

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Mariane Izabella Abreu de Melo

ESTUDO DOS EFEITOS TÓXICOS DA FORMULAÇÃO
COMERCIAL DO HERBICIDA GLIFOSATO SOBRE
CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO
HUMANO

Belo Horizonte
2015

Mariane Izabella Abreu de Melo

Dissertação de Mestrado

ESTUDO DOS EFEITOS TÓXICOS DA FORMULAÇÃO
COMERCIAL DO HERBICIDA GLIFOSATO SOBRE
CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO
HUMANO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof. Dra. Eliane Novato Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

Belo Horizonte

2015



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIANE IZABELLA ABREU DE MELO. Aos trinta dias do mês de janeiro de 2015 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Estudo dos efeitos tóxicos da formulação comercial do herbicida glifosato sobre células-tronco derivadas de tecido adiposo humano", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Dra. Eliane Novato Silva, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Cristiane Rodrigues Correa (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Dawidson Assis Gomes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Alfredo Miranda de Góes - Co-orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Eliane Novato Silva (Universidade Federal de MG.), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de janeiro de 2015.

Dra. Cristiane Rodrigues Correa (UFMG)

Dr. Dawidson Assis Gomes (UFMG)

Dr. Alfredo Miranda de Góes - Co-orientador (UFMG)

Dra. Eliane Novato Silva (UFMG) - Orientadora

Prof. Jader dos Santos Chu
 Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Aos meus amados pais e irmã, pelo carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof^a Eliane Novato Silva e Alfredo Miranda de Góes por todos os ensinamentos, suporte, confiança e paciência ao longo desses dois anos de mestrado.

Ao Prof. Dawidson Assis pelas contribuições ao trabalho, disponibilidade e entusiasmo em ajudar.

À equipe do Núcleo de Cirurgia Plástica pelo fornecimento dos produtos de lipoaspirado, imprescindível para a realização desse estudo.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais Geraldo e Luciene e à minha irmã Marina por todo o incentivo, carinho e amor desde sempre.

A todos os membros da família LICM. Faltam palavras para agradecer o quanto foi prazeroso trabalhar com essa equipe. Obrigada por todo o apoio, incentivo e amizade. Esses dois anos de muito aprendizado e amadurecimento só foi possível porque encontrei pessoas maravilhosas como vocês. Em especial:

À Thaís Martins pelo acompanhamento desde os primeiros dias que entrei no laboratório e também pela paciência, amizade e disposição em ajudar sempre.

À Andrea, amiga que conheço há quase seis anos. Obrigada por todos esses anos de amizade e por todas as palavras de incentivo e sábios conselhos!

Ao Marcelo e Jerusa, meus revisores de plantão. Obrigada por todos os protocolos e contribuições e também pela amizade!

A todos os amigos do grupo 'happy hour', obrigada pelos momentos inspiradores, dicas e boas risadas que sempre vou recordar, principalmente na hora do almoço!

À Priscila, por ter me apresentado ao mundo da biologia molecular e por ser esse doce de amiga!

À Marininha, obrigada pela amizade e companhia nas colorações de von Kossa e Oil Red!

Aos meus amigos do mestrado, Ana, Joaquim, Paulo! Obrigada pela amizade de vocês e, em especial, ao Paulo pela ajuda nas análises estatísticas.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

A CAPES, CNPq e Ministério da Saúde pelo apoio financeiro. Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para esse trabalho: Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

“Vá até onde puder ver; quando lá chegar poderá ver ainda mais longe. ”

(Johann van Goethe)

RESUMO

O glifosato é o herbicida mais comercializado no mundo e o Roundup® uma de suas fórmulas comerciais mais conhecidas. Muitos estudos têm sido realizados demonstrando o seu potencial em causar danos à saúde humana. Para realizar este trabalho, optamos por utilizar, como modelo experimental, as células-tronco derivadas de tecido adiposo (hASCs), isoladas de voluntários submetidos a cirurgia de lipoaspiração devidamente aprovados por comitê de ética. As hASCs são capazes de se diferenciar em células das linhagens adipogênica e osteogênica. Assim, o principal objetivo deste estudo foi investigar os efeitos tóxicos do Roundup® sobre hASCs nos estados indiferenciado e diferenciado destas células. Para isso, as mesmas foram mantidas no meio DMEM (suplementado com plasma humano) e Roundup® e meio de diferenciação adipogênico ou osteogênico com Roundup® na concentração de 36 µg mL⁻¹ (IC50 42,98 ±0,91 µg mL⁻¹). Os tempos de exposição foram de curto (24, 48 e 72 horas) e longo prazos (até 21 dias). Utilizou-se o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) para avaliar a toxicidade do glifosato ao longo do tempo do cultivo celular. A marcação por Anexina V- Alexa Fluor 488 e Iodeto de Propídio sugere que a exposição de hASCs ao Roundup® induziu as células à apoptose após 24 horas de exposição. Alterações morfológicas importantes também foram observadas por microscopia de luz durante o período de diferenciação das hASCs tratadas com Roundup®. Por outro lado, a expressão de genes relacionados à diferenciação, como leptina, fosfatase alcalina, e osteopontina, avaliada por RT-PCR foi semelhante ao controle indiferenciado durante o desafio tóxico. Entretanto, apesar de o gene para fosfatase alcalina (FA) ter sido expresso no grupo tratado com agrotóxico, o ensaio de BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato *p*-toluidina) – NBT (nitroblue tetrazólio clorídrico) mostrou que a atividade dessa enzima foi menor quando comparada às células em diferenciação sem tratamento com Roundup®. Em conclusão, as evidências têm mostrado que o herbicida Roundup® é capaz de provocar efeitos tóxicos sobre as células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo humano.

Palavras-chave: células-tronco, tecido adiposo, glifosato, Roundup®, toxicidade.

ABSTRACT

Glyphosate is the most commercialized herbicide in the world, known commercially as Roundup[®], and many studies were conducted to investigate its potential damage to human health. To carry out this work, we chose human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) as an experimental model, which are able to differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. These cells were derived from volunteers subjected to liposuction surgery approved by ethics committee. The main objective of this work was to investigate the toxic effects of Roundup[®] on hASCs in undifferentiated and differentiated state of these cells. These cells were exposed to a mixture containing Roundup[®] and DMEM (Penicilin-streptomycin-gentamicin and human plasma enriched) or Roundup[®] and osteogenic or adipogenic differentiation medium at a concentration of 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (IC_{50} 42, 98 \pm 0, 91 $\mu\text{g mL}^{-1}$), during short (24, 48, and 72 hours) and long (until 21 days) time of exposure. We used MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) to assess the toxicity of glyphosate throughout the days of culture. Annexin V-Alexa Fluor 488 and Propidium Iodide staining using fluorescence microscopy suggested that hASCs's exposure to Roundup[®] induced cells to apoptosis after 24h exposure. Morphological changes were observed by light microscopy during the hASCs differentiation's period with Roundup[®]. Otherwise, the expressions of genes related to differentiation, such as leptin, alkaline phosphatase, and osteopontin, accessed by standart PCR, were similar compared to the control during toxic challenge. However, despite alkaline phosphatase (AK) expression, the NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt) hydrolysis have shown that the AK enzymatic activity were less intense in treated group during osteogenic differentiation. In conclusion, evidences have shown that Roundup[®] causes toxic effects on adult stem cells derived from adipose tissue.

Keywords: stem cells, adipose tissue, glyphosate, Roundup[®], toxicity.

I – LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

® – Marca Registrada

ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva

AgNO₃ – Nitrato de prata

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Adenosina trifosfato

BCIP – 5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina

bp – Pares de base

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

cDNA – Ácido Desoxirribonucléico Complementar

CFU-Fs – Unidades formadoras de colônias fibroblásticas

CL – Concentração Letal

CO₂ – Dióxido de carbono

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DEPC – Dietilpirocarbonato

DL – Dose Letal

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA – Ácido Tetracético Etilenodiamidina

EPSP – 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato

EPSPS – 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato sintase

F- Foward

FA – Fosfatase alcalina

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

GAPDH – Gliceraldeído Fosfato Desidrogenase

GLUT 4 – Transportador de glicose GLUT 4

hASC – *human adipose tissue-derived stem cells* (Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano)

HCl – Ácido clorídrico

HLA – Antígeno leucocitário humano

HSC – *Hematopoietic stem cells* (células-tronco hematopoiéticas)

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IgG – Imunoglobulina G

INCA – Instituto Nacional do Câncer
ISCT – Sociedade Internacional de Terapia Celular
Kb- Kilobase
LEP – Leptina
Log – Logaritmo
Ltda – Limitada
m – massa
MG – Minas Gerais
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
MSCs – *mesenchymal stem cells* (células-tronco mesenquimais)
MTT – Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium
N1 – Número de células plaqueadas
N2 – Número de células contadas
NBT – Nitroblue tetrazólio clorídrico
PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
PBS – Tampão fosfato de sódio
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PE – Ficoeritrina
PEP – Fosfoenolpiruvato
PH – Plasma alogênico humano
pH – Potencial hidrogeniônico
PI – Iodeto de propídeo
POEA – Polioxietilenamida
PPARG2 – Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos
PS – Fosfatidilserina
R – Reverse
R1 – População de células - citometria de fluxo
RCF – *Relative centrifugal force*
RT – Transcriptase reversa
S3P – Xiquimato-3-fosfato
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SFB – Soro fetal bovino
T1 – Horário de plaqueamento das células
T2 – Horário de contagem das células

U – Unidade enzimática, quantidade de enzima que converte 1 μmol de substrato por minuto

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

V – Volume

θ – Temperatura

II – LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição das amostras analisadas de alimentos segundo a presença ou a ausência de resíduos de agrotóxicos (PARA, 2012).....	23
Figura 2 – Fórmula estrutural do glifosato (IUPAC).....	25
Figura 3 – Reação catalisada pela enzima EPSPS envolvendo a transferência do enolpiruvil do PEP para o S3P, formando o EPSP. Na figura, destaca-se a inibição do glifosato	26
Figura 4 – Imagem do aspecto morfológico das células-tronco mesenquimais humanas extraídas do produto de lipoaspirado, apresentado na quarta passagem.....	50
Figura 5 – Imagem representativa da coloração das hASCs submetidas à diferenciação adipogênica	61

III – LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classes de pesticidas utilizados no Brasil e coloração das faixas indicativas presentes nos rótulos das embalagens	21
Tabela 2 – Anticorpos primários utilizados na imunofenotipagem por citometria de fluxo	42
Tabela 3 – <i>Primers</i> utilizados para PCR	47

IV – LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva de crescimento das hASCs cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% PH.....	52
Gráfico 2 – Representação gráfica da dispersão lateral e frontal dos eventos obtidos por citometria de fluxo.	53
Gráfico 3 – Histogramas respresentativos da imunofenotipagem das hASCs com os marcadores de células-tronco mesenquimais CD90, HLA-ABC, CD105 e CD73. 54	
Gráfico 4 – Histogramas representativos da imunofenotipagem das hASCs para marcadores de células hematopoiéticas: CD19, CD14, CD45 e CD34.....	55
Gráfico 5 – Representação gráfica das curvas de metabolização de MTT das hASCs expostas ao Roundup®	57
Gráfico 6 – Gráficos representativos das curvas de metabolização de MTT das hASCs na exposição aguda ao Roundup®	58
Gráfico 7 – Determinação da IC50 após 24 horas de exposição ao herbicida Roundup®	59
Gráfico 8 – Representação gráfica da metabolização do MTT pelas hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e adipogênico suplementado com PH em ausência ou presença de Roundup®	63
Gráfico 9 – Análise de regressão linear da metabolização do MTT pelas hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e adipogênico suplementado com PH em ausência ou presença de Roundup®	64
Gráfico 10 – Representação gráfica da metabolização do MTT pelas hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e adipogênico suplementado com PH em ausência ou presença de Roundup® a cada tempo avaliado	64
Gráfico 11 – Representação gráfica da metabolização do MTT pelas hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e osteogênico suplementado com PH em ausência ou presença de Roundup®	69
Gráfico 12 – Análise de regressão linear da metabolização do MTT pelas hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e osteogênico suplementado com PH em ausência ou presença de Roundup®	70

Gráfico 13 – Representação gráfica da metabolização do MTT pelas hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e osteogênico suplementado com PH na ausência ou presença de Roundup [®] em cada tempo avaliado	70
Gráfico 14 – Representação gráfica da atividade de fosfatase alcalina das hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e osteogênico suplementado com PH em ausência ou presença de Roundup [®]	71
Gráfico 15 – Representação gráfica da porcentagem de morte por apoptose e necrose induzida por tratamento com Roundup [®] comparada aos controles. A = % de células apoptóticas, B = % de células necróticas e C = % de células apoptóticas tardias ou necróticas	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Considerações gerais sobre os agrotóxicos e sua utilização no Brasil	19
1.2	Classificação dos agrotóxicos	20
1.3	Agrotóxicos e riscos para a saúde humana	22
1.4	Glifosato	25
1.4.1	<i>Toxicidade do glifosato</i>	26
1.4.2	<i>Efeitos do Roundup® sobre a saúde de mamíferos</i>	28
1.4.3	<i>Efeitos do Roundup® sobre a saúde humana</i>	29
1.5	Células-tronco mesenquimais	30
1.6	Cultivo em meio livre de suplementação animal	32
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral:	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Isolamento e cultivo das células-tronco derivadas de tecido adiposo	36
4.2	Meios de cultura celular	37
4.2.1	<i>Meio de cultura DMEM</i>	37
4.2.2	<i>Obtenção de plasma humano para suplementação do meio de cultura</i>	37
4.2.3	<i>Meio Osteogênico</i>	38
4.2.4	<i>Meio Adipogênico</i>	38
4.3	Diluição da formulação comercial Roundup® e exposição das hASCs ao herbicida	38
4.4	Ensaio de Viabilidade celular	39
4.5	Curva de crescimento celular	40
4.6	Atividade da enzima fosfatase alcalina	40

4.7	Caracterização do imunofenótipo das hASCs	41
4.8	Indução da diferenciação osteogênica	43
4.8.1	<i>Avaliação da mineralização e expressão gênica na diferenciação osteogênica</i>	43
4.8.2	<i>Extração de RNA total</i>	44
4.8.3	<i>Síntese da primeira fita de cDNA</i>	44
4.8.4	<i>Reação em cadeia da polimerase</i>	44
4.9	Indução da diferenciação adipogênica	45
4.9.1	<i>Detecção do acúmulo intracelular de lipídeos</i>	45
4.9.2	<i>Análise da expressão de genes que codificam para leptina, transportador de glicose GLUT4 e receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPARG2)</i>	46
4.10	Detecção do tipo de morte celular induzida pelo tratamento com agrotóxico	47
4.11	Análises Estatísticas	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Isolamento e cultivo das hASCs	50
5.2	Curva de crescimento das hASCs cultivadas com DMEM 10% PH	51
5.3	Caracterização do imunofenótipo celular	52
5.4	Efeitos agudos da exposição das hASCs ao agrotóxico Roundup®	55
5.4.1	<i>Curvas de metabolização do MTT pelas hASCs expostas ao herbicida Roundup® de forma aguda mostram um efeito dose-dependente do produto</i>	55
5.4.2	<i>Determinação da IC50 após 24 horas de exposição ao Roundup®</i>	58
5.5	Efeitos crônicos da exposição das hASCs ao herbicida Roundup®	59
5.5.1	<i>Diferenciação adipogênica das hASCs em ausência e presença de agrotóxico</i>	59
5.5.2	<i>Diferenciação osteogênica das hASCs em ausência e presença de agrotóxico</i>	64
5.6	O tratamento com agrotóxico induz apoptose e necrose nas células-tronco derivadas de tecido adiposo	72
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES	84
8	PERSPECTIVAS	85

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXO A	95
ANEXO B	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre os agrotóxicos e sua utilização no Brasil

Agrotóxicos podem ser definidos como qualquer substância ou mistura de substâncias, usadas para prevenir, destruir ou controlar vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causadoras de danos ou interferência durante a produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados; ou que deva ser administrada para o controle de pestes que acometem os corpos de animais de criação (FAO, 2003).

Em termos jurídicos, segundo o artigo 2º da Lei Federal Brasileira nº 7802/89, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade é alterar a composição da fauna ou da flora, a fim de preservá-la da ação de seres vivos considerados nocivos. Nessa categoria, estão incluídas as substâncias empregadas como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Historicamente, a utilização de tais substâncias em escala global iniciou-se após a Segunda Guerra Mundial sob a influência do movimento conhecido como Revolução Verde, o qual visava à disseminação de novas sementes, tecnologias e práticas agronômicas em países em desenvolvimento. Isso resultou na expansão das fronteiras agrícolas e na mecanização da produção nos países produtores, sobretudo a partir das décadas de 1960 e 1970, onde se observou um crescimento exponencial da população mundial (BORSOI et al., 2014).

No Brasil, os agrotóxicos tiveram seu uso fortemente estimulado pelo governo a partir da década de 1970, com a concessão de crédito agrícola vinculada à sua aquisição aliada a uma propaganda que exaltava principalmente suas propriedades de reduzir o trabalho e prejuízos com pragas, beneficiando os produtores e a população. Estimuladas pelos benefícios das políticas de importação, as indústrias químicas multinacionais começam a visualizar a América Latina, e, sobretudo, o Brasil, como um novo e crescente mercado para os seus produtos. No final da década de 70, observou-se a comercialização dos primeiros produtos agrotóxicos em larga escala. Na segunda metade da década de 80, houve um massivo aporte de tais produtos, devido à implantação de alguns desses segmentos produtivos no parque

industrial brasileiro. Os pesticidas passaram a participar da vida diária dos trabalhadores do campo, como também se incorporaram à dieta dos brasileiros de forma geral, ao estarem presentes em alimentos contaminados (LA DOU, 1994; WAISSMANN, 2007). Nas últimas décadas, o consumo de agrotóxicos no país apresentou um crescimento vertiginoso devido à diminuição de preços e a isenção de impostos sobre determinados produtos. Em oito anos, a quantidade utilizada por área plantada no Brasil mais do que dobrou, passando de 70 kg por hectare em 1992 para mais de 150 kg por hectares em 2010 (IBGE, 2012).

Em 2008, o Brasil utilizou mais de 700 mil toneladas de agrotóxicos tornando-se o maior consumidor mundial e gerando divisas de 7,1 bilhões de dólares para a indústria química (PEDLOWSKI et al., 2012). Essa posição no *ranking* foi mantida até 2013, ano em que foi consumido um bilhão de litros de agrotóxicos equivalendo a uma distribuição per capita de 5 litros por habitante e a transação de cerca de R\$ 8 bilhões no mercado (FIOCRUZ, 2014).

Existe uma concentração do mercado de agrotóxicos em determinadas categorias de produtos. Os herbicidas, por exemplo, representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados. Os fungicidas respondem por 14% do mercado nacional, os inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos 29% (ABRASCO, 2012). Esses números estão diretamente associados ao crescimento e ao peso do agronegócio no país.

Aproximadamente 434 ingredientes ativos (IA) e 2.400 formulações de agrotóxicos estão registrados e são permitidos no Brasil. Porém, dos 50 mais utilizados nas lavouras, 22 são proibidos na União Europeia (ABRASCO, 2012). No Brasil, transita em processo de revisão, desde 2008, 14 agrotóxicos, sendo que três deles já foram proibidos (cihexatina, metamidofós e endossulfam). Outros ainda aguardam a conclusão de sua revisão: lactofem, carbofurano, thiram, paraquate, glifosato, abamectina (ANVISA, 2008; ANVISA, 2014).

1.2 Classificação dos agrotóxicos

Quanto à classificação funcional, os agrotóxicos podem ser denominados inseticidas (para combater insetos em geral), larvicidas (contra larvas de insetos), formicidas (para combater formigas), acaricidas (contra ácaros de plantas), carrapaticidas (contra carrapatos de animais), nematicidas (contra nematódeos parasitas de plantas, que formam nódulos ou “galhas”), moluscicidas (para combater moluscos), rodenticidas (para combater roedores em geral), raticidas (para combater ratos, em particular), fungicidas (contra fungos) ou herbicidas (contra ervas daninhas e outros vegetais indesejáveis) (SAMPAIO & GUERRA, 1991).

Em relação à classificação toxicológica, essa é baseada em análises laboratoriais com exposição oral, dérmica e inalatória para determinar a Dose Letal (DL50), a qual é a dose em miligramas do produto tóxico por quilo de peso corporal necessária para matar 50% dos animais expostos ao produto. Para os estudos de DL50 oral, por exemplo, produtos sólidos se enquadram na Classe I, Extremamente Tóxicos, quando a DL50 é menor ou igual a 0,005 g kg⁻¹ de peso do rato. Na Classe II, Muito Tóxicos, quando a DL50 é maior que 0,005 e menor ou igual a 0,05 g kg⁻¹. Classe III, Moderadamente Tóxicos, quando DL50 é maior que 0,05 podendo chegar até 0,5 g kg⁻¹. Classe IV, Pouco Tóxicos quando DL50 é maior que 0,5 g kg⁻¹ (LONDRES, 2011). Os agrotóxicos são classificados pela ANVISA de acordo com o grau de toxicidade representado através da coloração das faixas impressas nos rótulos destas substâncias (Tabela 1).

Tabela 1 – Classes de pesticidas utilizados no Brasil e coloração das faixas indicativas presentes nos rótulos das embalagens

Classe	Toxicidade	Cor da faixa
I	Extremamente tóxicos	Vermelha
II	Altamente tóxicos	Amarela
III	Medianamente tóxicos	Azul
IV	Pouco tóxicos	Verde

Fonte: UFAL, 2009

Os herbicidas são pesticidas utilizados para matar ou inibir o crescimento de plantas consideradas como ervas daninhas ou pragas na lavoura. No início do século XX, materiais inorgânicos, como sulfato de ferro, nitrato de cobre e ácido sulfúrico foram utilizados nas plantações. Na década de 1940, o 2,4-dinitrofenol (2,4-D), um produto químico orgânico sintético, foi desenvolvido. Desde então, centenas de princípios ativos foram sintetizados pela indústria.

Esses produtos podem ser divididos entre orgânicos e sintéticos. Os orgânicos contêm uma estrutura de carbono como base e geralmente agem alterando o padrão de crescimento vegetal. Esse grupo é subdividido entre óleos derivados do petróleo e orgânicos sintéticos. Aqueles derivados do petróleo são provenientes do refinamento desse recurso fóssil e podem ser utilizados como inseticidas e herbicidas. Quando utilizados como herbicida, são aplicados na lavoura sem diluição. Herbicidas orgânicos sintéticos são constituídos por

carbono, hidrogênio, nitrogênio, dentre outros elementos. Como exemplos principais de herbicidas sintéticos, temos 2,4-D e glifosato (ELDRIDGE, 2008).

Herbicidas inorgânicos são encontrados na forma de sais, muitas vezes contendo metal em sua composição, o que impede a absorção adequada de água ou movimento de fluidos através das paredes celulares das plantas daninhas. As cargas inorgânicas incluem materiais comuns tais como sulfato de cobre, ácido sulfúrico e clorato de sódio. São extremamente persistentes e causam problemas de poluição do solo (ELDRIDGE, 2008).

Em relação à seletividade, os herbicidas seletivos são utilizados para controlar certas espécies de plantas sem prejudicar outras. Por exemplo, podem atuar somente em plantas dicotiledôneas, preservando as demais plantas de uma cultura de monocotiledôneas. Alguns produtos agem em partes específicas da planta como as folhas, sem atingir as raízes. Os seletivos ainda podem ser divididos em pré e pós-emergentes, dependendo da época que são aplicados no solo. Os pré-emergentes são aplicados antes e os pós-emergentes são aplicados após a estação de crescimento ativo dos vegetais. Exemplos de herbicidas seletivos são: 2,4-D, atrazina e piroclam (ELDRIDGE, 2008).

Os herbicidas não seletivos devem ser utilizados com extrema cautela, pois são indicados para situações em que se faz necessária a remoção completa da vegetação. O espectro de espécies vegetais que podem ser atingidas pelos mesmos é mais amplo do que no caso dos herbicidas seletivos. Alguns deles, mais comumente utilizados são: glifosato, bromacil e paraquate. Tanto os produtos seletivos quanto os não seletivos podem ser divididos em herbicidas de contato e herbicidas sistêmicos (ELDRIDGE, 2008).

A aplicação de herbicidas pode matar apenas partes determinadas da planta que foi pulverizada, como por exemplo, as folhas. Nesse caso, os herbicidas são considerados herbicidas de contato, cuja aplicação deve ser direcionada e feita de forma adequada. Exemplos: bromoxynil, paraquate e diquat. Outros produtos são aplicados na folha, mas são translocados pelo sistema vascular para outras partes do vegetal e causam a morte da planta inteira. São chamados de herbicidas sistêmicos, indicados para o controle de plantas perenes profundamente enraizadas. Como exemplos, temos: MSMA, glifosato, 2,4-D, piroclam, dicamba (ELDRIDGE, 2008).

1.3 Agrotóxicos e riscos para a saúde humana

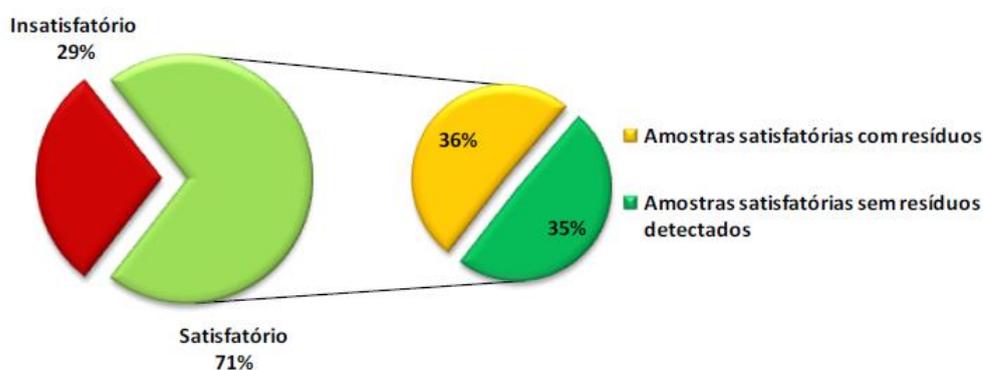
Apesar de auxiliar no aumento da produção agrícola, contribuindo para o desenvolvimento do setor, cuidados na utilização desses tóxicos devem ser tomados. Veiga

(2007) relacionou uma forte relação entre a agricultura e a saúde pública, seja na função de supridora de alimentos, seja pelos riscos à saúde humana causada pelo uso de agrotóxicos.

Os grupos de indivíduos com maior risco de intoxicação pelos agrotóxicos são aqueles que têm contato direto com os produtos no campo. Neles, inserem-se os aplicadores e preparadores de calda e os trabalhadores que têm contato indireto com os pesticidas ao realizar capinas, roçadas, colheitas, etc. Outros grupos de risco incluem: moradores de áreas ao entorno de lavouras, profissionais que trabalham com controle de vetores de doenças, funcionários de empresas dedetizadoras e de indústrias fabricantes de agrotóxicos, assim como pessoas que trabalham com transporte e comércio desses produtos. É importante incluir também os consumidores dos alimentos provenientes das lavouras que, ao longo de vários anos, se alimentam de produtos com resíduos de agrotóxicos (LONDRES, 2011).

O resultado do monitoramento do último Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos- PARA (2011/2012) da ANVISA mostra que 36% das amostras de alimentos de 2011 e 29% das amostras de 2012 apresentaram resultados insatisfatórios e riscos para o consumo (Figura 1). Existem dois tipos de irregularidades, uma quando a amostra contém agrotóxico acima do Limite Máximo de Resíduo (LMR) permitido e outra quando a amostra apresenta resíduos de produtos não autorizados para o alimento pesquisado. Das amostras insatisfatórias encontradas em 2012, cerca de 30% se referem a agrotóxicos que estão em processo de reavaliação pela ANVISA. Em janeiro de 2013, as amostras de culturas que apresentaram os maiores índices de reprovação foram: morango (50%), trigo (47%), pimentão (38%) e pêssego (14%) (ANVISA, 2013; FOOD SAFETY BRAZIL, 2013).

Figura 1 – Distribuição das amostras analisadas de alimentos segundo a presença ou a ausência de resíduos de agrotóxicos (PARA, 2012)



Os efeitos sobre a saúde ocasionados pela exposição aos pesticidas durante o trabalho no campo são produto de um conjunto de variáveis. Dentre elas, destacam-se: características físico-químicas dos produtos (solubilidade, estabilidade, formulação, presença de contaminantes); características genéticas e fenotípicas dos indivíduos expostos (sexo, idade, peso, estado nutricional, predisposição a doenças) e condições de exposição (frequência, dose, quantidade de produtos, forma de exposição) (SOUZA, 2008).

As intoxicações provocadas pelos pesticidas podem ser classificadas em três grupos: intoxicação aguda, subaguda e crônica. A intoxicação aguda é aquela na qual os sintomas são de surgimento rápido, com apenas algumas horas após a exposição a doses elevadas de produtos altamente tóxicos, por curto período. Pode ocorrer de forma leve, moderada ou grave, em função da quantidade de agrotóxico absorvido. Os sinais são facilmente perceptíveis: dores de cabeça, náuseas, vômitos, fraqueza, salivação, tremores, dificuldade respiratória, dores abdominais, convulsões, entre outros. Muitas vezes, esse tipo de intoxicação pode levar à morte (LONDRES, 2011). No Brasil, em 2011, foram registrados 5075 casos de intoxicação aguda por agrotóxicos de uso agrícola com 129 óbitos (SINTOXa e b, 2011). Entretanto, sabe-se que a subnotificação dos casos é um problema muito comum reconhecido pela própria Organização Mundial da Saúde. Estima-se que para cada caso registrado de intoxicação por agrotóxicos, existam outros 50 casos não notificados (LONDRES, 2011).

A intoxicação subaguda ocorre por exposição de leve a moderada a produtos altamente tóxicos e medianamente tóxicos e, em geral os sintomas têm aparecimento mais lento, levando dias ou semanas para surgir. Os sintomas são parecidos com o da intoxicação aguda, porém podem ser mais brandos, tais como: dor de cabeça, fraqueza, mal-estar sonolência, entre outros (LONDRES, 2011).

A intoxicação crônica tem como característica principal o surgimento tardio dos efeitos sobre a saúde. Ocorre após semanas ou anos de exposição pequena ou moderada a um ou vários produtos tóxicos. Os sintomas são muito subjetivos, o que dificulta o diagnóstico. São considerados sinais de alerta para intoxicação crônica: perda de peso, fraqueza muscular, insônia, anemia, depressão, irritabilidade, alterações hormonais ou imunológicas, efeitos reprodutivos (aborto, infertilidade, malformações congênitas), doenças renais, respiratórias ou neurodegenerativas, entre outros. Esse tipo de intoxicação pode provocar danos irreversíveis levando, muitas vezes ao surgimento de doenças graves como o câncer. Os agrotóxicos fazem parte do conjunto de fatores que implicam no aumento do número de casos de câncer no Brasil (LONDRES, 2011).

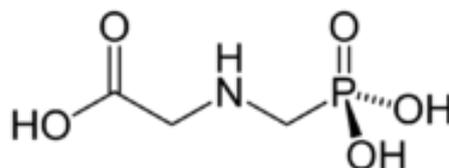
Existem evidências toxicológicas da ação mutagênica e carcinogênica de vários pesticidas. Em particular, aumentos significativos foram encontrados na incidência de tumores dos tecidos linfoides, mieloma múltiplo, linfoma tipo não-Hodgkin, linfoma de Hodgkin e cânceres de pulmão, estômago, fígado e bexiga, além de leucemias (SILVA, 2007; SOUZA, 2008).

Muito embora a pesquisa brasileira tenha avançado em relação ao estudo do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana, pouco se sabe acerca da extensão da exposição e a dimensão dos danos à saúde da população, decorrentes do uso intensivo desses produtos.

1.4 Glifosato

O glifosato (Figura 2) é um herbicida de amplo espectro, ou seja, não seletivo, sistêmico, indicado para o combate a ervas daninhas anuais e perenes em culturas de arroz irrigado, cana-de-açúcar, café, milho, soja, fumo, cacau, seringueira, algodão e também pastagens e na fruticultura. Possui uma representação de 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos (AMARANTE JR et al., 2002).

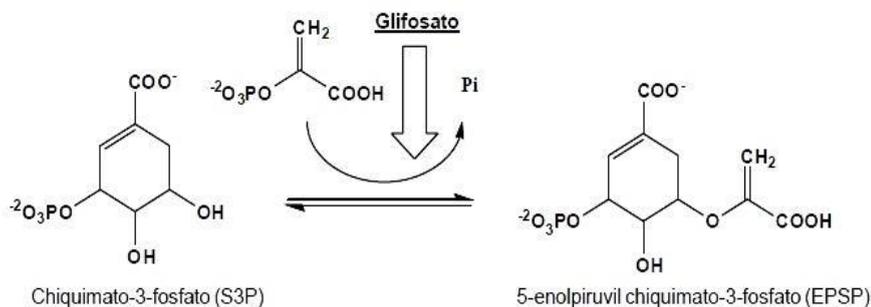
Figura 2 – Fórmula estrutural do glifosato (IUPAC)



Fonte: Souza, 2008

A molécula de glifosato é um análogo aminofosfônico da glicina denominado *N*-(fosfonometil) glicina. Seu peso molecular é de 169,7 g mol⁻¹ e seu mecanismo de ação baseia-se na inibição competitiva da enzima 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que catalisa a transferência do grupo fosfoenolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o xiquimato-3-fosfato (S3P), formando o 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato (EPSP), um intermediário da via de biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 3) (ROMANO, 2009). Essa via para a biossíntese de aminoácidos aromáticos não existe em nenhum membro do reino animal. Devido ao fato de que essa via metabólica existe somente em plantas e microorganismos, o mecanismo de ação não é considerado um risco para a saúde pública pelos fabricantes (CERDEIRA et al., 2007).

Figura 3 – Reação catalisada pela enzima EPSPS envolvendo a transferência do enolpiruvil do PEP para o S3P, formando o EPSP. Na figura, destaca-se a inibição do glifosato



Fonte: Czelusniak et al., 2012

Em 1971, a Companhia Monsanto patenteou uma formulação comercial de glifosato com o nome de Roundup[®]. Essa patente expirou em 2000 e, desde então, o produto passou a ser fabricado também por outras empresas. Segundo o Ministério da Agricultura, existem cerca de 60 formulações à base de glifosato no mercado. Dentre esses produtos fabricados no Brasil, estima-se que a venda anual alcance a marca de 250 milhões de litros. É importante ressaltar que a difusão da soja transgênica tolerante ao glifosato no Brasil contribuiu para o aumento da venda desse produto no país, que saltou de 57,6 mil toneladas para 300 mil toneladas entre os anos 2003 e 2009 (LONDRES, 2011).

1.4.1 Toxicidade do glifosato

Em estudos de toxicidade aguda, o glifosato e seus sais puros exibiram uma baixa toxicidade em animais de laboratório por via oral e dermal com valores de LD50 maiores que 5.000 mg kg⁻¹. Em relação à exposição dermal, foi considerado não-irritante, apesar de induzir irritação nos olhos de coelhos (FAO, 2011).

A ANVISA classifica esse herbicida com base em sua toxicidade aguda como um produto de baixa toxicidade, pertencente ao grupo IV (pouco tóxicos), porém há uma associação do glifosato e suas formulações comerciais a efeitos negativos sobre a saúde humana. Isso ocorre porque, embora o glifosato puro apresente baixa toxicidade, alguns componentes considerados inertes em formulações comerciais podem provocar efeitos tóxicos em células animais. Dentre esses componentes destacam-se as substâncias surfactantes, cuja finalidade é impedir a formação de gotas e o alcance de áreas da planta além das folhas pulverizadas (AMARANTE JR et al., 2002). Estudos determinaram que POEA (polioxietilenamida), uma etilamina usada como adjuvante nesse herbicida pode ser

considerado como o ingrediente ativo na morte de linhagens de células placentárias (JEG3), umbilicais (HUVEC) e renais humanas (293). Esse efeito é maior quando o POEA é combinado com o glifosato na formulação comercial Roundup, devido à interação sinérgica entre os compostos. Adjuvantes presentes na formulação Roundup mudam a permeabilidade celular e amplificam a toxicidade já induzida por glifosato através de apoptose e necrose (BENACHOUR & SÉRALINI, 2009).

Em uma situação de intoxicação aguda por glifosato (via dérmica) pode ocorrer dermatite de contato e, em caso de ingestão de doses elevadas (via oral), pode ocorrer um processo denominado síndrome tóxica, cujos sintomas podem ser: epigastralgia, ulceração ou lesão da mucosa gástrica, hipertermia, anúria, oligúria, hipotensão, conjuntivite, edema pulmonar, choque cardiogênico, arritmias cardíacas, necrose tubular aguda, elevação de enzimas hepáticas, aumento da quantidade de leucócitos, acidose metabólica e hipercalcemia. O composto é excretado principalmente na urina de indivíduos intoxicados (AMARANTE JR. et al., 2002).

Quanto à toxicidade crônica, segundo relatório da FAO (2001), um estudo de longo prazo realizado com glifosato padrão analítico (P.A.) nos quais foi utilizada a dose 30.000 mg kg⁻¹ na dieta de camundongos, mostrou que o princípio ativo levou à redução no crescimento desses animais, incidência de necrose e hipertrofia dos hepatócitos, e aumento da incidência de hiperplasia no epitélio da bexiga urinária. Ratos tratados com 20.000 mg kg⁻¹ também apresentaram problemas no crescimento, aumento no peso do fígado, degeneração ocular e inflamação gástrica.

Estudos apontam que a exposição aos agrotóxicos de forma crônica pode ocasionar danos muitas vezes silenciosos à saúde, tais como mutações genéticas, que resultarão no aparecimento tardio de doenças. Torres e colaboradores (2006) avaliaram a atividade clastogênica *in vivo* em ratos tratados com 100, 200 ou 400 mg kg⁻¹ de glifosato grau analítico (96% de pureza) mediante ensaio de micronúcleos e dano ao DNA avaliado por teste do cometa. Observou-se que as células hematopoiéticas de medula óssea dos ratos tratados com a maior dose apresentaram mutações e danos citogenéticos. Um trabalho utilizando teste do cometa em células humanas GM38 (fibroblastos humanos primários) e HT180 (linhagem proveniente de fibrossarcoma) mostrou que o tratamento com glifosato analítico induziu efeitos genotóxicos sobre essas células tratadas com concentrações entre 4,0-6,5 mmol L⁻¹ e 4,75 – 5,75 mmol L⁻¹, respectivamente (MONROY, 2005).

Existem no mercado diversas formulações de glifosato à venda. A fórmula comercial conhecida como Roundup[®] fabricada pela Monsanto é atualmente campeã de vendas no Brasil

e é comercializada sob a forma de diversos produtos, os quais se diferem quanto à proporção do princípio ativo em sua composição (MONSANTO, 2014). Outros fabricantes também produzem fórmulas comerciais à base de glifosato, como por exemplo: Mata-Mato da Bio Carb Indústria Química Ltda; Glizmax da Dow AgroSciences, entre outros.

1.4.2 Efeitos do Roundup[®] sobre a saúde de mamíferos

Existem diversos trabalhos relacionados na literatura abordando os efeitos do herbicida Roundup[®] sobre a saúde de mamíferos. Estudos com ratos Wistar mostraram que a exposição materna à formulação comercial de glifosato Roundup Transorb[®] perturbou o processo de masculinização da prole através de alterações nos parâmetros histológicos e endócrinos do sistema reprodutor. Essas mudanças estavam associadas principalmente a hipersecreção de andrógenos e aumento da atividade gonadal e produção de espermatozoides, com presença de espermatozoides anormais além de atraso na separação balanoprepucial, marco da puberdade (ROMANO et al., 2009 e 2012). Outro estudo realizado com exposição dos ratos nos períodos pré e pós-natal ao Roundup[®], mostrou que esse herbicida produziu uma diminuição em número dos espermatozoides na cauda do epidídimo e redução da produção diária de esperma na prole, além de uma redução dose-dependente da testosterona presente no soro, um aumento da porcentagem de espermatozoides anormais e sinais de degeneração das espermátides. (DALLEGRAVE et al., 2007).

Estudos em linhagem de células tumorais de Leyding MA-10 de camundongos expostas ao Roundup[®] mostraram a inibição da expressão da proteína StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*), responsável por mediar a etapa limitadora na esteroidogênese, ou seja, o início da síntese de todos os hormônios esteroides (WALSH et al., 2000). Esses resultados caracterizam esse agrotóxico como um possível disruptor endócrino em mamíferos.

Além disso, há na literatura, trabalhos demonstrando que as formulações de glifosato são capazes de induzir efeitos genotóxicos, com influência direta sobre o DNA das células e stress oxidativo. Em linfócitos de sangue periférico bovino, ocorreu aumento significativo no índice de troca de cromátides irmãs (SCE) e também redução dos índices de proliferação e mitose celular (SIVIKOVA, 2006). Em camundongos Swiss CD-1, tratados com injeções intraperitoneais contendo Roundup[®], foi observado um aumento na ocorrência de quebra de fita simples de DNA e alterações cromossomais nas células do fígado e rim. Além disso, houve aumento no número de micronúcleos em células de medula óssea dos camundongos expostos ao herbicida (BOLOGNESI et al., 1997).

Ratos machos tratados com injeções intraperitoneais contendo Roundup® apresentaram danos irreversíveis em seus hepatócitos, perceptíveis através do vazamento de enzimas hepáticas para o sangue, além da indução de stress oxidativo no fígado com aumento nos níveis de óxido nítrico (EL-SHENAWY, 2009). Outro estudo com mitocôndrias isoladas de fígado de rato demonstrou que o tratamento com Roundup® induziu ao colapso do potencial elétrico transmembrana devido ao aumento da sua permeabilidade. O agrotóxico também deprimiu a atividade respiratória através da inibição parcial dos complexos mitocondriais II e III e da atividade da enzima ATPase (PEIXOTO, 2005).

1.4.3 Efeitos do Roundup® sobre a saúde humana

Para investigar os efeitos dos agrotóxicos sobre a saúde humana, faz-se necessária a realização de pesquisas *in vitro* com células humanas, de forma a simular os efeitos sobre o organismo.

Estudos com linhagens de células humanas umbilicais (HUVEC), placentárias (JEG3) e embrionárias (293) mostraram que cinco formulações de Roundup® presentes no mercado europeu foram capazes de induzir necrose e apoptose devido a mudanças na permeabilidade celular. Os autores demonstraram a amplificação da toxicidade celular induzida pelo glifosato devido à presença de adjuvantes nessas formulações, os quais viabilizaram a entrada do princípio ativo nas células, concluindo que os mesmos não são inertes (BENACHOUR & SÉRALINI, 2009).

Trabalhos anteriores realizados pelo mesmo grupo demonstraram que o herbicida Roundup® em doses baixas não tóxicas (a partir de 0,01% V/V correspondente à concentração 210 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glifosato) é um disruptor da enzima aromatase. A inibição direta é dependente da temperatura e foi confirmada em diferentes tecidos e espécies (linhagens de placenta e rim embrionários, testiculares de equinos e extratos placentários frescos humanos). Além disso, o glifosato atua diretamente como um inativador parcial de aromatase microsomal de forma dose-dependente. A citotoxicidade e os efeitos potencialmente perturbadores no sistema endócrino pelo Roundup® são amplificados com o tempo (BENACHOUR et al., 2007). Células de linhagem de fígado humano HepG2, considerada como modelo para estudos dos efeitos da toxicidade de xenobióticos, foram expostas a quatro formulações diferentes de Roundup®, as quais apresentaram também atividade anti-estrogênica, com influência direta sobre a enzima aromatase, inibindo a conversão de andrógenos para estrogênio. Além disso, foi observada a perda de viabilidade e danos ao

DNA dessas células (GASNIER et al., 2009). Esses dados sugerem que a exposição ao Roundup® pode afetar a reprodução humana e o desenvolvimento fetal em caso de contaminação. De fato, uma pesquisa com trabalhadores rurais no Canadá mostrou que a exposição ao glifosato antes da concepção aumenta o risco de aborto espontâneo em 20 a 40% (ARBUCKLE et al., 2001).

O herbicida Roundup® também pode alterar parâmetros sanguíneos. A formulação Roundup Ultra360® incubada com eritrócitos humanos nas concentrações 100-1500 ppm induziu o aumento dos níveis de metaemoglobina após 1 hora de exposição, além de aumentar a peroxidação de lipídios a 500 ppm e hemólise na concentração de 1500 ppm (PIENIAZEC et al., 2004).

As propriedades citotóxicas e genotóxicas de Roundup® foram investigadas sobre células epiteliais bucais humanas (linhagem TR146), visto que muitos trabalhadores são expostos via inalação ao herbicida. A fórmula comercial induziu efeitos agudos a partir de concentrações maiores que 40 mg L⁻¹ após 20 minutos de exposição, identificados através de danos na membrana celular e prejuízos à função mitocondrial. Além disso, a presença de micronúcleos e extrusões nucleares, indicativos de danos ao DNA, foi observada em células expostas por 20 minutos a doses entre 10-20 mg L⁻¹ (KOLLER et al., 2012).

Existem ainda evidências de neurotoxicidade causada por exposição ao Roundup® relatadas em casos pontuais. Um estudo de caso relatou o desenvolvimento de Parkinsonismo em um homem de 52 anos, após o mesmo acidentalmente derramar um herbicida à base de glifosato no corpo (COSTA et al., 2003). Outro caso reportado na China relata o surgimento dessa mesma doença em uma mulher de 44 anos exposta por três anos ao glifosato durante o período em que trabalhou em uma fábrica de agrotóxicos. A síndrome do Parkinsonismo é caracterizada por tremores, hipocinesia, rigidez e instabilidade postural (WANG et al., 2011).

1.5 Células-tronco mesenquimais

As células-tronco são células indiferenciadas, com ampla capacidade de autorrenovação, ou seja, podem se multiplicar por longos períodos sem se especializar em um tipo celular definido. Isso proporciona uma reposição ativa de maneira constante nos tecidos. Outra característica interessante é a capacidade de especializarem nos mais diversos tipos celulares, desempenhando um papel regenerativo em tecidos que sofreram injúria (LEMISCHKA, 2005). Na comunidade científica, são bem caracterizadas: as células-tronco embrionárias, as quais são obtidas do estágio de blástula dos embriões de mamíferos e as

células-tronco adultas, assim denominadas por estarem presentes na vida pós-natal. Entre os tecidos conhecidos por apresentarem células-tronco adultas, a medula óssea foi a mais estudada como fonte tanto de células-tronco hematopoiéticas (*hematopoietic stem cell* – HSC) quanto de células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cell*- MSC). (BYDŁOWSKI et al., 2009).

As MSCs foram descritas primeiramente por Friedestein e colaboradores em 1968, como uma população de células clonogênicas aderentes, provenientes da medula óssea, em formato de espícula, com grande capacidade proliferativa, que definiu como formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-Fs). Em 1991, devido à capacidade de autorrenovação e diferenciação, as células estromais de medula óssea foram denominadas de células-tronco mesenquimais (MSC) por Caplan e colaboradores. Em 2005, a Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs o termo células estromais mesenquimais multipotentes, mantendo a sigla MSC (FRIEDESTEIN et al., 1972; CAPLAN et al., 2001; HORWITZ et al., 2005).

Diversos trabalhos na literatura mostram que as MSCs podem especializar-se em linhagens germinativas diferentes daquelas relacionadas à linhagem mesodérmica. Além de se diferenciarem em osteoblastos, condroblastos e adipócitos, essas células também teriam o potencial de diferenciação endodérmica e neuroectodérmica gerando, por exemplo, neurônios e hepatócitos (KOLF et al., 2007). Em relação às suas funções, as MSCs fornecem suporte estrutural e regulam a passagem de células através dos tecidos. Embora essas células tenham uma capacidade de diferenciação mais limitada que as células-tronco embrionárias, as quais são consideradas totipotentes, as mesmas apresentem como vantagens a facilidade de isolamento e de propagação em cultura e o fato de não serem imunogênicas, devido à baixa expressão de MHC de classe II e de moléculas coestimulatórias (LE BLANC & RINGDÉN, 2005).

Estudos afirmam que as MSCs estão associadas à parede dos vasos sanguíneos contribuindo para a manutenção da homeostasia tecidual e do sistema imune, através de uma proteção dos tecidos injuriados contra respostas imunes acentuadas, promovendo reposição celular e regeneração tecidual (DA SILVA MEIRELLES et al., 2008; CRISAN et al., 2008; SCHMITT et al., 2012). Outros trabalhos presentes na literatura relatam que as MSC apresentam propriedades importantes de imunossupressão e imunorregulação, sendo capazes de modular a função de células do sistema imune inato e adaptativo, podendo induzir tolerância imune (NAUTA & FIBBE, 2007; WILLIAMS & HARE, 2011).

Sabe-se atualmente que as MSCs podem ser encontradas não somente na medula óssea, mas também nos tecidos mesenquimais presentes em todos os órgãos do corpo. Células

com características de células-tronco mesenquimais já foram isoladas de pulmões (SABATINI et al., 2005), líquido amniótico (DE COPPI et al., 2007), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), sangue menstrual (MUSINA et al., 2008), polpa dental (GRONTHOS et al., 2000), sangue periférico (KUZNETSOV et al., 2001), cordão umbilical (SECCO et al., 2008) e tecido adiposo (ZUK et al., 2001).

Em 2006, foram propostos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular três critérios mínimos para definir células-tronco estromais mesenquimais humanas. São eles:

1 – Capacidade de aderência ao plástico quando mantidas em condições padrão de cultivo;

2 – No mínimo, 95% das MSC cultivadas devem expressar os antígenos de superfície CD105, CD73 e CD90 e não devem expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79 α e HLA-DR (não ultrapassando 2% da população positiva para esses marcadores);

3 – Multipotência, ou seja, capacidade de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos sobre condições padrão de diferenciação *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

Para a obtenção de células-tronco da medula óssea, há uma dificuldade devido à dor, morbidade e ao baixo número de células coletadas. Isso tem levado ao uso de fontes alternativas de MSCs para pesquisa. O tecido adiposo humano contém uma fração estromal de fácil isolamento, e as células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo (hASCs- *human adipose-derived stem cells*) podem ser obtidas do lipoaspirado proveniente de cirurgia estética (ZUK et al., 2002).

Assim como as MSCs de medula óssea, as hASCs são capazes de se diferenciar *in vitro* em células da linhagem osteogênica, adipogênica, condrogênica e miogênica. Outros trabalhos demonstraram o potencial de diferenciação dessas células em células endoteliais (PLANAT-BENARD et al., 2004), cardiomiócitos (STREM et al., 2005), células pancreáticas (TIMPER et al., 2006), neurônios (ZUK et al., 2002; ANGHILERI et al., 2008) e hepatócitos (AURICH et al., 2009). Os marcadores antigênicos de superfície das hASCs são semelhantes ao das MSCs, além da vantagem de as hASCs exibirem maior cinética de proliferação e poderem ser cultivadas por mais tempo sem entrarem em senescência (LOCKE et al., 2009).

1.6 Cultivo em meio livre de suplementação animal

A manutenção das atividades metabólicas, crescimento e proliferação das células humanas cultivadas *in vitro* dependem das condições de cultura a que estão submetidas. É necessário que essas condições mimetizem a fisiologia *in vivo*, principalmente em relação a

condições de temperatura, pH, osmolaridade e suprimento de oxigênio. O microambiente adequado para o cultivo celular depende de duas condições principais: 1- o substrato de cultura, ou seja, superfícies que propiciem a ligação e propagação das células; e 2- o meio de cultura, que fornece todos os tipos de moléculas solúveis importantes: nutrientes, sais, hormônios, fatores de crescimento, tamponamento e oxigenação (BRUNNER et al., 2010).

O soro fetal bovino (SFB) é considerado um suplemento indispensável utilizado ubiquamente em meios de cultura celular. Entretanto, em sua composição, há proteínas xenogênicas que podem ser internalizadas ou aderir à superfície das células-tronco provocando reações imunológicas (SPEES et al., 2004; MARTIN et al., 2005; HEISKANEN et al., 2007). Adicionalmente, existe um risco considerável de o SFB conter endotoxinas, microorganismos patogênicos, como vírus, bactérias e príons (MANELLO & TONTI, 2007), os quais são indesejáveis para o cultivo. Por fim, é importante destacar que os lotes desse suplemento podem apresentar variações nas concentrações de nutrientes e seu uso representa um problema ético devido à morte de milhões de fetos para sua obtenção (BRUNNER et al., 2010).

Diante desses problemas, estudos recentes têm tentado substituir a suplementação animal pela humana. Na literatura, diversos estudos relatam o uso de suplementos como soro humano alogênico ou autólogo (LIN et al., 2005; PÉREZ-ILZARBE et al., 2009; PAULA et al., 2013), o plasma humano autólogo (LIN et al., 2005), soro humano AB alogênico ou autólogo (KOCOAEMER et al., 2007; LINDROOS et al., 2010), plasma rico em plaquetas – trombina ativada (KOCOAEMER et al., 2007; KAKUDO et al., 2008, CHO et al., 2011, AMABLE et al., 2014), plasma autólogo derivado da medula óssea (SCHECROUN & DELLOYE, 2004; SUN et al., 2008), lisado plaquetário humano (PÉREZ-ILZARBE et al., 2009) e meios de cultura quimicamente definidos, livres de soro (VAN DER VALK et al., 2010; GOTTIPAMULA et al., 2013).

Para a realização desse trabalho, foi escolhido como suplemento o plasma alogênico humano (PH). Estudos presentes na literatura mostram que o plasma humano, quando utilizado em cultivo celular, é capaz de induzir o aumento da proliferação de células-tronco humanas *in vitro* (KAKUDO et al., 2008 e AMABLE et al., 2014). Outras vantagens do uso dessa suplementação são: facilidade de obtenção, como por exemplo, por doações de bolsas dos bancos de sangue e a eliminação de fatores de origem animal da cultura de células. Como uma possível desvantagem, deve-se levar em consideração a qualidade do plasma, uma vez que este deve estar livre de contaminação por agentes infecto-contagiosos causadores de doenças humanas, exigindo um controle de qualidade na obtenção do sangue de doadores.

2 JUSTIFICATIVA

A realização desse trabalho justifica-se pela necessidade de se fomentar a pesquisa na área da saúde humana relacionada aos efeitos agudos e crônicos do uso de agrotóxicos, considerando que o Brasil se situa há seis anos no primeiro lugar do *ranking* mundial no consumo desses produtos (2008-2013) (TERRA, 2014).

O uso indiscriminado dos mais diversos princípios ativos e produtos no país é um problema de saúde pública, devido ao grande número de doenças crônicas e graves correlacionadas, tais como: malformações congênitas, efeitos deletérios sobre os sistemas nervoso, hematopoiético, cardiorrespiratório, geniturinário, gastrointestinal, hepático, endócrino, imunológico, e até mesmo o risco aumentado do desenvolvimento do câncer (SILVA J.M. et al., 2005). Esses problemas tornam extremamente necessárias constantes reavaliações dos potenciais efeitos dos agrotóxicos para a saúde humana.

Há seis anos, o glifosato integra uma lista de produtos que precisam passar por uma reavaliação toxicológica. Entretanto, esse processo, coordenado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) tem enfrentado problemas devido às ações judiciais movidas pelos fabricantes desse herbicida e à grande demanda de atividades realizadas pelo órgão (TERRA, 2014). Por isso, é importante que mais pesquisas sobre os efeitos tóxicos desse herbicida sejam realizadas para uma resolução rápida desse entrave. Estudos internacionais mostram que a toxicidade do glifosato é aumentada na presença de adjuvantes da formulação comercial (BENACHOUR & SÉRALINI, 2009), justificando a escolha do Roundup® para a realização desse trabalho.

Além disso, nos últimos anos, células-tronco humanas vêm sendo utilizadas em ensaios toxicológicos e de *drug screening*, devido a sua sensibilidade aos compostos químicos (KANG & TROSKO, 2011; SCANU et al., 2011). Em 2006, Hoogduijn e colaboradores realizaram um trabalho demonstrando o efeito de inseticidas anticolinérgicos em células-tronco mesenquimais humanas (MSCs). Foi observado que esses pesticidas influem na regulação dos processos de diferenciação das MSCs. Assim, é possível que as células-tronco mesenquimais sejam um bom modelo para estudos dos efeitos de agrotóxicos sobre a saúde humana devido a uma série de funções importantes desempenhadas por essas células no organismo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

O objetivo geral desse trabalho foi averiguar a toxicidade da formulação comercial do herbicida glifosato sobre células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hASCs) em um modelo de exposição agudo e crônico.

3.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar fenotipicamente as células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hASCs) cultivadas em meio de cultura suplementado com plasma humano;
- b) Avaliar a viabilidade das células-tronco derivadas de tecido adiposo humano cultivadas por curto e longo prazos na presença do agrotóxico em estudo;
- c) Investigar a indução de apoptose e necrose em hASC expostas a curto prazo à formulação comercial de glifosato, visando compreender os mecanismos de toxicidade deste herbicida;
- d) Avaliar a capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica das hASC cultivadas na presença ou ausência do agrotóxico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento e cultivo das células-tronco derivadas de tecido adiposo

O tecido adiposo humano foi obtido conforme o consentimento de pacientes saudáveis submetidos à cirurgia de lipoaspiração no Núcleo de Cirurgia Plástica situado em Belo Horizonte, MG, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Plataforma Brasil- CAAE: 22912213.3.0000.5149). Geralmente estas amostras são retiradas dos flancos direitos e esquerdos e regiões infra e supraumbilical. As amostras foram coletadas em seringas estéreis e levadas com rapidez ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG para seu processamento.

Em capela de fluxo laminar, o lipoaspirado foi distribuído para tubos cônicos de polietileno de 50 mL estéreis e, em seguida, centrifugado por 6 minutos a 234x g em tampão salina fosfato 0,15 mol L⁻¹, pH 7,2 (PBS) para lavagem. As porções contendo óleo, células sanguíneas e PBS foram retiradas e o restante do tecido contendo gordura foi tratado para digestão da matriz extracelular com solução de colagenase tipo I 0,10% (Life Technologies) em PBS, por 1 hora, em estufa a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂. Durante esse período, a cada 15 minutos, o tubo contendo a gordura era agitado vigorosamente. Após 1 hora, o tubo foi centrifugado a 234 g por 10 minutos. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo a fração celular foi ressuspensão em meio de cultura DMEM suplementado com 10% V/V plasma humano (PH) e transferido para garrafas de cultura celular T-25 (Sarstedt®) que foram mantidas em estufa à 37 °C, atmosfera úmida e 5% V/V CO₂. Após dois dias de cultivo, o conteúdo das garrafas de cultura foi transferido para tubos de polietileno (15 mL) e centrifugado a 234x g à 24 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado formado ressuspensão em meio de cultura 10% V/V plasma humano e acondicionados em novas garrafas de cultura celular T-25.

A cada dois dias o meio de cultura foi removido e as células lavadas com 10 mL de PBS para remoção de células sanguíneas residuais e não aderentes. Quando as células atingiram 80% de confluência, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas novamente com 10 mL de PBS e tratadas com 0,5 mL de tripsina 0,05% m/V EDTA (LifeTechnologies®), por 5 minutos. Após a ação da tripsina, esta foi inativada com meio de cultura contendo plasma e a suspensão formada foi dividida em novas garrafas de cultura

celular T-75. As células foram expandidas, dessa maneira, até a 4^a e 5^a passagem para serem utilizadas nos experimentos, mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium high-glucose*) suplementado com plasma humano em atmosfera umidificada, a 37 °C e 5% CO₂.

4.2 Meios de cultura celular

Os meios de cultura utilizados nesse trabalho foram preparados com suplementação livre de soro animal (*animal-serum free conditions*), visando à eliminação de elementos xenobióticos da cultura.

4.2.1 Meio de cultura DMEM

As células-tronco isoladas do lipoaspirado foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium high-glucose*, Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mmol L⁻¹ de bicarbonato de sódio (Vetec); 100 U mL⁻¹ de penicilina, 0,1 mg mL⁻¹ de estreptomicina e 0,25 µg mL⁻¹ de anfotericina B (PSA - Sigma-Aldrich); 60 mg L⁻¹ de gentamicina (Schering-Plough). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, os meios foram filtrados com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm (Millipore). A suplementação do meio foi realizada com plasma humano 10% V/V.

4.2.2 Obtenção de plasma humano para suplementação do meio de cultura

As bolsas de plasma foram obtidas da Clínica Romeu Ibrahim de Carvalho Ltda, Juiz de Fora- MG. O plasma obtido do sangue total com anticoagulante (CPDA-1 - ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio e dextrose) foi transferido para tubos cônicos de polietileno de 50 mL onde foi adicionada solução de CaCl₂ (cloreto de cálcio) 0,025 mol L⁻¹. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 15 minutos e armazenados em geladeira por 24 horas. Posteriormente, foi feita centrifugação a 1.465 g por 10 minutos e a rede de fibrina formada foi retirada. O sobrenadante foi coletado, inativado a 56 °C em banho-maria, por 30 minutos e a seguir acrescentado ao meio de cultura DMEM em uma concentração correspondente a 10% do volume total (DMEM 10% PH).

4.2.3 Meio Osteogênico

Nos experimentos de diferenciação das células tronco derivadas de tecido adiposo, utilizamos meio osteogênico composto por DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium high-glucose*, Sigma-Aldrich) suplementado com 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dexametasona (Aché), 10 mmol L^{-1} de β -glicerofosfato (Sigma), 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico (Sigma) e 10% de plasma humano (ZHENG et al., 2013). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 μm .

4.2.4 Meio Adipogênico

Na composição do meio adipogênico para diferenciação celular, utilizamos DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium high-glucose*, Sigma-Aldrich[®]) suplementado com 0,1 μM de dexametasona (Aché[®]), 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de indometacina (Sigma[®]), 100 UI de insulina (Eli Lilly), 0,5 mmol L^{-1} de isobutil-metilxantina (Sigma[®]) e 10% de plasma humano (SEKIYA et al., 2004). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 μm .

4.3 Diluição da formulação comercial Roundup[®] e exposição das hASCs ao herbicida

Nesse trabalho, utilizamos o produto comercial Roundup Original[®] sob a forma concentrada solúvel com equivalente ácido de *N*- (fosfometil) glicina (glifosato) na concentração 360 g L^{-1} . O seu número de registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é 898793, e o produto pertence à classe toxicológica III- Medianamente Tóxico e possui potencial de periculosidade ambiental grau III- Perigoso ao Meio Ambiente (MONSANTO, 2014).

As hASCs foram expostas às diferentes concentrações do herbicida, o qual foi diluído em meio DMEM em concentrações decrescentes partindo de uma solução concentrada inicial 1% V/V, e avaliadas pelo ensaio de viabilidade celular (item 4.4). Tal proporção de 1% é a recomendada para o preparo da calda a ser aplicada na maioria dos cultivares para os quais o glifosato é recomendado (MONSANTO 2014b). As diluições em nove concentrações decrescentes do herbicida no intervalo de 1% a 0,01% V/V compreendem 3.600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do glifosato, o seu princípio ativo.

4.4 Ensaio de Viabilidade celular

A viabilidade das hASC foi mensurada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), cujo princípio se baseia na capacidade das enzimas desidrogenases, presentes em células viáveis, em converter o sal de MTT em cristais de formazan. O número de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de cristais produzidos (MOSMANN, 1983).

As células cultivadas no meio de cultura DMEM suplementado com plasma humano, foram plaqueadas em placas de 24 poços (TPP) na densidade de 5×10^3 células/poço contendo 1 mL de meio de cultura. Após 24 horas, esse meio de cultura foi substituído pelos meios correspondentes aos tratamentos conforme descrito no item anterior. As células foram incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂ em diferentes tempos: 24h, 48h, 72h, 7, 14 e 21 dias. O meio foi renovado a cada dois dias de cultivo.

Ao término de cada período de incubação, o meio de cultura foi removido sendo adicionado 210 µL/poço do respectivo meio de cultura DMEM. Em seguida, foram acrescentados 170 µL/poço de solução de MTT (5 mg mL⁻¹) (LifeTechnologies®) e a placa foi incubada em estufa a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas. As células foram observadas ao microscópio de luz (MOTIC AE2000) para visualização dos cristais de formazan. Os cristais formados foram solubilizados por meio da adição de 210 µL/poço de uma solução de SDS 10% HCl (ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹ - 10% V/V de dodecil sulfato de sódio em água) seguido de incubação em estufa a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 18 horas. Após esse período, 100 µL de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços de fundo reto (Nunc®), em triplicata, e a densidade ótica foi mensurada no espectrofotômetro a 595 nm.

Para estudo dos efeitos agudos na viabilidade celular, as hASCs foram expostas a curto prazo ao Roundup®: 24, 48 e 72 horas. A IC₅₀ do herbicida também foi determinada pelo ensaio de metabolização do MTT após um tempo de exposição de 24 horas. Para estudos dos efeitos crônicos, decorrentes da exposição ao herbicida por um tempo mais prolongado, a viabilidade das hASCs foi mensurada semanalmente por até 21 dias em meios com diferentes composições ou tratamentos, conforme descrito a seguir: DMEM 10% PH (controle); DMEM 10% PH + Roundup® (teste); Meio Adipogênico 10%PH (controle); Meio Adipogênico 10%PH + Roundup® (teste); Meio Osteogênico 10% PH (controle) e Meio Osteogênico 10% PH + Roundup® (teste). A dose escolhida para as análises crônicas foi a de 36 µg mL⁻¹,

correspondente a 100 vezes menos a quantidade de glifosato que é aplicada na lavoura. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 Curva de crescimento celular

A curva de crescimento das hASCs cultivadas no meio de cultura DMEM suplementado 10% de PH foi determinada pela contagem do número de células em tempos definidos. A partir da realização desse ensaio, é possível calcular o tempo de duplicação celular. No tempo zero, 1×10^4 células, na 4ª passagem, foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂ pelos seguintes intervalos de tempo: 1, 3, 7 e 9 dias.

Ao final de cada intervalo, as células foram removidas das placas com 250 µL de tripsina 0,05% EDTA. Após 5 minutos na estufa a 37 °C, 5% CO₂, a atividade da tripsina foi inativada com meio DMEM. Posteriormente, foram centrifugadas a 234x g por 6 minutos, ressuspendidas em 1 mL de DMEM 10% PH e contadas em câmara de Neubauer.

O tempo de duplicação das células cultivadas foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$y = (T2 - T1) \times \log_{10}2 \div \log_{10}(N2 \div N1)$$

na qual,

y: tempo de duplicação;

T2: horário de contagem das células;

T1: horário de plaqueamento das células;

N2: número de células contadas nos tempos definidos;

N1: número de células plaqueadas.

4.6 Atividade da enzima fosfatase alcalina

A atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) foi avaliada por meio do ensaio de BCIP-NBT (LifeTechnologies®). Trata-se de uma reação cromogênica decorrente da clivagem do grupamento fosfato do BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato *p*-toluidina) pela FA produzida pelas células. Essa reação produz uma coloração azulada e um próton que, por sua vez, reduz o NBT (nitroblue tetrazólio clorídrico), formando um precipitado insolúvel de cor púrpura (VALÉRIO et al., 2004).

As hASCs, cultivadas em meio de cultura DMEM suplementadas com PH na quarta passagem, foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 5×10^3 células/poço contendo 1 mL de meio de cultura correspondentes aos seguintes tratamentos: DMEM 10% PH (controle); DMEM 10% PH + Roundup[®] (teste); Meio Osteogênico 10% PH (controle) e Meio Osteogênico 10% PH + Roundup[®] (teste). Em seguida, foram incubadas a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 1, 7, 14 e 21 dias. O meio foi renovado a cada dois dias de cultivo.

Ao término de cada período de incubação, o meio de cultura foi descartado, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) 0,15 mol L⁻¹, pH 7,2 e incubadas com 200 µL/poço da solução de BCIP-NBT (preparada de acordo com as instruções do fabricante) a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas.

Após o período de incubação, os precipitados de cor púrpura formados foram visualizados em microscópio de luz. Em seguida, foram adicionados 210 µL/poço de SDS 10%-HCl para a solubilização dos precipitados. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 18 horas. Após este período, um volume de 100 µL de cada poço foi transferido, em triplicata, para uma placa de 96 poços e a densidade ótica foi medida em espectrofotômetro a 595 nm. Durante o experimento, todos os passos foram executados em condições de mínima luminosidade.

4.7 Caracterização do imunofenótipo das hASCs

As hASCs cultivadas em DMEM suplementado com plasma humano foram caracterizadas por citometria de fluxo pela análise da expressão das moléculas de superfície celular CD105, CD73 e CD90, marcadores comuns de MSCs. Para verificar a existência de contaminações na cultura com células-tronco hematopoiéticas, também foi analisada a presença das moléculas de superfície celular deste tipo celular: CD34, CD45, CD14 e CD19. As células também foram caracterizadas em relação à expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe II: HLA-DR (DOMINICI et al., 2006)

As células, na quarta passagem, foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 células/poço em placa de 96 poços (fundo em U) e incubadas com 0,4 µg de anticorpos primários (Tabela 2) a 4 °C, por 30 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 0,15 mol L⁻¹, pH 7,2 e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-IgG de camundongo feito em cabras (Life Technologies), na diluição de 1:500 a 4 °C por 30 minutos. Os anticorpos que já possuíam ligação com algum fluorocromo não foram incubados com

anticorpo secundário. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS 0,15 mol L⁻¹ e pH 7,2 e fixadas em formaldeído a 4% (Cromaline). Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho *versus* granulosidade com a finalidade de estabelecer a população a ser analisada.

Tabela 2 – Anticorpos primários utilizados na imunofenotipagem por citometria de fluxo

Antígeno	Tipo	Espécie	Conjugado	Fornecedor	Diluição
CD105	Monoclonal	Camundongo	FITC	BD [®] Biosciences	1:20
CD73	Monoclonal	Camundongo	PE	BD [®] Biosciences	1:10
CD90	Monoclonal	Camundongo	-	BD [®] Biosciences	1:41
CD34	Monoclonal	Camundongo	-	Santa Cruz	1:20
CD45	Monoclonal	Camundongo	-	BD [®] Biosciences	1:62
CD14	Monoclonal	Camundongo	-	BD [®] Biosciences	1:62
CD19	Monoclonal	Camundongo	-	BD [®] Biosciences	1:62
HLA-ABC	Monoclonal	Camundongo	FITC	Abcam	1:10

A aquisição dos dados foi feita por meio do citômetro de fluxo Guava easyCyte 6-2L (Merck Millipore[®]). Foram obtidos 5000 eventos, em triplicata, e os dados foram analisados no programa FlowJo. Primeiramente, a população de células de cada cultura a ser avaliada foi delimitada a partir do gráfico de tamanho *versus* granulosidade gerado pela análise das células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação. Posteriormente, um gráfico de histograma foi criado para determinar a região do controle negativo de fluorescência referente às células incubadas apenas com o anticorpo secundário. Definidos estes parâmetros, foram realizadas as análises das células marcadas, com anticorpos primários e secundários.

4.8 Indução da diferenciação osteogênica

Para promover a diferenciação osteogênica, as hASCs, na quarta passagem, foram semeadas na densidade de 1×10^4 células/poço em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio osteogênico 10% PH com e sem adição de Roundup[®] (na concentração $36 \mu\text{g mL}^{-1}$). As placas foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, atmosfera úmida e 5% CO_2 , por 1, 7, 14 e 21 dias. Como controle, as células também foram cultivadas no meio de cultura DMEM, com e sem adição de agrotóxico, na ausência dos fatores indutores, nas mesmas condições. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias. Os ensaios para comprovar a diferenciação foram realizados após o término de cada período de incubação e estão descritos a seguir. Todas as culturas e experimentos envolvendo o meio de diferenciação osteogênico foram realizados em condições de mínima luminosidade. Para avaliar a atividade da FA durante a indução da diferenciação osteogênica, foi realizado o ensaio de BCIP/NBT após 1, 7, 14 e 21 dias, conforme descrito no item 4.6.

4.8.1 Avaliação da mineralização e expressão gênica na diferenciação osteogênica

Para avaliar a mineralização durante a indução da diferenciação osteogênica foi realizada a coloração pelo método de *Von Kossa* (SHEEHAN & HRAPCHAK, 1980).

Ao término do período de 21 dias de indução da diferenciação osteogênica, as células foram lavadas com PBS $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2 e fixadas com álcool etílico 70% por 24 horas. Após a fixação, as células foram lavadas abundantemente com água destilada. Foi adicionado 1 mL/poço de solução de 5% de nitrato de prata (AgNO_3) (Vetec[®]) em água e as células foram expostas a luz ultravioleta, por 1 hora. A solução de AgNO_3 foi removida e as células foram lavadas com água destilada para posterior adição de solução de 5% de tiosulfato de sódio (Cinética Química Ltda) em água, por 5 minutos. Foi realizada, novamente, lavagem abundante com água destilada e as células foram coradas com eosina por 40 segundos. Foi feita a observação ao microscópio de luz e fotodocumentação (OLYMPUS IX70) para demonstração da presença de mineralização indicada pela coloração negra ou marrom.

Após 21 dias de indução da diferenciação osteogênica, foi realizada a extração do RNA, a síntese da primeira fita de cDNA e a reação em cadeia da polimerase (PCR) a fim de comprovar a diferenciação por meio da amplificação específica de fragmentos dos genes que codificam para FA, osteopontina, *runx2* e colágeno tipo I.

4.8.2 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído das células utilizando-se 1 mL do reagente Trizol (LifeTechnologies®) por poço da placa de 6 poços seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi solubilizado em água tratada com dietilpircarbonato (DEPC) (LifeTechnologies®). A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280nm em nanodrop (Multiskan Go-Thermo® Scientific) e a qualidade do RNA foi testada em gel de agarose 1%. (Sigma-Aldrich®). As amostras foram estocadas a -80°C até o momento de uso.

As amostras de RNA foram tratadas com DNase (RQ1 DNase Promega) a 37 °C por 30 minutos em tampão apropriado. A seguir, foi feito um passo de purificação do RNA com fenol-clorofórmio (Sigma-Aldrich®) e a precipitação com etanol.

4.8.3 Síntese da primeira fita de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir do RNA total, utilizando-se o RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, 2 µg de cada amostra de RNA total foi incubado com 0,5 µg de oligo (dT)₁₈ a 65 °C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados às amostras, 5X *reaction buffer*, 20 unidades Ribolock® RNase inhibitor, 2 µL de dNTP mix (10mM) e 200 unidades da enzima RevertAid® H Minus M-MuLV RT e, em seguida, as amostras foram incubadas por 60 minutos a 42 °C. A reação foi interrompida pelo aquecimento a 70 °C por 5 minutos.

4.8.4 Reação em cadeia da polimerase

A primeira fita de cDNA sintetizada foi utilizada na reação em cadeia da polimerase (PCR) objetivando a amplificação específica de fragmento dos genes codificantes das proteínas FA, osteopontina, runx2 e colágeno tipo I. Como controle positivo da reação também foi amplificado o segmento gênico que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), enzima expressa constitutivamente pelas células. Para reações de 10 µL de volume final, foram utilizados: 1X Green Go Taq Reaction Buffer, 25 µmol L⁻¹ de dNTP, 2 mmol L⁻¹ MgCl₂, 0,5 µmol L⁻¹ dos iniciadores (*primers*) específicos, 1 U de GoTaq

DNA polimerase (Promega[®]) e a quantidade de cDNA correspondente a 2,5 µg µL⁻¹. Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 3.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (PTC-100 MJ Research, Inc.) programado para um aquecimento inicial de 95 °C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 45 segundos à temperatura de anelamento específica para cada par de *primer*, 72 °C por 45 segundo. Para uma extensão completa dos produtos amplificados, adicionou-se um passo final de 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram resolvidos em gel de agarose 1% *m/V*, corados com brometo de etídio (5 µg mL⁻¹) e analisados em transluminador de luz ultravioleta UVP, seguida da aquisição de imagens.

4.9 Indução da diferenciação adipogênica

Na finalidade de promover a diferenciação adipogênica, as hASCs, na 4^a passagem, foram semeadas na densidade de 1×10⁴ células/poço em placas de 6 poços contendo 2 mL do meio adipogênico 10% PH com e sem adição de Roundup[®] (na concentração 36 µg mL⁻¹). As placas foram incubadas a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 21 dias. Como controle, as células também foram cultivadas no meio de cultura DMEM com e sem adição de agrotóxico, na ausência dos fatores indutores, nas mesmas condições. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias. Os ensaios para comprovar a diferenciação foram realizados ao término do período de indução e estão descritos a seguir.

4.9.1 Detecção do acúmulo intracelular de lipídeos

A coloração com *Oil Red O* foi realizada a fim de confirmar a diferenciação adipogênica por meio da coloração de lipídeos presentes no interior das células. Após 21 dias de indução da diferenciação adipogênica, o meio de cultura foi removido dos poços e estes foram lavados com 2 mL de PBS 0,15 mol L⁻¹, pH 7,2. Após lavagem, as células foram fixadas com formalina 10% (Cromaline) por 60 minutos, à temperatura ambiente. Foi preparada uma solução de uso do *Oil Red O* (Thermo Scientific) composta por 3 partes da solução estoque (300 mg de *Oil Red O* em 100 mL de isopropanol 99% *V/V*) para 2 partes de água destilada. Após o preparo, essa solução de uso foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, filtrada em papel filtro. Após o período de fixação, a formalina foi removida dos poços e estes foram lavados com 2 mL de água destilada. Foram adicionados 2 mL de isopropanol 60% *V/V* (Vetec[®]) por poço e a placa foi incubada por 5

minutos à temperatura ambiente. O isopropanol foi retirado e foram adicionados 2 mL da solução de uso do corante por poço. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, o *Oil Red O* foi removido e os poços foram lavados com água destilada. Após lavagem, foram adicionados 2 mL de hematoxilina por poço, seguido de incubação por 1 minuto à temperatura ambiente. A hematoxilina foi removida e os poços foram lavados com água destilada. A seguir, foram adicionados 2 mL de água destilada e foi feita a observação em microscópio de luz e a fotodocumentação (OLYMPUS IX70). Os lipídeos foram corados em vermelho.

4.9.2 Análise da expressão de genes que codificam para leptina, transportador de glicose GLUT4 e receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPARG2)

Após 21 dias de indução da diferenciação adipogênica, foi realizada a extração do RNA, a síntese do cDNA e a PCR a fim de comprovar a diferenciação por meio da amplificação específica de fragmentos dos genes codificantes para leptina, transportador de glicose GLUT4 e receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPARG2). Todos os procedimentos foram realizados conforme descrito anteriormente para a diferenciação osteogênica. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – *Primers utilizados para PCR*

Gene alvo*	Sequência (5'-3')	Fragmento(bp)	θ anelamento(°C)
<i>ALPL</i>	F: TGGTGAAGGAGGCAGAATTGAC R: CAGGACGCTCAGGGGGTAGA	581	56
<i>COL1A1</i>	F: TGACGAGACCAAGAAGCTG R: CCATCCAAACCACTGAAACC	599	62
<i>RUNX2</i>	F: CCAGGCAGTTCCCAAGCATT R: TCCATCAGCGTCAACACCATC	377	53
<i>SPP1</i>	F: GCCGAGGTGATAGTGTGGTT R: TGCTTGTGGCTGTGGGTTTC	253	51
<i>GLUT4</i>	F: TCTTCGAGACAGCAGGGGTA R: AGATGGCCACAATGGAGACG	228	60
<i>LEP</i>	F: GAACCCTGTGCGGATTCTTG R: TGAAGTCCAAACCGGTGACT	177	60
<i>PPARG</i>	F: CTCCTATTGACCCAGAAAGCGA R: GCAGGCTCCACTTTGATTGC	310	60
<i>GAPDH</i>	F: ACATCGCTCAGACACCATG R: TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	143	60

*ALPL – fosfatase alcalina; COL1A1 - colágeno tipo I; RUNX2: fator de transcrição runx2; SPP1 – osteopontina; GLUT4 - transportador de glicose GLUT4; LEP – leptina; PPARG - Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos PPARG2; GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; bp – pares de base (MARTINS et al., 2014).

4.10 Detecção do tipo de morte celular induzida pelo tratamento com agrotóxico

O tipo de morte celular (apoptose ou necrose) induzida pelo tratamento das hASCs com Roundup® foi analisada pela marcação das mesmas com Anexina V- Alexa Fluor 488 e iodeto de propídio, utilizando-se o kit *Annexin V/ Dead Cell Apoptosis Kit* (Life Technologies). Em seguida, foi realizada a fotodocumentação ao microscópio de fluorescência (OLYMPUS IX-70) e posterior análise pelo programa Image J. Como controle

positivo do experimento de morte celular, foi utilizada a droga Cisplatina (*cis-diaminodichloroplatina*), um agente antineoplásico e citotóxico cujo mecanismo de ação baseia-se na ligação ao DNA, com formação de adutos, originando ligações intra e intercadeias que induzem alterações estruturais. O seu efeito citotóxico é, assim, causado pela inibição dos processos de transcrição e replicação, induzindo a apoptose. A droga também é capaz de induzir necrose dependendo do tipo celular, estado metabólico e da dose utilizada (GONZALES et al., 2001; FUERTES et al., 2003; XU et al., 2014).

Para a realização desse ensaio, as hASCs, na quarta passagem, foram semeadas na densidade de 4×10^4 células por poço, em placas de 24 poços, em meio de cultura DMEM. No dia seguinte, após a adesão das células, o meio foi trocado pelos meios correspondentes aos seguintes tratamentos: DMEM 10% PH (controle negativo), DMEM 10% PH + Cisplatina $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (controle positivo), DMEM 10% PH + Roundup[®] $36 \mu\text{g mL}^{-1}$ (teste). Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS (tampão fosfato) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, 1 mL de tampão enriquecido com íons cálcio para ensaio de Anexina V (*5X annexin-binding buffer*) foi acrescentado a cada poço da placa. Posteriormente, foram pipetados em cada poço, 4 μL de Anexina V conjugada a Alexa[®] Fluor 488 e 2 μL de Iodeto de Propídio em condições de mínima luminosidade. A placa foi incubada na estufa de CO_2 a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora. Após esse período, seguiu-se a fotodocumentação em microscópio de fluorescência utilizando o *software* ImagePro[®] e a análise dos dados utilizando o *software* ImageJ[®].

Dessa forma, foram capturadas imagens de três campos diferentes de cada poço da placa, correspondentes a cada tratamento utilizando-se o *software* ImagePro[®]. Após a aquisição das imagens, foi realizada a marcação e contagem de células totais (não coradas, imagens feitas em campo claro), células apoptóticas (marcadas em verde), necróticas (marcadas em vermelho) e duplo-marcadas (verde e vermelho) com auxílio do ImageJ[®]. O número de células totais contadas por campo foi normalizado para 100%. A partir dessa porcentagem, foram determinadas as porcentagens correspondentes ao número de células marcadas para apoptose (em verde) e necrose (em vermelho), assim como àquela correspondente ao número de células duplo-marcadas (indicativo de apoptose tardia ou necrose). O experimento foi realizado em triplicata.

4.11 Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism[®] 5. Com o objetivo de avaliar a significância das diferenças observadas entre os grupos expostos ao agrotóxico avaliados pelo ensaio de MTT (exposição aguda), foi realizado o procedimento de análise One-way ANOVA (análise unidirecional de variância) com pós-teste de Dunnet. A análise por ANOVA é uma técnica utilizada para comparar as médias de três ou mais amostras. Já o pós-teste de Dunnet é utilizado para comparações das médias dos grupos tratamentos com o grupo controle ou referencial. Para análise da metabolização de MTT ao longo do tempo de cultivo (tratamento crônico), foi aplicado o teste ANCOVA (análise de covariância), um modelo linear geral que combina análise de variância e regressão. Esses mesmos grupos, assim como aqueles dos ensaios de atividade de fosfatase alcalina também foram analisados utilizando-se o método Two-way ANOVA, que analisa a influência de duas variáveis independentes categóricas diferentes (no caso, tempo e concentração de agrotóxico) em função de uma variável dependente contínua (no caso, metabolização de MTT, dada em absorbância). Os dados de morte celular foram avaliados por One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, o qual consiste na realização de um teste *t* para cada par de médias avaliadas. Esse pós- teste foi utilizado para comparação individual dos tratamentos em relação ao controle. Os resultados foram expressos graficamente em média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento e cultivo das hASCs

Para a obtenção das células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo, o lipoaspirado de voluntários foi submetido a processamento mecânico e químico. O processamento levou a obtenção de uma população heterogênea de células, aderentes, de aspecto fibroblastóide, em formato de espícula e células não aderentes. Após lavagens com PBS e trocas do meio DMEM 10% PH, seguidas de expansão até a quarta ou quinta passagens, as células não aderentes foram removidas do cultivo celular. Assim, obteve-se uma população homogênea de células aderentes, fibroblastóides, com capacidade de autorrenovação e formação de colônias. Essas características correspondem àquelas relacionadas às células-tronco mesenquimais (DOMINICI et al., 2006; P.BOURIN et al., 2013) (Figura 4). As células provenientes foram então mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de plasma humano, e armazenadas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C. Ao atingirem a quarta passagem, considerada a fase de crescimento e homogeneidade ideal, a cultura foi utilizada nos experimentos desse trabalho.

Figura 4 – Imagem do aspecto morfológico das células-tronco mesenquimais humanas extraídas do produto de lipoaspirado, apresentado na quarta passagem.

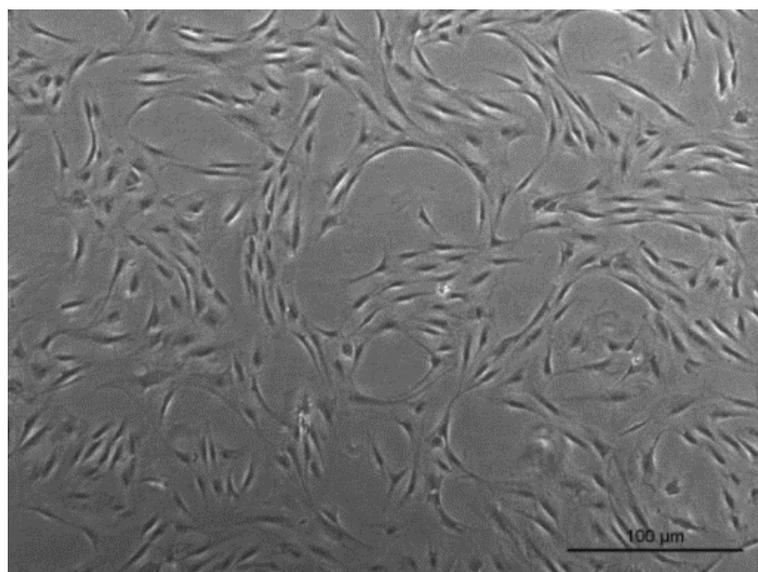


Imagem adquirida utilizando-se o microscópio Olympus IX70. Contraste de fase (DIC), objetiva 10x. Barra = 100 µm.

5.2 Curva de crescimento das hASCs cultivadas com DMEM 10% PH

É bem estabelecido em literatura o comportamento das hASCs em suplementação bovina (LINDROOS et al., 2011). Para determinar o tempo de duplicação e o comportamento celular em cultura suplementado com plasma humano, foi realizado o ensaio de estabelecimento da curva de crescimento celular. A curva de crescimento das células-tronco derivadas de tecido adiposo humano cultivadas com plasma humano como suplementação foi obtida por meio da contagem do número de células nos dias 1 (após 3 horas), 3, 7 e 9. Baseado nesse ensaio foi possível realizar o cálculo do tempo de duplicação celular, utilizando a fórmula apresentada anteriormente: $y = (T2 - T1) \times \log_{10}2 \div \log_{10}(N2 \div N1)$, onde:

y: tempo de duplicação;

T2: horário de contagem das células;

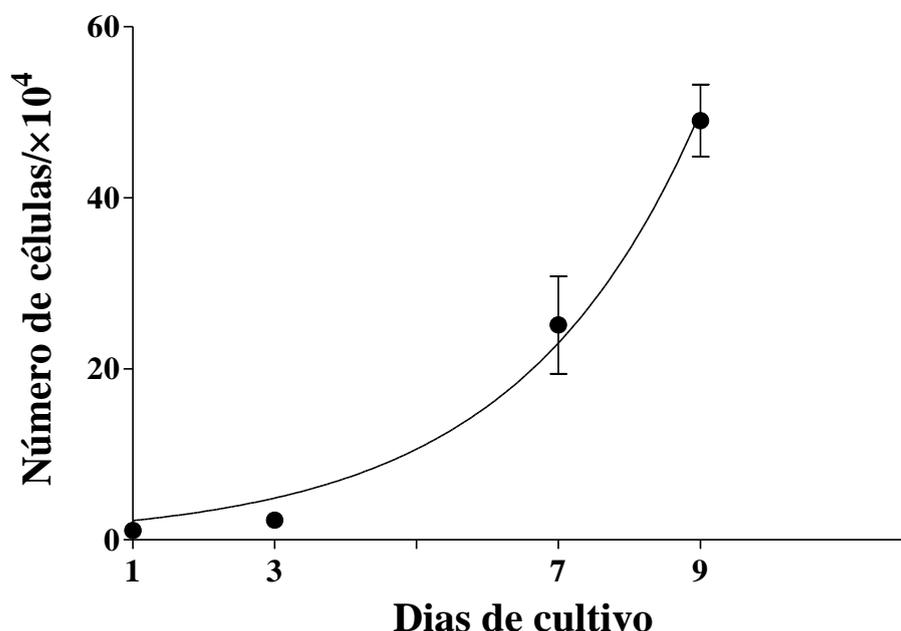
T1: horário de plaqueamento das células;

N2: número de células contadas nos tempos definidos;

N1: número de células plaqueadas.

Para realização desse cálculo, a partir de uma densidade inicial de 1×10^4 células (N1), com as células na quarta passagem, distribuídas em placas de 6 poços, foi calculada a média da contagem de células por poço (N2) presentes nas placas correspondentes a cada tempo definido. Assim, o tempo de duplicação médio das hASCs cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com PH foi estimado em 1,78 dias, equivalente a aproximadamente 42 horas. Os dados gerados foram plotados em um gráfico de crescimento exponencial, relativo a uma reação de primeira-ordem, dada por $y = y_0 \exp(k \times t)$, onde t é o tempo de duplicação das células e igual ao $\log_{10}(2) \times k$, sendo k a constante de primeira ordem, obtido da aproximação matemática semelhante à equação apresentada anteriormente (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Curva de crescimento das hASCs cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% PH

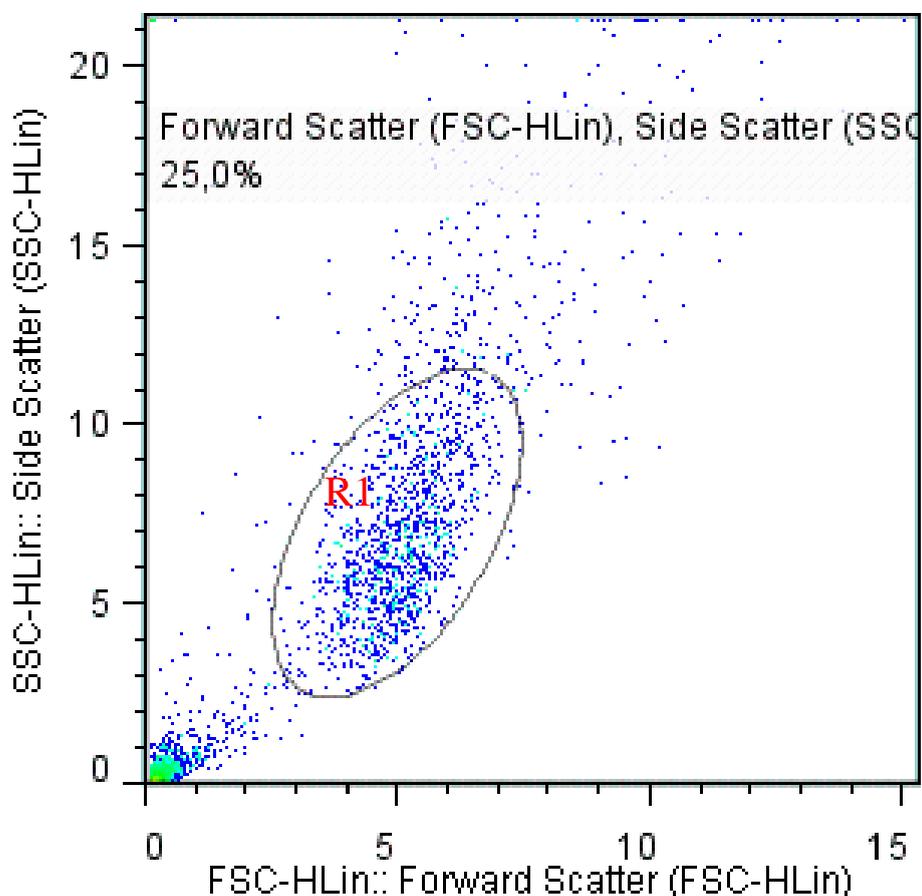


No tempo zero, 1×10^4 células, na 4ª passagem, foram plaqueadas em placas de cultura celular de seis poços. Nos dias 1 (após 3 horas), 3, 7 e 9 de cultivo foi feita a contagem do número de células. Tempo de duplicação = 1,78 dias. $R^2 = 0,9607$; $n = 1$.

5.3 Caracterização do imunofenótipo celular

Segundo Dominici e colaboradores (2006), as hASCs devem apresentar um padrão de CD (*cluster of differentiation* – grupo de diferenciação) de membrana específicos: positivo para CD105, CD73 e CD90 e negativo para CD45, CD34, HLA-DR, CD14 e CD19. Na quarta passagem, foi feita a análise do imunofenótipo das hASCs cultivadas em plasma humano e, a seguir, estão representados os histogramas das populações celulares (Figuras 5 e 6). A população de células avaliada foi definida a partir do gráfico de tamanho *versus* granulosidade, gerado por citometria de fluxo, obtido de células sem marcação específica (população R1 marcada no Gráfico 2).

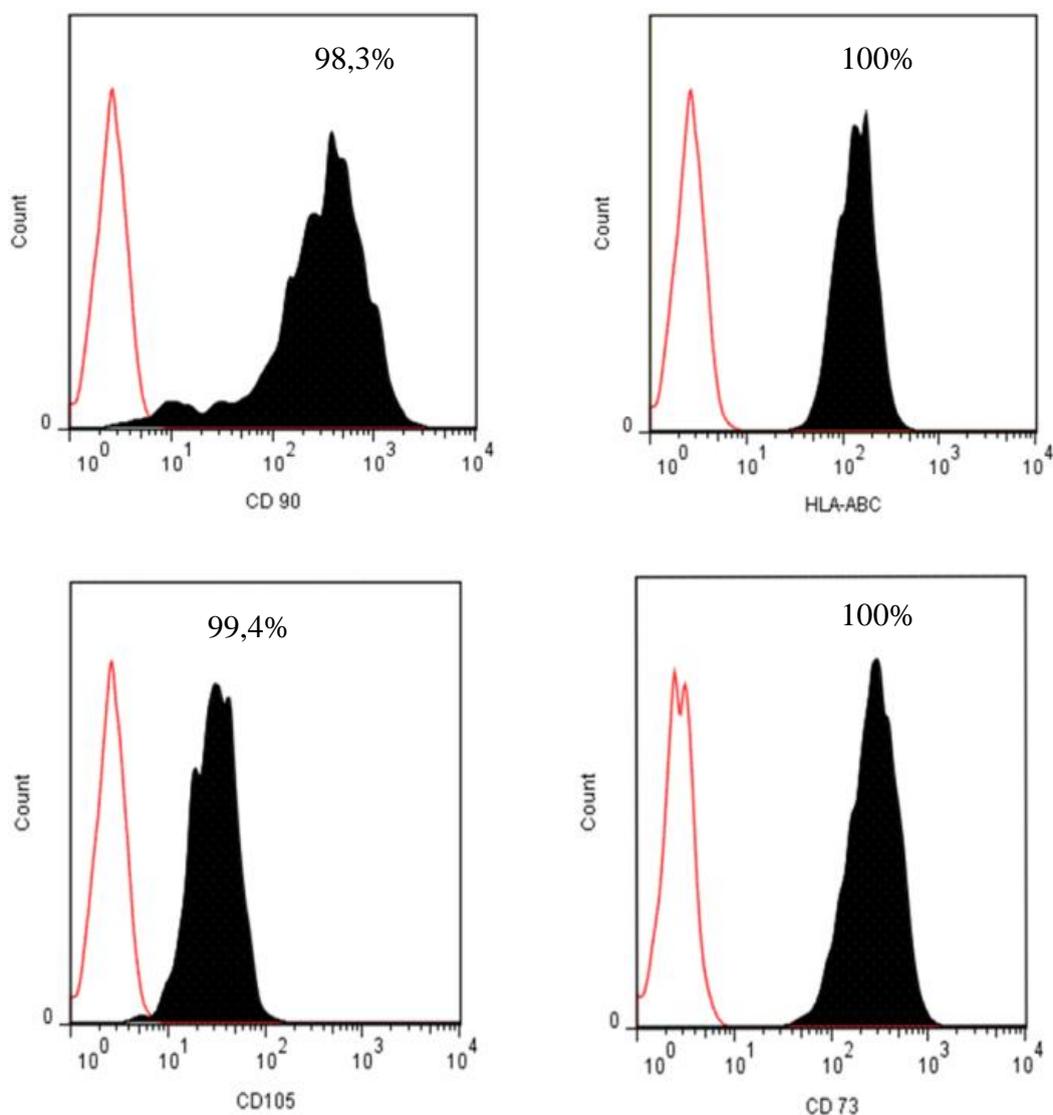
Gráfico 2 – Representação gráfica da dispersão lateral e frontal dos eventos obtidos por citometria de fluxo.



R1 é a população escolhida para análise dos marcadores das hASCs cultivadas em meio DMEM 10% PH.

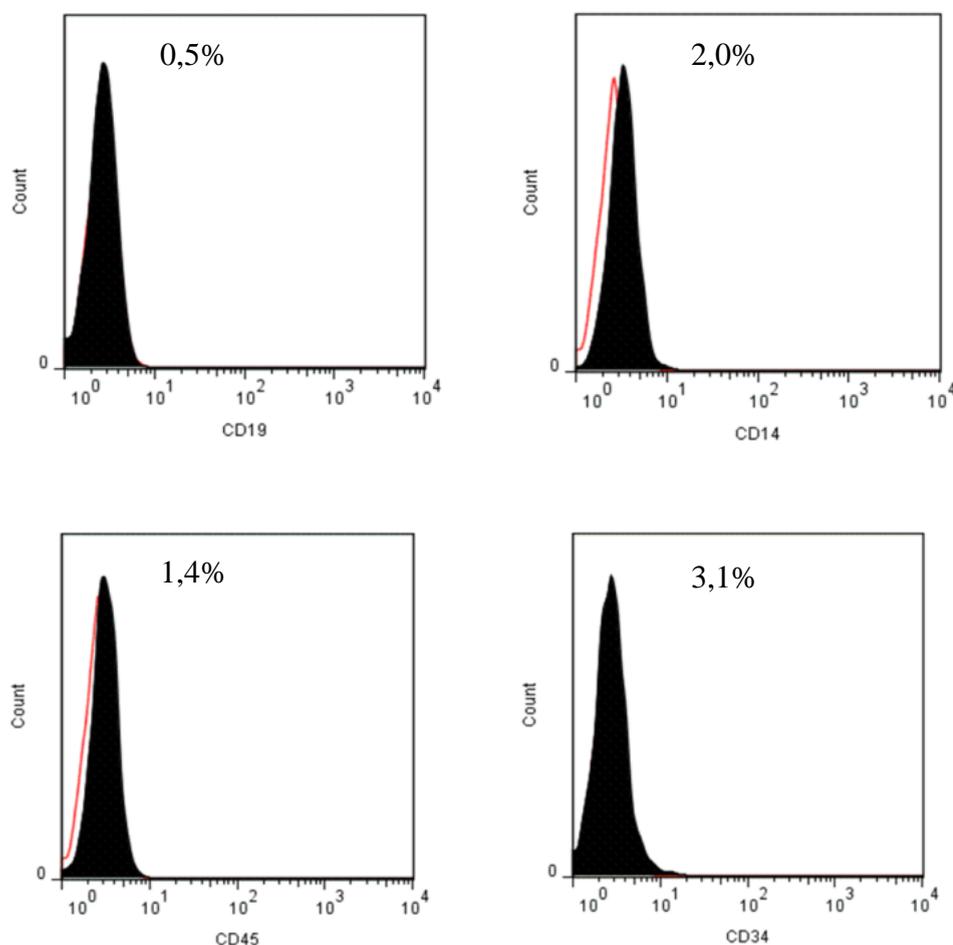
A quantificação dos histogramas demonstrou que 100% das hASCs expressaram os antígenos CD73 e HLA-ABC; 99,4% expressaram CD105 e; 98,3% expressaram CD90. Já os marcadores de superfície para células hematopoiéticas CD34, CD19, CD14 e CD45 foram expressos em 3% ou menos da população de hASCs (Gráfico 3 e 4).

Gráfico 3 – Histogramas respresentativos da imunofenotipagem das hASCs com os marcadores de células-tronco mesenquimais CD90, HLA-ABC, CD105 e CD73.



Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. A curva em tracejado vermelho corresponde ao controle negativo e a curva preta representa a população de células avaliadas para cada marcador. CD90:98,3%; CD HLA-ABC:100%; CD105: 99,4% e CD73: 100%.

Gráfico 4 – Histogramas representativos da imunofenotipagem das hASCs para marcadores de células hematopoiéticas: CD19, CD14, CD45 e CD34.



Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. A curva em tracejado vermelho corresponde ao controle negativo e a curva preta representa a população de células avaliadas para cada marcador. CD19:0,5%; CD14:2,0%; CD45: 1,4% e CD34: 3,1%

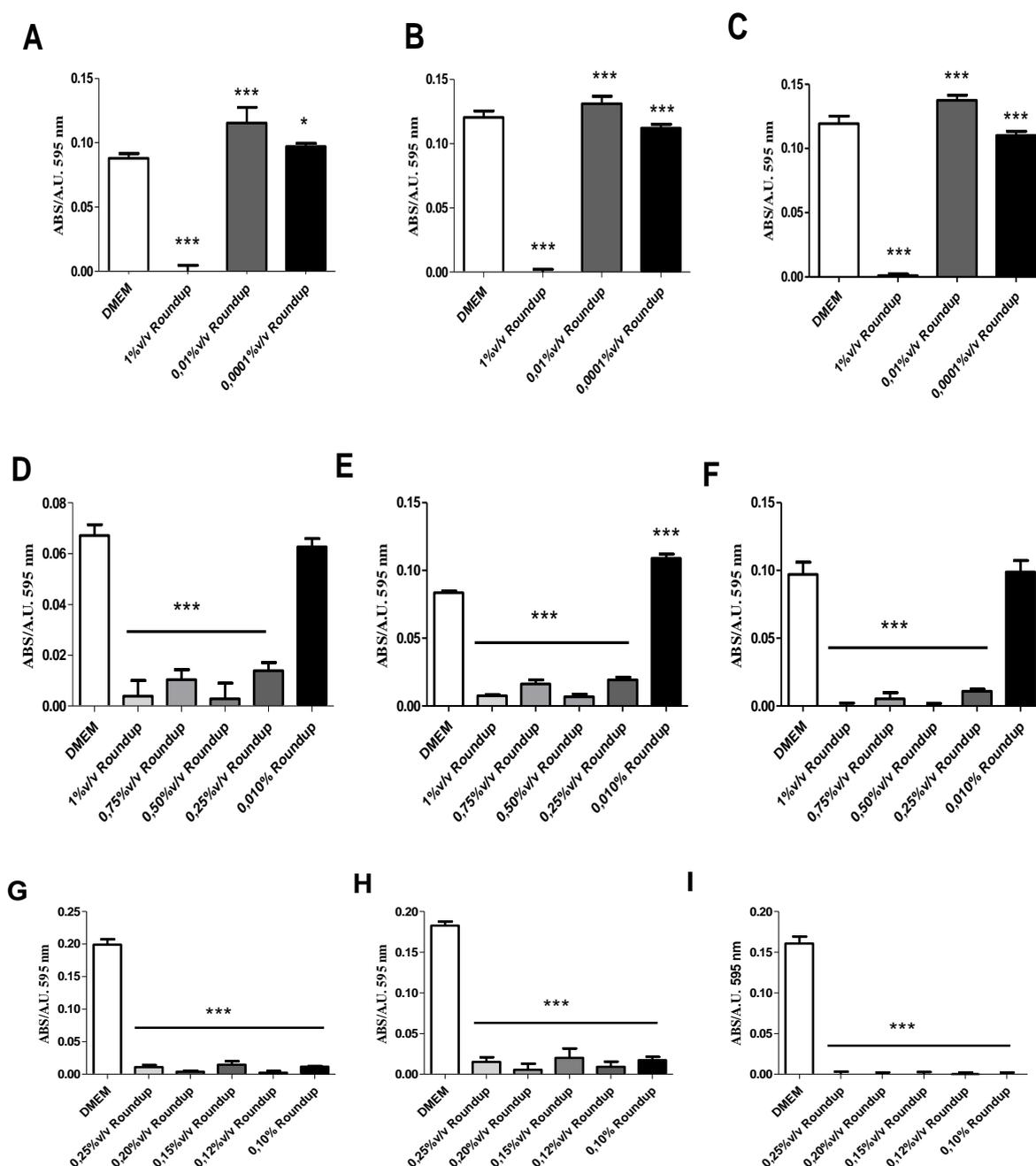
5.4 Efeitos agudos da exposição das hASCs ao agrotóxico Roundup®

5.4.1 Curvas de metabolização do MTT pelas hASCs expostas ao herbicida Roundup® de forma aguda mostram um efeito dose-dependente do produto

Para determinar qual é a ação do Roundup® nas células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, estas foram expostas a diferentes diluições do herbicida em meio DMEM partindo da concentração que é utilizada na calda aplicada nas lavouras (1% V/V ou 3.600 µg mL⁻¹ de glifosato). O tempo de exposição foi de 24, 48 e 72 horas. Após cada tempo definido, as células foram submetidas ao ensaio de metabolização do MTT. Ao todo, quatro ensaios de metabolização do MTT com diferentes intervalos de concentrações do herbicida

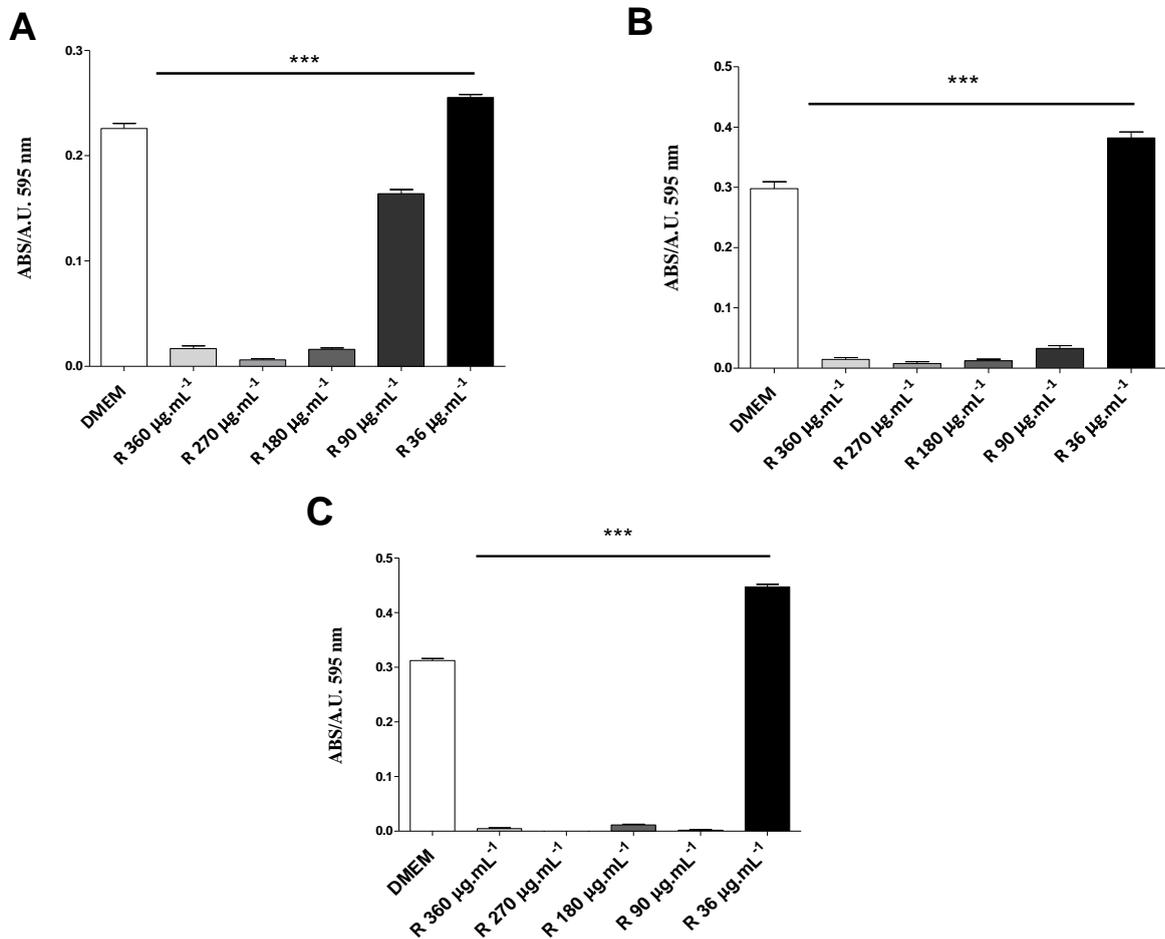
foram realizados. Os gráficos resultantes das curvas de exposição de 24, 48 e 72 h com o Roundup® estão compilados no Gráfico 5. As últimas curvas de metabolização do MTT mostram o ponto de transição entre a concentração de agrotóxico em que as células perdem a viabilidade (0,025% V/V ou 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ equivalente de glifosato) e àquela em que as células sobrevivem à exposição ao Roundup® (0,010% V/V ou 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de glifosato) em até 72 horas (Gráfico 6). Assim, a concentração 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi a escolhida para os ensaios de exposição crônica ao Roundup®.

Gráfico 5 – Representação gráfica das curvas de metabolização de MTT das hASCs expostas ao Roundup®



Os gráficos A, B, C correspondem à primeira curva de diluição do agrotóxico (1%-0,0001% V/V) testada nas células-tronco. Os gráficos D, E F correspondem ao segundo intervalo (1% -0,010% V/V) de concentrações de Roundup® testadas e os gráficos G, H e I ao terceiro intervalo testado (0,25%-0,10% V/V). Em A, D, G = 24 horas de exposição; B, E, H= 48 horas de exposição; C, F, I= 72 horas de exposição. Os tratamentos foram comparados em relação ao grupo controle DMEM 10% PH. ABS/ A.U. = Absorbância em 595 nm. One-Way ANOVA com pós-teste de Dunnett's. *p<0,05 e ***p<0,0001; n=3.

Gráfico 6 – Gráficos representativos das curvas de metabolização de MTT das hASCs na exposição aguda ao Roundup®



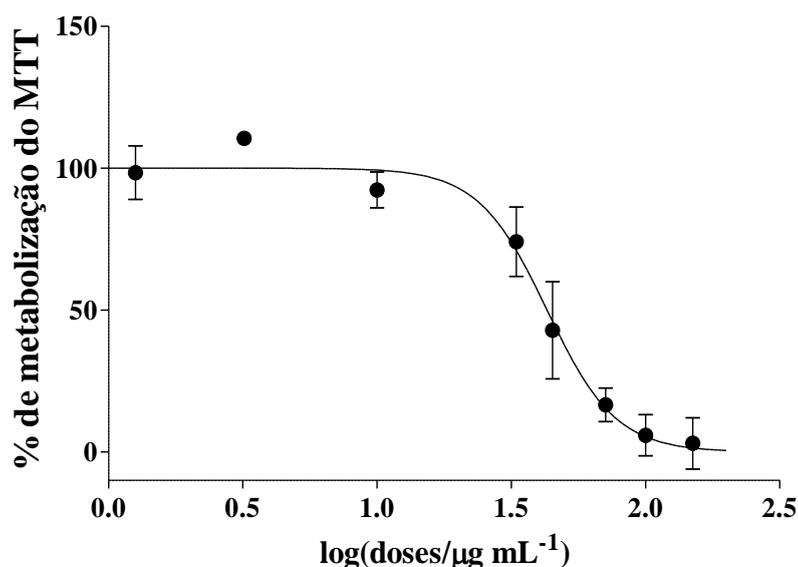
Metabolização de MTT após 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) da exposição ao agrotóxico. As curvas mostram o ponto de transição entre a concentração de agrotóxico em que as células perdem a viabilidade (0,025% V/V ou concentração R 90µg.mL⁻¹ de glifosato) e àquela em que as células sobrevivem à exposição de curto prazo (0,010% V/V ou concentração R 36µg.mL⁻¹). Todos os tratamentos foram comparados em relação ao controle DMEM. ABS/ A.U. = Absorbância em 595 nm. One-way ANOVA com pós-teste de Dunnet's ***p <0,0001; n=3. R= Roundup®

5.4.2 Determinação da IC50 após 24 horas de exposição ao Roundup®

A IC50 pode ser definida como a concentração de um inibidor onde a resposta biológica é reduzida pela metade, aqui percebida como a redução em 50% da metabolização do composto MTT. As células foram expostas às seguintes concentrações de Roundup®: 150, 100, 71, 45, 33, 10, 3,2 e 1,26 µg mL⁻¹. Após 24 horas de exposição, foi realizado o ensaio de MTT e os cristais de formazan produzidos pelas células foram solubilizados. Em seguida, foi realizada a leitura espectrofotométrica. Por fim, foi determinada uma curva consenso

utilizando os pontos médios de cada curva da triplicata, assim como a IC50. Essa curva consenso é dada pelo logaritmo das concentrações de Roundup® representadas em $\mu\text{g mL}^{-1}$ versus a porcentagem de metabolização do MTT. Assim, a IC50 foi determinada em 42,98 ($\pm 0,91$) $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Determinação da IC50 após 24 horas de exposição ao herbicida Roundup®



Dados representados em função do logaritmo das concentrações de Roundup® em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ versus porcentagem de metabolização do MTT. O log IC50 foi determinado em 1,633, o qual corresponde à concentração 42,98 ($\pm 0,91$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ equivalente de glifosato. $R^2 = 0,9315$; $n=3$.

5.5 Efeitos crônicos da exposição das hASCs ao herbicida Roundup®

5.5.1 Diferenciação adipogênica das hASCs em ausência e presença de agrotóxico

Células-tronco mesenquimais humanas são células multipotentes e responsáveis por vários eventos fisiológicos, dentre eles o reparo tecidual por meio da diferenciação em diversos tipos celulares (LEMISCHKA, 2005; KOLF et al., 2007). Para determinar qual o efeito do Roundup® sob as células em diferenciação, as hASCs foram submetidas à diferenciação adipogênica em meio de cultura contendo fatores indutores de diferenciação por 21 dias. Essa diferenciação foi realizada tanto em ausência ou presença de Roundup® na concentração de 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A diferenciação adipogênica foi determinada pelos seguintes ensaios: detecção do acúmulo intracelular de lipídeos e análise dos genes induzidos durante essa diferenciação

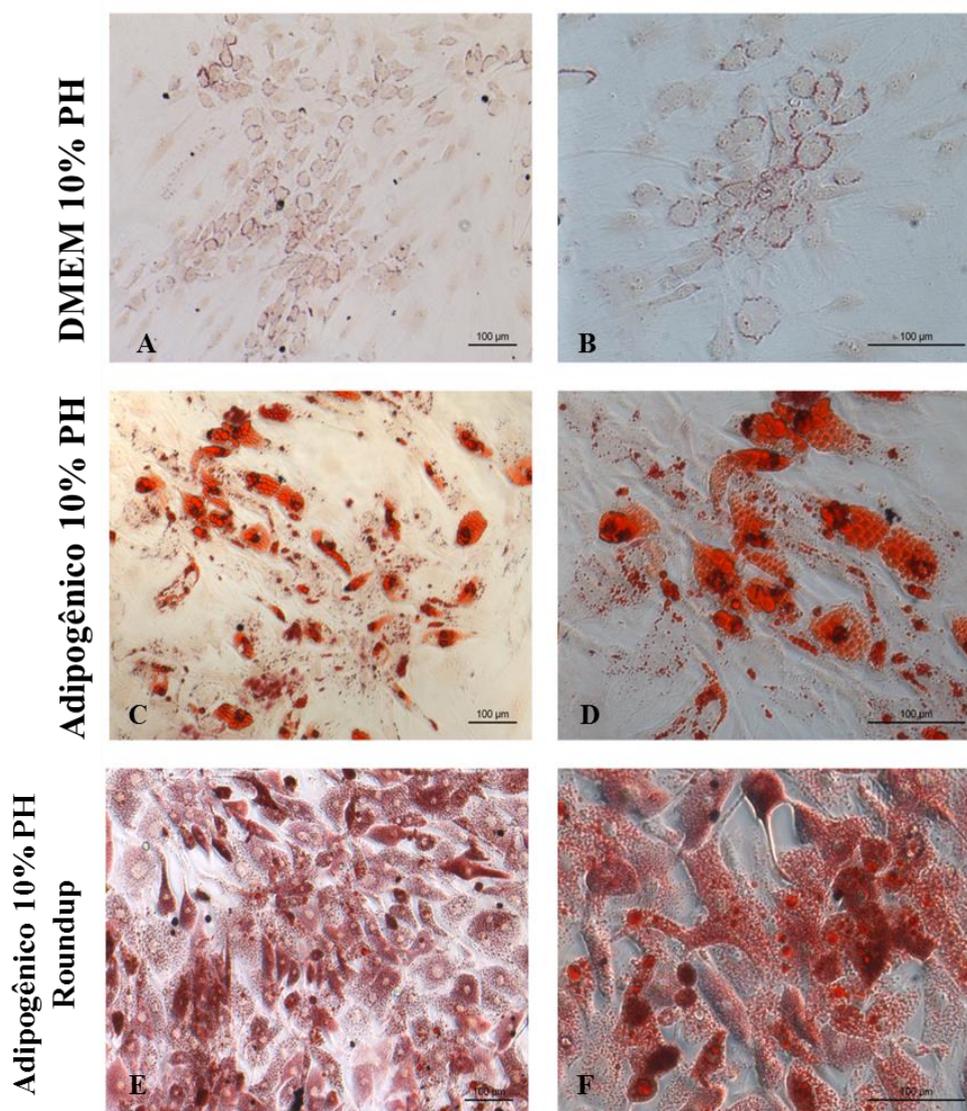
codificantes para: receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPARG2), transportador de glicose (GLUT 4) e leptina.

5.5.1.1 Acúmulo intracelular de lipídeos e alterações morfológicas nas hASCs tratadas com Roundup®

Com a finalidade de confirmar a diferenciação adipogênica, foi realizada a coloração de lipídeos presentes no interior das células com *Oil Red O*. Observou-se a presença de lipídeos intracelulares tanto nas hASCs cultivadas somente em meio adipogênico quanto nas células cultivadas em meio adipogênico com acréscimo de Roundup® na concentração de 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como esperado, somente o grupo controle DMEM 10% PH não apresentou acúmulo intracelular de lipídeos (Figura 5).

Interessantemente, foram observadas alterações morfológicas importantes nas células-tronco tratadas com agrotóxico quando comparadas ao controle, visíveis ao microscópio, tais como: aumento do diâmetro celular, fazendo com que as células ficassem mais arredondadas, e vesiculação intensa.

Figura 5 – Imagem representativa da coloração das hASCs submetidas à diferenciação adipogênica



Fotomicrografias das hASCs cultivadas em DMEM 10% PH, utilizando-se objetivas de aumento 4x (A) e 10x (B). Fotomicrografias das hASCs em meio indutor adipogênico 10% PH, em menor (C) e maior aumento (D) e, das hASCs cultivadas em meio adipogênico 10% PH com adição de Roundup[®] 36 µg mL⁻¹ em menor (E) e maior aumento (F). As células foram fotografadas após 21 dias de cultivo. Coloração por *Oil Red O*. Barras = 100 µm. Imagens adquiridas utilizando-se o microscópio Olympus IX70 e o software Image Pro.

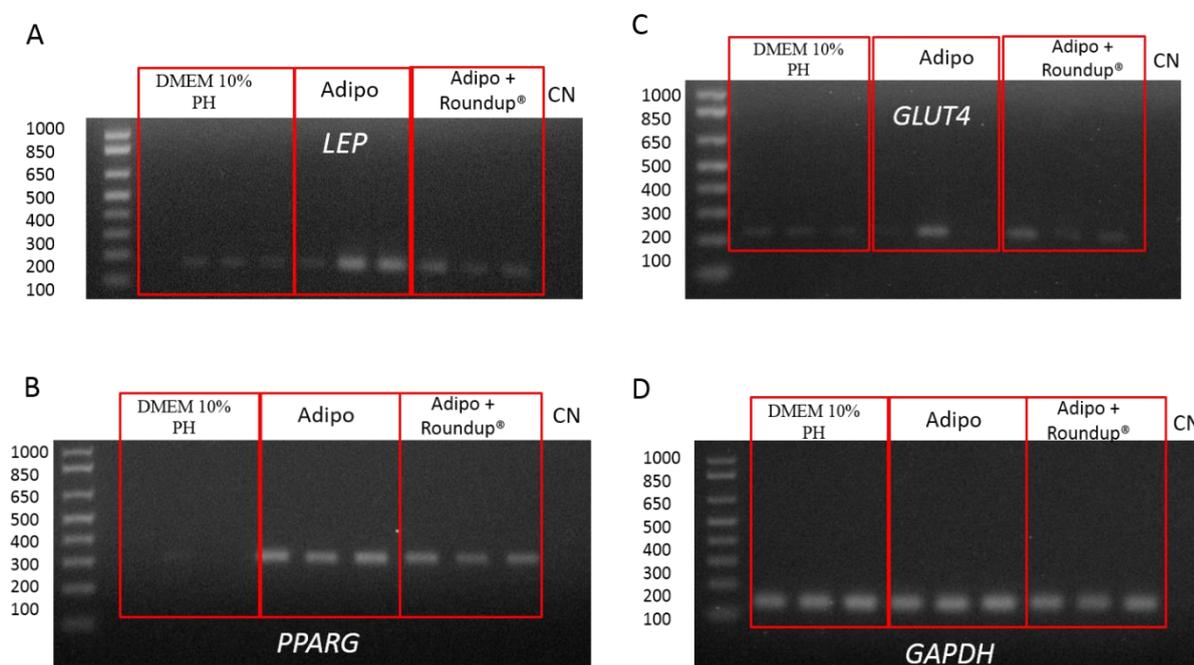
5.5.1.2 Os genes que codificam para leptina, GLUT4 e PPARG2 são expressos na presença de Roundup[®]

Os genes *LEP*, *GLUT4* e *PPARG* são induzidos durante o processo de diferenciação adipogênica (ZUK et al., 2002; P.BOURIN et al., 2013). Para determinar se ocorre diferenciação em presença de agrotóxico, os genes supracitados foram avaliados quanto a sua

expressão. Após 21 dias de indução da diferenciação adipogênica em presença ou ausência de Roundup[®], foi realizada a extração do RNA e qRT-PCR a fim de comprovar a amplificação específica de fragmentos desses genes que codificam para leptina, transportador de glicose (GLUT4) e receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPARG2), respectivamente.

PPARG foi expresso somente nas hASCs cultivadas no meio indutor adipogênico com e sem Roundup[®] 36µg mL⁻¹. Em contraste, não foram detectadas bandas referentes à amplificação dos segmentos gênicos de *PPARG* cultivadas no meio DMEM 10% PH (6-B). Em relação aos demais genes, observou-se a expressão de *LEP* e *GLUT4* (6- A e C) em todos os tratamentos analisados em pelo menos uma das triplicatas. Como controle das reações, foi utilizado o gene *GAPDH*, expresso constitutivamente pelas células de todos os grupos (6-D). O controle negativo atesta a pureza das amostras.

Figura 6 – Expressão dos genes A- *LEP*, B- *PPARG*, C- *GLUT4* e D- *GAPDH* nas hASCs cultivadas em meio de cultura DMEM 10% PH e em meio adipogênico com e sem Roundup[®] por 21 dias

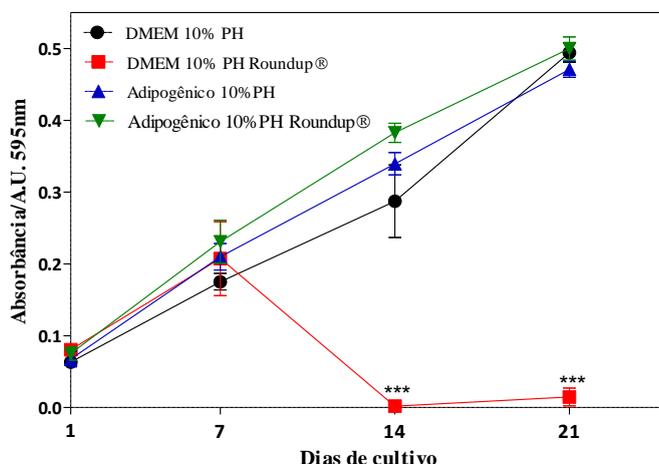


Adipo= Meio Adipogênico; CN = Controle Negativo; Marcador de peso molecular: 1Kb

5.5.1.3 A presença do agrotóxico não altera a viabilidade celular na diferenciação adipogênica

Ao longo dos 21 dias do ensaio de diferenciação adipogênica, as hASCs foram avaliadas semanalmente quanto à capacidade de metabolização do MTT. Realizou-se uma análise comparativa das células cultivadas em meios de diferentes composições: DMEM 10% PH; DMEM 10% PH + Roundup®; Meio Adipogênico 10% PH e Meio Adipogênico 10% PH + Roundup®. A representação gráfica da metabolização do MTT dada por absorbância *versus* tempo pode ser vista nos Gráfico 8 e Gráfico 9. Através de análise estatística, com regressão linear e teste ANCOVA, foi possível observar que a inclinação das retas é igual. Isso significa que o aumento do ritmo de metabolização de MTT ao longo do tempo foi igual para todos os tratamentos, com exceção do grupo DMEM 10% Roundup®, no qual as células morreram após o sétimo dia de cultivo. Os dados também foram representados em gráfico de barras, para comparação da viabilidade das hASCs de cada grupo em relação ao controle DMEM 10% PH a cada dia avaliado (Gráfico 10). A análise por Two-way ANOVA mostrou que, aos 7 e 14 dias de cultivo, todos os grupos diferiram do controle DMEM 10% PH. Aos 21 dias de cultivo, somente o grupo DMEM 10% PH Roundup® apresentou diferença em relação ao controle.

Gráfico 8 – Representação gráfica da metabolização do MTT pelas hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e adipogênico suplementado com PH em ausência ou presença de Roundup®



Foram semeadas 5×10^3 células/poço em placas de 24 poços. Após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio de MTT, os cristais de formazan formados foram solubilizados e a densidade ótica mensurada em 595nm. DMEM 10% PH Roundup® quando comparado aos demais grupos. ANCOVA *** $p < 0,0001$, $n=3$.

Gráfico 9 – Análise de regressão linear da metabolização do MTT pelas hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e adipogênico suplementado com PH em ausência ou presença de Roundup®

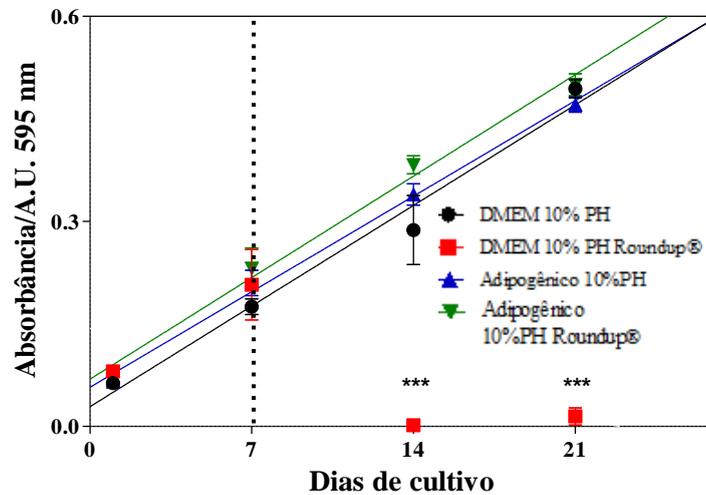
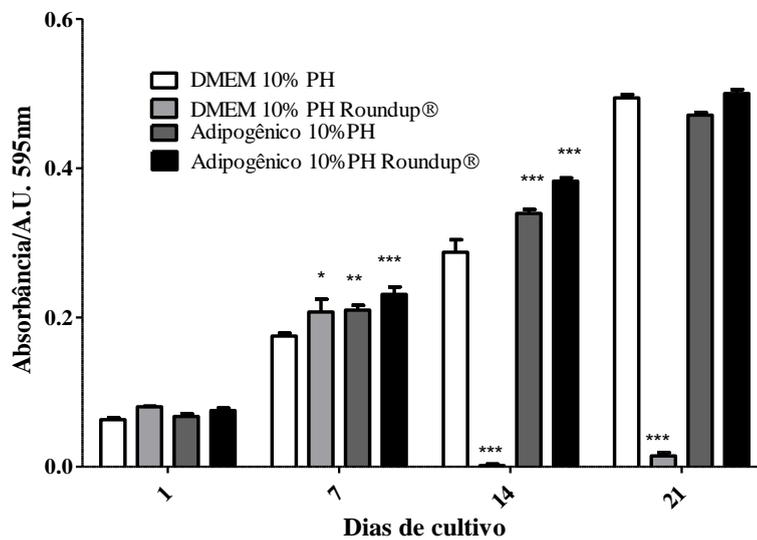


Figura 16. ANCOVA ***p<0,0001, n=3, 595nm.

Gráfico 10 – Representação gráfica da metabolização do MTT pelas hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e adipogênico suplementado com PH em ausência ou presença de Roundup® a cada tempo avaliado



O ensaio de MTT foi realizado após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo e a densidade ótica mensurada em 595nm. Todos os tratamentos foram comparados em relação ao grupo controle DMEM 10%PH em cada período de tempo avaliado. Two-way ANOVA * p <0,05. ** p <0,01 ***p<0,0001; n=3.

5.5.2 Diferenciação osteogênica das hASCs em ausência e presença de agrotóxico

Para determinar os efeitos do agrotóxico na diferenciação osteogênica, as hASCs foram induzidas à diferenciação por meio do cultivo em meio de cultura contendo fatores

indutores por 21 dias tanto em ausência ou presença de Roundup®. A fim de comprovar a diferenciação osteogênica, foram realizados os seguintes ensaios: avaliação da atividade da fosfatase alcalina, detecção de mineralização pela coloração de *von Kossa* e análise da expressão dos genes que codificam para fosfatase alcalina, osteopontina, runx-2 e colágeno tipo I.

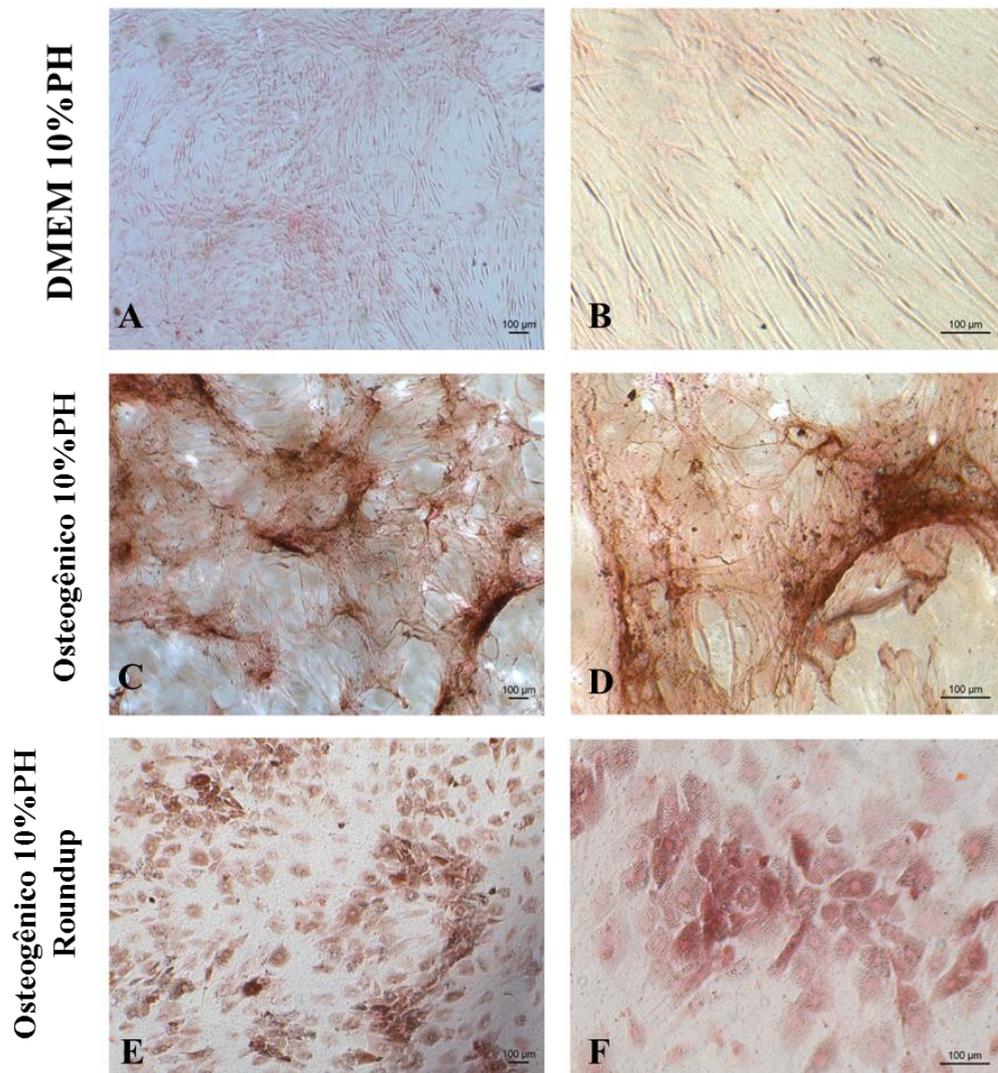
5.5.2.1 Nódulos de mineralização e alterações morfológicas em hASCs expostas ao Roundup®

Para avaliar a presença de nódulos de mineralização, foi realizada a coloração de *von Kossa* após 21 dias de indução da diferenciação osteogênica em ausência e presença de agrotóxico.

A presença de nódulos de mineralização, representada por coloração negra ou marrom, foi observada no grupo das hASCs cultivadas em meio de cultura osteogênico sem agrotóxico (7, C e D) e no grupo das hASCs cultivadas em meio de cultura osteogênico com Roundup® (7, E e F). No grupo controle, DMEM 10% PH, não foi observada mineralização (7, A e B).

Assim como notado na diferenciação adipogênica, as células-tronco tratadas com meio de diferenciação na presença de Roundup®, mostraram alterações morfológicas como o aumento do diâmetro celular, estando mais arredondadas e com formação de vesículas no citoplasma.

Figura 7 – Imagem representativa da indução da diferenciação osteogênica das hASCs



Fotomicrografias das hASCs do grupo DMEM 10% PH, utilizando objetivas de aumento 4x (A) e 10x (B). Fotomicrografias das hASCs em meio indutor osteogênico 10% PH, em menor (C) e maior aumento (D) e das hASCs cultivadas em meio osteogênico 10% PH com adição de Roundup® 36µg. mL⁻¹ em menor (E) e maior aumento (F). As células foram fotografadas após 21 dias de cultivo. Coloração de *von Kossa*. Barras = 100 µm. Imagens adquiridas utilizando-se o microscópio Olympus IX70 e o software Image Pro.

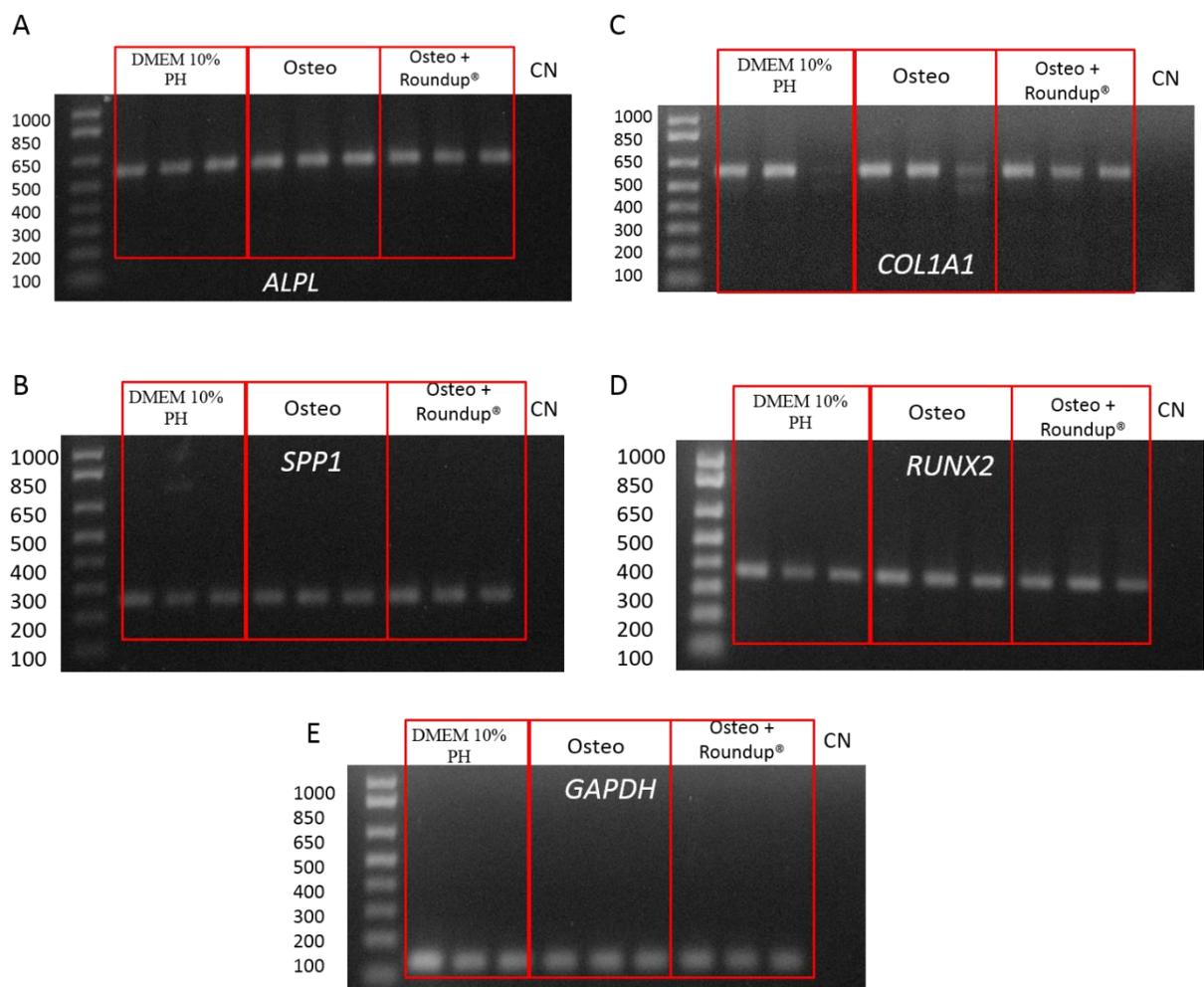
5.5.2.2 Os genes que codificam para fosfatase alcalina, runx2, osteopontina e colágeno tipo I são expressos em hASCs tratadas com agrotóxico

Os genes *ALPL*, *SPP1*, *RUNX2* e *COL1A1* são induzidos durante o processo de diferenciação osteogênica (ZUK et al., 2002; P.BOURIN et al., 2013). Para determinar se há real diferenciação em presença de agrotóxico, os genes supracitados foram avaliados quanto a sua expressão. Após 21 dias de indução da diferenciação osteogênica, em presença ou ausência de Roundup® na concentração 36 µg mL⁻¹, foi realizada a PCR a fim de comprovar a diferenciação por meio da amplificação específica de fragmentos dos genes *ALPL* (fosfatase

alcalina), *SPP1* (osteopontina), *RUNX2* (fator de transcrição runx2) e *COL1A1* (colágeno tipo I). Como controle das reações, foi utilizado o gene *GAPDH*, expresso constitutivamente pelas células em todos os tratamentos aplicados.

A amplificação do segmento gênico de todos os genes relacionados à diferenciação foi detectada nas hASCs cultivadas no meio de cultura DMEM assim como no meio indutor osteogênico, com e sem Roundup®, conforme pode ser observado na Figura 8. O controle negativo atesta a pureza das amostras.

Figura 8 – Expressão dos genes A- *ALPL*, B-*SPP1*, C-*COL1A1*, D-*RUNX2* e E- *GAPDH* nas hASCs cultivadas em meio de cultura DMEM 10%PH e meio osteogênico com e sem Roundup® por 21 dias

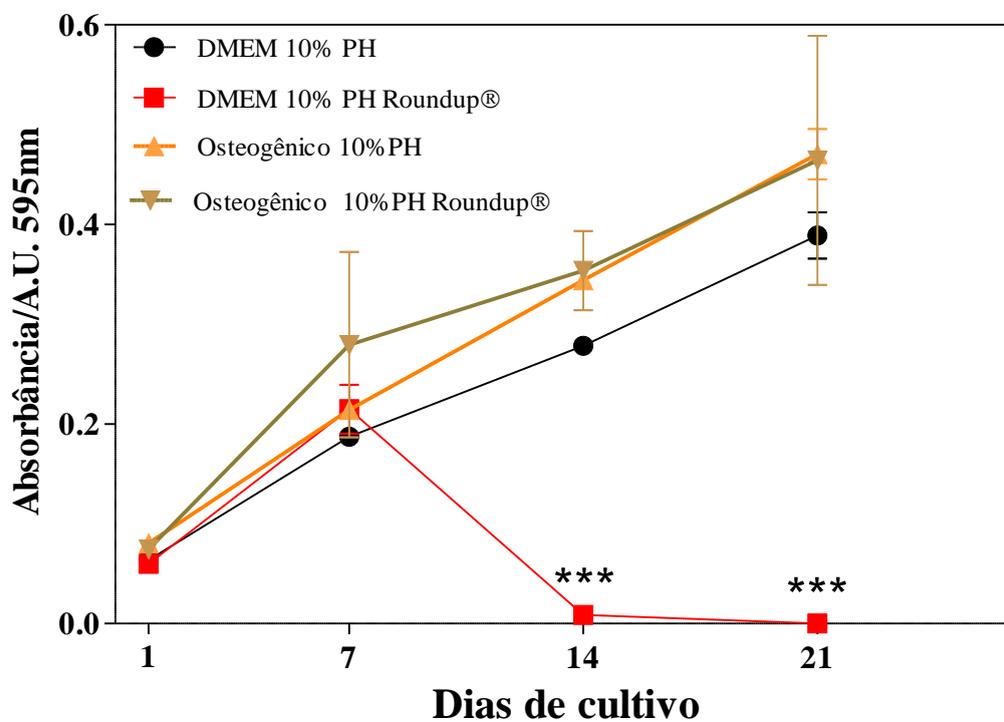


Osteo= Meio Osteogênico; CN= Controle Negativo; Marcador de peso molecular: 1Kb

5.5.2.3 A presença do agrotóxico não altera a viabilidade celular na diferenciação osteogênica

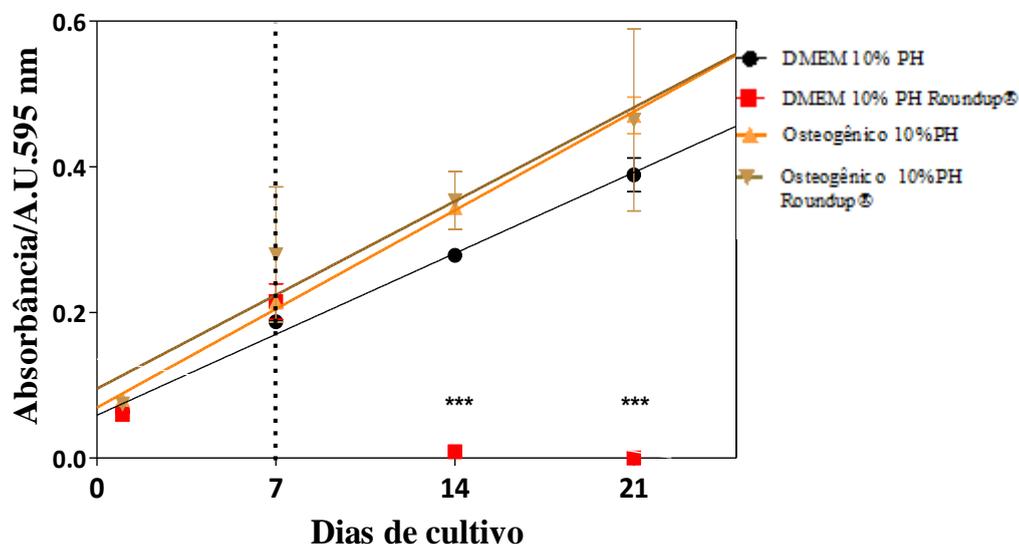
Assim como na diferenciação adipogênica, a viabilidade das hASCs foi mensurada semanalmente por até 21 dias para estudo dos efeitos crônicos da exposição ao Roundup® na diferenciação osteogênica. Realizou-se uma análise comparativa das células cultivadas nos meios: DMEM 10% PH; DMEM 10% PH + Roundup®; Meio Osteogênico 10% PH e Meio Osteogênico 10% PH + Roundup®. A representação gráfica da metabolização do MTT dada por absorbância *versus* tempo é apresentada nas Gráfico 11 e Gráfico 12. Na análise estatística, ao fazer uma regressão linear e aplicar o teste ANCOVA aos dados, é possível observar pela inclinação das retas, que o aumento da taxa de metabolização de MTT foi igual para todos os tratamentos. A viabilidade ao longo do tempo aumentou a uma taxa constante e igual para todos os grupos durante os 21 dias de cultivo, exceto para o grupo DMEM 10% PH Roundup®, no qual houve morte das células após o sétimo dia de cultura. Os dados também foram representados em gráfico de barras, para melhor visualização da viabilidade a cada tempo de cultivo avaliado (Gráfico 13). A análise por Two-way ANOVA mostrou que, aos sete dias de cultivo, somente o grupo Osteogênico 10%PH Roundup® apresentou diferença (**p<0,0001) em relação ao grupo DMEM 10% PH. Nos dias 14 e 21 do cultivo, todos os grupos diferiram do controle DMEM 10% PH (**p<0,01 e ***p<0,0001).

Gráfico 11 – Representação gráfica da metabolização do MTT pelas hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e osteogênico suplementado com PH em ausência ou presença de Roundup®



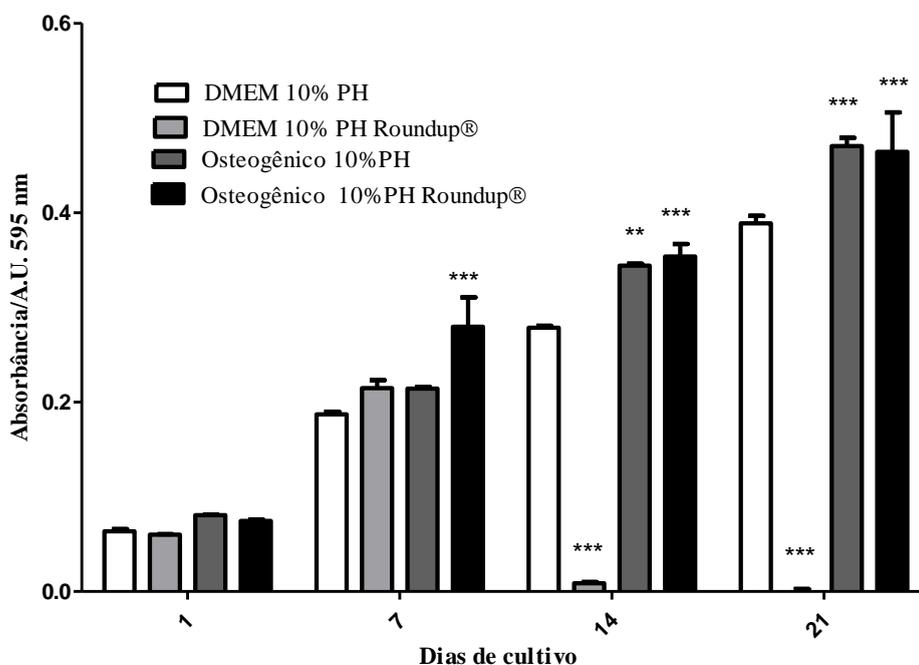
Foram semeadas 5×10^3 células/poço em placas de 24 poços. Após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio de MTT, os cristais de formazan formados foram solubilizados e a absorbância mensurada em 595 nm. n= 3; *** DMEM 10% PH Roundup® quando comparado aos demais grupos. ANCOVA, ***p<0,0001.

Gráfico 12 – Análise de regressão linear da metabolização do MTT pelas hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e osteogênico suplementado com PH em ausência ou presença de Roundup®



ANCOVA, ***p <0,0001, 595nm.

Gráfico 13 – Representação gráfica da metabolização do MTT pelas hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e osteogênico suplementado com PH na ausência ou presença de Roundup® em cada tempo avaliado



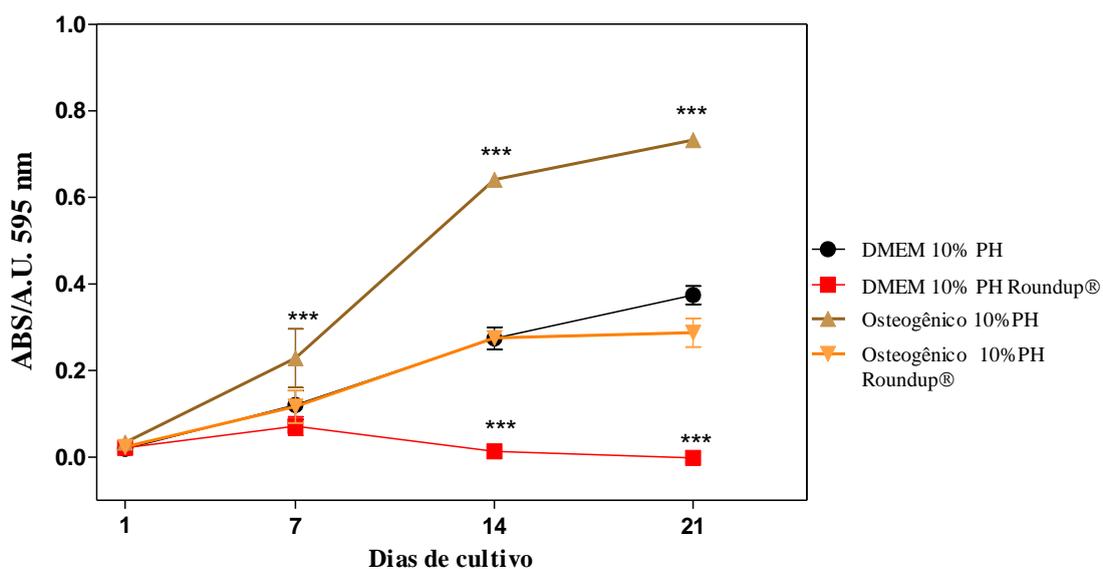
Foram semeadas 5×10^3 células/poço em placas de 24 poços. Após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio de MTT, os cristais de formazan formados foram solubilizados e a absorbância mensurada em 595nm. Todos os tratamentos foram comparados em relação ao grupo controle DMEM 10%PH em cada período de tempo avaliado (** p <0,01 ***p<0,0001). Two-way ANOVA n=3.

5.5.2.4 O tratamento com agrotóxico altera a atividade de fosfatase alcalina das hASCs

O ensaio de BCIP/NBT foi realizado com a finalidade de comparar a atividade da enzima fosfatase alcalina durante a diferenciação osteogênica em ausência e presença de agrotóxico.

Ao realizar a análise de grupos, observou-se que a atividade de fosfatase alcalina foi maior nas células cultivadas em meio de cultura osteogênico suplementado com PH em comparação às células cultivadas nos meios DMEM 10%PH, DMEM 10% PH Roundup® e Osteogênico 10% PH Roundup® aos 7, 14 e 21 dias de cultivo (**p<0,0001). É importante destacar que as células pertencentes ao grupo DMEM 10% PH Roundup® perderam a viabilidade a partir de sete dias de cultivo, e a atividade de fosfatase alcalina não pôde ser mensurada (**p<0,0001). As células submetidas ao meio de diferenciação osteogênico com adição de agrotóxico (Osteogênico 10% PH Roundup®) apresentaram uma atividade de fosfatase alcalina semelhante à atividade das células-tronco cultivadas em meio DMEM 10% PH (Gráfico 14).

Gráfico 14 – Representação gráfica da atividade de fosfatase alcalina das hASCs cultivadas em meios de cultura DMEM e osteogênico suplementado com PH em ausência ou presença de Roundup®



Após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo das hASCs, foi realizado o ensaio de BCIP-NBT, o precipitado púrpura foi solubilizado e a absorvância mensurada. n= 3. Todos os tratamentos foram comparados em relação ao grupo controle DMEM 10%PH em cada período de tempo avaliado. Two-way ANOVA (**p<0,0001).

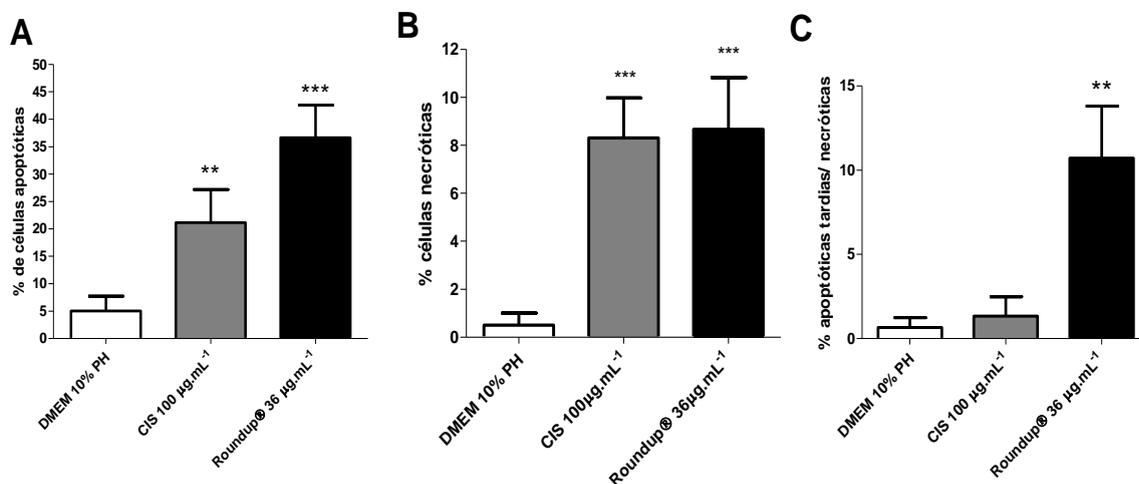
5.6 O tratamento com agrotóxico induz apoptose e necrose nas células-tronco derivadas de tecido adiposo

Com a finalidade de se determinar a via de morte celular induzida pelo tratamento com Roundup[®], as hASCs foram expostas à concentração 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 24 horas. A droga Cisplatina foi utilizada como controle de morte (positivo) na concentração 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para marcação das células apoptóticas e necróticas foi utilizado o kit *Annexin V/ Dead Cell Apoptosis Kit*, seguido de fotodocumentação utilizando-se microscopia de fluorescência (OLYMPUS IX70) e o programa ImagePro[®]. A análise foi realizada utilizando-se ImageJ[®].

A representação gráfica das porcentagens calculadas de células apoptóticas e necróticas para os grupos DMEM 10% PH, Cisplatina 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e Roundup[®] 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pode ser visualizada no Gráfico 15. A partir da contagem de células totais por campo, considerada como 100%, a porcentagem de células apoptóticas no grupo tratado com Roundup[®] 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi estimada em 36,60% ($\pm 5,99$), células necróticas em 8,67% ($\pm 2,16$) e de apoptóticas tardias ou necróticas em 10,71% ($\pm 3,08$). O grupo tratado com cisplatina na concentração 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou 21,13% ($\pm 6,07$) de células apoptóticas, 8,31% ($\pm 1,67$) de células necróticas e 1,33% ($\pm 1,15$) de apoptóticas tardias ou necróticas. O grupo DMEM 10% PH (controle negativo) apresentou 5% de células apoptóticas ($\pm 2,73$), 0,5% de células necróticas ($\pm 0,5$) e 0,6% de apoptóticas tardias ou necróticas ($\pm 0,57$).

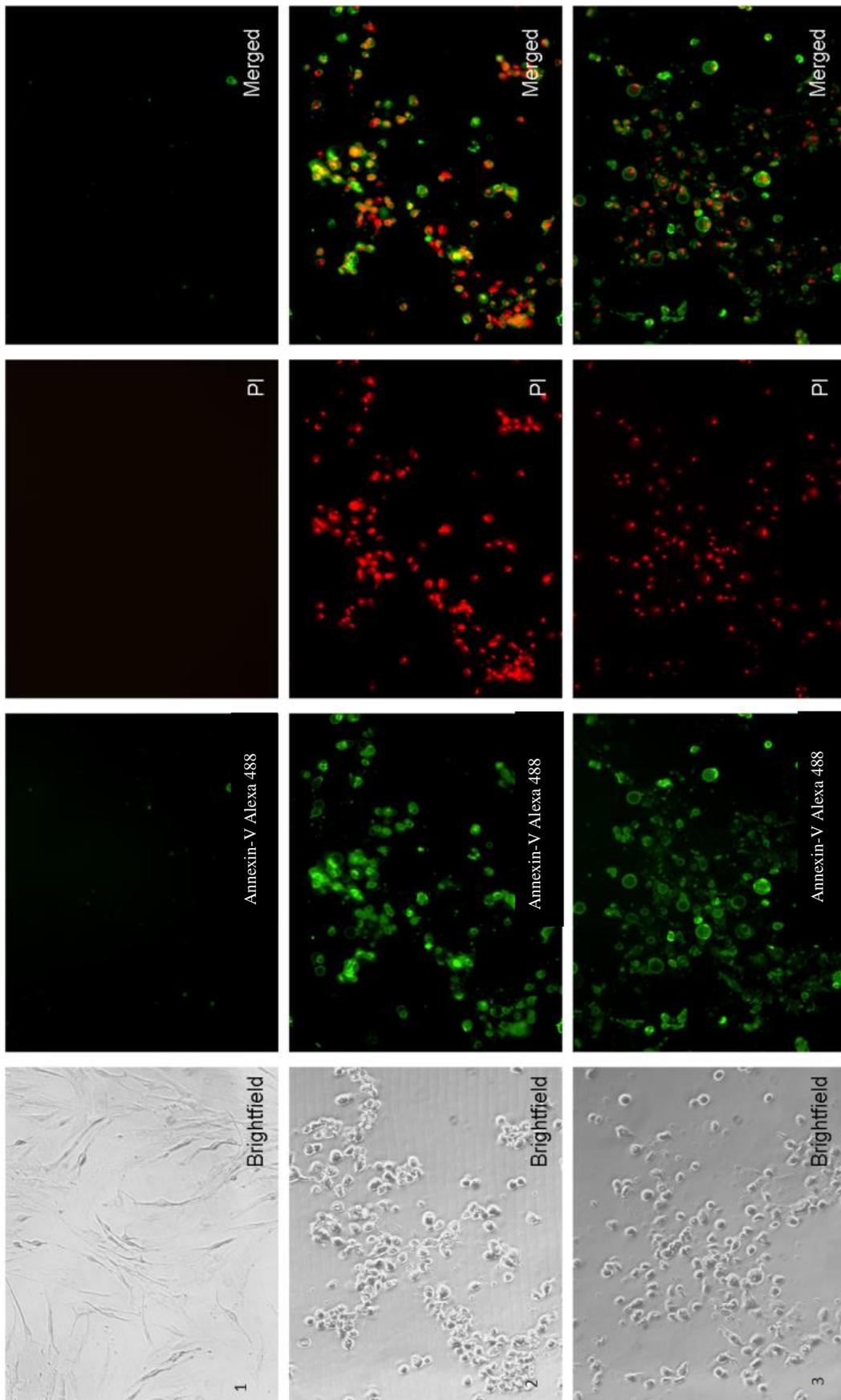
A análise por One-way ANOVA mostrou que as porcentagens de células apoptóticas do grupo tratado com Cisplatina e Roundup[®] são diferentes do grupo controle DMEM 10% PH, assim como a de células necróticas. Quanto às células duplo-marcadas, ou seja, em apoptose tardia ou em necrose, somente o grupo tratado com Roundup[®] apresentou diferença em relação ao controle. Um painel representativo da fotodocumentação dos ensaios pode ser visualizado na Figura 9. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as médias e desvio padrão foram calculados a partir desses valores.

Gráfico 15 – Representação gráfica da porcentagem de morte por apoptose e necrose induzida por tratamento com Roundup® comparada aos controles. A = % de células apoptóticas, B = % de células necróticas e C = % de células apoptóticas tardias ou necróticas



Os tratamentos das hASCs com Cisplatina e Roundup® foram comparados ao controle DMEM 10% PH (não tratado). One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni (**p<0,01, ***p<0,0001), n=3.

Figura 9 – Painel representativo da marcação de células apoptóticas e necróticas com o *Annexin V/ Dead Cell Apoptosis Kit*.



1-Células-tronco expostas ao meio DMEM 10%PH (controle negativo) 2- Células-tronco tratadas com Cisplatina 100 µg mL⁻¹ (controle positivo) 3-Células-tronco expostas ao herbicida Roundup® na concentração 36 µg mL⁻¹. Legenda: Brightfield=DIC; PI= iodeto de propídeo (em vermelho); Annexin V-Alexa Fluor 488 = Anexina V conjugada ao fluoróforo Alexa 488 (em verde) e Merged = Sobreposição das imagens marcadas com PI e Annexin V - Alexa 488

6 DISCUSSÃO

As formulações comerciais de glifosato já foram testadas em diversas linhagens celulares e também em células de cultura primária isoladas de tecidos humanos como, por exemplo, eritrócitos, hepatócitos (HEPG2), células umbilicais (HUVEC), embrionárias de rim (293), placentárias (JEG3) e epiteliais bucais (TR146) (PIENIAZEC et al., 2004; GASNIER, 2009; BENACHOUR & SÉRALINI et al., 2009; KOLLER et al., 2012).

Nesse estudo, a opção em utilizar as hASCs como modelo experimental para estudo dos efeitos tóxicos do Roundup® foi viabilizada pelas vantagens de isolamento e cultivo *in vitro*, tais como: o fato de serem coletadas a partir do produto da cirurgia de lipoaspiração e estarem disponíveis em grande quantidade, podendo ser isoladas do tecido adiposo e expandidas rapidamente e não apresentarem problemas éticos como as células-tronco embrionárias (BYDLOWSKI et al., 2009; MIZUNO, 2009; LINDROOS et al., 2011). É importante destacar que a capacidade de serem repositoras naturais das células no organismo e o fato de se diferenciarem em múltiplas linhagens como a osteogênica e a adipogênica possibilitou uma investigação dos efeitos de agrotóxicos no estado indiferenciado e diferenciado dessas células. Assim, os resultados obtidos podem sugerir os efeitos a longo prazo do agrotóxico na regeneração tecidual dos consumidores e ou trabalhadores que têm contato com o produto.

O uso do meio de cultura contendo plasma humano (PH) em substituição ao soro fetal bovino (SFB) no cultivo foi realizado de acordo com os protocolos de Boas Práticas de Manipulação, visto que a ausência de elementos xenobióticos em culturas celulares é importante para o cultivo de células-tronco mesenquimais (LINDROOS et al., 2011). Hipotetiza-se que a interação das células-tronco humanas com uma suplementação da mesma espécie possa possibilitar uma melhora no padrão de crescimento celular, visto que os elementos presentes no plasma humano são similares àqueles circulantes no organismo.

Quanto ao fenótipo celular, ao microscópio óptico, as hASCs mantiveram a morfologia fibroblastoide, a competência de formar colônias e a aderência à superfície plástica na presença de plasma humano (Figura 4), importantes características descritas na literatura para células-tronco mesenquimais (FRIEDESTEIN et al., 1972; DOMINICI et al., 2006; ZUK et al., 2001; P. BOURIN et al., 2013).

O tempo de duplicação das hASCs em SFB foi estimado em 120 horas (PAULA et al., 2013) enquanto que, nesse trabalho, foi obtido um tempo de duplicação de

aproximadamente 42 horas ou 1,78 dias, o qual é cerca de 3 vezes mais rápido. Assim, observou-se que a capacidade proliferativa das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo cultivadas em meio DMEM 10% PH foi maior que a capacidade de proliferação dessas mesmas células, descrita na literatura, quando cultivadas em meio DMEM 10% SFB. (Gráfico 1). Hipotetiza-se que existam fatores presentes no plasma humano que favoreçam a multiplicação celular, viabilizando a saída da fase G0 e levando ao comprometimento com a mitose celular. De fato, estudos já demonstraram que o plasma humano rico em plaquetas foi capaz de aumentar a proliferação *in vitro* de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano e de medula óssea em até dez vezes mais que a suplementação com soro fetal bovino (KAKUDO et al., 2008 e AMABLE et al., 2014).

As hASCs cultivadas em meio de cultura basal 10% PH também foram capazes de metabolizar o MTT e produzir cristais de formazan indicando que a viabilidade dessas células foi mantida ao longo da exposição crônica. Além dessas observações, o aumento da absorbância das amostras, ao longo dos tempos de cultivo avaliados (por até 21 dias), reforça que o tipo de suplemento utilizado não interferiu na viabilidade celular (Gráfico 8 ao Gráfico 13).

Com o intuito de avaliar a expressão de marcadores de superfície para células-tronco mesenquimais, foi realizada uma caracterização fenotípica das hASCs isoladas de lipoaspirado. Verificou-se que as hASCs formaram, *in vitro*, uma população homogênea já que 100% das células expressaram os antígenos CD73 e HLA-ABC; 98,3% expressaram CD90 e 99,4% expressaram CD105, marcadores que são específicos de células-tronco mesenquimais e menos de 2% expressaram os marcadores CD19, CD14 e CD45, esses últimos específicos de células-tronco hematopoiéticas (Gráfico 3 e Gráfico 4). O marcador CD34 estava presente em 3,1% das células analisadas. Em 2013, uma declaração conjunta da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) determinou que a porcentagem de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo que podem expressar o marcador antigênico de superfície CD34 varia entre 2%-30%, dependendo das condições de isolamento e cultivo. Essa expressão ocorre na fase inicial da cultura e vai decrescendo com as contínuas divisões celulares. Assim, as hASCs estabelecidas nesse trabalho estão de acordo com as características fenotípicas propostas por Zuk e colaboradores (2002) e pela ISCT (Sociedade Internacional de Terapia Celular) (DOMINICI et al., 2006; P. BOURIN et. al., 2013).

As hASCs também foram avaliadas quanto à viabilidade na exposição aguda ao Roundup®, em um período de 24 a 72 horas. As curvas de metabolização de MTT mostraram que o tratamento com a formulação induziu uma rápida redução na viabilidade celular de

modo dose-dependente, também encontrado por Benachour e colaboradores (2007) em células embrionárias e placentárias humanas tratadas com esse herbicida. No caso da exposição das hASCs, concentrações mais elevadas de herbicida e um período de exposição mais prolongado, ou seja, de 72 horas induziram uma maior perda de viabilidade das células (Gráfico 5). As análises mostraram que a viabilidade das células expostas às concentrações menores de Roundup® (a partir de 0,01% V/V, não letais), em alguns casos, foi maior que as células do grupo controle DMEM 10% PH (Gráfico 5-A, B, C e E e Gráfico 6). Hipotetiza-se que, por conter surfactantes em sua fórmula, estes componentes possam ter facilitado a entrada da solução de MTT nas células, permitindo um contato maior dessa substância com as enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias celulares. Isso, por sua vez, gerou um aumento na produção de cristais de formazan com a consequente detecção de uma maior absorvância das amostras.

Somente na concentração abaixo do recomendado para a utilização na agricultura, equivalente a $36 \mu\text{g mL}^{-1}$ de glifosato, as células foram capazes de sobreviver a uma exposição aguda ao agrotóxico. O valor de IC50 do composto foi determinado neste experimento, sendo obtido o valor de $42,98 (\pm 0,91) \mu\text{g mL}^{-1}$ (Gráfico 7). Esses achados são semelhantes ao observado em células da linhagem HEPG2, onde a IC50 estimada foi de $37,65$ a $45,14 \mu\text{g mL}^{-1}$, para o produto Roundup Ultra Max® em concentrações abaixo das utilizadas na lavoura (CHAUFAN et al., 2014). É interessante notar que, mesmo se tratando de tipos celulares distintos, o valor de IC50 foi muito próximo ao encontrado para células-tronco humanas.

Benachour & Séralini (2009) mostraram que, para todas as formulações de glifosato testadas, a mortalidade de células humanas umbilicais, placentárias e embrionárias não estabelece uma relação linear com a concentração de glifosato presente nesses produtos. Isso pode ser justificado pelas concentrações dos adjuvantes presentes nesses produtos, como POEA (polioxietilenamida), que também apresenta citotoxicidade. De fato, outros estudos com células humanas expostas ao glifosato revelaram que a formulação comercial é mais tóxica do que o próprio princípio ativo, reforçando a ideia de que os adjuvantes nesses produtos desempenham um papel na toxicidade do herbicida (MARTINEZ et al., 2007; GASNIER et al., 2010 e 2011). Isso se aplica aos resultados obtidos nesse trabalho, uma vez que os efeitos tóxicos observados nas hASCs não podem ser atribuídos exclusivamente à formulação ou ao princípio ativo, fazendo-se necessária uma investigação do papel de cada um dos componentes do produto comercial sobre essas células.

As células-tronco mesenquimais (MSCs) têm como principal característica a capacidade de se diferenciarem em células de linhagens mesenquimais como as que constituem ossos, cartilagem e gordura. Vários sinais e mecanismos controlam a sobrevivência, proliferação e diferenciação dessas células e uma falha ou interrupção dessas vias de sinalização pode levar a doenças degenerativas e até mesmo o câncer (HOOGDUIJN et al., 2006). Com a intenção de se avaliar os efeitos tóxicos sobre a diferenciação celular, as hASCs foram submetidas à diferenciação adipogênica durante 21 dias em meio de cultura com fatores indutores já caracterizados na literatura (dexametasona, indometacina, insulina e isobutil metilxantina) na ausência e presença de Roundup® (ZUK et al., 2002; KERN et al., 2006).

As hASCs foram distribuídas em grupos correspondentes aos seguintes meios de cultura: DMEM 10% PH; DMEM 10% PH + Roundup®; Meio Adipogênico 10% PH e Meio Adipogênico 10% PH + Roundup®. A viabilidade das células-tronco foi avaliada semanalmente pelo ensaio de metabolização de MTT, sendo observado um aumento a uma taxa constante e igual para todos os grupos durante os 21 dias de cultivo. Dessa forma, as células-tronco induzidas à diferenciação adipogênica permaneceram viáveis independentemente do tratamento com agrotóxico. Porém, as hASCs tratadas com DMEM 10% PH + Roundup®, ou seja, sem estímulo adipogênico, perderam a viabilidade a partir de 7 dias de cultivo (Gráfico 8 ao Gráfico 10). Assim, pode-se dizer que as células submetidas à diferenciação apresentam maior tolerância ao herbicida do que as células multipotentes indiferenciadas. Entretanto, essa tolerância pode ser relativa, dado que os componentes do meio DMEM e do meio adipogênico são diferentes e podem ter influenciado na morte ou sobrevivência das células, principalmente devido a uma possível interação com a formulação comercial de glifosato. Sabe-se que alguns fatores que compõem os meios de diferenciação (adipogênico e osteogênico) atuam como anti-inflamatórios, como, por exemplo, a dexametasona, um glicocorticoide sintético que também apresenta atividade imunossupressora. É descrito na literatura que o tratamento com dexametasona pode induzir resistência parcial a apoptose em linhagens de gliomas e astrocitomas, à cisplatina e ao metotrexato (BAVARESCO et al., 2005). Essas propriedades de prevenir a morte celular podem estar associadas a um efeito protetor sobre a viabilidade das células em diferenciação expostas ao agrotóxico.

O acúmulo intracelular de lipídeos foi observado nas células cultivadas em meio adipogênico com e sem agrotóxico pelo método de coloração com *Oil Red O*. Esse acúmulo não foi observado no grupo DMEM 10% PH (controle) e, portanto, conclui-se que a

diferenciação foi bem-sucedida. Porém, é importante destacar que as células cultivadas em meio adipogênico com acréscimo de Roundup® apresentaram alterações morfológicas significativas, tais como o aumento de diâmetro e formação de vesículas em seu citoplasma (Figura 5). Esse resultado também pode estar relacionado à presença de surfactantes na formulação comercial, os quais alteram a permeabilidade das membranas celulares conforme descrito previamente na literatura (BENACHOUR & SÉRALINI, 2009).

Ao final do período de 21 dias, as células-tronco foram avaliadas quanto à expressão de genes marcadores da linhagem adipogênica, como *PPARG* (receptor γ ativado pelo fator proliferador de peroxissomos), transportador de glicose *GLUT4* e leptina (*LEP*). Esses resultados revelaram a capacidade de diferenciação adipogênica das hASCs mesmo na presença de agrotóxico. A expressão do gene *PPARG* foi observada somente nas células cultivadas em meio adipogênico com e sem Roundup®. Entretanto, a expressão dos genes que codificam para *GLUT4* e leptina foi notada em células cultivadas em meio DMEM 10% PH (Figura 6). Essas observações são semelhantes ao encontrado em um trabalho realizado por Zuk e colaboradores (2001), onde as células do grupo controle (não induzidas à diferenciação) também expressaram *GLUT4* e *LEP* aos 21 dias de cultivo, quando avaliados por Real Time-PCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real). Nesse mesmo estudo, *PPARG* foi definido como um gene específico para células-tronco induzidas à diferenciação adipogênica, não tendo sido expresso em células do grupo controle, suportando os resultados obtidos.

O gene codificante para a enzima gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (GAPDH), foi utilizado como controle das reações de PCR. A enzima GAPDH pertence à via glicolítica, e seu gene é expresso constitutivamente em diversas células e tecidos do corpo humano (BARBER et al., 2005). Assim, a sua expressão foi detectada em todos os grupos de células submetidas aos diferentes tratamentos, conforme o esperado, validando o experimento.

Os efeitos tóxicos de Roundup® sobre a diferenciação osteogênica das hASCs também foram avaliados (Figuras 7 e 8 e Gráfico 10 ao 14). A indução da diferenciação osteogênica foi realizada através da adição de dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato ao meio de cultura DMEM suplementado com PH por até 21 dias. A utilização desses fatores indutores na diferenciação osteogênica utilizando células-tronco também já é bem estabelecida na literatura (KERN et al., 2006; LIU et al., 2007).

Similarmente à diferenciação adipogênica, os grupos: DMEM 10% PH; DMEM 10% PH + Roundup®; Meio Osteogênico 10% PH e Meio Osteogênico 10% PH + Roundup® tiveram suas viabilidades analisadas semanalmente. O ensaio de metabolização de MTT indicou um aumento com o tempo na metabolização de MTT igual para todos os grupos,

com exceção do grupo DMEM 10%PH + Roundup[®], no qual as células-tronco morreram com somente sete dias de cultivo. Entretanto, observou-se que o tratamento com agrotóxico não influenciou a viabilidade das células cultivadas em meio osteogênico (Gráfico 10 ao Gráfico 12). Dessa forma, as hASCs indiferenciadas demonstraram-se mais sensíveis ao tratamento com o herbicida do que aquelas submetidas à diferenciação. Este perfil foi observado tanto na diferenciação osteogênica quanto na adipogênica.

As imagens de coloração por *Von Kossa* apontaram a presença de mineralização nas culturas cultivadas em meio osteogênico suplementado com PH ao fim do período de 21 dias. Os nódulos de mineralização, detectados pela coloração marrom ao microscópio ótico, foram observados até mesmo nas células-tronco do grupo submetido ao meio osteogênico com adição de Roundup[®]. Entretanto, estas últimas mostraram-se alteradas morfológicamente, de modo similar ao ocorrido na diferenciação adipogênica: aumento de diâmetro e presença de vesículas no citoplasma (Figura 7). É importante ressaltar mais uma vez que, a presença de surfactantes na formulação comercial de glifosato pode ter influenciado diretamente na permeabilidade da membrana das hASCs submetidas à diferenciação osteogênica.

As hASCs também foram analisadas quanto à expressão de genes para fosfatase alcalina (*ALPL*), *runx2* (*RUNX2*), osteopontina (*SPPI*) e colágeno tipo I (*COL1A1*), marcadores importantes da diferenciação osteogênica relacionados na literatura (Figura 8) (ZUK et al., 2002; LIU et al., 2007; PAULA et al., 2013). Cada marcador exerce uma função importante na formação do tecido ósseo. A fosfatase alcalina é considerada um marcador precoce de diferenciação osteogênica. Já a osteopontina, a qual é produzida por osteoblastos durante diferentes estágios da maturação tecidual, quando localizada no meio intracelular, estimula a migração e proliferação celular. Em meio extracelular, parece regular o processo de mineralização. O fator de transcrição *runx2* é essencial para diferenciação osteoblástica, formação e crescimento do osso e colágeno tipo I é essencial para mineralização da matriz óssea (PAULA et al., 2013).

Independentemente do tratamento com Roundup[®], a expressão de todos os genes foi detectada ao fim do período de diferenciação. Além disso, as células pertencentes ao grupo DMEM 10% PH também mostraram a expressão desses marcadores. A expressão dos genes para colágeno tipo I, fosfatase alcalina e *runx2* em células cultivadas em meio DMEM (controle) também foi observada em um estudo anterior (PAULA et al., 2013). Osteopontina também foi detectada em células-tronco não induzidas (ZUK et al., 2002). Embora importantes como marcadores para diferenciação osteogênica, estes genes não podem ser considerados específicos para a linhagem osteoblástica e, por isso suas detecções em células

do grupo controle. A expressão do gene para osteocalcina, um marcador tardio da diferenciação osteogênica, é o único consenso em literatura considerado específico para a linhagem osteoblástica (ZUK et al., 2002). Entretanto, tentativas de avaliar a expressão desse gene não foram bem-sucedidas nesse estudo por problemas técnicos.

A fosfatase alcalina é considerada um marcador para células-tronco embrionárias e também expressa em hASCs (RIEKSTINA et al., 2009). Uma análise da expressão por ensaio de Real Time-PCR nas células-tronco de tecido adiposo submetidas à diferenciação osteogênica por 21 dias mostrou um aumento de duas vezes em sua expressão comparado às células-tronco indiferenciadas, perfil consistente com os dados dos ensaios enzimáticos (ZUK et al., 2002).

O aumento da atividade dessa enzima ocorre no início da diferenciação osteogênica e pode ser facilmente detectado pelo ensaio colorimétrico de BCIP-NBT. A análise dos dados obtidos em nosso estudo mostrou que a atividade enzimática do grupo cultivado em meio osteogênico foi superior à observada para o grupo indiferenciado, cultivado em meio DMEM 10% PH. Esse aumento da atividade pôde ser detectado a partir de 7 dias de cultivo ($p < 0,01$), tornando-se ainda maior aos 14 e 21 dias do processo de diferenciação ($p < 0,0001$) (Gráfico 14). As hASCs submetidas à diferenciação osteogênica e na presença de Roundup® apresentaram uma atividade enzimática semelhante às células do grupo indiferenciado. É possível que o tratamento com agrotóxico tenha influenciado nesse resultado, através de alguma interação com as células. Em um estudo realizado em 2006, por Hoodjuin e colaboradores, células-tronco mesenquimais humanas (MSCs) foram expostas a concentrações micromolares de agrotóxicos do tipo organofosforados e carbamatos. Efeitos tóxicos sobre a proliferação ou sobrevivência das MSCs não foram observados, embora a capacidade de diferenciação osteogênica tornou-se limitada com redução da atividade de fosfatase alcalina e decréscimo na mineralização. Realizando-se uma análise comparativa com esse trabalho, destacam-se semelhanças: ao serem expostas ao Roundup®, o qual é um herbicida organofosforado, as hASCs proliferam, conforme avaliado pelo ensaio de MTT, durante a diferenciação osteogênica, porém a atividade de fosfatase alcalina também foi reduzida aproximando-se do controle (DMEM 10% PH).

Nas avaliações toxicológicas de algum composto, é importante a determinação da via de morte celular induzida pelo mesmo. O processo apoptótico é manifestado pela condensação do citoplasma e do núcleo (picnose), fragmentação nuclear (cariorrexe), aparência morfológica normal de organelas citoplasmáticas e uma membrana plasmática intacta. À medida que o processo se desenvolve, ocorre uma fragmentação do núcleo e a célula se

desagrega em corpos apoptóticos envoltos por porções da membrana plasmática. Por outro lado, a necrose é evidenciada pelo inchaço do citoplasma, ruptura da membrana plasmática, inchaço das organelas citoplasmáticas (particularmente da mitocôndria) e algum grau de condensação da cromatina nuclear. Além desses, existem outros processos descritos na literatura para a morte celular como, por exemplo, autofagia e catástrofe mitótica. (BENACHOUR & SÉRALINI, 2009).

A morte por apoptose se manifesta por uma série de eventos citados anteriormente e também pela presença de fosfatidilserinas (PS) na superfície exterior da membrana plasmática das células, importante para o reconhecimento pelos macrófagos e posterior fagocitose das mesmas. No início do processo apoptótico, com a desorganização da membrana celular, as PS são deslocadas da superfície interna da bicamada lipídica, onde estão voltadas para o citosol, para o lado exterior. No ensaio de detecção de apoptose, ocorre a ligação de Anexina V, uma proteína celular de alta afinidade, nos sítios de ligação presentes nas fosfatidilserinas. Essa ligação é dependente de cálcio.

O marcador nuclear fluorescente Iodeto de Propídio (PI) é utilizado para distinguir as células apoptóticas das células necróticas. É uma molécula que se intercala ao DNA (ácido desoxirribonucleico) com a condição de que a membrana celular esteja permeável à sua entrada, mostrando assim a perda de sua integridade. Assim que as células se desintegram, o acesso à superfície interna da membrana viabiliza a ligação adicional de Anexina. Dessa forma, a dupla-marcação é utilizada para diferenciar as células em apoptose tardia e/ ou necrose. Dessa forma, ao corar as células simultaneamente com Anexina V- Alexa Fluor 488 (fluorescência verde) e com o corante PI (fluorescência vermelha), é possível discriminar por microscopia, células viáveis e intactas (ALEXA FLUOR- PI-), no início de apoptose (ALEXA FLUOR+PI-), células tardiamente apoptóticas ou necróticas (ALEXA FLUOR+PI+) e necróticas (ALEXA FLUOR- PI+) (LIFE TECHNOLOGIES PROTOCOLS, 2014).

Nesse trabalho, os resultados obtidos na análise por imagem (Figura 9) e quantificação da morte celular (Gráfico 15) induzida por Roundup[®], indicaram que o herbicida, foi indutor tanto do processo apoptótico quanto necrótico em hASCs expostas por 24 horas ao mesmo, com destaque para o primeiro mecanismo. De acordo com o relatado na literatura, em células da linhagem primária umbilical (HUVEC) e placentária (JEG3) humanas, o tratamento com uma solução na concentração $18 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Roundup[®] por 24 horas levou à apoptose, evidenciada pelo aumento da condensação do DNA, picnose e cariorrexe. Observou-se, também, a ativação enzimática das caspases 3/7, as quais são mediadoras-chave de eventos mitocondriais na apoptose. A necrose também foi observada em

HUVEC e células embrionárias de rim humanas (293), evidenciada pela perda da integridade da membrana plasmática e liberação de adenilato quinase pelas células para o meio extracelular. HUVEC mostrou-se 100 vezes mais sensível ao tratamento com Roundup[®] do que as demais linhagens (BENACHOUR & SÉRALINI, 2009). Outro trabalho com células da linhagem hepática HEPG2 expostas a uma formulação comercial de glifosato na concentração 35 µg mL⁻¹, muito próxima à que foi testada nesse estudo, por 24 horas, evidenciou a indução de picnose e condensação da cromatina nuclear além de ativação das caspases 3/7. (CHAUFAN et al., 2014). Coletivamente, essas observações mostram que ambos os processos podem ser induzidos pelo tratamento com Roundup[®].

Contudo, para propormos de fato o mecanismo de morte celular induzidos por agrotóxico, o qual parece ser apoptótico, é importante que as hASCs sejam ainda avaliadas após a exposição ao Roundup[®] quanto ao aspecto da cromatina e do núcleo (picnose e cariorrexe) assim como da atividade de caspases envolvidas nesse processo.

Diante do exposto, esse trabalho figura-se como pioneiro no estudo dos efeitos tóxicos do herbicida Roundup[®] sobre hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com plasma humano (PH), assim como os efeitos deste agrotóxico na diferenciação dessas células cultivadas com fatores indutores específicos.

7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesse trabalho mostraram que as células-tronco humanas derivadas de tecido adiposo (hASCs) foram capazes de proliferarem e se diferenciarem em meio de cultura suplementado com plasma humano, mantendo o fenótipo característico de células-tronco mesenquimais.

Além disso, esse estudo evidenciou que, a exposição das hASCs à formulação comercial a base de glifosato (Roundup[®]) foi capaz de provocar efeitos tóxicos, tais como: perda de viabilidade em exposição aguda a concentrações elevadas do produto, indução de morte celular por apoptose e necrose, alterações morfológicas nas células submetidas às diferenciações adipogênica e osteogênica e redução da atividade de fosfatase alcalina. A estimativa da IC50, importante em estudos toxicológicos, também foi um dado relevante obtido nesse estudo na avaliação da resposta *in vitro* de células-tronco humanas expostas ao agrotóxico.

Diante do exposto, esse trabalho estende-se por vários segmentos de pesquisa necessários para a confirmação dos processos celulares que acompanham a ação desse herbicida, assim como aprofundar a investigação dos mecanismos envolvendo a sua toxicidade em células humanas, enfatizando-se os processos de morte celular.

8 PERSPECTIVAS

Este trabalho foi pioneiro na avaliação dos efeitos do agrotóxico Roundup® na sobrevivência, capacidade proliferativa e na diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. A fim de estendermos a caracterização dos mecanismos relacionados a esses processos, temos como perspectivas para este estudo:

- 1- Analisar e quantificar a morte celular por necrose e apoptose induzida por Roundup® utilizando técnicas adicionais, como por exemplo, citometria de fluxo e avaliação do estado de condensação da cromatina com corantes que apresentem afinidade ao DNA das células.
- 2- Quantificar a expressão de genes relacionados à diferenciação durante o tratamento com agrotóxico utilizando PCR em tempo real (Real Time-PCR).
- 3- Realizar uma análise de mutagenicidade do Roundup® através do teste de micronúcleo.
- 4- Avaliar os efeitos tóxicos dos adjuvantes da formulação comercial de glifosato, principalmente do POEA, sobre as células-tronco derivadas de tecido adiposo humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRASCO. **Grupo Inter GTs de Diálogos e Convergências da ABRASCO. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** ABRASCO. Parte I, 98p, Rio de Janeiro, Abr 2012 Disponível em: < <http://www.abrasco.org.br/UserFiles/File/ABRASCODIVULGA/2012/DossieAGT.pdf>>. Acesso em 20 dez. 2014. *Academy Of Sciences Of The United States Of America*, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.
- AMABLE, P.R.; et al. *Mesenchymal Stromal Cell Proliferation, Gene Expression and Protein Production in Human Platelet-Rich Plasma-Supplemented Media.* **PLoS ONE**, v.9, n.8, 2014.
- AMARANTE JR, O.P. et al. *Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos E Legislação.* **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p.589-593, 2002.
- ANGHILERI, E.; MARCONI, S.; PIGNATELLI, A. et al. *Neuronal differentiation potential of human adipose derived mesenchymal stem cells.* **Stem Cells Develop**, v. 17, n. 5, p. 909-916, 2008.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Audiência pública para discutir o uso de agrotóxicos na agricultura e seus efeitos sobre trabalhadores rurais e consumidores de produtos agropecuários.** In: AUDIÊNCIA PÚBLICA DA COMISSÃO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA, ABASTECIMENTO E DESENVOLVIMENTO RURAL. Requerimento nº 607/2014, Brasília, 27/11/2014. Disponível em: < <http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-publicas-2014/audiencia-publica-27-de-novembro-de-2014-2>>. Acesso em: 20 dez. 2014.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - Relatório de Atividades de 2011 e 2012.** Brasília, Out 2013, p 18-20. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/58a5580041a4f6669e579ede61db78cc/Relat%C3%B3rio+PARA+2011-12+-+30_10_13_1.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 22 dez 2014.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n. 10 de 22 de fevereiro de 2008. Que estabelece a reavaliação toxicológica de 14 agrotóxicos.** Brasília, DOU de 28 fev.2008. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/270208_rdc_10_08_completo.pdf> Acesso em: 20 dez 2014.
- ARBUCKLE, T.E.; LIN, Z.E.; MERY, L.S. *An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population,* **Environ Health Perspect**, v.109, n.8, p. 851-857, 2001.
- AURICH, H.; SGODDA, M.; KALTWAßER, P. et al. *Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo.* **Gut**, v. 58, n. 4, p. 570-581, 2009.

- BARBER, R.D. et al. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. **Physiol Genomics**, v. 21, n.3, p.389-395,2005.
- BARVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.N.O. Glicocorticóides: Usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v.17,nº7/9,p.58-60, 2005.
- BENACHOUR, SÉRALINI. Glyphosate Formulations Toxicity in Human Cells. **Chem. Res. Toxicol**, v. 22, n. 1, 2009.
- BENACHOUR, N. et al. Time- and Dose-Dependent Effects of Roundup on Human Embryonic and Placental Cells. **Arch Environ Contam Toxicol**. v. 53, n.1, p.126-133, 2007.
- BOLOGNESI, C.; et al. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. **J Agric Food Chem**, v.45, p. 1957-62, 1997.
- BORSOI, A. et al. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. Cascavel, **Acta Iguazu**, v.3, n.1, p. 86-100, 2014.
- BRASIL. Lei nº 7802/89, de 11 de julho de 1989. Regulamentada pelo Decreto nº 98816/90. Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 12 jul. 1989.
- BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H. et al. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. **Altex**, v. 27, p. 53-62, 2010.
- BYDŁOWSKI, S.P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v.31 (Supl. 1), p. 25-35, 2009.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.
- CERDEIRA, A. L. et al. Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosate-resistant soybean. **Brazil J Environ Sci Health Part B**, v. 42, p. 539-549, 2007.
- CHAUFAN, G. et al. Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. **Int J Toxicol**, v.33, n.1, p.29-38, 2014.
- CHO, H. S.; SONG, I. H.; PARK, S. et al. Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich PH and its influence on human mesenchymal stem cells. **Kor J Lab Med**, v. 31, p. 212-218, 2011.
- COSTA, M.D.L. et al. Alterações de Neuroimagem no Parkinsonismo: Estudo de cinco casos. **Arq. Neuro-Psiquiatr**, v.62, n.2, 2003.
- CRISAN, M.; YAP, S.; CASTEILLA, L. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell Stem Cell**. v. 3, p. 301-313, 2008.

- CZELUSNIAK, K.E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. Botucatu, **Rev Bras Pl Med**, v. 14, n. 2, p.400-409, 2012.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-2299, 2008.
- DALLEGRAVE, E. et al. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Arch Toxicol**. v. 81, n.9, p.665-673, 2007.
- DE BARI, C. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthr Rheum**, v. 44, n. 8, p. 1928-1942, 2001.
- DE COPPI, P.; BARTSCH, G. J.; SIDDIQUI, M M. et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nature Biotech**, v. 25, n. 1, p. 100-106, 2007.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.
- ELDRIDGE, B.F. **Pesticide Classification and Formulation**. In: Pesticide Application and Safety Training for Applicators of Public Health Pesticides. California, 2008. Cap2. Disponível em: < http://westnile.ca.gov/special/category_a/?page=Chapter2.htm>. Acesso em: 22 dez 2014.
- EL-SHENAWY, N.S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environ Toxicol Pharmacol**. v.28 p. 379-385, 2009.
- FAO - Food and Agriculture Organization. **Agricultural database**, 2003. Disponível em: <<Http://www.fao.org>> Acesso em: 10 dez. 2014.
- FAO- Food and Agriculture Organization of the United States. **FAO Specifications and Evaluations for Plant Protection Products Glyphosate** p.20-30, 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/glypho01.pdf> Acesso em: 28 dez 2014.
- FIOCRUZ. **Brasil consome 14 agrotóxicos proibidos no mundo**. Portal Redes Fito, Rio de Janeiro, 27 Fev. 2014. Disponível em: < <http://redesfito.far.fiocruz.br/index.php/noticias/58-brasil-consome-14-agrotoxicos-proibidos-no-mundo>> .Acesso em: 20 dez. 2014.
- FOOD SAFETY BRAZIL. **MAPA divulga informações sobre o monitoramento de pesticidas e contaminantes em vegetais**. Brasil, 2 Jul. 2013.Blog foodsafetybrazil.com. Disponível em:< <http://foodsafetybrazil.com/mapa-divulga-informacoes-sobre-o-monitoramento-de-pesticidas-e-contaminantes-em-vegetais/>>.Acesso em: 20 nov. 2014.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; LALYKINA, K. S. Thymus cells are inducible to osteogenesis. **Eur J Immunol**, v. 2, p. 602-603, 1972.

- FUERTES, M.A. et al. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. **Curr Med Chem**, v. 10, n. 3, p. 257-66, 2003.
- GASNIER, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E. et al. Dig1 protects against cell death provoked by glyphosate-based herbicides in human liver cell lines. **J Occup Med Toxicol**, v.5, p. 29-41, 2010.
- GASNIER, C.; LAURANT, C.; DECROIX-LAPORTE, C. et al. Defined plant extracts can protect human cells against combined xenobiotic effects. **J Occup Med Toxicol**, v. 6, n.1, p 3-13, 2011.
- GASNIER, C. et al. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicol**, v. 262, n.3, p.184-191, 2009.
- GONZALEZ, V.M; FUERTES, M.A; ALONSO, C; PEREZ, J.M. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? **Mol Pharmacol**, v.59, p.657–663, 2001.
- GOTTIPAMULA, S et al. Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. **J Tissue Eng Regen Med**, 2013.
- GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. In: **Proceedings of the national**,v.97,n.25,2000.
- EISKANEN, A.; SATOMAA, T.; TIITINEN, S. et al. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. **Stem Cells**, v. 25, p. 197-202, 2007.
- HOOGDUIJN, M.J.; RAKONCZAY, Z.; GENEVER, P.G. The Effects of Anticholinergic Insecticides on Human Mesenchymal Stem Cells. **Toxicol Sci**, v. 94, n. 2, p.342-350, 2006.
- HORWITZ, E. M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytother**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável- Brasil 2012**. Estudos e pesquisas. Rio de Janeiro, 2012 Disponível em: ftp://geoftp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/indicadores_desenvolvimento_sustentavel/2012/ids2012.pdf .Acesso em: 20 dez 2014.
- KAKUDO, N. et al. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblastos. **Plast Reconstr Surg**,v.122,n.5, p.1352-1360, 2008.
- KANG, K.S; TROSKO, J.E. Stem cells in toxicology: fundamental biology and practical considerations. **Toxicol Sci**, v. 120, Suppl 1:S269-89, 2011.

- KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p.1294-301, 2006.
- KOCHAEEMER, A.; KERN, S.; KLÜTER, H. et al. Serum and thrombin-activated platelet-rich PH are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. **Stem Cells**, v. 25, p. 1270-1278, 2007.
- KOLF, C.M.; CHO, E.; TUAN, R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells. Regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Res Ther**, v. 9, n.1, p.204, 2007.
- KOLLER, V.J. et al. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. **Arch Toxicol**, v. 86, n.5, p.805-813, 2012.
- KUZNETSOV, S. A.; MANKANI, M. H.; GRONTHOS, S. Circulating skeletal stem cells. **J Cell Biol**, v. 153, 2001.
- LA DOU, J. The export of environmental responsibility (Editorial). **Arch Environ Health**, v. 49, n.1, p. 6-8, 1994.
- LE BLANC, K.; RINGDÉN, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation biology of blood and marrow transplantation. **Am Soc Blood Marrow Transpl**, v. 11, p. 321-334, 2005.
- LEMISCHKA, I.R. Stem cell biology: a view toward the future. **Ann NY Acad Sci**, v. 1044, p.132-138, 2005.
- LIFE TECHNOLOGIES PROTOCOLS. **Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit**. Thermo Fisher Scientific. 2014 Disponível em: < <http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/flow-cytometry-protocol/apoptosis/alexa-fluor-488-annexin-v-dead-cell-apoptosis-kit.html>>. Acesso em: 28 dez.2014.
- LIN, H. T. et al. Using human PH supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential. **Transpl Proc**, v. 37, p. 4504-4505, 2005.
- LINDROOS, B.; AHO, K.; KUOKKANEN, H. et al. Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum. **Tissue Engin: Part A**, v. 16, p. 2281-2294, 2010.
- LIU, T. M. et al Identification of Common Pathways Mediating Differentiation of Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells into Three Mesenchymal Lineages. **Stem Cells**, v. 25, p. 750-760, 2007.
- LOCKE, M.; WINDSOR, J.; DUNBAR, P. R. Human Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Characterization and Applications in Surgery. **ANZ J Surg**, v. 79, p. 235-244, 2009.

- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1ª ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – 2011. 190 p.
- MANNELLO, F.; TONTI, G. A. Concise Review: No Breakthroughs for Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cell Culture: Conditioned Medium, FeederLayer, or Feeder-Free; Medium with Fetal Calf Serum, Human Serum, or Enriched Plasma; Serum-Free, Serum Replacement Nonconditioned Medium, or Ad Hoc Formula? All That Glitters Is Not Gold! **Stem Cells**, v. 25, p. 1603-1609, 2007.
- MARTIN, M. J.; MUOTRI, A.; GAGE, F. et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. **Nature Med**, v. 11, n. 2, p. 228-232, 2005.
- MARTINEZ, A.; REYES, I.; REYES, N. Cytotoxicity of the herbicide glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells. **Bioméd**, v. 27, n. 4, p. 594-604, 2007.
- MARTINS, T.M.; PAULA, A.C.; GOMES, D.A.; GOES, A.M. Alkaline Phosphatase Expression/Activity and Multilineage Differentiation Potential are the Differences Between Fibroblasts and Orbital Fat-Derived Stem Cells – A Study in Animal Serum-Free Culture Conditions. **Stem Cell Rev and Rep**, n.10, p. 697–711, 2014.
- MIZUNO, H. 2009. Adipose-derived Stem Cells for Tissue Repair in Regeneration: Ten Years of Research and Literature Review. **J Nippon Med Scho**, v. 76, p. 56-66.
- MONROY, C.M. et al. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. Colombia, **Biomed**, v. 25, p. 335-345, 2005.
- MONSANTO. Produtos. **Portal Monsanto Company**. 2014. Disponível em: <<http://www.roundup.com.br/produtos.php>> Acesso em 28 dez 2014.
- MOSSMAN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MUSINA, R. A. et al. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. **Bull Experim Biol Med**, v. 145 n. 4, 2008.
- NAUTA, A. J.; FIBBE, W. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, p. 3499-3506, 2007.
- P.BOURIN. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). **Cytother**, v. 15, p. 641-648, 2013.
- PAULA, A. C. C.; ZONARI, A. A. C.; MARTINS, T. M. M. et al. Human serum is a suitable supplement for the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate scaffolds. **Tissue Engin: Part A**, v. 19, n. 1-2, p. 277-289, 2013.

- PEDLOWSKI, M. A. et al. Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. **Crop Protection**, v. 31, n.1, p. 113–118, 2012.
- PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, n.8, p.115-122, 2005.
- PÉREZ-ILZARBE, M.; DÍEZ-CAMPELO, M.; ARANDA, P. et al. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. **Transfusion**, v. 49, p. 1901-1910, 2009.
- PÉREZ-ILZARBE, M. et al. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. **Transfusion**, v. 49, p. 1901-1910, 2009.
- PIENIAZEK, D.; BUKOWSKA, B.; DUDA, W. Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. **Pest Biochem Physiol**, v.79, n.2. P.58-63, 2004.
- PLANAT-BENARD, V. et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. **Circulation**, v. 109, n. 5, p. 656 663, 2004.
- ROMANO, M.A. et al. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Arch. Toxicol**, v. 86, n.4, p. 663-673, 2012.
- ROMANO, R.M; ROMANO, M.A; OLIVEIRA, C.A de. Glifosato como desregulador endócrino químico. *Ambiência – Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, v.5, n.2, 2009.
- SABATINI, F.; PETECCHIA, L.; TAVIAN, M. et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Lab Invest**, v. 85, n. 8, p. 962-971, 2005.
- SAMPAIO, D. P. A. E GUERRA, M. S. **Receituário agrônômico – Guia prático para a nova lei dos agrotóxicos**. São Paulo, Publicações Globo, 1991.
- SCANU, M.; MANCUSO, L.; CAO, G. Evaluation of the use of human Mesenchymal Stem Cells for acute toxicity tests. **Toxicol In Vitro**, v. 25, n.8, p. 1989-1995, 2011.
- SCHECROUN, N.; DELLOYE, C. In vitro growth and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells supported by autologous PH. **Bone**, v. 35, p. 517- 524, 2004.
- SCHMITT, A.; GRIENSVEN, M. V.; IMHOFF, A. B. et al. Application of stem cells in orthopedics. **Stem Cells Int**, v. 2012, p. 1-11, 2012.
- SECCO, M.; ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! **Stem Cells**, v. 26, p. 146-150, 2008.

- SEKIYA, I.; LARSON, B.L.; VUORISTO, J.T.; CUI, J.G.; PROCKOP, D.J. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). **J Bone Miner Res**, v.19, p. 256-264, 2004.
- SHEEHAN, D.; HRAPCHAK B. **Theory and Practice of Histotechnology**, Battelle Press, Ohil. 2nd Ed, pp 226-227, 1980.
- SILVA, J.M. et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. Rio de Janeiro, **Rev C S Col**, v.10, n.4, p. 891-903, out./dez. 2005.
- SILVA, Jandira Maciel Da. **Cânceres Hematológicos na Região Sul de Minas Gerais**. 2007. 217 f. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2007.
- SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas. **Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Circunstância**. Brasil, 2011. Disponível em: < http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/Tabela%206.pdf> .Acesso em: 25 dez 2014, a.
- SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico- Farmacológicas. **Óbitos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Circunstância**. Brasil, 2011. Disponível em: < http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/Tabela%2011.pdf> Acesso em: 25 dez 2014, b.
- SIVIKOVA, K. E; DIANOVSKY, J. Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes, **Int J Hyg Environ Health**, v.209, n.1, p 15-20, 2006.
- SOUZA, R.A. **Estudo da linhagem U-937 como modelo laboratorial para avaliação da imunotoxicidade de agrotóxicos de interesse em saúde pública**. 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- SPEES, J. L.; GREGORY, C. A.; SINGH, H. et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. **Mol Ther**, v. 9, p. 447-456, 2004.
- STREM, B. M. et al. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue derived cells in a murine model of acute myocardial injury. **Cytother**, v. 7, n. 3, p. 282-291, 2005.
- SUN, X. et al. In vitro proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells cultured in autologous PH derived from bone marrow. **Tissue Engin: Part A**, v. 14, n. 3, 2008.
- TERRA. **Pedido para reavaliar herbicida a base de glifosato está parado há 6 anos**. Terra Networks Brasil.8 Abr.2014. Disponível em: <<http://noticias.terra.com.br/ciencia/pedido-para-reavaliar-herbicida-a-base-de-glifosato-esta-parado-ha-6-anos,5281f68d15d35410VgnCLD2000000ec6eb0aRCRD.html>> Acesso em: 10 out 2014.

- TIMPER, K. et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. **Biochem Biophys Res Comm**, v. 341, n. 4, p. 1135-1140, 2006.
- UFAL. **Classificação dos Agrotóxicos**. Portal de Extensão UFAL. 23 out 2009. Disponível em: < <http://portaldeextensao.wikidot.com/classificacao-dos-agrotoxicos>>. Acesso em: 22 dez 2014.
- VALERIO, P.; PEREIRA, M. M.; GOES, A. M.; LEITE, M. F. The Effect of Ionic Products from Bioactive Glass Dissolution on Osteoblast Proliferation and Collagen Production. **Biomaterials**, v. 25, p. 2941-2948, 2004.
- VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K. et al. Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicol in Vitro**, v. 24, p. 1053-1063, 2010.
- VEIGA, M. M. Pesticides: economic efficiency and social and environmental injustice, Rio de Janeiro, **Cien Saude Colet**, v.12, n.1, p 145-152, 2007.
- WAISSMANN, W. Agrotóxicos e doenças não transmissíveis. **Cien Saude Colet**. Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 20-21, 2007.
- WALSH, L. P; McCORMICK, C.; MARTIN, C; STOCCO, D.M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environ Health Perspect**, v. 108, n. 8, p. 769–776, 2000.
- WANG, G. et al. Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate. **Parkinsonism Relat Disord**. v. 17, n.6, p. 486 487, 2011.
- WILLIAMS, A. R.; JOSHUA, M. H. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. **Circ Res**, v. 109, p. 923-940, 2011.
- XU, Y. et al. Receptor Interactive Protein Kinase 3 Promotes Cisplatin-Triggered Necrosis in Apoptosis-Resistant Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. **PloSOne**, v. 9, n. 6, 2014.
- ZHENG, Y.H.; XIONG, W.; SU, K.; KUANG, S.J.; ZHANG, Z.G. Multilineage differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and. **Exp Ther Med**, v.5, p. 1576 – 1580, 2013.
- ZUK, P. A. al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, v. 13, p. 4279-4295, 2002.
- ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engin**, v. 7, p. 211-228, 2001.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPTO. DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

UFMG

Belo Horizonte, 15 de outubro de 2013

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

Atendendo solicitação estou enviado-lhe parecer do projeto de pesquisa intitulado: "Estudo das células-tronco derivadas de tecido adiposo abdominal e palpebral humano como biomarcadores de efeito do herbicida glifosato", sob coordenação do Alfredo Miranda de Goes.

Parecer:

Trata-se de um trabalho cujo objetivo é averiguar a genotoxicidade do glifosato sobre células-tronco derivadas de tecido adiposo humano e tecido adiposo palpebral em exposição de curto e longo prazo, como modelo laboratorial de estudo dos efeitos deste herbicida sobre as células humanas. O projeto apresenta méritos quanto ao emprego de metodologia atual, bem fundamentada e pertinente com os objetivos propostos. As células serão fornecidas por pacientes submetidos a blefaroplastia na clínica de olhos da Santa Casa de Misericórdia e Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais e por pacientes submetidos à lipoaspiração no Núcleo de Cirurgia Plástica que concordem em participar da pesquisa comprovando tal concordância com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este procedimento não trará nenhum desconforto adicional para o paciente não ferindo, portanto, a ética médica, conforme preconizado pelo Comitê de Ética Médica da UFMG. As amostras que serão utilizadas neste projeto são normalmente descartadas após a cirurgia e todos os procedimentos serão realizados somente após assinatura de termo de consentimento. Portanto, sou de parecer favorável pela aprovação do projeto apresentado.

Atenciosamente,

Davidson Assis Gomes, MSc, PhD

Professor adjunto

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Aprovado em reunião de Câmara Departamental realizada em 16 de outubro 2013.

Prof. Carlos Renato Machado

Chefe Dep. de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Davidson Assis Gomes, MSc, PhD
PROF. ADJUNTO
DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

ANEXO B – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em PesquisaUNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** ESTUDO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO ABDOMINAL (hADSC) E PALPEBRAL (OFSC) HUMANO COMO BIOMARCADORES DE EFEITO DO HERBICIDA GLIFOSATO**Pesquisador:** Alfredo Miranda de Goes**Área Temática:****Versão:** 1**CAAE:** 22912213.3.0000.5149**Instituição Proponente:** PRO REITORIA DE PESQUISA**Patrocinador Principal:** Ministério da Saúde**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 490.490**Data da Relatoria:** 11/12/2013**Apresentação do Projeto:**

Esse trabalho visa o desenvolvimento de biomarcadores de efeito do herbicida glifosato. Para esse fim, células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo abdominal e palpebral serão utilizadas como modelo experimental. Essas células, obtidas de pacientes saudáveis submetidos às cirurgias de lipoaspiração e blefaroplastia, serão cultivadas com a presença ou não do agrotóxico. A resposta citológica in vitro ao glifosato será avaliada por várias técnicas de análise toxicológica. Os danos ao material genético e a mortalidade das células expostas ao pesticida serão averiguados por citometria de fluxo e testes colorimétricos. Os resultados obtidos serão utilizados para um futuro desenvolvimento de biossensores de exposição a agrotóxicos.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário:**

Averiguar a genotoxicidade do glifosato sobre células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hADSC) e tecido adiposo palpebral (OFSC) em exposição de curto e longo prazo, como modelo laboratorial de estudo dos efeitos deste herbicida sobre células humanas.

Objetivo Secundário:

- Mensurar a viabilidade, capacidade proliferativa e produção de fosfatase alcalina das células-tronco hADSC e OFSC cultivadas por longo prazo na presença de agrotóxico. Além de avaliar a

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005**Bairro:** Unidade Administrativa II**CEP:** 31.270-901**UF:** MG**Município:** BELO HORIZONTE**Telefone:** (31)3409-4592**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 490.490

formação de micronúcleos (MNI) em células expostas a curto e longo prazo ao glifosato in vitro, a fragmentação do DNA dessas células-tronco cultivadas e expostas ao glifosato in vitro.

- Investigar a indução de senescência celular, apoptose e necrose em hDASC e OFSC expostas a curto e longo prazo ao glifosato, visando compreender os mecanismos de toxicidade deste herbicida,
- Avaliar a capacidade de diferenciação das hADSC e OFSC em células de linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica cultivadas ou não em presença de agrotóxico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A condução dos experimentos planejados neste projeto prevê riscos mínimos para a saúde dos manipuladores, já que está de acordo com as normas de biossegurança e serão rigorosamente controlados. Os resultados obtidos com a pesquisa serão divulgados de acordo com o interesse da comunidade científica e dentro de critérios éticos sem que haja exposição tanto dos pacientes quanto dos doadores envolvidos. Não existem riscos associados ao procedimento adotado neste estudo para a coleta das bolsas de gordura da pálpebra e da gordura abdominal. O paciente será exposto apenas aos riscos inerentes à cirurgia em que será submetido. De qualquer maneira, o paciente estará em regime de internação e será assistido por profissionais qualificados que fazem parte da equipe médica multidisciplinar das clínicas participantes. O método de obtenção das células não acarreta danos para a saúde, nem prejudica a recuperação do paciente, mesmo assim, as amostras de tecido adiposo serão obtidas somente com a permissão por escrito destes. As células serão obtidas de pacientes submetidos à blefaroplastia e lipoaspiração. O cirurgião plástico responsável reservará, durante o ato cirúrgico, as bolsas de gordura e o tecido adiposo abdominal que serão encaminhados ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob coordenação do professor Alfredo Miranda de Goes. Os pacientes terão suas identidades preservadas e receberão um termo de consentimento no qual constará o destino do material. Os experimentos não apresentam riscos à comunidade, à saúde humana e nem ao meio ambiente. Todo material biológico será descartado de acordo com as normas de biossegurança, sendo os resíduos tratados e descontaminados antes da disposição final.

Benefícios:

Este projeto poderá contribuir para o desenvolvimento de biomarcadores de efeito para avaliação dos impactos da utilização do herbicida glifosato sobre a saúde de trabalhadores rurais, através da avaliação de parâmetros bioquímicos, toxicológicos e genômicos em células-tronco adultas,

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 490.490

objetivando, assim, uma futura construção de um biossensor para a detecção de danos à saúde em indivíduos expostos ocupacionalmente ao glifosato, associado ou não a outros agrotóxicos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa relevante sobre o efeito genotoxicidade do glifosato sobre células-tronco derivadas de tecido adiposo humano e a busca de um possível biomarcador para o efeito deletério tóxico desta substância. Os autores tem domínio sobre o método utilizado. Estudos prévios vem sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisadores que já obtiveram aprovação do Comitê de Ética para outros projetos relacionados. Os autores do atual projeto solicitam permissão para incluírem a atual pesquisa na condução de experimentos com o herbicida glifosato. A pesquisa será feita em colaboração com a Clínica de Olhos da Santa Casa e Núcleo de Cirurgia Plástica. O material utilizado na pesquisa é, geralmente, descartado após sua retirada. A utilização na pesquisa dependerá da concordância do paciente mediante assinatura do TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram adequadamente apresentados:

- Projeto de Pesquisa anexo
- Folha de rosto assinada pelo diretor do ICB
- Parecer da Câmara Departamental
- Anuência da Clínica de Olhos da Santa Casa
- Anuência do Núcleo de Cirurgia Plástica
- TCLE em linguagem acessível e em forma de convite

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pesquisa relevante na área que propõe ser desenvolvida e poderá trazer contribuição na pesquisa envolvendo o efeito tóxico do herbicida glifosato sobre as células-tronco adiposas humanas. Não há impedimentos éticos para a sua realização. Portanto, SMJ, somos favoráveis à sua aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme parecer.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br