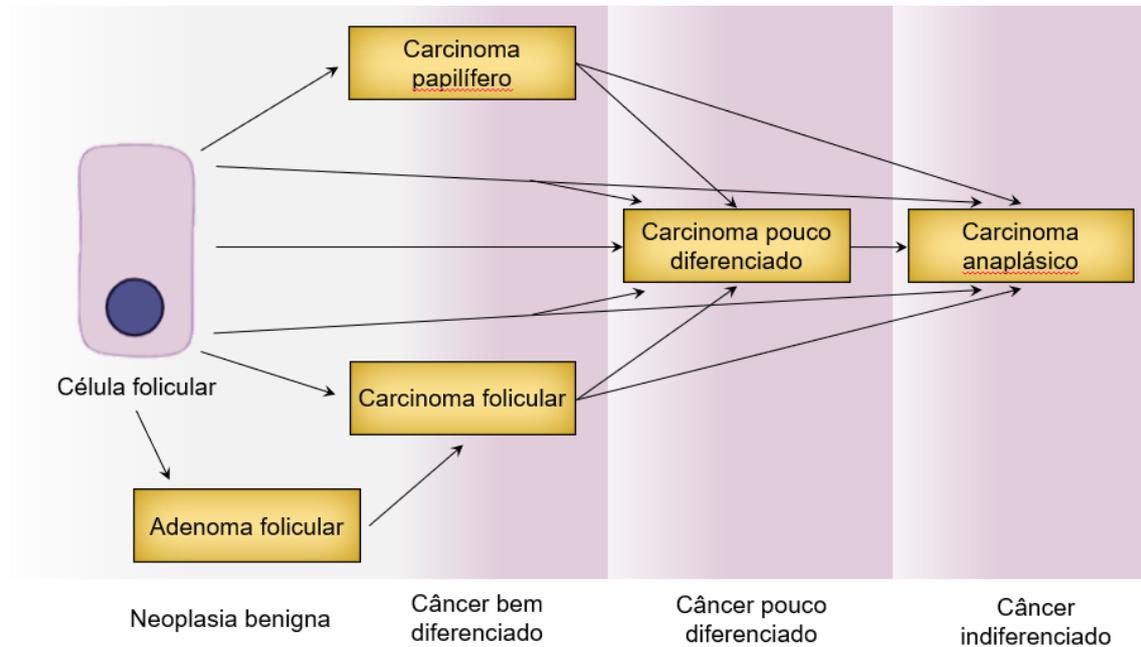


Figura 2. Esquema da desdiferenciação de células foliculares que originam o câncer de tireoide, adaptado (12).

Durante as últimas décadas, um aumento significativo do número de casos de CT foi observado em todo o mundo. Embora as taxas de mortalidade permaneçam baixas e estáveis (Figura 3), o aumento na incidência atinge a taxa mais alta de crescimento, em comparação com qualquer outra neoplasia maligna (13, 14). Embora o uso de ferramentas de diagnóstico por imagem sejam um importante motivo para o aumento da incidência de CT, relacionado à maior possibilidade de diagnóstico, vários elementos indicam que este não é o único motivo, e outros fatores contribuem (Quadro 1) (15-17).

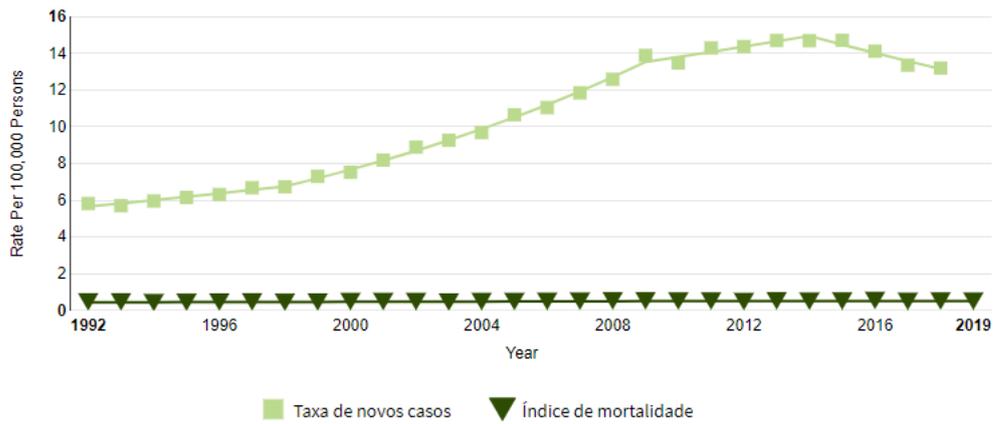


Figura 3. Resumo da incidência do câncer de tireoide (2).

Diversos fatores carcinogênicos vem sendo investigados como, os fatores ligados à alimentação, condições de trabalho, medicamentos, hormônios, radiação, vírus, agentes químicos, poluição, entre outros (10, 16-18). Têm-se sugerido que mais de 90% dos casos de câncer estão associados à fatores ambientais, os quais interagem com as características genéticas e adquiridas de cada indivíduo (19).

Quadro 1. Principais fatores de risco associados ao câncer de tireoide.

	Fator	Fonte
Exógeno	Raio X	Imagens médicas (radiografias e tomografias)
	^{131}I	Procedimentos em medicina nuclear
	Iodo	Dieta
	Nitrato	Água e dieta
	Estilo de vida e fatores ambientais	Carcinógenos
	Poluentes	Bisfenol A (BPA), bisfenilos policlorados (PCB), éteres difenílicos polibromados (PBDEs), pesticidas
Endógeno	Fator	Mecanismo
	TSH	Estimulação do crescimento da tireoide
	Auto-imune Tireoidite	Aumento do TSH e estresse oxidativo
	Obesidade e resistência à insulina	Aumento de insulina promove o câncer

Fonte: Adaptado de, Pellegrine *et al.*, 2013, p.5 (17).

1.2. Desreguladores endócrinos

Entre os fatores de risco para o aumento da incidência do câncer de tireoide, estão os desreguladores endócrinos (DE). Do inglês "Endocrine Disrupting Chemicals" (EDCs), essas substâncias desreguladoras possuem diferentes definições. Alguns autores consideram desreguladores quando são substâncias que interagem com sítios de receptores de hormônios, outros, qualificam como qualquer substância que cause algum desequilíbrio ou alguma alteração no sistema endócrino, atuando diretamente, ou não, no sítio do receptor (20-23).

Segundo a "Environmental Protection Agency" (EPA), um DE é uma substância química única ou uma mistura de compostos exógenos que afetam o sistema endócrino em qualquer aspecto da ação hormonal, modificando a regulação hormonal, mimetizando a ação dos hormônios, afetando a síntese, a secreção, o transporte, a ligação e a eliminação dos hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos, podendo ocasionar diferentes efeitos em um único organismo ou, até mesmo em seus descendentes (24).

O modo como os DEs atuam ainda é desconhecido devido à complexidade dos mecanismos de ação envolvidos. Essas substâncias químicas conseguem se ligar a uma diversidade de receptores sejam estes, os nucleares ou de membrana, receptores hormonais, além dos neurotransmissores (25, 26). As ligações com estes receptores podem resultar na estimulação (agonista) ou bloqueio (antagonista) dos mecanismos de transcrição ou pós-transcrição celular. Podem alterar a ação dos elementos de resposta dos genes, impossibilitar a ligação dos hormônios naturais aos seus receptores e até mesmo, aumentar a quantidade de hormônio endógeno, mimetizando o hormônio natural (Figura 4) (27, 28).

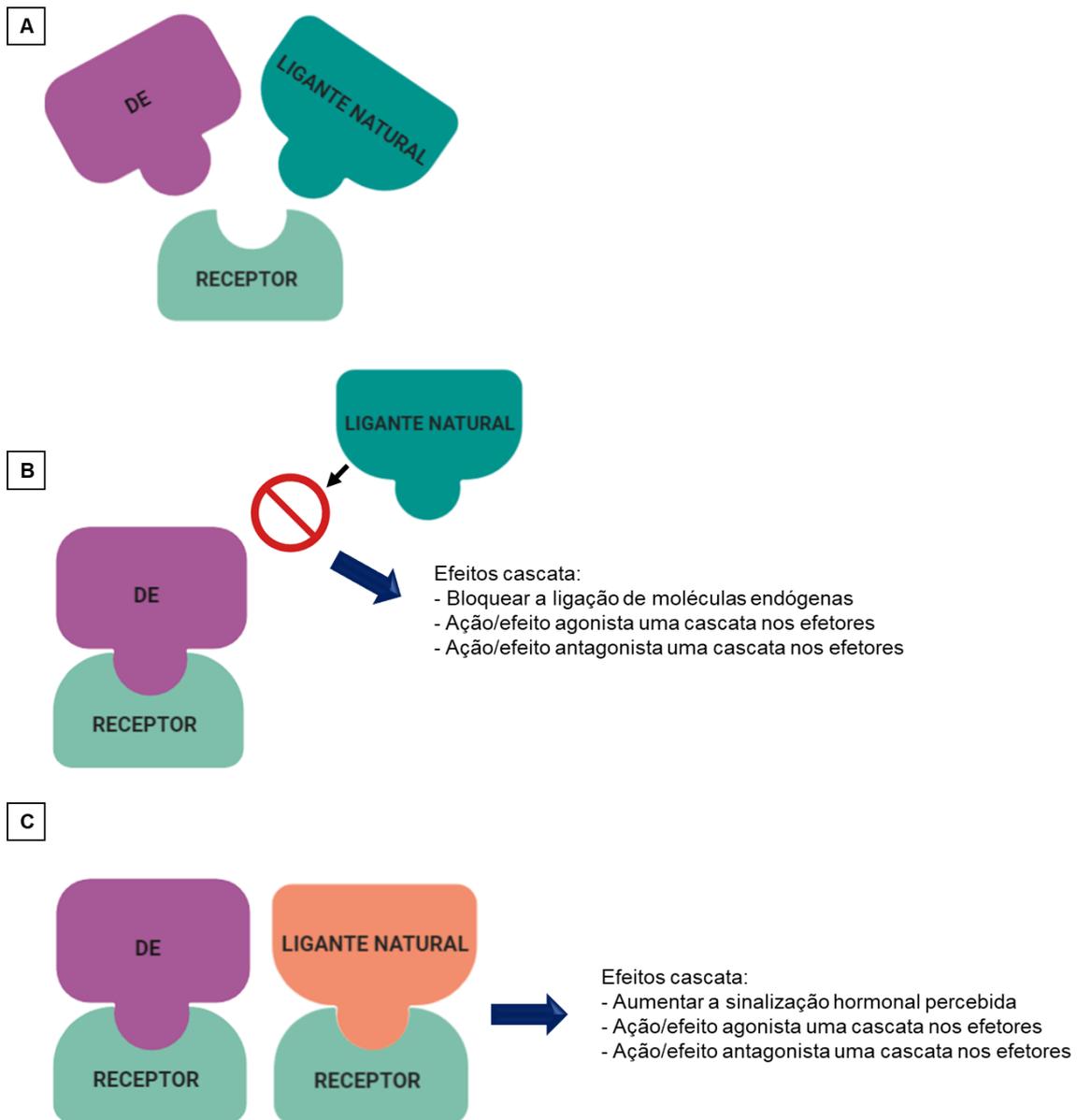


Figura 4. Representação de algumas das interações de desreguladores endócrinos (DE) e ligantes naturais (LN) na função do receptor. (A) Os DE podem competir com os LN pela ligação com o receptor. (B) A ligação do DE como competidores aos LN pode resultar na alteração da sinalização do seu receptor. (C) Os DE podem se ligar a receptores livres enquanto o LN também estão ligados, o que resulta em sinalização de forma agonista ou antagonista, adaptado (28).

Existem duas classes de DE, os naturais são substâncias que estão presentes em diversos tipos de alimentos, entre eles os fitoestrógenos, que apresentam a ação estrogênica no organismo como por exemplo, a soja (20, 25, 29-31) e, os sintéticos, que são substâncias desenvolvidas em laboratórios, sendo capazes de continuarem no meio ambiente em diferentes contextos e, algumas vezes, por tempo indeterminado, como é o caso dos poluentes orgânicos persistentes ou POPs (Quadro 2) (20).

Quadro 2. Origem de alguns dos desreguladores endócrinos e seus efeitos hormonais.

Ftalatos	Cosméticos	Bloqueiam os receptores dos estrogênios e dos hormônios tireoidianos.
	Embalagens de comida	
	Brinquedos	
	Materiais de construção	
	Materiais médicos	
BPA	Agentes estabilizante do plástico	Efeitos estrogênicos e sobre os receptores dos hormônios tireoidianos.
	Recipiente e garrafas de plásticos	
	Material dentário	
	Revestimento interno de latas	
	Tintas e resinas	
PCB	Transformadores e condensadores elétricos	Ativação dos receptores dos estrogênios; Bloqueio dos receptores dos hormônios tireoidianos.
	Agente plastificantes de tintas	
	Subproduto de vários processos industriais	
Dioxinas	Subproduto residuais formados na incineração de materiais com cloro, metais, papel e herbicidas.	Efeito antagonista dos estrogênios.
Pesticidas	Amitrol	Inibe a síntese dos hormônios tireoidianos.
	Atrazina	Ativação dos receptores de estrogênios e androgênios.
	DDT	Efeito estrogênico, efeito anti-androgênio, interferência com síntese hormonal.
	Metoxicloro	Efeito estrogênico

Fonte: Adaptado de, C. Castro-Correia, 2015, p.188 (20).

Na maioria dos casos, os fitoestrógenos não ocasionam muitas complicações pelo fato de não conseguirem se ligar fortemente aos receptores hormonais além, de serem facilmente eliminados, não favorecendo acúmulo tecidual. Por outro lado, as substâncias sintéticas, conseguem permanecer no ambiente, se acumulando nos solos e nos sedimentos, o que permite que sejam conduzidas para diferentes lugares. Além disso, essas substâncias podem se acumular ao longo da cadeia alimentar promovendo efeitos de maior risco nos animais superiores, conhecido como efeito de magnificação (19). Então, é possível encontrar

corriqueiramente as substâncias desreguladoras, pois as vias de exposição a elas são inúmeras, como através do ar, do solo, da água, além dos alimentos que utilizamos (Tabela 1) (30, 32).

Tabela 1. Exemplos de vias de exposição aos Desreguladores endócrinos.

Como somos expostos aos DEs?	De onde vêm os DEs?	Exemplos de DEs
Consumo oral de água ou de alimentos contaminados	Resíduos ou pesticidas industriais que contaminam o solo ou águas subterrâneas	Bifenilpoliclorados (PCBs), dioxinas, compostos perfluorados, DDT
	Percolação de substâncias químicas a partir de recipientes de alimentos ou de bebidas; resíduos de pesticidas em alimentos ou bebidas	Bisfenol A (BPA), ftalatos, clorpirifós, DDT
Contato com a pele e/ou por inalação	Mobiliário caseiro tratado com retardantes de chamas	Retardadores de chamas bromado (BFRs)
	Pesticidas utilizados na agricultura, residências, ou para o controle de vetores de doenças públicas	DDT, clorpirifós, vinclozolina, piretroides
Intravenoso	Tubulação intravenosa	Ftalatos
Aplicação à pele	Alguns cosméticos, produtos de higiene pessoal, antibacterianos, protetores solares, medicamentos	Ftalatos, triclosan, parabenos, repelentes de insetos
Transferência biológica da placenta e/ou do leite materno	Carga corporal materna devido às exposições prévias/atuais	Vários DEs podem atravessar a placenta, como também detectados no leite

Fonte: Gore AC, *et al.*, 2014, p.12 (32).

Como mencionado anteriormente, os mecanismos pelos quais os DEs podem interferir na ação hormonal podem ser bastante complexos, produzindo efeitos inesperados até mesmo em concentrações muito baixas (31, 33). Uma das particularidades de diversos desreguladores endócrinos é que as curvas dose-resposta não obedecem a uma regra. Em alguns casos, baixas doses de DE podem gerar ou influenciar muitas doenças, uma vez que o sistema endócrino responde à estímulos químicos a baixas concentrações. Muitos DEs possuem curvas de dose-resposta não-monotônica (NMDRCs) (formato de U ou de U invertido), ou seja, geram efeitos as doses baixas e, que não podem ser pressupostos da mesma maneira que outras

substâncias que, em altas doses geram curvas monotônicas de dose-resposta (linear ou não linear) (Figura 5) (34-36).

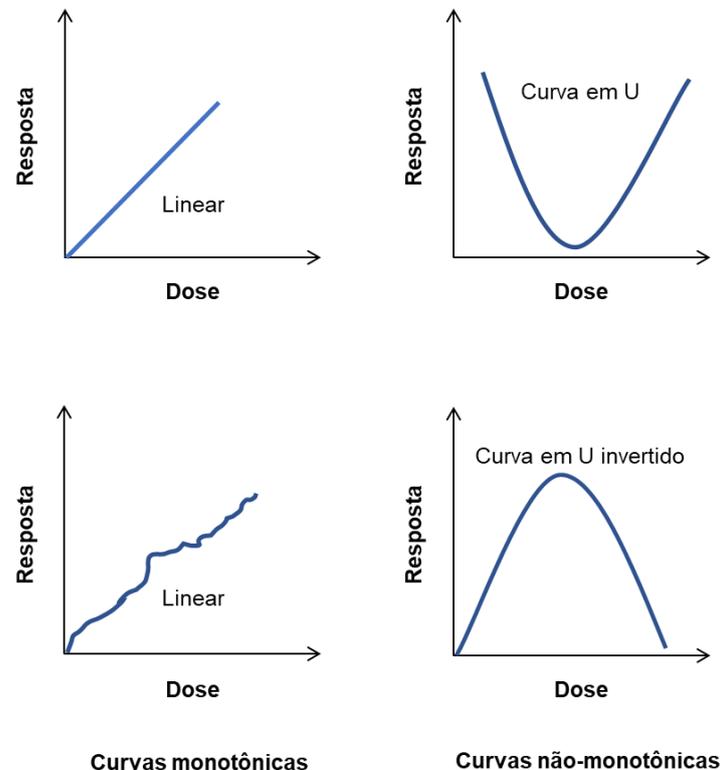


Figura 5. Curvas de resposta à dose monotônica e não-monotônica (35, 37).

A exposição aos DEs relaciona-se diretamente à resultados adversos à saúde. O tempo de exposição é um fator crítico, associado ao comprometimento da saúde, bem como, idade na qual a exposição ocorre, uma vez que esta pode estar relacionada; no feto e/ou no recém-nascido, devido à imaturidade do sistema fisiológico, gerando maior risco ao longo da vida e condicionando probabilidade ao surgimento de doenças (Figura 6) (20). A exposição aos DEs vem sendo relacionada com puberdade precoce, telarca precoce, síndrome de ovário policístico, câncer da mama, infertilidade masculina, alterações na genitália, hiperplasia/câncer de próstata, efeitos neuroendócrinos, hipotireoidismo, entre outros (20, 26, 38).

Na infância e adolescência ainda observa-se a maturação dos principais sistemas endócrinos, o que os tornam susceptíveis a exposição de substâncias químicas (39). O desenvolvimento precoce das glândulas mamárias em meninas são resultados dos DEs, pois eles podem estimular os receptores estrogênicos, além de ocasionarem um crescimento da secreção de hormônio secretor das gonadotrofinas (GnRH) (29). Em homens, uma das ações mais frequente dos DEs é o surgimento de oligospermia e redução da fertilidade (40). Além de afetarem os hormônios que são associados a reprodução, outros sistemas também podem ser

afetados como, tireoidiano, retinóide, bem como outras vias metabólicas associadas a diabetes e a obesidade (25).

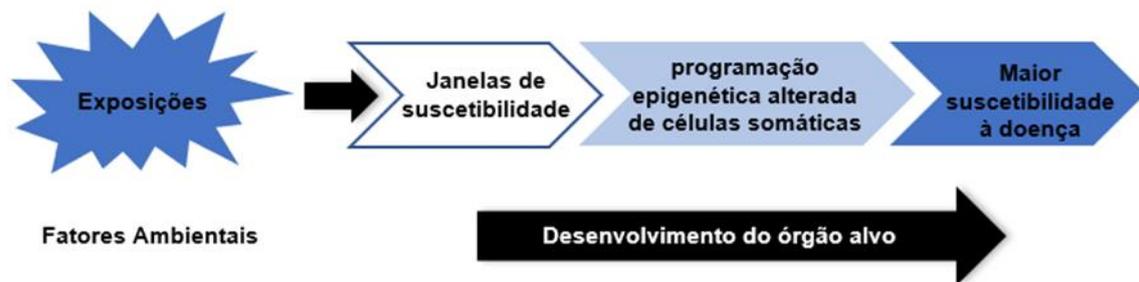


Figura 6. Exemplo de como a exposição precoce pode causar alterações celulares que induzem alterações na fisiológicas, e, por fim, maior propensão a doenças no adulto (26).

A avaliação de risco gerada pela exposição aos DEs é difícil de ser determinada, pois baixas doses dessas substâncias geram efeitos biológicos prejudiciais (35) e, como somos expostos a doses baixas destes desreguladores em diferentes contextos, todos os dias, dificulta ainda mais a avaliação de risco desses agentes considerados sem limite de risco.

1.2.1. Perspectiva histórica sobre os desreguladores endócrinos

Desde os anos 1940, a bióloga Rachel Carson observou a crescente produção e liberação para o ambiente, de diferentes agentes químicos que poderia causar mudanças significantes no ecossistema e na saúde humana (32).

Durante e após a Segunda Guerra Mundial, o DDT foi usado em larga escala para combater piolhos vetores de tifo e mosquitos vetores de malária (41), Carson passou a dar importância para conservação e os problemas ambientais devido ao grande uso dos pesticidas (42). Em 1962, escreveu o livro “*Silent Spring*” (A Primavera Silenciosa) no qual relatou e alertou sobre as consequências da má utilização dos pesticidas e inseticidas, em especial o DDT, como possível causador de falhas reprodutivas e morte de diferentes aves (32, 42, 43) além de, uma possível correlação entre a manifestação de doenças crônicas e câncer, e a aplicação descontrolada do DDT (42, 43). Tais considerações geraram na comunidade científica e no público, o pensamento de que os produtos químicos seriam capazes de danificarem o ecossistema e a saúde humana (43).

Logo após o “*Silent Spring*”, foi estabelecido em 1969 pelo governo dos Estados Unidos, o Instituto Nacional de Ciências da Saúde Ambiental (NIEHS) que tinha como objetivo estudar o efeito do meio ambiente sobre a saúde. Além disso, em 1970, foi fundada a Agência de Proteção Ambiental (EPA) para regulamentar proteção ao ambiente e a saúde humana (Figura 7) (44).

Outra mulher com marco importante na história dos desreguladores endócrinos, foi a Zoóloga Theo Colborn. Em 1988, observou que nos Grandes Lagos da América do Norte, se acumulavam produtos industriais por anos (45) com isso, reparou que as cascas dos ovos de algumas espécies estavam diferentes, com má formação de filhotes e, a falta de sucesso deles para se desenvolver (46, 47). Além disso, percebeu que, algumas mudanças eram visíveis apenas nos jovens/adultos, ou seja, depois de tempos de exposição e não durante a formação ou logo após a exposição. Então, concluiu que, os efeitos dos produtos químicos eram promovidos pela cadeia alimentar, representando uma ameaça para as pessoas que comiam peixes contaminados dos Grandes Lagos (45).

Em 1991, com o aumento na compreensão de que produtos químicos provocavam estragos nos padrões ecológicos, e que os DEs eram similares aos hormônios, Theo Colborn e outros cientistas se reuniram para explorar mais esse ramo da pesquisa. Essa reunião é conhecida como *Wingspread I Conference* e foi onde o termo “desregulação endócrina” foi criado (44, 45).

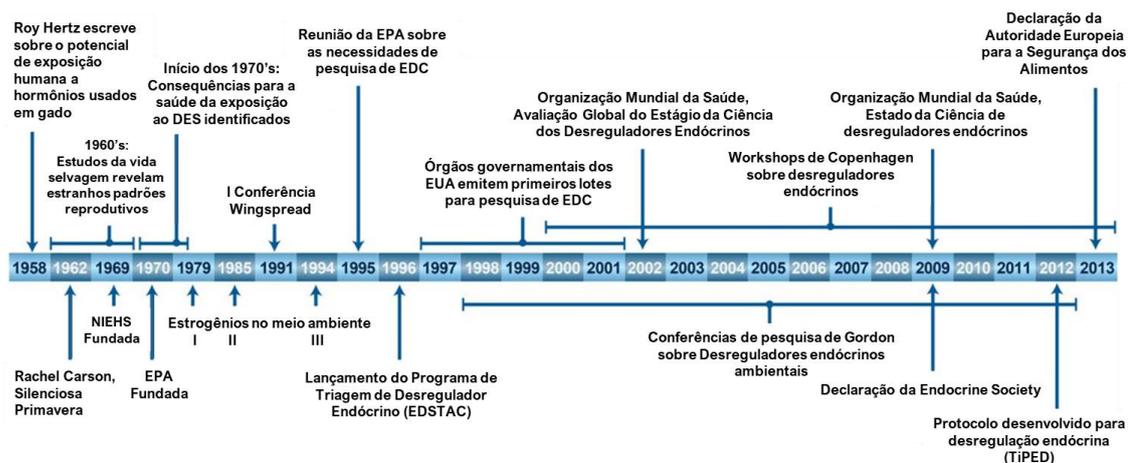


Figura 7. Histórico na evolução dos desreguladores endócrinos, adaptado (44).

Após a conferência e trabalhos realizados com agentes químicos, Theo Colborn ficou ainda mais conhecida e em 1996, os DEs foram popularizados em seu livro “*Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival? A Scientific Detective Story*” (Nosso futuro roubado: Estamos ameaçando nossa fertilidade, inteligência e sobrevivência? Uma história de detetive científica) (47), o que levou à divulgação de novas leis em todo o mundo além de, ajudar a identificar os DEs (45, 48). Outro grande ponto de vista que Colborn teve e que a tornou-se prestigiada nas pesquisas, foi sobre exposições a químicos nas “janelas críticas de desenvolvimento”(45).

1.2.2. Desreguladores endócrinos que afetam a função da tireoide

Os hormônios tireoidianos (HT) exercem uma função importante na normalização do desenvolvimento físico, no crescimento somático, no metabolismo e na distribuição de energia, sendo fundamentais para o desenvolvimento normal do cérebro (33, 49). Portanto, qualquer influência desfavorável no padrão e sinalização dos HT durante o desenvolvimento poderia causar um impacto na saúde, principalmente no desenvolvimento físico e neural (25, 50, 51).

Do ponto de vista de desregulação relacionada aos HT, existem evidências de que várias substâncias, por exemplo, éteres difenil polibromados, bifenilas policloradas, pesticidas e ftalatos (52, 53) com capacidade de modificar processos bioquímicos como: o feedback ou retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT), a síntese, o armazenamento e a liberação dos HT, além do seu transporte, ligação à proteínas carreadoras plasmáticas e seu metabolismo intracelular (54, 55).

Os DEs tireoidianos alteram a homeostase dos HT prejudicando a ação e a atividade da triiodotirononina (T3) e tiroxina (T4) (56). Vários DEs foram encontrados tanto no líquido amniótico (57) quanto no cordão umbilical (54), tendo a possibilidade de entrar em contato com o feto (56). Na fase inicial da vida, isso pode causar modificações definitivas, pois os HT são fundamentais para o neurodesenvolvimento do feto e do recém-nascido (58).

A exposição aos desreguladores tireoidianos tem sido relacionada com o surgimento de bócio e tumores de tireoide (59). Estas substâncias podem interferir em várias vias de metabolismo dos HT: inibir o transporte ativo de iodo inorgânico para a célula folicular; imitar e/ou antagonizar os hormônios tireoidianos; inibir enzimas reguladoras da síntese e metabolismo dos HT; modificar concentrações circulantes ou teciduais dos HT; modificar as concentrações de receptores de HT, etc (Figura 8) (60). Além disso, a alteração na homeostase dos HT modifica o eixo-hipotálamo-hipófise tireoide, afetando os hormônios tireotrófico (TRH) e tireoestimulante (TSH), que são responsáveis por estimular a hipófise a produzir o TSH e, consequentemente estimular a tireoide a secretar o hormônio T4 que depois é convertido em T3 (61).

Alguns desreguladores tireoidianos testados em ratos causam redução nas concentrações séricas de T4 e aumento nas concentrações de TSH (62). As células foliculares da tireoide tentam aumentar os níveis de T4, liberando mais hormônio ou produzindo novos hormônios. Se o grau de inibição de T4 feito pelas substâncias desreguladoras for muito grande e não tiver compensação por estas medidas, pode ocorrer a hiperplasia das células foliculares da tireoide como resultado de estimulação por TSH na tentativa de elevar os níveis de T4, com

o aparecimento de bócio. Além disso, os resultados adversos descritos mais comuns diante da exposição a essas substâncias que diminuem o T4 plasmático, são efeitos neurológicos e tumores da tireoide (62, 63).

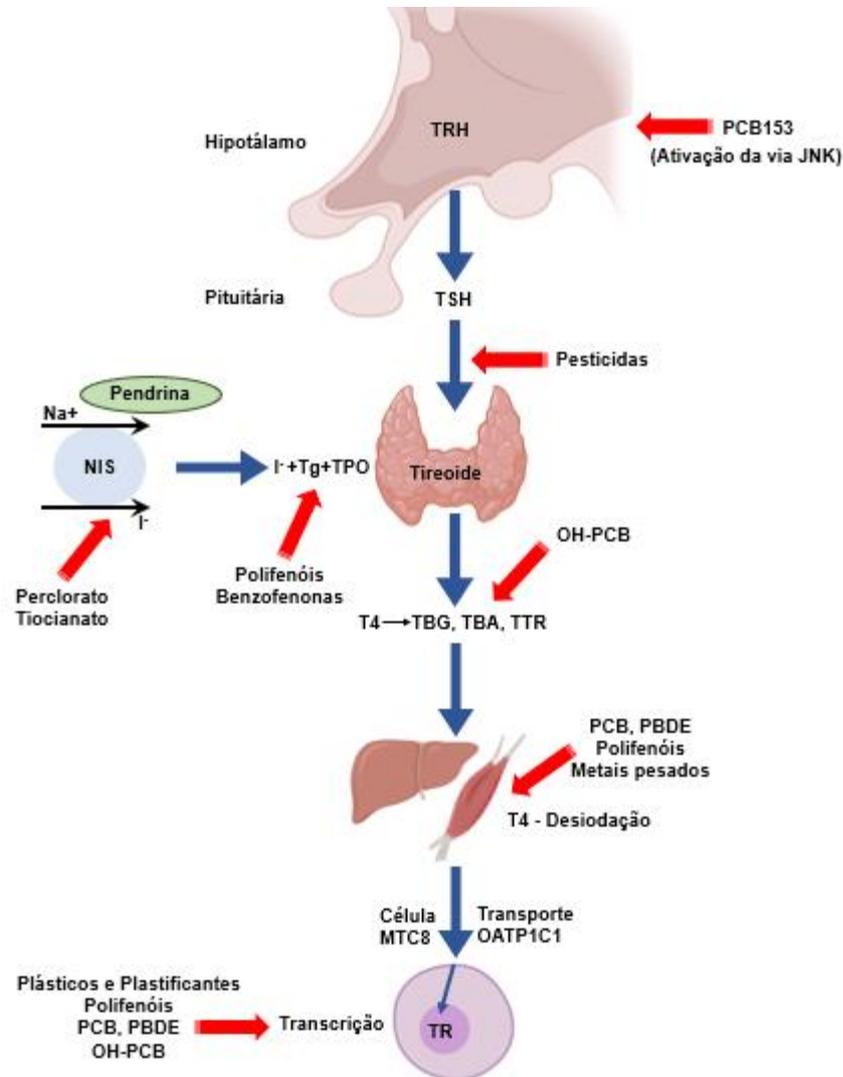


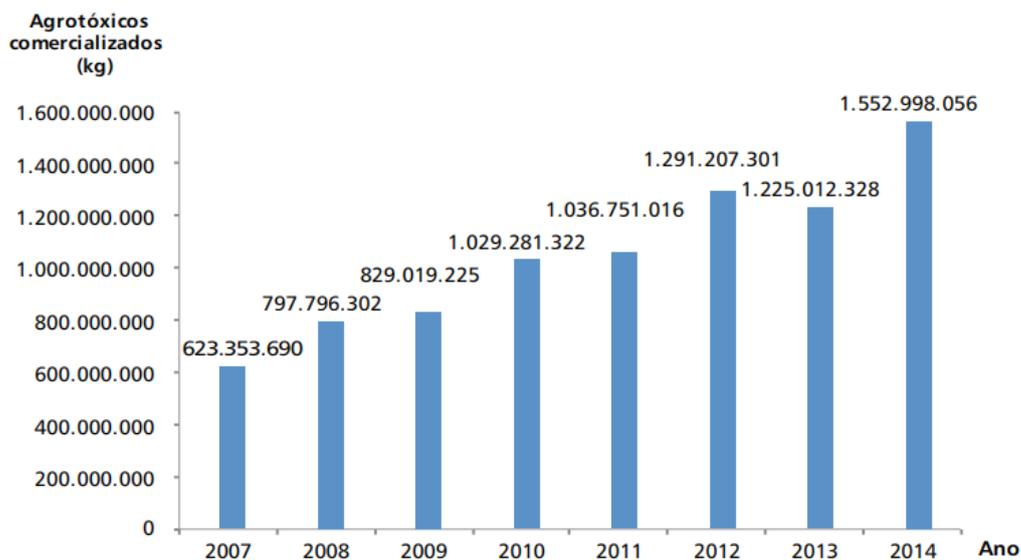
Figura 8. Diferentes pontos onde as substâncias desreguladoras afetam, atrapalhando a função e a ação da tireoide. , adaptado (50).

Outra associação importante com a tireoide, é a relação entre hipotireoidismo e pesticidas. Um estudo conduzido pela “*Agricultural Health Study*” com 22.246 homens que aplicam pesticidas, demonstraram associações estatisticamente importantes com o hipotireoidismo sobre o aumento do nível de exposição para os herbicidas alachlor e 2,4-D, e os inseticidas aldrin, chlordane, DDT, lindano e parathion (64).

1.3. Agrotóxicos

Dentre os poluentes ambientais, destacamos os agrotóxicos. Embora seu uso aumente a produtividade das colheitas, pelo motivo de sua toxicidade, além de bioacumulação que vários agrotóxicos possuem, a exposição a essas substâncias pode afetar o ambiente, a saúde animal e humana (65).

O Brasil, possui uma variedade em relação aos agrotóxicos, com diversos princípios ativos e formulações diferentes. E, durante os últimos anos, o mercado brasileiro obteve uma expansão acelerada, mantendo o Brasil nos países que mais consomem agrotóxicos (66). De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit) em 2014, foi o ano com a maior quantidade de agrotóxicos vendidos no Brasil, com um total de 1.552.998.056 quilos, um aumento de 149,14% desde 2007 (Figura 9) (67). Como consequência da abundante utilização destes produtos no Brasil, a exposição aos agrotóxicos e os impactos causados por eles, tornaram-se um grande problema de saúde pública no País (65, 67).



Fonte: Agrofit/MAPA, 2014.

*A comercialização de agrotóxicos foi estimada pela soma das variáveis cliente, venda direta, indústria e revenda.

Figura 9. Quantidade de agrotóxicos comercializados no Brasil entre 2007-2014 (67).

Durante o ano de 2014, entre os agrotóxicos mais comercializados no País, o herbicida glifosato foi o que mais se sobressaiu, correspondendo a 31,45% do total de agrotóxicos (Figura 10) (67). Classificado em primeiro lugar desde 2014 e vem se mantendo como o agrotóxico mais vendido no Brasil(68).

Classificação	Agrotóxicos	Total (kg) 2014
1	Glifosato ^b	488.388.696,10
2	2,4-D ^c	52.889.356,02
3	Óleo mineral (hidrocarbonetos alifáticos)	52.239.957,28
4	Acefato (organofosforado)	48.891.645,90
5	Metomil (metilcarbamato de oxima)	48.502.231,65
6	Clorpirifós (organofosforado)	46.760.108,99
7	Atrazina (triazina)	35.397.501,74
8	Dicloreto de paraquate (bipiridílio)	32.920.024,56
9	Carbendazim (benzimidazol)	15.307.157,79
10	Mancozebe (alquilenobis (ditiocarbamato))	14.770.319,00

Figura 10. Classificação dos agrotóxicos mais comercializados no Brasil em 2014 (67).

No Brasil, os agrotóxicos são classificados conforme estudos e testes realizados, que determinam uma dosagem letal 50% (DL50) sendo a dose precisa para matar 50% de uma população que está em teste. O resultado da dosagem é expresso em miligrama da substância por quilograma da massa corporal (mg/kg) e cada substância apresenta um rótulo que são identificados por cor com sua respectiva classificação toxicológica (Quadro 3) (19, 69). Contudo, em 23 julho de 2019 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reorganizou a classificação dos agrotóxicos no Brasil com o padrão internacional do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS*) (Figura 11) (70).

Quadro 3. Classificação dos agrotóxicos conforme os efeitos à saúde humana.

Classe toxicológica	Toxicidade	DL50	Faixa colorida
I	Extremamente tóxico	≤ 5 mg/kg	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50 mg/kg	Amarela
II	Medianamente tóxico	Entre 50 e 500 mg/kg	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5.000 mg/kg	Verde
-	Muito pouco tóxico	Acima 5.000 mg/kg	-

Fonte: Adaptado de, Peres F e Moreira, JC. orgs, 2003, p.384 (19).

Segundo a Resolução RDC nº 294, de 29 de julho de 2019 da Anvisa, foi ampliada a classificação toxicológica dos agrotóxicos (de quatro, foi para cinco categorias) e, foi incluído “não classificado”, para produtos capazes de gerar baixo dano (69, 70). Além disso, a tabela de cores é organizada conforme *Pantone Matching System*, de 2015 da *Guidelines - Food and Agriculture Organization of the United Nations* (71).

CATEGORIA	TOXICIDADE	COR DA FAIXA DE RÓTULO E BULA	PANTONE MATCHING SYSTEM (PMS)
1	EXTREMAMENTE TÓXICO	Faixa vermelha	Vermelho PMS Red 199 C
2	PRODUTO ALTAMENTE TÓXICO		
3	PRODUTO MODERADAMENTE TÓXICO	Faixa amarela	Amarelo PMS Yellow C
4	PRODUTO POUCO TÓXICO	Faixa azul	Azul PMS Blue 293 C
5	PRODUTO IMPROVÁVEL DE CAUSAR DANO AGUDO		
Não Classificado	PRODUTO NÃO CLASSIFICADO	Faixa verde	Verde PMS Green 347 C

Figura 11. Categorias toxicológicas, segundo a Resolução RDC nº 294, de 29 de julho de 2019 da Anvisa (69).

Além de serem classificados em relação a classe toxicológica, os agrotóxicos também podem ser classificados conforme a estrutura química e a classe do agente (pragas) a ser combatido como: inseticidas (controlam insetos), herbicidas (combatem plantas invasoras), fungicidas (combatem fungos), desfoliantes (combatem folhas indesejadas), fumigantes (combatem bactérias do solo), raticidas (controlam ratos), moluscocidas (combatem moluscos), nematicidas (combatem nematódeos) e, os acaricidas (combatem ácaros) (19).

A enorme utilização desses compostos químicos ocasiona diversos problemas ambientais como, no ecossistema terrestre e aquático, no ar e podem acarretar modificações nos ciclos biogeoquímicos (ciclo da água, do carbono, do oxigênio e do nitrogênio) (72). Um dos compostos de maior uso no mundo, são os pesticidas organofosforados, no qual afeta todo o metabolismo vegetal, como também a saúde animal e humana. um exemplo de organofosforado, composto de diversos herbicidas é o glifosato (72, 73).

1.3.1. Herbicida glifosato

A propriedade do herbicida mais utilizado no mundo foi descoberta pelo químico John E. Franz, da Companhia Monsanto, em 1970. Mas, somente em 1974 que o composto

glifosato foi divulgado comercialmente e com o nome Roundup® (74). A utilização do glifosato na agricultura se estende há mais de 4 décadas e, seu uso cresceu substancialmente nos últimos vinte e cinco anos, no mundo, devido a inserção de plantas geneticamente modificadas, resistentes ao glifosato (75).

O glifosato (N-(fosfonometil)glicina) é um organofosforado, que está na classe da glicina, com sua fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (76). É um herbicida classificado como não seletivo (mata a maioria das plantas), sistêmico (absorvido através da folha com transportação no interior da planta) e pós-emergente (aplicado após plantas daninhas existentes no plantio) (76, 77). Além disso, em monografias autorizadas pela ANVISA, o herbicida a base de glifosato tem classificação toxicológica de nível IV, ou seja, pouco tóxico (78).

No comércio, existem várias formulações do herbicida a base de glifosato (HBG), podendo ser na forma ácida ou, como sais (sal de isopropilamina, de amônio, fosfato diamônio ou potássio). É um dos principais produtos comerciais de glifosato, é o Roundup® patenteado pela Monsanto (79). Apesar de ser classificado como um produto pouco tóxico pela ANVISA, suas diferentes formulações apresentam adjuvantes, que são substâncias acrescentadas aos herbicidas para melhorar a competência do produto, mas, pouco se sabe sobre seus efeitos. Estes adjuvantes podem ser os surfactantes (modificam as propriedades de superfície dos líquidos) e os aditivos (aumentam a absorção dos herbicidas, por efeito da sua ação direta sobre a cutícula) (80). Porém, em determinadas formulações, os adjuvantes estão mais alto que o próprio ingrediente ativo dos herbicidas e, já foi relatado que podem causar diferentes tipos de danos a exposições a estes adjuvantes sendo irritantes e tóxicos (81-85).

O eventual dano relacionado à exposição a HBG, pode depender da concentração à qual o organismo está exposto. O problema é que esta exposição pode ocorrer de diversas maneiras pois, os herbicidas são detectados no solo, no ar, nas águas superficiais e subterrâneas (86, 87). Os HBGs podem ser fatais para células *in vitro*, mesmo utilizando concentrações menores do que as determinadas comercialmente (88).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) declarou, em 2005, a preocupação com o potencial de toxicidade dos HBGs, pelo fato de terem acumulação de resíduos na cadeia alimentar (89). E em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), classificou o glifosato como um agente possivelmente carcinogênico (Quadro 4) (90, 91).

Quadro 4. Classificação da IARC do pesticida glifosato.

	Atividade (status atual)	Evidências em humanos (sites de câncer)	Evidências em animais	Evidências de atuação	Classificação *
Glifosato	Herbicida (usado atualmente; herbicida de maior volume de produção global)	Limitada (linfoma não Hodgkin)	Suficiente	Genotoxicidade e estresse oxidativo	2A†
† A evidência de atuação forneceu suporte independente da classificação 2A com base na evidência de carcinogenicidade em humanos e animais experimentais.					

Fonte: Modificado de, Guyton KZ, *et al.*, 2015, p.1 (91).

Os impactos que os agrotóxicos geram na saúde humana, tem sido uma importante preocupação para a população científica (92). A exposição a essas substâncias ocorre por ingestão de água ou de alimentos contaminados, sendo que a ingestão é o motivo predominante da exposição humana; depois, são por aspiração e/ou contato com a pele (93-95). Dentre essas exposições, a ocupacional é a mais preocupante pois, se trata dos profissionais que trabalham diretamente em contato com agrotóxicos e que podem se contaminar ao longo das diluições, no preparo da calda, na aplicação dos agrotóxicos e após a aplicação nas lavouras (92, 96). Outro grupo de risco, são os pilotos agrícolas, que durante as aplicações aéreas, existe a possibilidade de entrarem em contato e se contaminarem (92).

Estudos indicam que os pesticidas têm o potencial de estar ligado a variadas doenças como, câncer, asma, diabetes, Parkinson, leucemia, efeitos cognitivos e outros efeitos que incluem o sistema reprodutivo masculino (97, 98). Além de que muitos pesticidas têm efeitos de desreguladores endócrinos (99). Mesmo que a exposição seja em níveis baixos, podem ter efeitos adversos à saúde, principalmente em mulheres grávidas, indivíduos no início do desenvolvimento e crianças (100). Essa ameaça à saúde em relação a exposição aos pesticidas não vem unicamente pela toxicidade dos produtos mas também, pelo grau de exposição (98).

1.3.2. Estudos com glifosato e tireoide

Os distúrbios da tireoide encontram-se associado a muitas consequências que são prejudiciais à saúde, porém, os hormônios tireoidianos são essenciais para diversas ações fisiológicas, desempenhando funções de vários órgãos como, o cérebro, coração, rins e fígado; e, atuando na fertilidade, ciclo menstrual, memória, peso, entre outros. Então, é importante para a saúde pública identificar quais são os fatores de risco (101-103).

Diversos estudos demonstram diferentes substâncias que prejudicam o eixo HHT em vários níveis (104-106), entretanto, a utilização de herbicidas da base de glifosato (HBG) em relação tireoide, ainda é pouco sabido e publicações já feitas, são divergentes (87).

Um estudo com ratos Wistar machos e fêmeas, analisou a ruptura do eixo HHT a exposição perinatal ao herbicida Roundup Transorb®, resultando o TSH em níveis menores. Apesar disso, não demonstraram qualquer alteração nos níveis de TH. No período perinatal nos machos, mostraram que o HBG impede a regulação do TSH além de, impedir expressão de genes relacionados na função e homeostase dos HT, mas não a concentração periférica. Contudo, quando avaliaram o perfil metabólico, foi demonstrado um padrão semelhante aos animais hipotireoideos (87).

Reis e colaboradores (107) investigaram o efeito intergeracional em ratos para analisar a homeostase da tireoide em exposição ao herbicida Roundup® Transorb. No estudo, demonstraram que, os animais adultos que receberam a exposição perinatal do HBG, vários genes relacionados ao metabolismo dos HT demonstraram alterações nas expressões, induzindo assim, uma mudança na homeostase dos HT e sugerindo também, que é envolvido nas alterações intergeracionais.

Em humanos, já foi relatado que o glifosato se encontrou em todas as urinas de trabalhadores da agricultura. Observaram que, no final do dia que pulverizavam o herbicida e logo no dia seguinte, sua concentração de glifosato na urina era extremamente maior que nos dias anteriores, antes da pulverização. Além da urina, também foi analisado amostras de sangue para examinar os HT. Os resultados demonstraram que, no dia anterior da pulverização em relação ao dia posterior, as mudanças nos níveis dos HT não foram muito diferentes, porém, com a alteração mensurada dos níveis de metabólitos, demonstraram que, o aumento do glifosato na urina dos agricultores, no dia após a pulverização, aumentou significativamente os níveis do T4 (108).

Mesmo com diferentes estudos apontando que, o glifosato possivelmente é citotóxico e que é capaz de interferir no eixo HHT, em 2015 a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA) relatou que, o glifosato não possui capacidade para perturbar as vias da tireoide (87, 109). Nos ensaios puberais realizados em ambos os sexos, não encontraram consequências no peso da tireoide, na histopatologia e nos níveis séricos de T4 e TSH. Deste modo, finalizaram que o glifosato não consegue interagir com o HHT (109). Em 2020 a US EPA publicou uma revisão de mitigação, detalhando a avaliação de risco à saúde humana perante o glifosato e, reforçou que não existe qualquer preocupação para a saúde humana

quando usado corretamente, conforme mencionado no rótulo do produto e, que também não é um produto cancerígeno (110, 111).

Agências como US EPA e IARC se posicionam de modo diferente em relação ao glifosato pois, a IARC considerou ensaios realizados para investigar efeitos genotóxicos (estresse oxidativo e hormônios sexuais) de 81 ensaios, 62 tiveram resultados positivos; a análise foi feita dando destaque aos resultados utilizando formulações de HBG e seu metabólito AMPA; e as avaliações foram feitas contendo informações de dieta média, cenários de exposição elevada e ocupacional. Por outro lado, a US EPA se baseou principalmente em relatórios regulatórios dos quais 99% foram negativos em relação a toxicidade, estudos técnicos de glifosato e além de se concentrarem em exposições alimentares comuns da população, negligenciando os riscos e exposições ocupacionais mais altos (112). Lembrando que, as diferentes formulações de glifosato que possuem os surfactantes são parâmetros importantes da toxicidade do glifosato (113). Produtos com formulações de glifosato são mais prejudiciais do que o próprio glifosato, sendo contribuinte de diferentes doenças (114, 115).

Compreender as respostas biológicas a produtos químicos tóxicos é de extrema importância para a avaliação da poluição, tanto para monitorar a exposição à contaminação ambiental existente, quanto para estimar riscos de efeitos e sugerir medidas de precaução (116). Além disso, identificar as lesões e/ou mutações que podem ser causados por agentes químicos é fundamental para a compreensão do seu modo de ação (117). E, em virtude de baixa toxicidade já relatado do ingrediente glifosato, é mais interessante levar em consideração estudos com suas diferentes formulações e/ou seus co-formulantes pois não são inativos e sim muitas vezes agravam o meio ambiente e perturbam a saúde humana (118).

1.4.Hipótese

O câncer de tireoide e os distúrbios da função tireoidiana, em particular o hipotireoidismo, tornaram-se cada vez mais comuns. Esse aumento na prevalência pode estar relacionado com os DEs mas, mas, não se sabe como esses contaminantes ambientais podem influenciar células que já possuem uma mutação oncogênica. Os herbicidas a base de glifosato são DE de ampla dispersão ambiental e seu acúmulo pode causar uma cascata de alterações relacionadas à função tireoidiana. Aumentando a proliferação, migração, invasão e apoptose celular. Poderia ter também, algum potencial de contribuição para a tumorigênese e a agressividade tumoral, porém, seu efeito sobre as células tireoidianas ainda é pouco conhecido.

Esta pesquisa mostrará como um herbicida à base de glifosato (Roundup®

Original DI) agem nas linhagens tireoidianas normais e nas linhagens do carcinoma papilífero tireoidiano. Uma melhor compreensão da ação desse DE nessas células terá um impacto direto na saúde humana, mostrando como os contaminantes ambientais nos afetam e fornecerá informações para futuras pesquisas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar os efeitos do herbicida glifosato (Roundup® Original DI), em células tireoidianas normais e tumorais.

2.2. Objetivos específicos

1. Analisar a viabilidade celular das linhagens tireoidianas Nthy-ori 3-1 (células foliculares) e TPC-1 (derivadas de CPT) expostas a diferentes concentrações do herbicida à base de glifosato Roundup® Original DI.
2. Determinar o efeito citotóxico do herbicida Roundup® Original DI nas linhagens Nthy-ori 3-1 e TPC-1.
3. Analisar a influência do Roundup® Original DI na proliferação celular das linhagens Nthy-ori 3-1 e TPC-1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os métodos descritos abaixo foram realizados em momentos diferentes para as linhagens TPC-1 e Nthy-ori 3-1 a fim de evitar contaminações cruzadas. Os testes foram realizados em triplicata.

3.1. Cultura celular

Os modelos experimentais utilizados foram duas linhagens derivadas de tireoide humana, a TPC-1 e Nthy-ori 3-1, sendo a TPC-1 proveniente de carcinoma papilífero e a Nthy-ori 3-1 funcionou como um controle para a célula neoplásica já que se trata de uma linhagem derivada de células foliculares tireoidianas. A linhagem TPC-1 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Valdemar de Jesus Conde Máximo, do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto, Portugal (IPATIMUP) com o qual temos parceria, e a linhagem Nthy-ori 3-1 foi obtida comercialmente pela *Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*. As linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino, 1% de Penicilina-

Streptamicina e 250mg/ml de fungizone (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*). Foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO₂) (119-122).

3.2. Glifosato (*Roundup® Original DI*)

Para a exposição das linhagens celulares tireoidianas TPC-1 e Nthy-ori 3-1, foi utilizado o herbicida glifosato Roundup® Original DI (*Monsanto, São Paulo, Brasil*). Sua composição possui: 445 g/L (44,5% m/v) Sal de Di-amônio de N-(phosphonomethyl)glycine (Glifosato); 370 g/L (37,0% m/v) Equivalente ácido de N-(phosphonomethyl)glycine (Glifosato) e 751 g/L (75,1% m/v) Outros ingredientes, com uma concentração de 1,566 g/L (123).

3.3. Diluição e escolha das concentrações do Roundup® Original DI

As concentrações do Roundup® Original DI variaram de 6,5 µg/L a 6500 µg/L (total de 15 concentrações), baseados em um estudo anterior (127), além de doses como, Nível Aceitável de Exposição Ocupacional (AOEL) e Ingestão Diária Aceitável (IDA), presentes na Nota Técnica (Processo nº 25351.056754/2013-17) da ANVISA (128) para uma pré-seleção de concentrações utilizadas no trabalho. O herbicida Roundup® Original DI foi diluído em água Milli-Q® (*Merck Group*) e, foram preparadas duas soluções onde, a primeira solução foi para as concentrações mais altas, ou seja, menos diluídas, com concentração igual a 156,6 µg/L e a segunda solução, foi para as concentrações mais baixas, mais diluídas com concentração igual a 1,566 µg/L.

3.4. Cálculo de diluição para as concentrações ambientais utilizando o livro: “Guyton e Hall: Tratado de Fisiologia Médica - 12ª Edição”

Para calcular as doses ambientais presentes na Nota Técnica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do herbicida glifosato, foi utilizado o livro “*Tratado De Fisiologia Médica Capítulo 25 - Os Compartimentos dos Líquidos Corporais: Líquidos Extracelular e Intracelular, Líquido Intersticial e Edema*” (32).

As doses como, a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0,5 mg/kg e o Nível Aceitável de Exposição Ocupacional (AOEL) de 0,1 mg/kg, são publicadas em unidades de medida de mg/kg, então, foi preciso converter, para facilitar no cálculo de diluição e obter a mesma unidade de medida. Por isso, o livro do Guyton e Hall foi utilizado como apoio e auxiliar na pesquisa.

Utilizamos os parâmetros da página 304 do livro onde diz: “Em homem adulto com peso médio de 70 quilos, a quantidade total de água fica em torno de 60% do seu peso corporal,

algo em torno de 42 litros”. (124, 125). Então, o herbicida foi diluído em água Milli-Q® e as doses de tratamento foram preparadas em diferentes concentrações. Para as doses referenciadas pela ANVISA foi usado a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Nível aceitável de exposição ocupacional}}{0,1 \text{ mg/kg (AOEL)} \times 70 \text{ kg (peso corporal médio de um adulto)}} = 160 \mu\text{g/L}$$

$$42 \text{ L (total de água do peso corporal)}$$

$$\frac{\text{Ingestão diária aceitável}}{0,5 \text{ mg/kg (IDA)} \times 70 \text{ kg (peso corporal médio de um adulto)}} = 830 \mu\text{g/L}$$

$$42 \text{ L (total de água do peso corporal)}$$

3.5. Ensaio azul de tripan

O ensaio por azul de tripan é um método muito usado para analisar a viabilidade celular. As células não viáveis se coram com o corante, onde é absorvido pelo seu citoplasma, pela perda de integridade da membrana e, células viáveis, não se coram, pois permanecem com sua membrana celular intacta (126).

As linhagens celulares tireoidianas TPC-1 e Nthy-ori 3-1 foram colocadas em placas de cultura de 12 poços (Kasvi®) ($3,7 \times 10^4$ /poço) e incubadas por 24 horas para a completa adesão celular e chegar em uma confluência de 80%. Em seguida, as linhagens celulares foram expostas a 15 concentrações de Roundup® Original DI por 24 e 48 horas e, comparadas com células não expostas (controle). As concentrações do Roundup® Original DI variaram de 6,5 µg/L a 6500 µg/L (Tabela 2), para uma pré-seleção de concentrações utilizadas no trabalho.

Tabela 2. Faixas de concentrações de Roundup® utilizadas no Ensaio Azul de Tripan.

Roundup® Original DI
6,5 µg/L
12,7 µg/L
25,4 µg/L
50,78 µg/L
65 µg/L
101,56 µg/L
160 µg/L
203,12 µg/L

406,25 µg/L
 650 µg/L
830 µg/L
 812,5 µg/L
 1625 µg/L
 3250 µg/L
 6500 µg/L

Após as exposições celulares nos tempos propostos, o meio RPMI 1640 foi substituído por 200 µl de 0.05% Trypsin-EDTA (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*). Em seguida, foi colocado 500 µl de meio RPMI 1640 em cada poço, para interromper a ação da tripsina e as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. Foi retirado o sobrenadante de cada microtubo e ressuspendido com 200 µl de meio RPMI 1640.

Para a contagem celular foram retirados 10 µl de suspensão celular e adicionado 10 µl de Azul de Tripán 0,4% (*Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA*) e, desta mistura, 10 µl de cada microtubo foram colocados em lâminas descartáveis para contagem de células pelo Countess® II FL (*Thermo Fisher Scientific*). O ensaio foi realizado em triplicata técnica.

3.6. Ensaio Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

O ensaio CCK-8, permite ensaios colorimétricos sensíveis para a determinação do número de células viáveis em ensaios de proliferação celular e citotoxicidade (129, 130). O ensaio utiliza o sal de tetrazólio que é solúvel em água WST-8 [2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio, sal monossódico] e, produz um corante de formazan após redução na presença de um transportador de elétrons (Figura 12). O WST-8 é reduzido por desidrogenases nas células transformando o produto numa cor alaranjada (formazan), que é solúvel no meio de cultura. A quantidade de corante formazan gerado pela atividade das desidrogenases nas células, é diretamente proporcional ao número de células vivas (129).

Esquema 1. Disposição do ensaio CCK-8 em placa de 96 poços. Letras **A, B, C, D e E**, equivalente as cinco concentrações de Roundup® Original DI (6,5; 65; 160; 830 e 6500 µg/L); **Ctrl** equivalente ao controle (células sem exposição ao herbicida) e **B** (poços apenas com meio de cultura RPMI 1640 - Branco).

Com os resultados obtidos pelo leitor de microplaca, foi calculado as médias para saber a porcentagem de células viáveis por concentração nos tempos de 24 e 48 horas. Para definir esta porcentagem de células vivas, primeiramente, foi calculada a média de todos os resultados, ou seja, a média das triplicatas das diferentes concentrações de Roundup® Original DI; a média dos controles e a média dos brancos. O controle foi representado como 100% de atividade desidrogenase, o que equivale ao número de células vivas, e a viabilidade celular foi expressa como porcentagem das células não tratadas com o Roundup® Original DI. Os valores dos brancos equivalem à absorbância da solução de CCK-8 e estes foram subtraídos de todas as amostras (tratadas e não tratadas). Calculada da seguinte forma:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(\text{Absorbância do Roundup}) - (\text{Absorbância do branco})}{(\text{Absorbância do controle}) - (\text{Absorbância do branco})} \times 100$$

3.7. Ensaio de proliferação celular BrdU

O ensaio de proliferação celular por BrdU identifica o 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) que é incorporado ao DNA usando um anticorpo anti-BrdU, durante a proliferação celular. O BrdU é um análogo sintético de timina, onde é captado pelas células durante a fase S da mitose (Figura 12), sendo desta forma, um marcador de células em proliferação com coloração azulada. Então, a coloração formada é proporcional à quantidade de BrdU incorporada às células e usada diretamente como um indicador de proliferação celular. Assim, quanto maior a incorporação de BrdU ao DNA, maior é a atividade proliferativa das células analisadas.



Figura 13. Desenho esquemático refletindo o ciclo celular e o estágio em que ocorre expressão de BrdU. O BrdU somente é incorporado durante a fase de síntese (fase S) do ciclo celular, indicando que a célula se encontra na fase S ou já passou por ela.

Para o ensaio, foi utilizado o kit de proliferação celular BrdU da *Cell Signaling Technology*® e, realizado de acordo com as instruções do fabricante (132). As células foram cultivadas em placas de 96 poços e foram semeadas 100.000 células/poço das linhagens TPC-1 e Nthy-ori 3-1 e, incubados por 24 horas em uma incubadora umidificada a 37°C, com 5% de CO₂, para a adesão completa das células, em meio RPMI-1640. Subsequentemente, foi adicionado os tratamentos de Roundup® Original DI (6,5µg/L; 65µg/L; 160µg/L (AOEL); 830µg/L (IDA) e 6500µg/L) e as linhagens foram incubadas nos tempos de 24 e 48 horas de exposição.

Após os tempos de exposições, para a incorporação do BrdU, foi adicionado 10 µl da solução de BrdU 10X, onde foi previamente diluído - BrdU 1:100 com o meio de cultura celular Opti-MEM® (*Thermo Fisher Scientific*) e, depois, incubado por 2 horas. Após a incubação, foi adicionado 100 µl por poço da solução de fixação/desnaturação e, as placas foram mantidas em temperatura ambiente (TA), por 30 minutos. Removido a solução de fixação/desnaturação, foi adicionado 100 µl de solução de anticorpo de detecção BrdU 1X (previamente diluído 1:100 com diluente de anticorpo de detecção) e as placas foram mantidas em TA por 1 hora. Após isso, foi removido a solução e as placas foram lavadas 3 vezes com Wash Buffer 1X, onde foi diluído em água purificada. Em seguida, foi adicionado à solução de anticorpo secundário conjugado com HRP 1X (diluído 1:100 com diluente de anticorpo ligado a HRP) em cada poço, e novamente, as placas foram mantidas à TA por 30 minutos e, lavado 3 vezes com 1X Wash Buffer. Depois, foi adicionado 100 µl de substrato TMB e incubado por 30 minutos em TA. Nesta etapa, foi observado a mudança de cor das placas, pois possivelmente seria necessário interromper a reação antes do tempo de desenvolvimento padrão de 30 minutos. Passado este tempo, foi adicionado 100 µl de solução STOP em cada poço e para a leituras das placas, foi utilizado um leitor de microplacas (*ELx808, Biotek, Winooski, VT, USA*) com absorvância a 450 nm. O ensaio foi realizado em triplicata técnica em ambas linhagens e tempos. A proliferação celular foi expressa pela absorvância e, logo em seguida, os valores foram corrigidos com o resultado do branco (controle da reação).

3.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o software SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.4 (SAS Institute Inc, 2002-2012, Cary, NC, USA). Para

a comparação de medidas numéricas entre concentração e seu respectivo controle, foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. Para a comparação de medidas numéricas entre concentrações, tempos e linhagens celulares, foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos. O teste de perfil por contrastes, foi aplicado para as comparações múltiplas, quando necessário. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio azul de tripan

❖ *Linhagem TPC-1*

Como podemos observar no gráfico 1, os resultados obtidos nos mostram uma curva de dose-resposta não monotônica, como é característica dos DEs. A segunda concentração mais baixa (12,7 µg/L) causou mais mortes celulares do que algumas concentração mais altas, como a 3250 µg/L em 24h (71% vs. 55%), e em 48 horas com a nossa maior dose (6500 µg/L) (25% vs. 15%). A maior porcentagem de mortalidade celular alcançada foi de 71% com a concentração de 12,7 µg/L e, em 48 horas a porcentagem mais alta foi de 42% com a concentração de 203,1 µg/L. As doses autorizadas da ANVISA (AOEL e IDA) tiveram uma porcentagem próxima em ambos os tempos: em 24 horas 50% e 58% e, em 48 horas 33% e 37%, respectivamente.

Os efeitos citotóxicos do Roundup® Original DI na linhagem TPC-1 foram mais pronunciados após 24 horas de exposição e, apresentaram valores mais baixos após 48 horas (Gráfico 1).

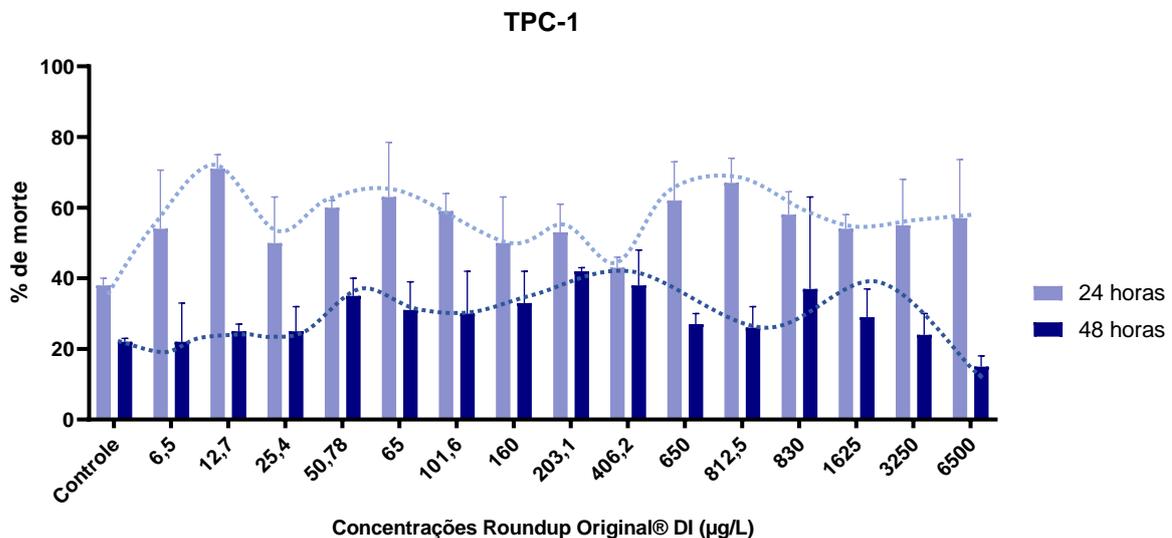


Gráfico 1. Porcentagem de células TPC-1 mortas após exposição a concentrações crescentes de Roundup® Original DI por 24 h e 48 h, medidas pelo teste de corante azul de tripano.

❖ *Linhagem Nthy-ori 3-1*

Após o resultado do ensaio azul de tripan, na linhagem TPC-1, foi feita uma seleção das concentrações para prosseguir com nosso estudo. Da mesma forma que a TPC-1, na linhagem Nthy-ori 3-1, houve uma diminuição de células viáveis após exposição de 24 horas e, que em 48 horas, foi observado maior número de células viáveis.

A dose de 160 µg/L (AOEL) e 830 µg/L (IDA) totalizaram em 43% e 35%, em 24 horas. Entretanto, em 48 horas observamos apenas 33% e 18%, de forma similar ao ocorrido com a TPC-1, como mostrado no gráfico 3. A menor porcentagem de células mortas em ambos os tempos, foi com a concentração IDA. Nossa maior concentração 6500µg/L levou 53% das células a morrerem em 24 horas, sendo a porcentagem mais alta e, 23%, em 48 horas (Gráfico 2).

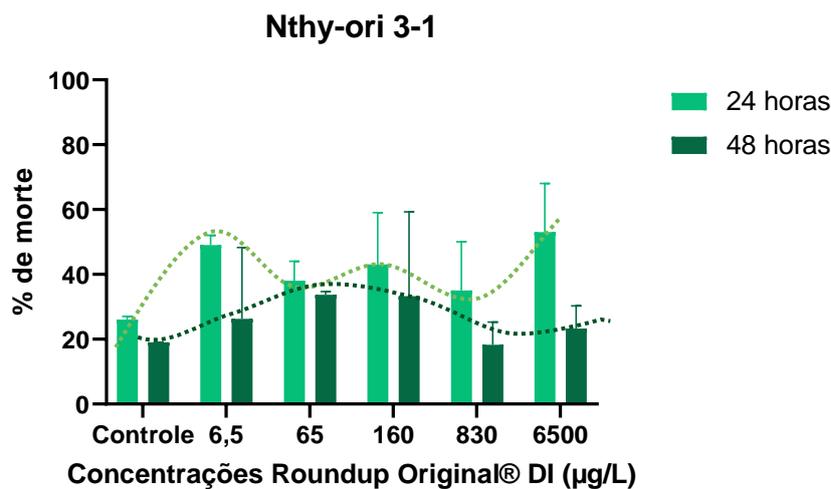


Gráfico 2. Porcentagem de células Nthy-ori 3-1 mortas após exposição a cinco concentrações crescentes selecionadas de Roundup® Original DI por 24 h e 48 h medidas pelo teste de corante azul de tripano.

Comparando as duas linhagens celulares testadas, observa-se que com 65 µg/L, na linhagem Nthy-ori 3-1 em 48 horas e, na TPC-1 em 24 horas, foi a concentração que causou mais morte celular (Gráfico 3).

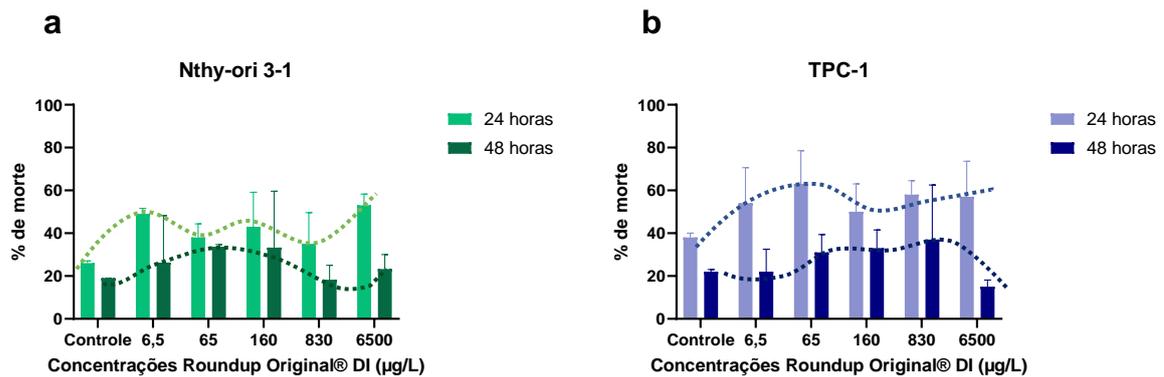


Gráfico 3. Comparação da mortalidade celular nas linhagens Nthy-ori 3-1 (a) e TPC-1 (b) após exposição a concentrações crescentes de Roundup® Original DI por 24 h e 48 h pelo teste de corante azul de tripano.

Observamos uma taxa de lesão celular importante, mas limitada, conforme detalhado na tabela 3. A exposição de células Nthy-ori 3-1 e TPC-1 por 24 h em concentrações de AOEL causou a morte de 43% e 50% das células, respectivamente, enquanto IDA resultou em 35% e 58% de morte celular. Após 48 h de exposição, AOEL e IDA causaram um menor número de células mortas Nthy-ori 3-1 (33% e 18%) e TPC-1 (33% e 37%), respectivamente.

Tabela 3. Porcentagem de mortalidade de células Nthy-ori 3-1 e TPC-1, após exposição ao Roundup® Original DI por 24 h e 48 h, em diferentes concentrações, medida pelo teste de exclusão do azul de tripano. O valor de p, refere-se à comparação entre o número de células mortas expostas ao herbicida e, o número de células controle mortas não expostas.

	24 horas				48 horas			
	Nthy-ori 3-1	Valor de p*	TPC-1	Valor de p*	Nthy-ori 3-1	Valor de p*	TPC-1	Valor de p*
6,5 µg/L	49% ± 2.6	0.5000	54% ± 16.6	0.5000	26% ± 21.9	1.0000	22% ± 10.5	0.5000
65 µg/L	38% ± 6.4	0.2500	63% ± 15.5	0.5000	34% ± 1.0	0.5000	31% ± 8.4	0.5000
160 µg/L	43% ± 16.1	0.5000	50% ± 13.0	1.0000	33% ± 26.3	0.5000	33% ± 8.5	0.2500
830 µg/L	35% ± 14.6	1.0000	58% ± 6.5	0.2500	18% ± 6.7	0.2500	37% ± 25.5	0.5000
6500 µg/L	53% ± 5.3	0.2500	57% ± 16.6	0.5000	23% ± 6.7	0.5000	15% ± 3.1	1.0000

*Baseado no teste de Wilcoxon para amostras relacionadas.

4.2. Ensaio CCK-8

❖ Linhagem Nthy-ori 3-1

As porcentagens de células vivas em 24 horas foram de 86% a 113% e, em 48 horas, de 84% a 102%. Em 24 horas, a menor concentração de 6,5 µg/L, obteve 13% a mais de viabilidade comparado ao controle. A menor viabilidade celular foi de 86% com a dose de 6500

$\mu\text{g/L}$. Em 48 horas, a maior porcentagem de células vivas foi na dose 65 $\mu\text{g/L}$ e a menor foi na dose de 160 $\mu\text{g/L}$ (AOEL), chegando a 84%.

Assim, observamos que, o Roundup® Original DI não causou citotoxicidade, com nenhuma das cinco concentrações usadas, em nenhum dos tempos, como mostra o gráfico 4, mas sim, causou uma pequena proliferação celular com as concentrações de 6,5 $\mu\text{g/L}$ e 65 $\mu\text{g/L}$ em ambos os tempos.

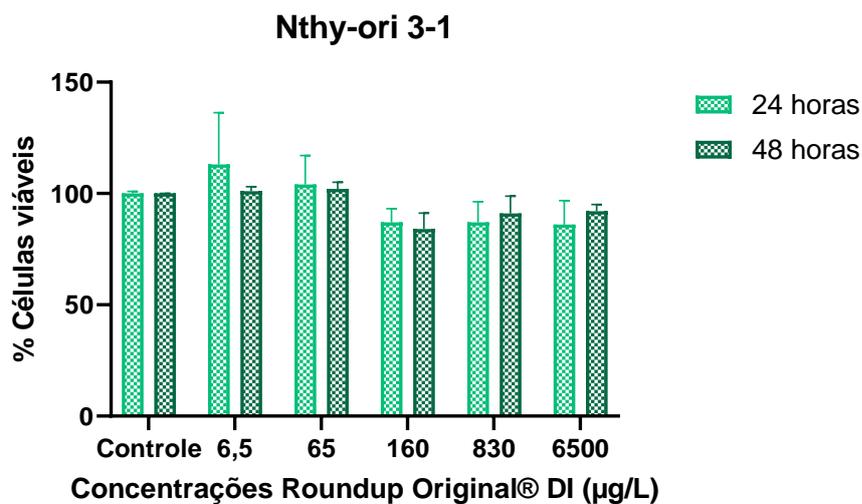


Gráfico 4. Porcentagem de células vivas da linhagem Nthy-ori 3-1, após exposição a concentrações crescentes de Roundup® Original DI, por 24 h e 48 h, medido pelo ensaio CCK-8.

❖ *Linhagem TPC-1*

As porcentagens de células viáveis foram de, 88% a 105% em 24 horas e, de 79% a 106%, em 48 horas. Em 24 horas, a menor concentração 6,5 $\mu\text{g/L}$ obteve 5% de aumento de células viáveis, comparado com o controle, da mesma forma como havíamos observado na Nthy-ori 3-1. A menor viabilidade celular foi de 88%, com dose AOEL (160 $\mu\text{g/L}$). Em 48 horas, a maior porcentagem de células vivas ocorreu com a dose de 6500 $\mu\text{g/L}$ e, a menor (de 79%) com as doses de 6,5 e 65 $\mu\text{g/L}$.

Da mesma maneira que a Nthy-ori 3-1, os resultados da linhagem TPC-1 não apresentaram indícios de citotoxicidade provocada pelo Roundup® pois, as viabilidades foram mantidas acima de 79% (Gráfico 5). Também, foi observado uma pequena proliferação celular nas concentrações de 6,5 $\mu\text{g/L}$ e 6500 $\mu\text{g/L}$ em 24 e 48 horas, respectivamente.

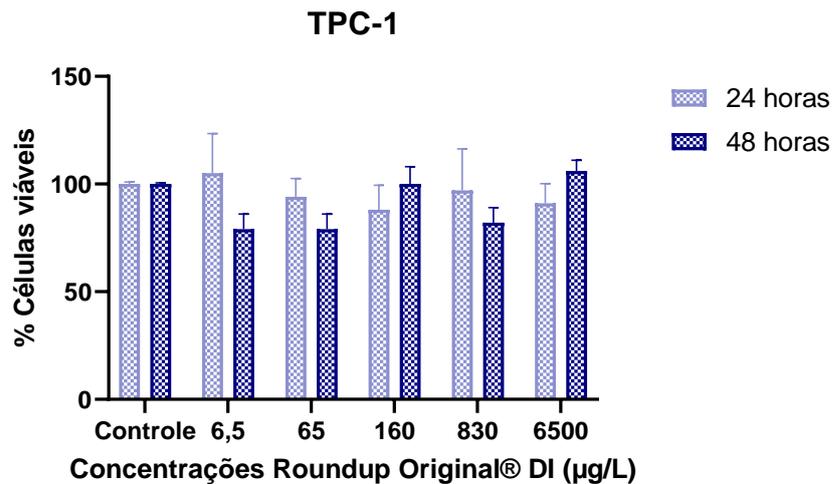


Gráfico 5. Porcentagem de células vivas da linhagem TPC-1, após exposição a concentrações crescentes de Roundup® Original DI, por 24 h e 48 h, medido pelo ensaio CCK-8.

Uma comparação do número de células viáveis, em 24 e 48 horas de exposição ao Roundup® Original DI, nas mesmas doses, mostrou que o herbicida teve efeitos semelhantes nas células Nthy-ori 3-1 e TCP-1 (Gráfico 6 e Tabela 4). E, em 24 horas, na menor concentração de 6,5 µg/L, ambas ultrapassam os 100% de viabilidade celular. Além disso, os resultados foram comparados utilizando ANOVA para medidas repetidas (concentrações e tempos). Foram utilizados como fatores: os tipos de células, as concentrações e os tempos de exposição e, as interações entre eles. Especificando os resultados da interação *concentrações*células*, na linhagem Nthy-ori 3-1, tivemos diferenças nas concentrações de maneira que, 65 µg/L apresentou valores maiores que 160, 830 e 6500 µg/L, e que, 160 µg/L foi menor que 830 µg/L. Para essa análise após o ANOVA, foi feito um post-hoc (teste de perfil por contraste) para localizar essa diferença. Porém, na linhagem TPC-1 não foi observado diferença entre as concentrações. Além disso, não houve diferença significativa entre as células (Nthy-ori 3-1 e TPC-1) para as concentrações (Tabela 5).

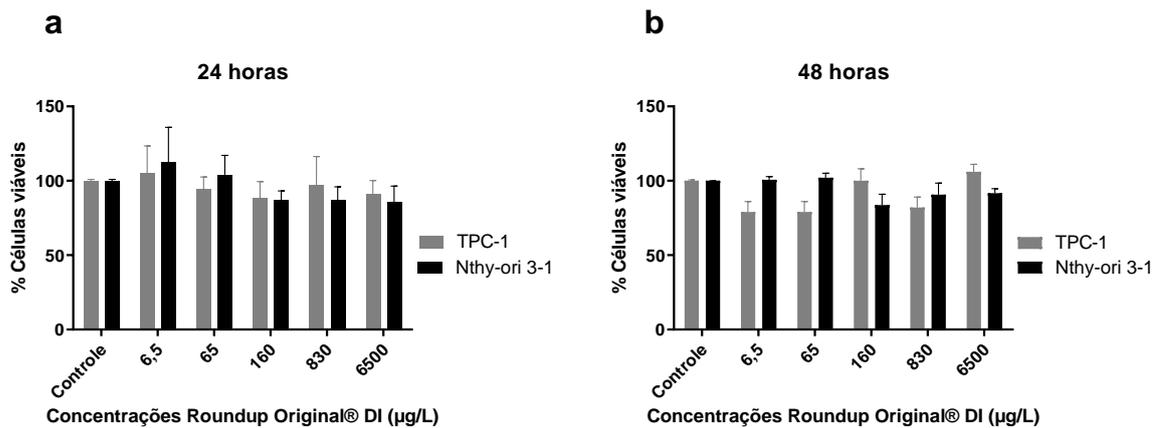


Gráfico 6. Comparação entre a porcentagem de células viáveis TPC-1 e Nthy-ori 3-1 em 24 h (painel a) e 48 h (painel b) de exposição a diferentes concentrações de Roundup® Original DI usando o ensaio CCK-8.

Tabela 4. Porcentagem de células viáveis Nthy-ori 3-1 e TPC-1 após exposição ao Roundup® Original DI por 24 h e 48 h em diferentes concentrações, medido pelo ensaio CCK-8. O valor de p refere-se à comparação entre o número de células viáveis expostas ao herbicida e o número de células viáveis de controle não expostas.

	Nthy -ori 3-1		TPC-1	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
6,5 µg/L	113% ± 23.29	101% ± 2.08	105% ± 18.40	79% ± 7.10
65 µg/L	104% ± 13.08	102% ± 3.00	94% ± 8.50	79% ± 7.10
160 µg/L	87% ± 6.24	84% ± 7.23	88% ± 11.36	100% ± 7.80
830 µg/L	87% ± 9.29	91% ± 7.77	97% ± 19.30	82% ± 7.77
6500 µg/L	86% ± 10.79	92% ± 3.06	91% ± 9.20	106% ± 3.06

Tabela 5. Resultados da ANOVA para medidas repetidas comparando o ensaio CCK-8 (% células vivas*) entre tipos de linhagens celulares, concentrações e tempos (n=3).

Tipos de Células	Concentrações (µg/L)	Tempos	Interações			
			Concentrações*células	Tempos*células	Concentrações*tempos	Concentrações*tempos*células
Nthy-ori 3-1 e TPC-1	6,5, 65, 160, 830, 6500	24h e 48h	0.0471^a	0.9839	0.5633	0.5434

*Variável transformada em postos (*ranks*) para a análise.

^a Efeito significativo da interação concentração*células: diferenças significativas entre concentrações na linhagem Nthy-ori 3-1 (p=0.0013): 65>160; 65>830; 65>6500; 160<830 (teste de perfil por contrastes). Sem diferenças na linhagem TPC-1 (p=0.7695). Sem diferenças significativas entre as linhagens em cada concentração.

4.3. Ensaio BrdU

❖ Linhagem Nthy-ori 3-1

A incorporação por BrdU, juntamente com os resultados do ensaio CCK-8, revelou que a exposição ao Roundup® Original DI, na linhagem Nthy-ori 3-1, aumentou a proliferação celular em 24 horas com a concentração de 65 µg/L e, em 48 horas com todas as concentrações, quando comparadas ao controle (Gráfico 7 e Tabela 6).

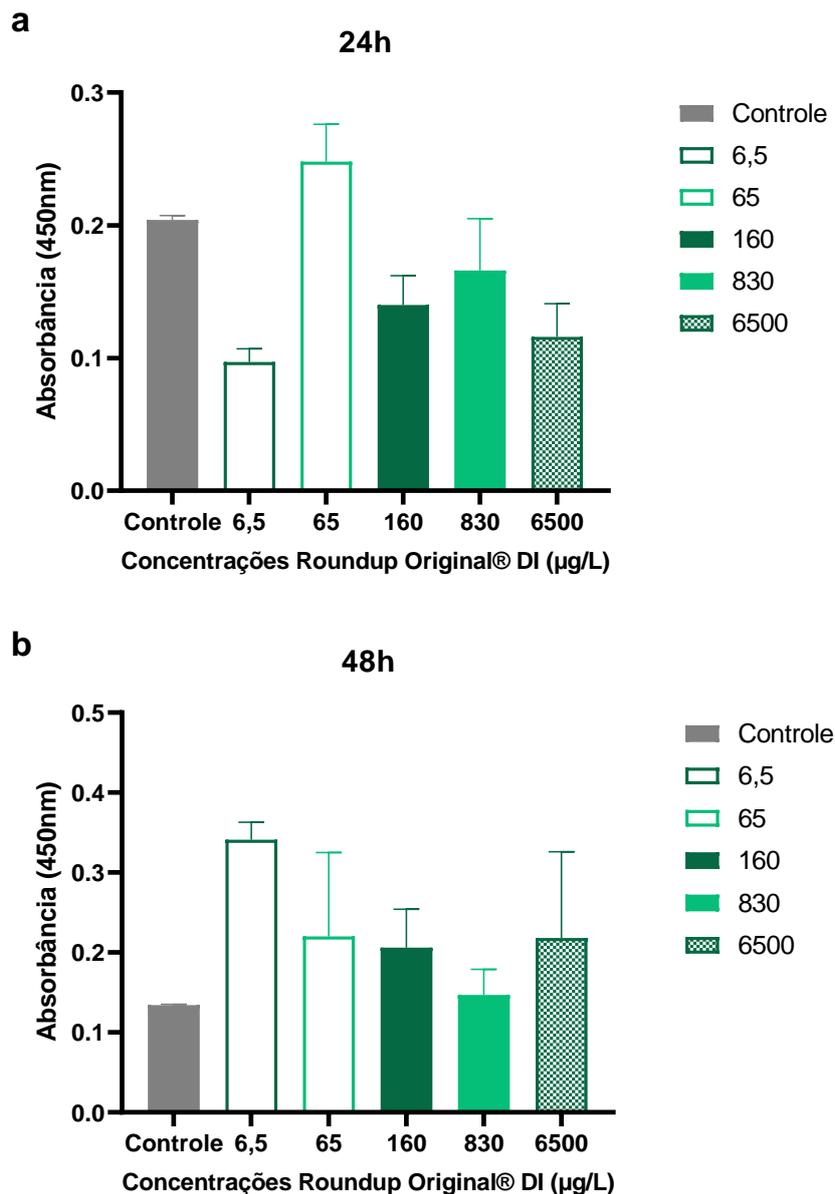


Gráfico 7. Linhagem Nthy-ori 3-1 tratadas com Roundup® Original DI pelos tempos de 24 horas (painel a) e 48 horas (painel b). A proliferação celular foi medida pelo ensaio BrdU e as leituras de foram corrigidas subtraindo os resultados do branco. Os dados são apresentados como média ± DP.

❖ *Linhagem TPC-1*

Com a linhagem TPC-1 em 24 horas, o Roundup® também demonstrou um aumento na proliferação celular em quatro concentrações (6,5, 65, 160 e 6500 µg/L). Já em 48 horas, houve um aumento de proliferação somente com as concentrações de 6,5, 830 e 6500 µg/L, quando comparadas ao controle (Gráfico 8) Verificado o efeito proliferativo do Roundup® Original DI, o ensaio BrdU mostrou importante efeito estimulador de crescimento em ambas as linhagens, mas principalmente sobre TPC-1, mesmo em doses baixas (Tabela 6).

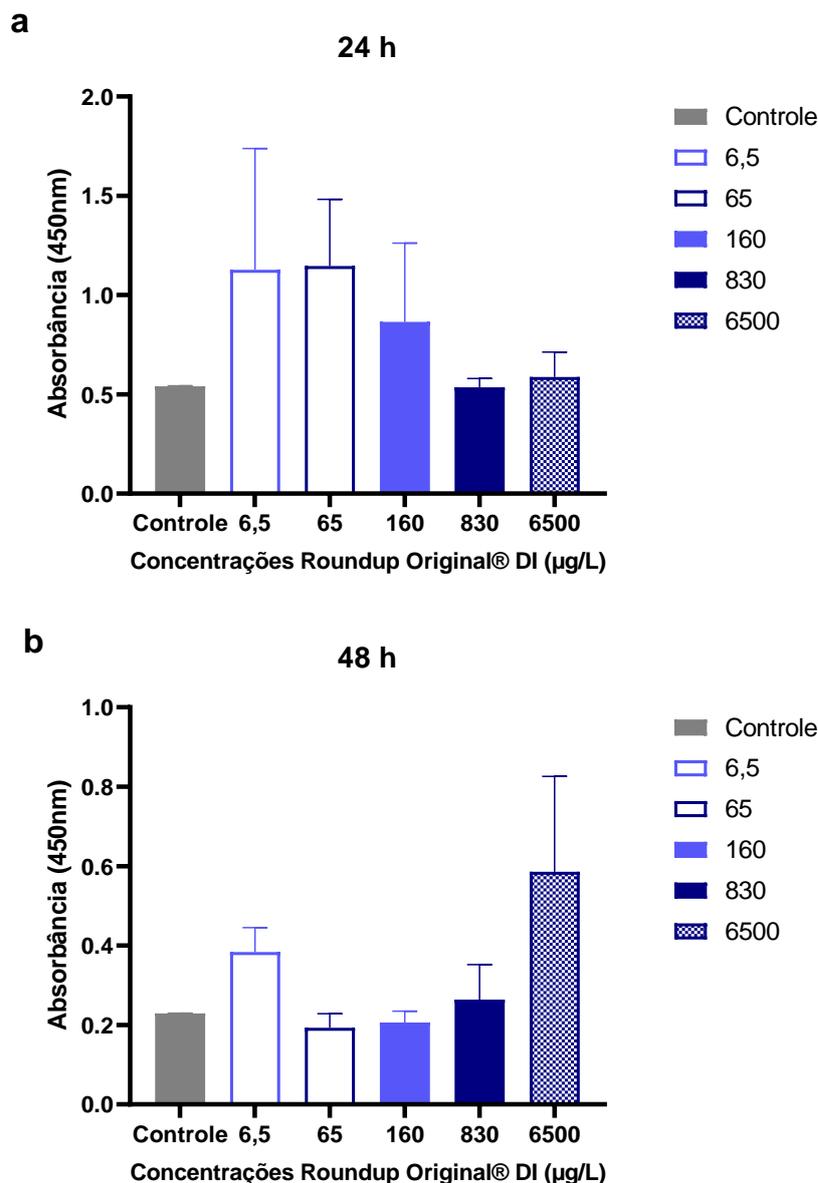


Gráfico 8. Linhagem TPC-1 tratadas com Roundup® Original DI pelos tempos de 24 horas (painel a) e 48 horas (painel b). A proliferação celular foi medida pelo ensaio BrdU e as leituras de foram corrigidas subtraindo os resultados do branco. Os dados são apresentados como média \pm DP.

De fato, como mostrado na tabela 6, na Nthy-ori 3-1, a concentração de 6,5 µg/L do herbicida produziu um efeito proliferativo significativo após 48h de exposição comparado com o controle. Porém, as células TPC-1 foram ainda mais sensíveis ao efeito proliferativo do Roundup® que foi observado em diversas concentrações, principalmente em 24 horas de exposição (Tabela 7). Comparando os resultados da tabela 7 pela ANOVA para medidas repetidas e utilizando como fatores o tipo de células, as concentrações e os tempos de exposição e, as interações entre eles, foi mostrado que o efeito, entre os tipos de células foi significativo, independente do tempo de exposição e concentração. Avaliando a interação concentrations*times que teve efeito significativo, no tempo de 48h o controle foi menor que 6,5 µg/L, 6,5 µg/L foi maior que 65, 160 e 830 µg/L e, 65 µg/L foi menor que 6500 µg/L, em ambas as células. Porém, em 24h de exposição, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações. Na análise dos tempos 24 h e 48 h apenas para uma concentração houve diferença significativa (65 µg/L) onde, 24 h foi maior que 48 h.

Tabela 6. Absorbância de BrdU e porcentagem de células Nthy-ori 3-1 e TPC-1 após exposição ao Roundup® Original DI por 24 h e 48 h em diferentes concentrações. O valor de p refere-se à comparação entre a absorbância de BrdU em células expostas ao herbicida e a absorbância em células controle não expostas.

[]	Nthy-ori-3-1		TPC-1	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
	ABS (%)	ABS (%)	ABS (%)	ABS (%)
Controle	0.204 (100)	0.134 (100)	0.541 (100)	0.229 (100)
6,5 µg/L	0.097 (34)	0.341 (321)	1.128 (210)	0.384 (208)
65 µg/L	0.248 (124)	0.220 (192)	1.146 (214)	0.193 (75)
160 µg/L	0.140 (60)	0.206 (178)	0.865 (159)	0.206 (85)
830 µg/L	0.166 (75)	0.147 (114)	0.536 (96)	0.264 (125)
6500 µg/L	0.116 (46)	0.218 (190)	0.587 (106)	0.586 (349)

Tabela 7. Resultados da ANOVA para medidas repetidas comparando o ensaio BrdU (absorbância de proliferação celular*) entre tipos de linhagens celulares, concentrações e tempos (n=3).

Linhagens celulares	Concentrações (µg/L)	Tempos	Interações			
			Concentrações*células	Tempos*células	Concentrações*tempos	Concentrações*tempos*células
Nthy-ori 3-1 e TPC-1	6,5, 65, 160, 830, 6500	24h e 48h				
			0.5103	0.0764	0.0011^b	0.4448
			0.0005^a			

*Variável transformada em postos (*ranks*) para a análise.

^a Efeito significativo da interação concentração*células: diferenças significativas entre concentração para o tipo de linhagem celular (TPC-1>Nthy-ori 3-1).

^b Efeito significativo da interação concentração*tempo: diferenças significativas entre concentrações no tempo de 48 horas (p=0.0197): controle<6,5; 6,5>65; 6,5>160; 6,5>830; 65<6500 (teste de perfil por contrastes). Sem diferenças para 24 horas (p=0.1068). Diferenças significativas entre tempos no controle (p<0.0001, 24h>48h) e na concentração 65 (p=0.0369, 24h>48h). Sem diferenças significativas entre os tempos para as demais concentrações.

4.4. Morfologia celular

❖ Linhagem Nthy-ori 3-1

Observando a linhagem Nthy-ori 3-1, por microscopia óptica em aumento de 40X (*EVOS XL Core, Invitrogen*), foram observadas algumas alterações nas células expostas ao Roundup® Original DI em ambos os tempos, em comparação as células não tratadas (Ctrl). Apresentaram *debris* celulares, algumas células com tamanho reduzido e sem brilho; além disso algumas células apresentaram um formato irregular (Figuras 13 e 14).

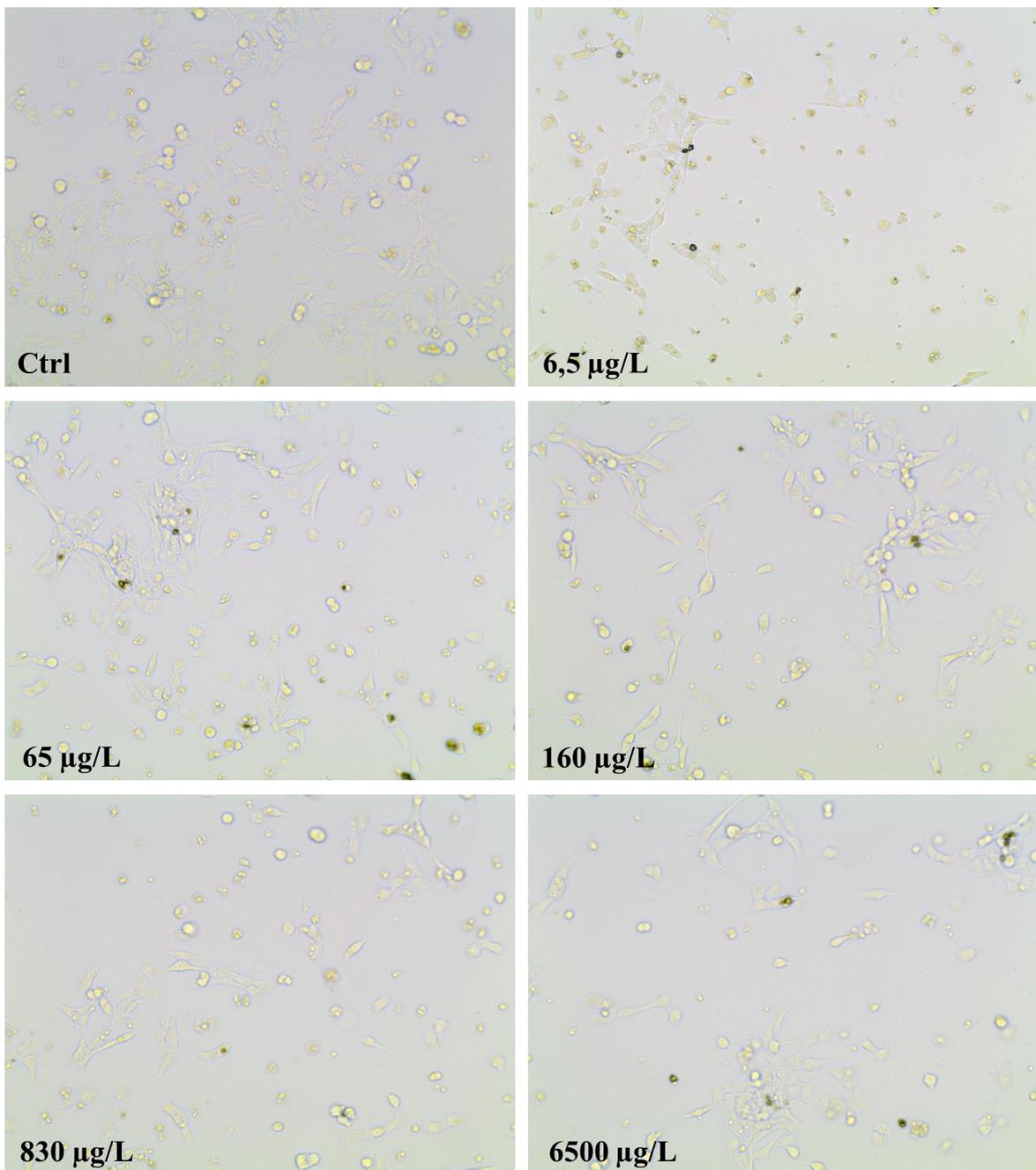


Figura 13. Características celulares da linhagem Nthy-ori 3-1 após a exposição ao Roundup® Original DI no tempo de 24 horas, comparadas com o controle.

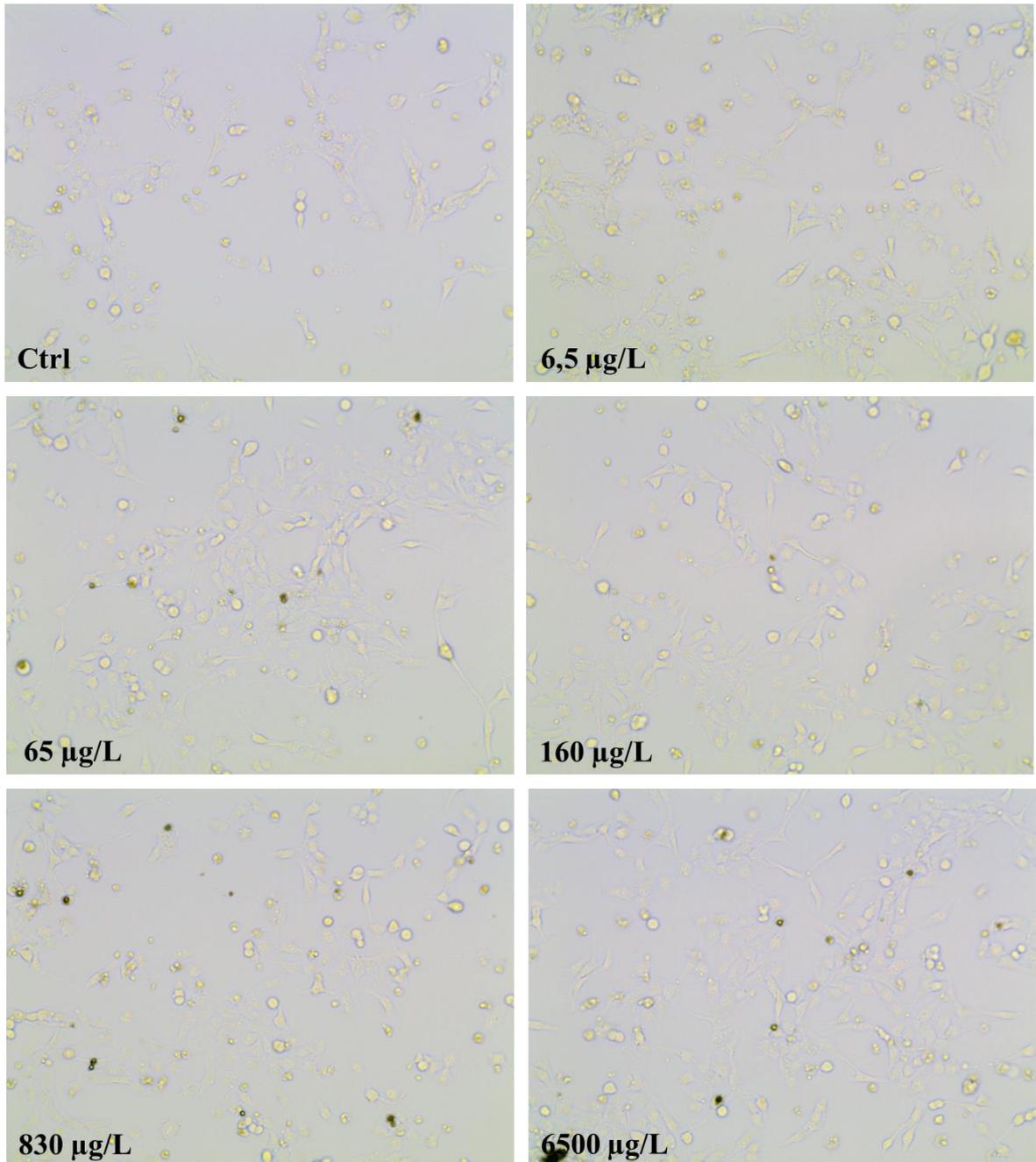


Figura 14. Características celulares da linhagem Nthy-ori 3-1 após a exposição ao Roundup® Original DI no tempo de 48 horas, comparadas com o controle.

❖ *Linhagem TPC-1*

Observando a linhagem TPC-1, notamos que não existe muita diferença entre o controle e as células expostas ao Roundup® Original DI testadas no tempo de 24 horas. Existiam algumas células descoladas no fundo dos poços e, poucos *debris* celulares, porém similar ao observado nas células não tratadas (Ctrl). Em 48 horas, foi observado aumento na quantidade de células, quando comparado com 24 horas de exposição e, alguns *debris* celulares, tanto no controle quanto nas células tratadas (Figuras 15 e 16).

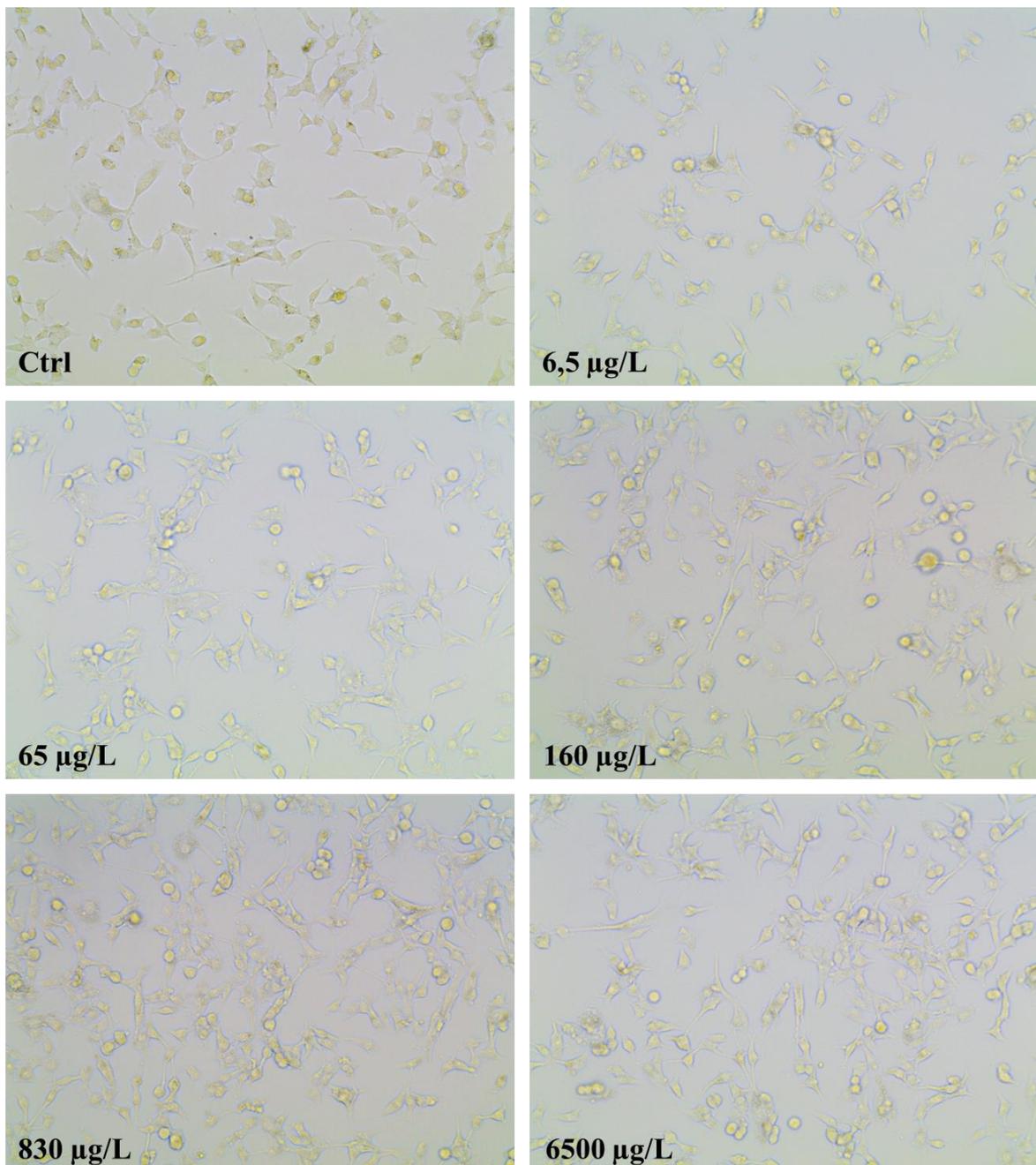


Figura 15. Características das células da linhagem TPC-1 após a exposição ao Roundup® Original DI nos tempos de 24 horas, comparadas com o controle.

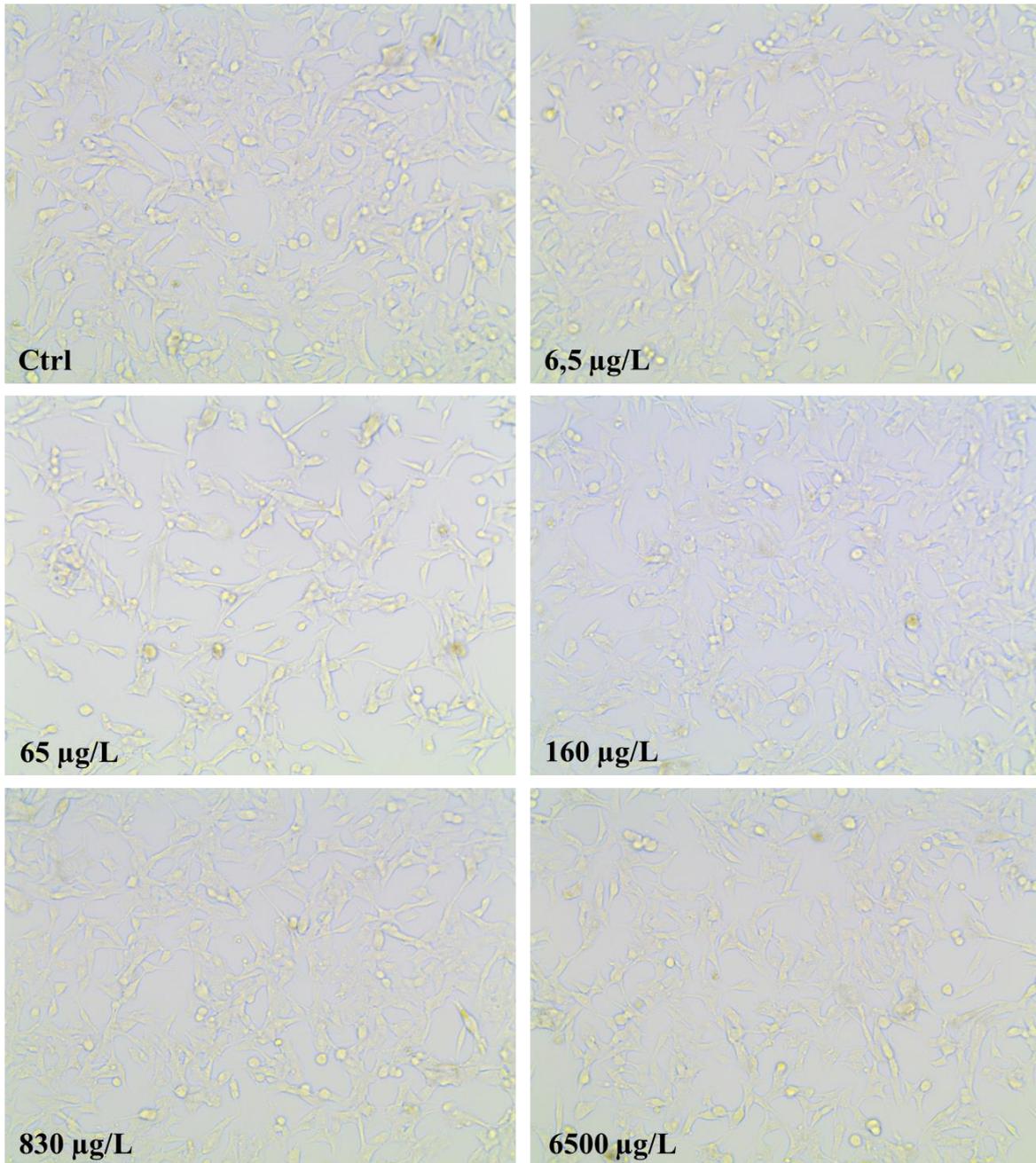


Figura 16. Características das células da linhagem TPC-1 após a exposição ao Roundup® Original DI nos tempos de 48 horas, comparadas com o controle.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, atestamos que, a exposição a diferentes doses de Roundup® Original DI, incluindo AOEL (Nível Aceitável de Exposição Ocupacional) e IDA (Dose Diária Aceitável), disponível na Nota Técnica (Processo nº 25351.056754 / 2013-17) da ANVISA, nas linhagens celulares tireoidianas em 24 e 48 horas, apresentaram uma dose-resposta de curva não-monotônica, característica de um desregulador endócrino, o que impossibilita as interpretações tradicionais em toxicologia regulatória (35, 133). O Roundup® Original DI

produziu uma maior redução na integridade da membrana celular na linhagem TPC-1, de 63%, do que na linhagem Nthy-ori 3-1 (53%), mas ambas as linhagens pareceram se recuperar após 48 horas de exposição. Confirmando relatos anteriores, também demonstramos que danos e mortalidade não são proporcionais às concentrações de Roundup®. De fato, a mortalidade das células tireoidianas ocorre mesmo em doses baixas, como as recomendadas na agricultura e aquelas correspondentes a baixos níveis de resíduos nos alimentos. Ao contrário, estudos em linfócitos humanos expostos ao pesticida indicaram uma viabilidade dependente da dose (115, 134). Chaufan *et al* constataram que uma formulação de glifosato causava citotoxicidade na célula HepG2 dependendo da dose e do tempo de exposição, mesmo em diluições abaixo do recomendado (135). Em outro estudo, eles também observaram efeitos citotóxicos do glifosato em células HK-2 expostas por 24 horas em concentrações de 20-100 μM e, o número de viabilidade celular foi consideravelmente reduzido em concentrações acima de 40 μM . Além disso, estendendo os tempos de exposição para 36 e 48 horas, observaram que as viabilidades celulares nas concentrações de 40 e 60 μM eram ainda mais reduzidas (136). Essa diferença com o que constatamos nas células tireoidianas poderia estar relacionada a uma sensibilidade específica da célula ao composto. Nós demonstramos que, na dose de 65 $\mu\text{g/L}$ ocorreu maior morte celular do que com maior dose de 6500 $\mu\text{g/L}$, em ambas as linhagens tireoidianas (Gráfico 3 e Tabela 3). Esse é um dado relevante, visto que essa é uma dose baixa e que pode ser encontrada ambientalmente. Um estudo conduzido entre 2016 e 2017 numa população de horticultores, biomarcadores urinários de exposição ao glifosato encontraram concentrações de até 7,4 $\mu\text{g/L}$ (137). No Litoral Sul do Rio Grande do Sul no Brasil, foram coletadas amostras de água em lavouras de arroz irrigado, canais (de irrigação e drenagem) e açudes e, foram encontradas concentrações de glifosato a 144 $\mu\text{g/L}$ (138). Em *Campeche*, no México existe um uso intenso de glifosato na agricultura mexicana e com isso, foram observadas amostras em águas subterrâneas, água potável engarrafada e urina de agricultores. Na análise, as maiores concentrações nas águas subterrâneas foi de 1,42 $\mu\text{g/L}$ e em amostras de urina dos agricultores foi de 0,47 $\mu\text{g/L}$ (139). Já foi demonstrado a prevalência de glifosato em alimentos como, laticínios, carnes, frutas, legumes e grãos. Em geral, as maiores concentrações em alimentos individuais variavam de 0,15 ppm (equivalente a 150 $\mu\text{g/L}$) a 13 ppm (equivalente a 13000 $\mu\text{g/L}$), sendo este último encontrados em leguminosas. Os valores mais altos de glifosato em frutas e legumes frescos e em produtos processados foram de 0,085 ppm, igual a 85 $\mu\text{g/L}$ e 0,062 ppm, igual a 62 $\mu\text{g/L}$, um valor igual ao que usamos (140). Curiosamente, as células da tireoide podem se adaptar aos efeitos do agrotóxico pois, após 48 horas, seu efeito no dano celular diminui claramente. A ativação de mecanismos de reparo celular pode ser responsável

pelo controle de danos (141, 142). De fato, usando *Anguilla anguilla* como modelo de exposição, Marques *A et al* mostraram que após o 7º e 14º dias, o dano ao DNA desapareceu (143). Outros mecanismos, incluindo a renovação celular, podem justificar a diminuição do número de mortes celulares observadas ao longo do tempo. Também confirmando nossos próprios dados, um estudo envolvendo a análise da toxicidade do glifosato em tecido de guelras de peixes demonstrou que os danos causados pelo glifosato diminuíram com o aumento do tempo de exposição (144). Além disso, o efeito do pesticida pode ser específico de tecido e/ou célula. Na verdade, os danos causados pelo Roundup® Transorb em eritrócitos de peixes foram maiores após 24 e 96 horas do que após 6 horas de exposição. Porém, nas células branquiais os resultados foram diferentes, com 96 horas não houve muitos danos, mas uma grande destruição foi observada após 24 horas de exposição (145). Outra questão importante é que diferentes adjuvantes adicionados aos muitos herbicidas derivados de glifosato disponíveis comercialmente, podem produzir efeitos diferentes, aumentando ou, atenuando o efeito do composto. Benachour *et al* mostraram que o Roundup® em células derivadas de embriões humanos e placentas humanas manifestaram maior citotoxicidade dependente do tempo e da dose, além de um efeito mais potente no Roundup® do que no composto de glifosato puro (146). Em relação ao nosso trabalho, mais estudos são necessários para demonstrar nossa hipótese pois, os meios de modulação do reparo de DNA por herbicidas ainda não são bem compreendidos.

Para confirmar os efeitos na viabilidade e proliferação celular, utilizamos o ensaio de CCK-8. A atividade metabólica das células viáveis das linhagens Nthy-ori 3-1 e TPC-1 foram levemente reduzidas em 24 e 48 horas, em algumas concentrações. Além disso, nossos achados demonstram que o Roundup® induziu a proliferação celular. Obtivemos duas concentrações em ambos os tempos e linhagens que levou a um aumento, chegando a superar os 100% de nas células viáveis, principalmente na linhagem TPC-1 proveniente de carcinoma papilífero (Gráfico 6). Isso sugere um possível estímulo à proliferação celular por parte do químico, fato já registrado na literatura. Diversos estudos indicam que concentrações baixas de glifosato estimulam efetivamente a proliferação celular, especialmente em células já instáveis e com forte proliferação, como as células tumorais. De forma similar aos nossos achados, um estudo com células HepG2 (câncer de fígado humano) tratadas com glifosato observou um aumento da proliferação celular após 4 horas de tratamento em doses como IDA e REL (nível de exposição residencial), cerca de 9 e 8% de aumento, respectivamente (141). O interessante deste trabalho, é que também utilizaram doses do cotidiano e, de modo similar ao que nós observamos na linhagem TPC-1, uma das doses que induziram proliferação também foi a IDA.

Já foi relatado em células de câncer de mama e adenocarcinoma que o glifosato e alguns herbicidas à base de glifosato, promoveram uma proliferação celular (147). Lin e Garry, relataram também em células de câncer de mama, que o glifosato e o Roundup® induziram proliferação celular ($135 \pm 3,5$ e $126 \pm 5,1$), respectivamente (148). Estudos *in vitro* mostraram resultados semelhantes com efeitos proliferativos em células cancerosas endometriais (HEC1A) expostas ao glifosato (149). A TPC-1 por ser uma linhagem proveniente de carcinoma papilífero de tireoide, apresenta mutações, como *RET/PTC*, que conferem maior resistência à apoptose e morte celular (7, 13). Isso pode explicar a maior taxa de proliferação que observamos nas células TPC-1 em comparação com a linhagem celular Nthy-ori 3-1, especialmente em 24 horas (Tabela 6). Os dados epidemiológicos podem ser explicados, pelo menos em parte, por esse efeito proliferativo. De fato, pequenos carcinomas de tireoide são frequentemente encontrados em autópsias, e a maioria deles é considerada indolente (44). Nossa hipótese é que a exposição a desreguladores endócrinos contribui para a progressão dessas pequenas lesões, contribuindo para o aumento dramático nas taxas de incidência de câncer de tireoide, paralela ao aumento nas taxas de uso de herbicidas à base de glifosato.

Vale lembrar que esses resultados são relativos a tempos de exposição de curta-duração ao Roundup® Original DI, como na maioria dos estudos envolvendo essa substância. Pode ser que uma exposição a doses repetidas do químico em intervalos de tempo maiores, leve a um efeito cumulativo com consequências distintas. Estudo realizado com ratos expostos a doses de 10 mg/Kg de glifosato 3 vezes na semana durante 20 dias observou efeito tóxico do químico no tecido hepático, com indução de estresse oxidativo e ativação de vias de apoptose (150).

Em resumo, o risco de câncer com o uso do glifosato em humanos ainda não é conclusivo e, embora a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer da Organização Mundial da Saúde tenha estabelecido o glifosato como um provável carcinógeno humano (151), a European Food Safety Authority (EFSA) concluiu que o herbicida não prova ser cancerígeno ou mutagênico (152). Nossos dados parecem apoiar esta afirmação sobre o Roundup® Original DI, embora destaquemos a importância de estudar com muito cuidado as implicações dos co-formulantes no pesticida (153). Além disso, outras evidências epidemiológicas são de extrema necessidade para avaliar os potenciais efeitos adversos do glifosato e dos HBGs em algumas populações humanas sensíveis como, em crianças e indivíduos com doenças benignas da tireoide.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foram avaliados os efeitos citotóxicos sobre as linhagens celulares tireoidianas Nthy-ori 3-1 e TPC-1, bem como a indução de proliferação celular do herbicida Roundup® Original DI.

As linhagens da tireoide expostas ao Roundup® apresentam uma curva dose-resposta não monotônica, característica de desregulador endócrino. Concentrações baixas do herbicida, tidas como aceitáveis, como AOEL e IDA causam morte celular, mas também exerce um efeito proliferativo, especialmente nas células TPC-1 provenientes de carcinoma papilífero de tireoide.

7. REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
2. Cancer Stat Facts: Thyroid Cancer.
3. INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. 2020.
4. Carling T, Udelsman R. Thyroid cancer. *Annual review of medicine*. 2014;65:125-37.
5. Lebastchi AH, Callender GG. Thyroid cancer. *Current problems in cancer*. 2014;38(2):48-74.
6. Brown RL, de Souza JA, Cohen EE. Thyroid cancer: burden of illness and management of disease. *Journal of Cancer*. 2011;2:193-9.
7. Abdullah MI, Junit SM, Ng KL, Jayapalan JJ, Karikalan B, Hashim OH. Papillary Thyroid Cancer: Genetic Alterations and Molecular Biomarker Investigations. *International journal of medical sciences*. 2019;16(3):450-60.
8. Rios A, Rodriguez JM, Parrilla P. Treatment of thyroid follicular carcinoma. *Cirugia espanola*. 2015;93(10):611-8.
9. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2016;26(1):1-133.
10. Grodski S, Brown T, Sidhu S, Gill A, Robinson B, Learoyd D, et al. Increasing incidence of thyroid cancer is due to increased pathologic detection. *Surgery*. 2008;144(6):1038-43; discussion 43.
11. Al-Suhaimi EA, Al-Khater K. Functions of stem cells of thyroid glands in health and disease. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2019;20(2):187-95.
12. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature reviews Endocrinology*. 2011;7(10):569-80.
13. Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Frontiers in endocrinology*. 2020;11:102.
14. Pacini F, Castagna MG, Brilli L, Pentheroudakis G, Group EGW. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2010;21 Suppl 5:v214-9.

15. Ward LS. Thyroid tumors: are we unveiling the puzzle? *Endocrine-related cancer*. 2014;21(5):E7-8.
16. Marcello MA, Malandrino P, Almeida JF, Martins MB, Cunha LL, Bufalo NE, et al. The influence of the environment on the development of thyroid tumors: a new appraisal. *Endocrine-related cancer*. 2014;21(5):T235-54.
17. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *Journal of cancer epidemiology*. 2013;2013:965212.
18. Liu FC, Lin HT, Lin SF, Kuo CF, Chung TT, Yu HP. Nationwide cohort study on the epidemiology and survival outcomes of thyroid cancer. *Oncotarget*. 2017;8(45):78429-51.
19. PERES F M, JC., orgs. *É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente* [online] Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 384 p ISBN 85-7541-031-8 Available from SciELO Books. 2003.
20. C. Castro-Correia MF. The influence of environmental exposure to Endocrine Disruptors in the growth and development of children and adolescents. *Início Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 2015;10(2):186-92.
21. Koifman SP, FJR. Impact of environmental endocrine-active substances on Public Health. *Cad Saúde Pública*. 2002;18(2).
22. Calle EE, Frumkin H, Henley SJ, Savitz DA, Thun MJ. Organochlorines and breast cancer risk. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2002;52(5):301-9.
23. Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*. 2012;153(9):4097-110.
24. US.EPA. *Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis*, U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/630/R-96/012, Washington D. C. 1997.
25. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*. 2009;30(4):293-342.
26. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;127(3-5):204-15.
27. Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones*. 2010;9(1):9-15.

28. Rogers JA, Metz L, Yong VW. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Molecular immunology*. 2013;53(4):421-30.
29. Ozen S, Darcan S. Effects of environmental endocrine disruptors on pubertal development. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*. 2011;3(1):1-6.
30. Bila DD, M. Endocrine disrupters in the enviroment: part 1 - effects and consequences. *Quím Nova*. 2007;30(3).
31. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Phytoestrogens and Health. COT Repor. 2003:441.
32. Gore AC, Crews DD, L.L.; La Merrill, M; Patisaul, H; Zota, A. INTRODUÇÃO AOS DISRUPTORES ENDÓCRINOS (DES) UM GUIA PARA GOVERNOS E ORGANIZAÇÕES DE INTERESSE PÚBLICO. Endocrine Society. 2014.
33. Gorini F, Bustaffa E, Coi A, Iervasi G, Bianchi F. Bisphenols as Environmental Triggers of Thyroid Dysfunction: Clues and Evidence. *International journal of environmental research and public health*. 2020;17(8).
34. Aghajanpour-Mir SM, Zabihi E, Akhavan-Niaki H, Keyhani E, Bagherizadeh I, Biglari S, et al. The Genotoxic and Cytotoxic Effects of Bisphenol-A (BPA) in MCF-7 Cell Line and Amniocytes. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2016;5(1):19-29.
35. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*. 2012;33(3):378-455.
36. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environmental health : a global access science source*. 2015;14:13.
37. Bello. A FA. *Nutrição E Destoxificação - Bases Moleculares Para A Prática Clínica*. Editora: Rubio. 2016;1:66-8.
38. Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Phillips TM, Jefferson WN. Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Reproductive toxicology*. 2007;23(3):290-6.
39. Barker DJ, Clark PM. Fetal undernutrition and disease in later life. *Reviews of reproduction*. 1997;2(2):105-12.
40. Hauser R, Chen Z, Pothier L, Ryan L, Altshul L. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE. *Environmental health perspectives*. 2003;111(12):1505-11.

41. Nobel Prize Org. Paul Müller – Biographical. [acesso em 06/04/21]. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1948/muller/biographical/>.
42. Rachel Carson Biography. 02/04/14. [atualizada em 02/09/20; acesso em 06/04/21] The Biography.com website. Disponível em: <https://www.biography.com/scientist/rachel-carson>.
43. Carson R, 1907-1964. Primavera silenciosa/Rachel Carson; [traduzido por Claudia Sant'Anna Martins]. 1ª ed. - São Paulo: Gaia. Título original: Silent spring. ISBN 978-85-7555-235-3. 2010.
44. Schug TT, Johnson AF, Birnbaum LS, Colborn T, Guillette LJ, Jr., Crews DP, et al. Minireview: Endocrine Disruptors: Past Lessons and Future Directions. *Molecular endocrinology*. 2016;30(8):833-47.
45. Kwiatkowski CF, Bolden AL, Liroff RA, Rochester JR, Vandenberg JG. Twenty-Five Years of Endocrine Disruption Science: Remembering Theo Colborn. *Environmental health perspectives*. 2016;124(9):A151-4.
46. Theo Colborn; Coralie Clement. *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection*. . Princeton Scientific Publishing Co, Inc Princeton, New Jersey: 1992 ISBN: 09-111-31353. 1992.
47. Theo Colborn; Dianne Dumanoski; John Peterson Myers; Cláudia Buchweitz (tradução). *O futuro roubado*. 1ª Ed. Porto Alegre: L&PM; 1996. Disponível em: <https://jornalismosocioambiental.files.wordpress.com/2017/02/o-futuro-roubado.pdf>.
48. Fenner-Crisp, P.A; Maciorowski, A.F; Timm, G.E. The Endocrine Disruptor Screening Program Developed by the U.S. Environmental Protection Agency. *Ecotoxicology*. 2000;9:85-91.
49. Brouwer A, Morse DC, Lans MC, Schuur AG, Murk AJ, Klasson-Wehler E, et al. Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicology and industrial health*. 1998;14(1-2):59-84.
50. Duntas LH. Chemical contamination and the thyroid. *Endocrine*. 2015;48(1):53-64.
51. Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(11):5185-90.
52. Calsolaro V, Pasqualetti G, Niccolai F, Caraccio N, Monzani F. Thyroid Disrupting Chemicals. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(12).
53. Gorini F, Iervasi G, Coi A, Pitto L, Bianchi F. The Role of Polybrominated Diphenyl Ethers in Thyroid Carcinogenesis: Is It a Weak Hypothesis or a Hidden Reality? From Facts to

- New Perspectives. *International journal of environmental research and public health*. 2018;15(9).
54. Gutleb AC, Cambier S, Serchi T. Impact of Endocrine Disruptors on the Thyroid Hormone System. *Hormone research in paediatrics*. 2016;86(4):271-8.
55. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(9):3035-43.
56. Moraes. NV, Grando. MD, ; Valerio. DAR, Oliveira. DP,. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos. *Revista Brasileira de Toxicologia*. 2008;21(1):1-8.
57. Woodruff TJ, Zota AR, Schwartz JM. Environmental chemicals in pregnant women in the United States: NHANES 2003-2004. *Environmental health perspectives*. 2011;119(6):878-85.
58. Preau L, Fini JB, Morvan-Dubois G, Demeneix B. Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window for endocrine disruption. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1849(2):112-21.
59. Langer P, Tajtakova M, Kocan A, Trnovec T, Sebkova E, Klimes I. From naturally occurring goitrogens to the effects of anthropogenic endocrine disruptors on the thyroid in Slovakia. *Bratislavske lekarske listy*. 2003;104(3):101-7.
60. Jenssen BM. Endocrine-disrupting chemicals and climate change: A worst-case combination for arctic marine mammals and seabirds? *Environmental health perspectives*. 2006;114 Suppl 1:76-80.
61. Wilson AG, Thake DC, Heydens WE, Brewster DW, Hotz KJ. Mode of action of thyroid tumor formation in the male Long-Evans rat administered high doses of alachlor. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*. 1996;33(1):16-23.
62. Axelstad M, Hansen PR, Boberg J, Bonnichsen M, Nellemann C, Lund SP, et al. Developmental neurotoxicity of propylthiouracil (PTU) in rats: relationship between transient hypothyroxinemia during development and long-lasting behavioural and functional changes. *Toxicology and applied pharmacology*. 2008;232(1):1-13.
63. Kobayashi K, Tsuji R, Yoshioka T, Kushida M, Yabushita S, Sasaki M, et al. Effects of hypothyroidism induced by perinatal exposure to PTU on rat behavior and synaptic gene expression. *Toxicology*. 2005;212(2-3):135-47.
64. Freire C, Koifman RJ, Sarcinelli PN, Simoes Rosa AC, Clapauch R, Koifman S. Long-term exposure to organochlorine pesticides and thyroid status in adults in a heavily contaminated area in Brazil. *Environmental research*. 2013;127:7-15.

65. Tomiazzi JS, Judai MA, Nai GA, Pereira DR, Antunes PA, Favareto APA. Evaluation of genotoxic effects in Brazilian agricultural workers exposed to pesticides and cigarette smoke using machine-learning algorithms. *Environmental science and pollution research international*. 2018;25(2):1259-69.
66. Rigotto RM, Vasconcelos DPe, Rocha MM. Pesticide use in Brazil and problems for public health. *Cadernos de saude publica*. 2014;30:1360-2.
67. Brasil. Ministério da Saúde. Pesticides from the perspective of the Brazilian Public Health System./ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 2 v. : il.
68. Ipea. Texto para discussão. Agrotóxicos no Brasil: Padrões de uso, Política da regulação e Prevenção da captura regulatória. Brasília: Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea); 2019. ISSN 1415-4765.
69. Anvisa. Guia para elaboração de rótulo e bula de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira: GUIA N ° 12/2019 – Versão 2. [acesso em 2021 Fev 02]. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/406921>. 2019.
70. Ascom/Anvisa. Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos. 01/08/2019 [atualizada em: 08/08/2019. Acesso em: 2021 Fev 02]. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=5578706&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos-&inheritRedirect=true.
71. WHO/FAO. 2015. International code of conduct on pesticide management: guidelines on good labelling practice for pesticides (revised): International code of conduct on pesticide management. Rome: Dr. R. Yadav / WHOPEPES. 2015.
72. Ermakova IT, Shushkova TV, Leont'evskii AA. [Microbial degradation of organophosphonates by soil bacteria]. *Mikrobiologiya*. 2008;77(5):689-95.
73. Tan S, Evans R, Singh B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino acids*. 2006;30(2):195-204.
74. Galli AJB, Montezuma MC. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. ACADCOM Gráfica e Editora Ltd. 2005.

75. Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B. et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental health perspectives*. 2016;15(19).
76. Kertesz MA, Cook AM, Leisinger T. Microbial metabolism of sulfur- and phosphorus-containing xenobiotics. *FEMS microbiology reviews*. 1994;15(2-3):195-215.
77. Coutinho CFB, Mazo LH. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. *São Paulo Química Nova*. 2005;28(6).
78. ANVISA. Monografias autorizadas (G01 – Glifosato). [08.09.2020 - atualizada em 4/02/2021; acesso em 17/03/2021]. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>.
79. Roundup. Produtos. [acesso em 17/03/2021]. Disponível em: <http://www.roundup.com.br/produtos-da-familia-roundup#familia>.
80. VARGAS L, ROMAN ES. Conceitos e aplicações dos adjuvantes. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 56). Passo Fundo: Embrapa, 2006. ISSN 1518-6512. [acesso em 17/03/2021]. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do56.htm. 2006.
81. Amarante Junior, Ozelito Possidônio de et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova*. 2002;25(4):589-93.
82. Kim YH, Hong JR, Gil HW, Song HY, Hong SY. Mixtures of glyphosate and surfactant TN20 accelerate cell death via mitochondrial damage-induced apoptosis and necrosis. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2013;27(1):191-7.
83. Brausch JM, Smith PN. Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2007;52(2):217-21.
84. Mesnage R, Bernay B, Seralini GE. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*. 2013;313(2-3):122-8.
85. Tsui MT, Chu LM. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*. 2003;52(7):1189-97.
86. Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental health : a global access science source*. 2016;15:19.

87. de Souza JS, Kizys MM, da Conceicao RR, Glebocki G, Romano RM, Ortiga-Carvalho TM, et al. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. *Toxicology*. 2017;377:25-37.
88. Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon MC, Seralini GE. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*. 2009;262(3):184-91.
89. Bai SH, Ogbourne SM. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environmental science and pollution research international*. 2016;23(19):18988-9001.
90. Cancer IAfRo. IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. [acesso em 21/04/20]. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/MonographVolume112.pdf>. 2015.
91. Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*. 2015;16(5):490-1.
92. P N. Intoxicação por agrotóxicos agrícolas no estado de Goiás, Brasil, de 2005-2015: análise dos registros nos sistemas oficiais de informação. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2020;25(7):2743-54.
93. Sharma D, Nagpal A, Pakade YB, Katnoria JK. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: a review. *Talanta*. 2010;82(4):1077-89.
94. Donkor A, Osei-Fosu P, Dubey B, Kingsford-Adaboh R, Ziwu C, Asante I. Pesticide residues in fruits and vegetables in Ghana: a review. *Environmental science and pollution research international*. 2016;23(19):18966-87.
95. Tudi M, Daniel Ruan H, Wang L, Lyu J, Sadler R, Connell D, et al. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International journal of environmental research and public health*. 2021;18(3).
96. Cremonese C. Exposição a agrotóxicos e distúrbios reprodutivos: estudo em trabalhadores rurais, seus familiares e jovens do município de Farroupilha - RS [tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); 2014.
97. Mehrpour O, Karrari P, Zamani N, Tsatsakis AM, Abdollahi M. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. *Toxicology letters*. 2014;230(2):146-56.

98. Kim KH, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *The Science of the total environment*. 2017;575:525-35.
99. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine reviews*. 2015;36(6):E1-E150.
100. Damalas CA, Eleftherohorinos IG. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International journal of environmental research and public health*. 2011;8(5):1402-19.
101. Shrestha S, Parks CG, Goldner WS, Kamel F, Umbach DM, Ward MH, et al. Pesticide Use and Incident Hypothyroidism in Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. *Environmental health perspectives*. 2018;126(9):97008.
102. Cooper DS, Biondi B. Subclinical thyroid disease. *Lancet*. 2012;379(9821):1142-54.
103. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *The New England journal of medicine*. 2001;344(7):501-9.
104. Langer P, Kocan A, Tajtakova M, Susienkova K, Radikova Z, Koska J, et al. Multiple adverse thyroid and metabolic health signs in the population from the area heavily polluted by organochlorine cocktail (PCB, DDE, HCB, dioxin). *Thyroid research*. 2009;2(1):3.
105. Leung AM, Pearce EN, Braverman LE. Perchlorate, iodine and the thyroid. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2010;24(1):133-41.
106. Sathyapalan T, Manuchehri AM, Thatcher NJ, Rigby AS, Chapman T, Kilpatrick ES, et al. The effect of soy phytoestrogen supplementation on thyroid status and cardiovascular risk markers in patients with subclinical hypothyroidism: a randomized, double-blind, crossover study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(5):1442-9.
107. Costa Reis LT, Sena de Souza J, Hirochi Herai R, Cunha EB, Ribeiro Pereira Soares J, Santos El-Bacha R, et al. Intergenerational thyroid hormone homeostasis imbalance in cerebellum of rats perinatally exposed to glyphosate-based herbicide. *Environmental toxicology*. 2021;36(6):1031-42.
108. Kongtip P, Nankongnab N, Pundee R, Kallayanatham N, Pengpumkiat S, Chungcharoen J, et al. Acute Changes in Thyroid Hormone Levels among Thai Pesticide Sprayers. *Toxics*. 2021;9(1).
109. Levine SL, Webb EG, Saltmiras DA. Review and analysis of the potential for glyphosate to interact with the estrogen, androgen and thyroid pathways. *Pest management science*. 2020;76(9):2886-906.

110. EPA. Glyphosate Interim Registration Review Decision Case Number 0178. [Acesso em: 25/03/21]. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2020-01/documents/glyphosate-interim-reg-review-decision-case-num-0178.pdf>. 2020.
111. EPA. EPA Finalizes Glyphosate Mitigation. United States: January 30, 2020. [acesso em: 25/03/21]. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticides/epa-finalizes-glyphosate-mitigation>.
112. Benbrook CM. How did the US EPA and IARC reach diametrically opposed conclusions on the genotoxicity of glyphosate-based herbicides? Environmental Sciences Europe. 2019.
113. Bradberry, S.M., Proudfoot, A.T. & Vale, J.A. Glyphosate Poisoning. . Toxicol Rev. 2004;23:159–67
114. Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini GE. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. Environmental health perspectives. 2005;113(6):716-20.
115. Agostini LP, Dettogni RS, Dos Reis RS, Stur E, Dos Santos EVW, Ventorim DP, et al. Effects of glyphosate exposure on human health: Insights from epidemiological and in vitro studies. The Science of the total environment. 2020;705:135808.
116. Bundy JG, Sidhu JK, Rana F, Spurgeon DJ, Svendsen C, Wren JF, et al. 'Systems toxicology' approach identifies coordinated metabolic responses to copper in a terrestrial non-model invertebrate, the earthworm *Lumbricus rubellus*. BMC biology. 2008;6:25.
117. Beal MA, Gagne R, Williams A, Marchetti F, Yauk CL. Characterizing Benzo[a]pyrene-induced lacZ mutation spectrum in transgenic mice using next-generation sequencing. BMC genomics. 2015;16:812.
118. Defarge N, Spiroux de Vendomois J, Seralini GE. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. Toxicology reports. 2018;5:156-63.
119. van Staveren WC, Solis DW, Delys L, Duprez L, Andry G, Franc B, et al. Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype. Cancer research. 2007;67(17):8113-20.
120. Meireles AM, Preto A, Rocha AS, Rebocho AP, Maximo V, Pereira-Castro I, et al. Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association. 2007;17(8):707-15.
121. Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, Dom G, Hebrant A, van Staveren WC, et al. Thyroid cancer cell lines: an overview. Frontiers in endocrinology. 2012;3:133.

122. Fuziwara CS, Saito KC, Leoni SG, Waitzberg AFL, Kimura ET. The Highly Expressed FAM83F Protein in Papillary Thyroid Cancer Exerts a Pro-Oncogenic Role in Thyroid Follicular Cells. *Frontiers in endocrinology*. 2019;10:134.
123. Sistema Roundup Ready Plus – Linha Roundup®. Bula do Roundup Original® DI. Disponível em: <http://www.monsantoglobal.com/global/br/produtos/documents/roundup-original-di-bula.pdf>. Acesso em: 15/11/2019.).
124. ANVISA. NOTA TÉCNICA Nº 12/2020/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA. 2019.
125. AC G. Tratado de Fisiologia Médica. 2006.
126. Coder DM. Assessment of cell viability. *Current protocols in cytometry*. 2001;Chapter 9:Unit 9 2.
127. Lopes FM, Sandrini JZ, Souza MM. Toxicity induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in the zebrafish hepatocyte cell line (ZF-L). *Ecotoxicology and environmental safety*. 2018;162:201-7.
128. ANVISA. NOTA TÉCNICA Nº 23/2018/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA. 2018.
129. Sigma-Aldrich. Cell Counting Kit – 8. Darmstadt, Germany. [acesso em 2021 Mar 11] Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/96992datpdf>. 2018.
130. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*. 1997;44(7):1299-305.
131. Selleckchem. Bioreagents. cell counting kit-8. Acesso em: 21/06/21. Disponível em: <https://www.selleckchem.com/bioreagents/cell-counting-kit-8.html>.
132. Cell Signaling Technology. BrdU Cell Proliferation Assay Kit #6813. Acesso em: 25/02/22. Disponível em: <https://www.cellsignal.com/products/cellular-assay-kits/brdu-cell-proliferation-assay-kit/6813>.
133. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 2006;147(6 Suppl):S56-69.
134. Mladinic M, Berend S, Vrdoljak AL, Kopjar N, Radic B, Zeljezic D. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2009;50(9):800-7.

135. Chaufan G, Coalova I, Rios de Molina Mdel C. Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. *International journal of toxicology*. 2014;33(1):29-38.
136. Gao H, Chen J, Ding F, Chou X, Zhang X, Wan Y, et al. Activation of the N-methyl-d-aspartate receptor is involved in glyphosate-induced renal proximal tubule cell apoptosis. *Journal of applied toxicology : JAT*. 2019;39(8):1096-107.
137. Connolly A, Basinas I, Jones K, Galea KS, Kenny L, McGowan P, et al. Characterising glyphosate exposures among amenity horticulturists using multiple spot urine samples. *International journal of hygiene and environmental health*. 2018;221(7):1012-22.
138. Mattos M PM, Dias S, Prata F, Camargo L. Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 2002;12:145-154.
139. Rendon-von Osten J, Dzul-Caamal R. Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *Int J Environ Res Public Health*. 2017 Jun 3;14(6):595. doi: 10.3390/ijerph14060595. PMID: 28587206; PMCID: PMC5486281.
140. Kolakowski BM, Miller L, Murray A, Leclair A, Bietlot H, van de Riet JM. Analysis of Glyphosate Residues in Foods from the Canadian Retail Markets between 2015 and 2017. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2020;68(18):5201-11.
141. Kasuba V, Milic M, Rozgaj R, Kopjar N, Mladinic M, Zunec S, et al. Effects of low doses of glyphosate on DNA damage, cell proliferation and oxidative stress in the HepG2 cell line. *Environmental science and pollution research international*. 2017;24(23):19267-81.
142. Moustacchi E. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutation research*. 2000;464(1):35-40.
143. Marques A, Guilherme S, Gaivao I, Santos MA, Pacheco M. Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods--insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP*. 2014;166:126-33.
144. Guilherme S, Gaivao I, Santos MA, Pacheco M. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide -- elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutation research*. 2012;743(1-2):1-9.

145. Moreno NC, Sofia SH, Martinez CB. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2014;37(1):448-54.
146. Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, Gasnier C, Travert C, Seralini GE. Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2007;53(1):126-33.
147. Mesnage R, Phedonos A, Biserni M, Arno M, Balu S, Corton JC, et al. Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2017;108(Pt A):30-42.
148. Lin N, Garry VF. In vitro studies of cellular and molecular developmental toxicity of adjuvants, herbicides, and fungicides commonly used in Red River Valley, Minnesota. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2000;60(6):423-39.
149. De Almeida LKS, Pletschke BI, Frost CL. Moderate levels of glyphosate and its formulations vary in their cytotoxicity and genotoxicity in a whole blood model and in human cell lines with different estrogen receptor status. *3 Biotech*. 2018;8(10):438.
150. Astiz M, de Alaniz MJ, Marra CA. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2009;72(7):2025-32.
151. IARC. Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans / Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. International Agency for Research on Cancer. 2017;112.
152. EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 2015;13(11):4302. 2015.
153. Lorenz V, Rossetti MF, Dallegre E, Milesi MM, Varayoud J. Editorial: Glyphosate Herbicide as Endocrine Disruptor and Probable Human Carcinogen: Current Knowledge and Future Direction. *Frontiers in endocrinology*. 2021;12:772911.