

## **1. TÍTULO**

### **“Estudo da Citotoxicidade do Glifosato sobre Linhagens Celulares Tireoidianas”**

## **2. RESUMO**

A glândula tireoide é um dos componentes mais importantes do sistema endócrino. É responsável pela produção de Tiroxina (T4) e de Triiodotironina (T3) e, entre suas funções, estão o controle da homeostasia e a regulação do consumo de energia por todo o organismo em diversas fases do desenvolvimento. Contudo, substâncias químicas denominadas desreguladores endócrinos estão presentes em uma grande variedade de compostos ambientais e podem interferir no funcionamento da glândula. Nesse grupo, destaca-se o glifosato, um potente herbicida organofosforado que é um dos agrotóxicos mais utilizados no mundo. Nesse estudo, foi analisado se essa substância apresenta citotoxicidade e se é capaz de interferir na viabilidade das linhagens celulares tireoidianas Nthy-ori 3-1 e TPC-1. Para isso, foram realizados os ensaios Azul de Tripán e Cell Counting Kit-8 (CCK-8). As linhagens foram estudadas após 24h e 48h de exposição a cinco concentrações diferentes de glifosato e os resultados foram comparados com os obtidos no grupo controle, composto pelas células não expostas ao químico. No teste Azul de Tripán, a linhagem Nthy-ori 3-1 não ultrapassou 55% de morte nas condições de análise; a linhagem TPC-1, por sua vez, teve porcentagens de mortalidade maiores. Contudo, nas duas linhagens, as porcentagens de morte no grupo experimental foram muito parecidas com os resultados obtidos no grupo controle. No ensaio CCK-8, as altas taxas de viabilidade celular obtidas confirmaram que o glifosato não foi citotóxico às células nos tempos de exposição e concentrações estudados.

**Palavras-chave:** glândula tireoide, glifosato, citotoxicidade

## **3. INTRODUÇÃO**

### **3.1 Glândula Tireoide**

A Glândula Tireoide é a maior glândula endócrina do corpo humano e está envolvida na manutenção da homeostasia e na regulação do consumo de energia. Os hormônios produzidos e secretados por ela são principalmente a triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4), os quais possuem papel fundamental no controle do metabolismo e na atividade celular em múltiplos órgãos-alvo [1].

Para realizarem sua função primordial, os hormônios tireoidianos atuam aumentando o número de mitocôndrias nas células, a velocidade de captação de glicose, o fluxo sanguíneo e a motilidade do TGI [2]. Contudo, para exercer seu papel biológico

adequadamente, a tireoide necessita da regulação da síntese e da produção de seus hormônios através do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e, também, da integração com o meio-ambiente [1,3].

É importante entender o funcionamento desse órgão dado sua importância clínica. Disfunções hormonais tireoide dependentes são frequentes e o câncer de tireoide é a neoplasia endócrina mais comum [1,4]. No Brasil, em 2020, foram estimados no país cerca de 13.780 casos de neoplasias na glândula, 1830 em homens e 11.950 em mulheres [4]. Estuda-se hoje a possibilidade de desreguladores endócrinos, tal como o glifosato, estarem envolvidos no desenvolvimento desse tipo de câncer [5].

### **3.2 Desreguladores Endócrinos**

Diversas substâncias, naturais ou artificiais, presentes no meio ambiente e no ambiente de trabalho, podem interferir no sistema endócrino levando a efeitos adversos à saúde da população em geral. Quando esses agentes afetam o funcionamento do sistema endócrino-metabólico são denominados desreguladores endócrinos (DES) [6,7]. Alguns são considerados citotóxicos e funcionam mimetizando ligantes dos receptores endócrinos. Eles podem provocar a ativação ou inativação desses receptores, modificar a metilação de DNA e mudar a sensibilização hormonal. Assim, influenciam diversos aspectos da viabilidade celular [8,9].

Os agrotóxicos constituem o principal grupo de desreguladores endócrinos. Nesta classe, destacam-se os herbicidas, sendo o glifosato o mais utilizado no mundo, os inseticidas, como o DDT e o carbaril, além dos fungicidas, como o maneb. Substâncias como as bifenilas policloradas, as dibenzodioxinas, os alquilfenóis e o bisfenol A também têm sido referidas como passíveis de interação com o sistema endócrino [7,9].

A glândula tireoide costuma ser frequentemente relatada como um dos principais órgãos endócrinos a sofrer desregulação [10]. Muitos desses produtos podem afetar sua atividade em diversas fases da vida, contribuindo para o aparecimento de tumores. O sistema de captação de iodo, a produção de hormônios tireoidianos e a ativação de receptores celulares podem ser alteradas por essas substâncias, levando a um comprometimento da integridade, da proliferação e das funções das células tireoidianas [11].

### **3.3 Glifosato**

O glifosato é um desregulador endócrino representante dos aminoácidos fosfonados. Atualmente, é um componente ativo de formulações conhecidas como herbicidas à base

de glifosato (HBG), que estão entre os principais agrotóxicos do mundo, sendo usados hoje em 140 países [12].

Devido ao seu grande uso nos mais variados setores da agricultura e ambientes urbanos, o HBG tem sido amplamente difundido no meio ambiente. Desde o final dos anos 1970, o volume de HBG aplicado aumentou cerca de 100 vezes e vários relatórios afirmam que níveis residuais de glifosato podem ser encontrados amplamente no solo, alimentos, ar e água, bem como no soro humano, leite materno e urina [12]. Conseqüentemente, há uma preocupação crescente com os danos que esses compostos podem causar à saúde humana [13].

Por ter sido associado à indução de distúrbios metabólicos, danos no DNA e estresse oxidativo, em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer da OMS reclassificou os HBG como “provavelmente cancerígenos para humanos” [6,14]. Além disso, estuda-se a capacidade de determinadas doses do glifosato interferir nas vias de sinalização endócrina, perturbar a síntese de hormônios endógenos e prejudicar a sobrevivência das células produtoras dessas substâncias [12,15].

Sobre os efeitos citotóxicos desse produto em linhagens celulares humanas, foi descrito que exposição a herbicidas a base de glifosato, em doses consideradas não tóxicas, induzem lesões no material genético e levam a ativação de caspases em células de hepatoma humano (HepG2) [16,17]. Além disso, já se demonstrou que o glifosato é capaz de induzir morte em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) e de carcinoma alveolar (A549) através de mecanismos envolvendo estresse oxidativo, apoptose e autofagia [17,18]. Contudo, ainda são escassos os estudos que se aprofundam nos efeitos do glifosato sobre as células do sistema endócrino.

### **3.4 Glifosato e a Glândula Tireoide**

O glifosato pode interferir na ação da glândula tireoide. Um recente estudo epidemiológico evidenciou que há correlação entre a maior incidência de câncer de tireoide nos Estados Unidos nas últimas duas décadas e o aumento do uso de glifosato nos cultivos de milho e soja do país [14]. Um estudo cruzado de amostras de soro de trabalhadores de estufas expostos a pesticidas mostrou que os níveis de T4 e T3 foram reduzidos, e os níveis de TSH aumentaram do início ao final da temporada de pulverização [19]. Além disso, em um estudo transversal com residentes de fazendas no Brasil, o total de anos de vida de exposição ao glifosato e outros agrotóxicos foi associado ao aumento do TSH e diminuição do FT4 entre homens [20]. Contudo, ainda são escassos

os dados na literatura que se referem aos efeitos do glifosato nas células da glândula. Por isso, o objetivo principal dessa pesquisa foi analisar possíveis efeitos citotóxicos do glifosato em duas nas linhagens celulares bem representativas da tireoide.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 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 com translocação RET/PTC e a Nthy-ori 3-1 um controle para a célula neoplásica já que se trata de linhagem derivada de células foliculares tireoidianas normais que mantem várias propriedades e funções. A linhagem TPC-1 foi 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 Nthy-ori 3-1 foi comercializada pela Sigma-Aldrich. As células tireoidianas foram cultivadas em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 1% de Penicilina- Streptamicina e 250mg/ml de fungizone mantidas em estufa a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) [21,22]. As células foram expostas ao glifosato (Roundup Original DI®) após chegarem a uma confluência de 80%. As células não expostas constituíram o controle dos experimentos.

### **4.2 Glifosato**

Foi utilizado o glifosato (Roundup Original DI®) (Monsanto) em linhagens celulares tireoidianas (TPC1 e Nthy-ori 3-1) com exposições nos tempos 24h e 48h. Para isso, as células foram cultivadas em placas de cultura de 12 poços (3,7x10<sup>4</sup>/poço) e incubadas por 24h para adesão celular. Foram preparadas cinco concentrações diferentes de glifosato (Roundup Original DI®) em água Milli-Q® (Merck Group), que variaram de 6,5 µg/L a 6500 µg/L baseadas em estudo anterior [23]. Dentre essas cinco concentrações, foram testadas doses como AOEL (Nível Aceitável de Exposição Ocupacional) e IDA (Ingestão Diária Aceitável), presentes na Nota Técnica (Processo nº 25351.056754/2013-17) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária [24], que correspondem respectivamente a 160 µg/L e 830 µg/L. O meio de cultura inicial foi renovado antes de as células serem expostas ao químico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica e biológica.

### **4.3 Teste Azul de Tripán**

Utilizou-se o Azul de Tripán 0,4% (Sigma-Aldrich) para a contagem de células mortas por concentração nos determinados períodos de exposição (24 e 48 horas). Foi feita uma diluição 1:1 da suspensão de células tratadas e uma solução de Azul de Tripán. Tal solução foi homogeneizada e dela se retirou uma alíquota no total de 10µl para a realização do cálculo de células mortas pelo contador automático de células Countess® II FL (Thermo Fisher Scientific).

#### **4.4 Ensaio Cell Counting Kit-8 (CCK-8)**

A análise da citotoxicidade foi feita por meio do CCK-8. Foram usadas placas de 96 poços contendo 100 µl de meio RPMI 1640 completo e que continham cerca de 5000 cells/well. Após os tempos previstos de exposição ao glifosato (24h e 48h), adicionou-se 10 µl da solução de CCK-8, contendo o WST-8 (Water Soluble Tetrazolium Salts), em cada poço das placas de cultura celular. Então, as placas foram deixadas na estufa por 3 horas e, em seguida, a absorbância foi medida a 450nm utilizando-se um leitor de microplaca (ELx808, Biotek, Winooski, VT, USA) e o controle negativo, correspondente aos resultados obtidos nas células não expostas ao químico, foi designado como 100% de atividade de desidrogenases. A absorbância própria do meio de cultura também foi levada em consideração na interpretação dos resultados.

### **5. ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS**

Conforme definido na Resolução CNS n.º 466/12, devem ser submetidas à apreciação do Sistema CEP/CONEP as pesquisas envolvendo seres humanos. Não é o caso desse estudo, que utilizou como modelos experimentais apenas linhagens celulares tireoidianas. Estamos à disposição para enviar a dispensa conferida pelo comitê caso necessário.

### **6. RESULTADOS**

#### **6.1 Avaliação da Viabilidade Celular por Azul de Tripán**

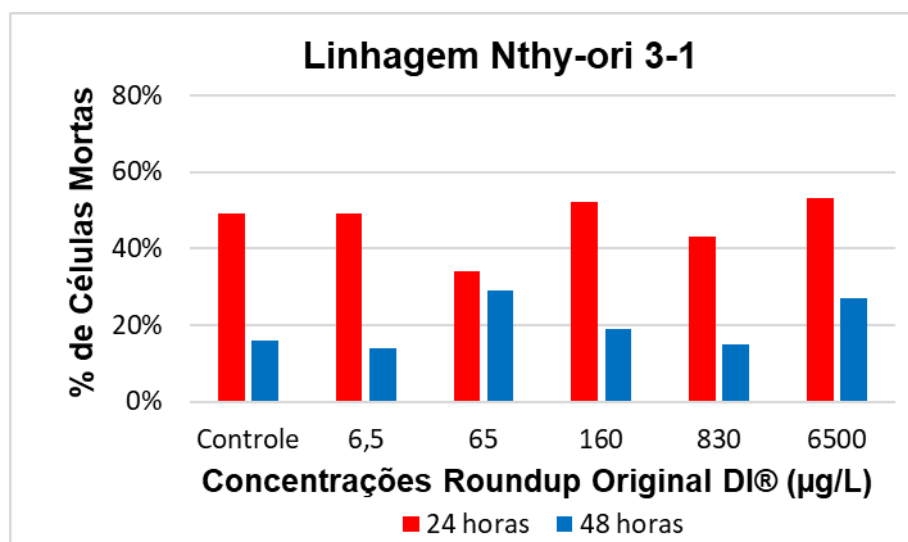
##### **6.1.1 Linhagem Nthy-ori 3-1**

Os resultados obtidos referentes a essa linhagem estão expostos no Gráfico 1a. Nas células expostas ao glifosato por 24 horas, obteve-se um total de 49% de morte na menor concentração analisada (6,5 µg/L) e 53% de morte na maior concentração (6500 µg/L), que foi o maior resultado encontrado. Em 65 µg/L, foi obtida a menor mortalidade: 34%.

A taxa de morte das células analisadas após 48 horas foi menor do que nas analisadas após 24 horas. Nas células expostas ao glifosato por 48 horas, obteve-se um total de 27%

de morte na maior concentração analisada (6500 µg/L) e 14% de morte na menor concentração (6,5 µg/L), que foi o menor valor representado no Gráfico 1a.

Em ambos os intervalos de tempo, os resultados obtidos nas doses correspondentes à IDA e ao AOEL não se destacaram em relação às demais. Além disso, não houve uma diferença significativa na morte das células expostas e não expostas ao glifosato em seus respectivos períodos de análise.



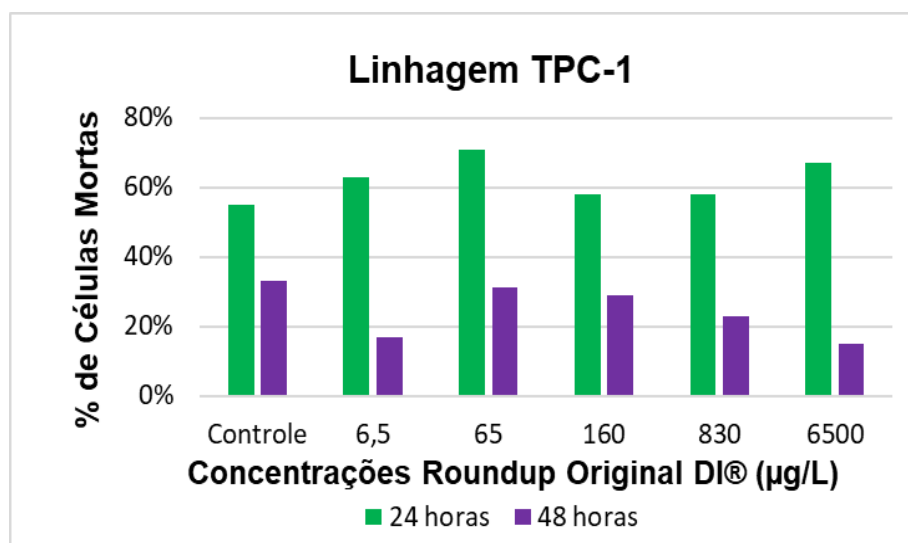
**Gráfico 1a:** Resultados do teste Azul de Tripán realizado na Linhagem Nthy-ori 3-1

### 6.1.2 Linhagem TPC-1

Os resultados obtidos referentes a essa linhagem estão expostos no Gráfico 1b. Quando se analisa os valores referentes a 24 horas de exposição, percebe-se que há 63% de morte celular na menor concentração analisada (6,5 µg/L) e 67% de morte na maior (6500 µg/L). Nesse período, o menor resultado obtido foi 58% de mortalidade, nas concentrações 160 µg/L (AOEL) e 830 µg/L (IDA); e a maior foi 71% de mortalidade, em 65 µg/L. Além disso, em 24 horas, a mortalidade do grupo controle foi o menor valor obtido (55%), apesar desse resultado se manter próximo da porcentagem de células mortas que foram células expostas ao químico nas concentrações permitidas pela Anvisa.

Em relação à exposição ao glifosato por 48 horas, obteve-se um total de 17% de morte na menor concentração e 15% de morte na maior, que correspondeu à menor mortalidade. A maior porcentagem de células mortas foi 31%, novamente em 65 µg/L. Houve uma queda na morte em todas as cinco concentrações. Ademais, os resultados permaneceram próximos da média dos valores obtidos para o controle do experimento.

Ao comparar os resultados referentes a ambas as linhagens, percebe-se que em 24 horas de exposição a mortalidade das células TPC-1 foi maior do que a das células Nthy-ori 3-1. Já em 48 horas, a taxa de morte nas duas linhagens foi parecida. Ademais, os resultados de nenhum dos dois gráficos expostos foram lineares e crescentes. As taxas de mortalidade variaram entre as concentrações, de maneira que foi possível observar taxas mais altas de morte celular também nas pequenas concentrações estudadas. E, no geral, houve maior número de morte celular após 24 horas de exposição do que após 48 horas.



**Gráfico 1b:** Resultados do Teste Azul de Tripán na Linhagem TPC-1

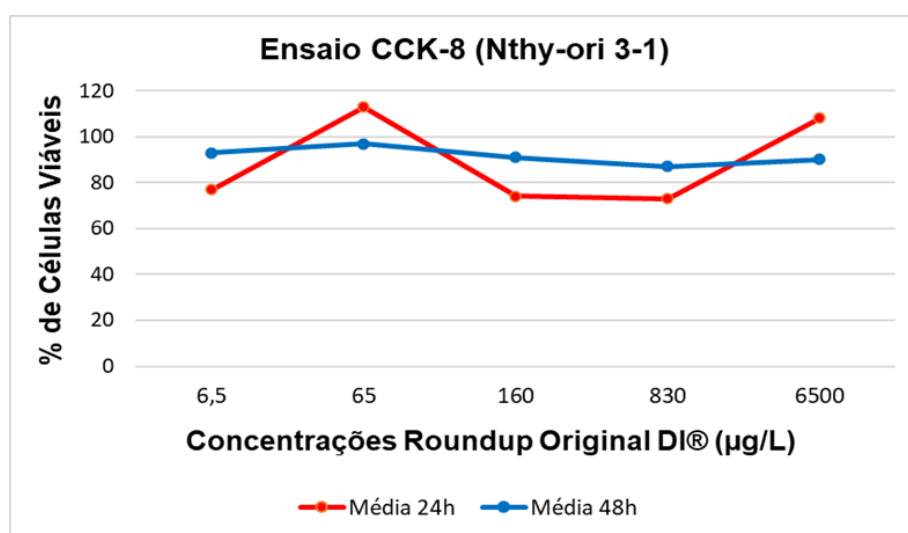
## 6.2 Ensaio Cell-Counting Kit-8 (CCK-8)

### 6.2.1 Linhagem Nthy-ori 3-1

Em relação às células da linhagem Nthy-ori 3-1 expostas ao glifosato por 24 horas, os resultados expostos no Gráfico 2a evidenciaram que a citotoxicidade do glifosato nas concentrações estudadas foi mínima. Isso porque obteve-se um total de 77% de viabilidade na menor concentração analisada (6,5 µg/L) e 108% de células viáveis na maior (6500 µg/L). O menor valor obtido foi 73%, em 830 µg/L; e o maior foi 113% em 65 µg/L.

Por sua vez, os resultados referentes às células expostas ao químico por 48 horas foram parecidos, apesar de não ter sido atingido 100% de células viáveis em nenhuma das concentrações. Nesse intervalo de tempo, os resultados tenderam a manter uma constância maior, como podemos ver na curva azul do Gráfico 2a, que quase forma uma reta. Os resultados mostraram 93% de viabilidade na menor concentração estudada e 97% de células viáveis na maior. As porcentagens variaram de 87%, em 830 µg/L, a 97% em 65 µg/L.

Não se pode afirmar pelos resultados que há uma relação de proporcionalidade entre o tempo de exposição e a concentração do químico com a citotoxicidade do glifosato na linhagem Nthy-ori 3-1. Também, como todos os valores obtidos foram acima de 70% e alguns ultrapassaram 100%, a linhagem suportou bem a presença do químico, a ponto de ela conseguir permanecer viva, crescer e se multiplicar até melhor do que a parte da linhagem não exposta.



**Gráfico 2a:** Resultados do Ensaio CCK-8 na Linhagem Nthy-ori 3-1

### 6.2.2 Linhagem TPC-1

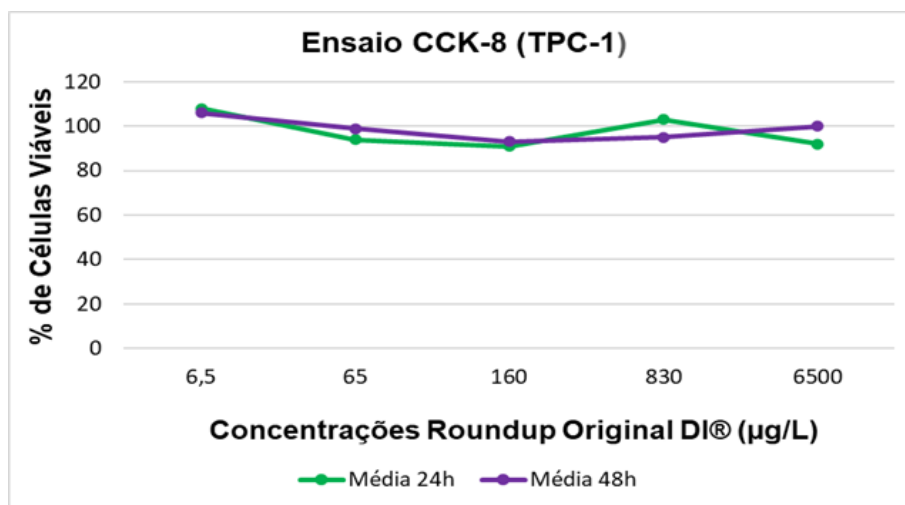
Como demonstra o gráfico 2b, as células da linhagem TPC-1 expostas ao glifosato por 24 horas tiveram alta taxa de sobrevivência. Obteve-se 92% de viabilidade na maior concentração analisada (6500 µg/L). Na menor concentração a que a linhagem foi exposta (6,5 µg/L), observou-se a maior porcentagem de células viáveis: 108%. O menor resultado foi 91%, em 160 µg/L.

Em exposição de 48 horas, a citotoxicidade do glifosato também foi baixa, posto que o menor resultado foi de 93% de células viáveis, em 160 µg/L. Na menor concentração estudada (6,5 µg/L), a porcentagem obtida foi a maior do ensaio: 106%. Na maior (6500 µg/L), a taxa de viabilidade chegou a 100%.

Em ambos os intervalos de tempo, a menor porcentagem de células viáveis se deu em 160 µg/L; e a maior, em 6,5 µg/L. Esse achado difere do encontrado para a linhagem Nthy-ori 3-1. Contudo, assim como demonstraram os resultados para estas células linhagem, a análise da linhagem TPC-1 também não permite afirmar que o aumento da concentração do glifosato e do tempo de exposição a ele causa aumento da sua citotoxicidade nas condições deste estudo. Isso é reforçado pelo fato de que no Gráfico



2b, as linhas referentes às Médias 24h e 48h quase se sobrepõem, havendo uma pequena diferença apenas nas duas últimas concentrações analisadas.



**Gráfico 2b:** Resultados do Ensaio CCK-8 na Linhagem TPC-1

### 6.3 Análise Morfológica das Células

Enquanto as células cresciam nas placas e iam sendo expostas ao glifosato foi realizado uma análise qualitativa de suas morfologias no microscópio óptico com lente de aumento de 10X. Observou-se a presença de *debris* celulares e de células pequenas e sem brilho, que pareceram estar no fim do processo de apoptose. Contudo, não se pode afirmar com certeza que essas alterações foram causadas pela exposição ao químico, posto que em pequenas quantidades elas são próprias de processos fisiológicos intrínsecos às células.

Também foi possível observar proliferação celular, que foi mais aparente nas células expostas a menores concentrações de glifosato. Todavia, no geral, as alterações morfológicas observadas em ambas as linhagens e tempos de exposição não foram expressivas.

## 7. DISCUSSÃO

Diversos artigos têm proposto que os DES desafiam os conceitos tradicionais de toxicologia, em particular o dogma de “a dose faz o veneno”, porque eles podem provocar efeitos em baixas doses que não são observados em doses maiores. Com o envolvimento cada vez maior dos cientistas e dos endocrinologistas clínicos na pesquisa e na prática dos DES, as evidências relativas aos efeitos de doses baixas do glifosato estão progressivamente aumentando [25,26]. Isso significa que não se espera dessa substância uma curva dose-resposta monotônica, na qual doses mais elevadas têm efeito maior do

que doses mais baixas. Ao contrário, o glifosato possivelmente apresenta uma curva dose-reposta não-monotônica [25]. Nesse caso, como observado nos resultados da pesquisa, doses baixas e intermediárias podem produzir efeitos maiores que doses altas.

Esse tipo de resposta é uma das características dos DES e uma das maiores dificuldades em seu entendimento [26]. No presente estudo, em especial nos testes realizados com o Azul de Tripan, as maiores taxas de mortalidade das linhagens celulares foram obtidas em sua maioria em baixas concentrações. Merece um destaque os resultados obtidos na segunda menor concentração analisada: 65 µg/L de exposição ao glifosato. Na linhagem TPC-1, a mortalidade das células foi maior nessa dose tanto em 24h como em 48h. Na linhagem Nthy-ori 3-1, também se percebeu um aumento na mortalidade das células nessa concentração após 48 horas de exposição.

Nesse sentido, nosso estudo sugere que o glifosato pode ter um efeito maior sobre as linhagens celulares em baixas doses, apresentando uma resposta não-monotônica. Resultados como esse são interessantes porque doses pequenas do químico são comumente observadas no ambiente. Em um estudo conduzido entre 2016 e 2017 numa população de horticultores, biomarcadores urinários de exposição ao glifosato encontraram concentrações de até 7,4µg/L [27]. Em plantações de arroz no Sul do Brasil, foram encontradas concentrações de glifosato entre 13 e 144 µg/L [28]. Também, em um riacho localizado em Pelotas, cidade do Estado do Rio Grande do Sul, foram aferidas concentrações de glifosato próximas a 100 µg/L [29].

Outro resultado interessante observado foi a percepção de que os efeitos do herbicida à base de glifosato foram mais pronunciados após 24 horas de exposição. Em 48 horas, houve uma queda de mortalidade em todas as cinco concentrações analisadas. Com base nesses dados, pode-se afirmar que, no geral, houve maior número de morte celular após 24 horas de exposição do que após 48 horas.

Uma hipótese é de que, após 48 horas, a ativação dos mecanismos de reparo de erros do genoma que podem ter sido causados pelo glifosato resultou na maior sobrevivência das células [30]. Em paralelo, um projeto envolvendo a análise da toxicidade do glifosato em tecido das brânquias de peixes, observou também que os danos causados pelo glifosato foram diminuindo conforme o tempo de exposição ao químico aumentava. Nesse estudo, essa variação temporal foi explicada pelos níveis reduzidos do pesticida no tecido em análise, combinados com a intervenção do sistema de reparo do DNA e do turnover celular [31].

Contudo, neste projeto realizado com peixes, as análises demonstraram que o glifosato foi tóxico aos tecidos analisados, promovendo dano ao DNA e estresse oxidativo nas células [31]. Esses resultados vão de encontro com os obtidos no nosso projeto. Apesar dos resultados obtidos nos dois experimentos realizados parecerem diferentes à primeira vista, tanto o teste Azul de Tripán quanto o ensaio CCK-8 demonstram que o glifosato não foi citotóxico às linhagens analisadas nas concentrações e tempos estudados. Isso porque apesar das análises morfológicas das células ao microscópio e do teste Azul de Tripán terem evidenciado a ocorrência de morte celular, as porcentagens de morte nas células expostas ao glifosato foram muito parecidas com os resultados obtidos no grupo controle.

Além disso, no ensaio CCK-8, tido na literatura como teste mais sensível para a análise da citotoxicidade de produtos químicos, a viabilidade das células expostas ao químico em comparação com a viabilidade das células não expostas foi consideravelmente alta [32]. Considera-se que um produto é considerado citotóxico se a viabilidade das células expostas a ele for reduzida a 70% [33]. Como todos os resultados obtidos no ensaio foram acima desse valor, pode-se concluir que as linhagens estudadas parecem suportar bem a presença do químico nas condições do experimento, a ponto de ele não interferir significativamente em sua viabilidade.

É interessante notar também que em algumas concentrações a viabilidade das células chegou a superar 100%, principalmente na linhagem TPC-1, proveniente de carcinoma papilífero. Isso sugere um possível estímulo à proliferação celular por parte do químico, fato já registrado na literatura. Estudos realizados com linhagens celulares provenientes de carcinoma hepatocelular (HEPG2), coriocarcinoma humano (JEG3) e células embrionárias (HEK293) indicaram que concentrações baixas de glifosato estimulam efetivamente a proliferação celular, especialmente em células já instáveis e com forte proliferação, como as células tumorais [34,35]. Tal correlação parece explicar a diferença, ainda que pequena, dos resultados do ensaio CCK-8 entre as duas linhagens analisadas, posto que, no geral, a viabilidade da linhagem Nthy-ori 3-1 foi menor.

Vale lembrar que esses resultados são relativos a tempos de exposição ao glifosato de curta-duração, como a 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. Poucos são as pesquisas já feitas envolvendo linhagens celulares humanas que adotam essa metodologia. Mas um estudo realizado com ratos expôs os animais a doses de 10 mg/Kg de glifosato 3 vezes na semana

durante 20 dias e observou no tecido hepático efeito tóxico do químico, que foi capaz de induzir estresse oxidativo nas células e ativar vias de apoptose [36].

## **8. CONCLUSÃO**

Em conclusão, nossos resultados sugerem que o glifosato (Roundup Original DI®) não é citotóxico às linhagens celulares TPC-1 e Nthy-ori 3-1 nos tempos de exposição e concentrações analisadas, como indicado pelas altas taxas de viabilidade celular no ensaio CCK-8 e pela semelhança das taxas de mortalidade obtidas entre os grupos experimentais e os grupos controle no teste Azul de Tripán. As células pareceram suportar bem a presença do químico inclusive nas concentrações permitidas pela Anvisa (IDA e AOEL).

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Beynon ME, Pinneri K. An Overview of the Thyroid Gland and Thyroid-Related Deaths for the Forensic Pathologist. *Acad Forensic Pathol.* 2016;6(2):217-236.
2. Nunes MT. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2003;47:639-43.
3. Köhrle J, Frädriich C. Thyroid hormone system disrupting chemicals. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2021;7:101562.
4. Instituto Nacional do Câncer [homepage na internet]. Estimativa 2020: incidência do câncer no Brasil [acesso em 31 mar 2020]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>
5. Samsel A, Seneff S. Glyphosate, pathways to modern diseases IV: cancer and related pathologies. *Journal of Biological Physics and Chemistry.* 2015;15(3):121-159
6. Crusselle-Davis VJ, Archer TK. *Comprehensive Toxicology*: Elsevier; 2010.
7. Ministério da Saúde [homepage na internet]. Disruptores endócrinos no meio ambiente um problema de saúde pública e ocupacional [acesso em 07 abr 2020]. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/trabalhador/pdf/texto\\_disruptores.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/trabalhador/pdf/texto_disruptores.pdf)
8. Gore AC. Endocrine-Disrupting Chemicals. *JAMA Intern Med.* 2016 Nov 1;176(11):1705-1706.
9. Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:135-62.
10. Mnif W, Hassine AI, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8(6):2265-303.

11. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;40(1):241-58.
12. Muñoz JP, Bleak TC, Calaf GM. Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. *Chemosphere.* 2021;270:128619.
13. Jansons M, Pugajeva, I, Bartkevics V. Occurrence of glyphosate in beer from the Latvian market. *Food Addit Contam.* 2018; 35:1767-1775.
14. Swanson NL, Leu A, Abrahamson J, Wallet B. Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America. *J Organic Systems.* 2014;9(2):6-37.
15. Levine SL, Webb EG, Saltmiras DA. Review and analysis of the potential for glyphosate to interact with the estrogen, androgen and thyroid pathways. *Pest Manag Sci.* 2020;76(9):2886-2906.
16. Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon MC, Séralini GE. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology.* 2009;262(3):184-91.
17. Hao Y, Zhang Y, Ni H, Gao J, Yang Y, Xu W, et al. Evaluation of the cytotoxic effects of glyphosate herbicides in human liver, lung, and nerve. *J Environ Sci Health B.* 2019;54(9):737-744.
18. Martínez MA, Rodríguez JL, Lopez-Torres B, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Maximiliano JE, et al. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. *Environ Int.* 2020;135(1):105414
19. Toft G. Thyroid function in Danish greenhouse workers. *Environmental Health: A Global Access Science Source. Environ. Health.* 2006;5:32.
20. Piccoli C, Cremonese C, Koifman RJ, Koifman S, Freire C. Pesticide exposure and thyroid function in an agricultural population in Brazil. *Environ. Res.* 2016;151:389–398.
21. Lopes FM, Sandrini JZ, Souza MM. Toxicity induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in the zebrafish hepatocyte cell line (ZF-L). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018;162:201-207.
22. Saiselet M. Thyroid cancer cell lines: an overview. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3.
23. Lopes FM, Sandrini JZ, Souza MM. Toxicity induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in the zebrafish hepatocyte cell line (ZF-L). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018;162:201-207.

- 24.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota Técnica: N° 23/2018/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA. Brasília. 2018.
- 25.** 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. *Sci Total Environ.* 2020;705:135808.
- 26.** Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev.* 2012;33(3):378-455.
- 27.** 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. *Int J Hyg Environ Health.* 2018 Aug;221(7):1012-1022.
- 28.** Mattos M, Peralba M, 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.
- 29.** Silva DRO, Avila LA, Agostinetto D, Dal Magro T, Oliveira E, Zanella R, et al. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. *Ciência Rural.* 2009;39(9):2383-2389.
- 30.** Moustacchi E. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat Res.* 2000;464(1):35-40.
- 31.** Guilherme S, Gaivão 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. *Mutat Res.* 2012 Mar 18;743(1-2):1-9.
- 32.** Aslantürk ÖS. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world.* 2018;2:64-80.
- 33.** International Organization for Standardization (ISO). ISO10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva. 2009.
- 34.** Kašuba V, Milić M, Rozgaj R, Kopjar N, Mladinić M, Žunec S, et al. Effects of low doses of glyphosate on DNA damage, cell proliferation and oxidative stress in the HepG2 cell line. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017;24(23):19267-19281.
- 35.** Mesnage R, Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini GE. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *Biomed Res Int.* 2014;2014:179691.
- 36.** Astiz M, de Alaniz MJ, Marra CA. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009 Oct;72(7):2025-32.

