

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Levantamento de dados de efeitos genotóxicos do herbicida glifosato e suas implicações
cancerígenas em modelos animais

Danny Maria Oliveira

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Junho - 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Levantamento de dados de efeitos genotóxicos do herbicida glifosato e suas implicações
cancerígenas em modelos animais

Danny Maria Oliveira

Orientador: Prof.^a. Dr.^a Rute Magalhães Brito

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Junho – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Levantamento de dados de efeitos genotóxicos do herbicida glifosato e suas implicações
cancerígenas em modelos animais

Danny Maria Oliveira

Orientador: Prof.^a. Dr.^a Rute Magalhães Brito
Instituto de Biotecnologia / IBTEC

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior
Coordenador do Curso de Graduação em Biotecnologia / Bacharelado

Uberlândia – MG
Junho – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Levantamento de dados de efeitos genotóxicos do herbicida glifosato e suas implicações
cancerígenas em modelos animais

Danny Maria Oliveira

Aprovado pela Banca Examinadora em: / /

Nota: _____

Prof.^a. Dr.^a Rute Magalhães Brito

Uberlândia, 11 de junho de 2021

Dedico este trabalho a minha família, especialmente aos meus pais, e a minha professora orientadora por todo o apoio e ensinamentos proporcionados, os quais são essenciais ao meu crescimento como pessoa e como futura profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Élide e Gesmar, por todos os ensinamentos e oportunidades que me proporcionaram ao longo de toda a minha trajetória. À Prof.^a Dr.^a Rute Magalhães Brito, por ter aceitado me instruir e por toda dedicação em me auxiliar quando tive dúvidas e inseguranças. Ao meu namorado Víctor, por toda força e apoio que me deu durante toda a graduação.

RESUMO

O intenso uso atual de herbicidas na agricultura é um problema de saúde pública que chama atenção dos pesquisadores e desencadeia inúmeros estudos todos os anos ao redor do mundo sobre seus efeitos e consequências. Através de organismos modelos pode-se estudar o efeito do herbicida mais utilizado atualmente no Brasil e no mundo, o glifosato. O presente estudo foram selecionadas vinte publicações para avaliar os resultados discutidos pelos autores que investigaram a genotoxicidade do composto, a fim de compreender suas implicações cancerígenas. Dentre os organismos modelos, têm-se estudos aplicados a humanos e células humanas, camundongos, animais silvestres e a mosca *Drosophila melanogaster*. Os estudos da toxicidade do herbicida nos ajuda a entender suas consequências para a saúde humana e impactos na sociedade.

Palavras-chave: câncer, glifosato, genotoxicidade, citotoxicidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Câncer: Um problema de saúde pública mundial.....	1
1.2. Glifosato: o herbicida mais utilizado no Brasil.....	2
1.3. Glifosato e seu potencial cancerígeno	3
2. OBJETIVOS	5
3. METODOLOGIA.....	5
3.1. Busca de dados	5
3.2. Seleção de artigos	5
3.3. Desenvolvimento de gráficos	6
4.RESULTADOS	6
4.1. Evolução das publicações sobre efeitos genotóxicos do glifosato em modelos animais.....	6
5. DISCUSSÃO.....	11
6. CONCLUSÃO	19
7. REFERÊNCIAS	19

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer: Um problema de saúde pública mundial

A quantidade de casos de câncer tem crescido consideravelmente no mundo todo, sendo caracterizado atualmente como um dos maiores problemas de saúde pública mundial. O câncer é uma doença provocada pela multiplicação desordenada de células que se propagam por mitose, desencadeada por mutações nos genes que codificam proteínas reguladoras do ciclo celular (BERNARDES et al., 2019).

Os fatores de risco do câncer podem ser hereditários ou provocados pelo meio ambiente. Cerca de 80% dos casos estão condicionados ao meio ambiente, ou seja, o meio físico, social, estilo de vida e hábitos de consumo. Uma mutação que modifica uma única base pode-se converter em uma seqüência oncogênica (DE ALMEIDA et al., 2005).

As células cancerosas não possuem controle sobre a divisão celular, enquanto as células normais se dividem sob influências extracelulares, como fatores de crescimento e hormônios. No câncer as células não respondem a esses agentes, dividindo-se continuamente formando tumores, conseguindo se multiplicar mesmo na ausência de fatores ou sinais de proteínas que estimulam o seu crescimento. Na metástase ocorre a migração das células neoplásicas para outras regiões do corpo (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2021).

O desenvolvimento carcinógeno assume caráter letal quando rompe os tecidos e órgãos necessários para a sobrevivência do organismo como um todo. A transformação maligna da célula advém de um acúmulo de mutações em classes específicas de genes (BALUZ; DO CARMO; ROSAS, 2002).

Mutações em genes podem causar perturbações na célula pela alteração da quantidade ou atividade dos produtos protéicos. O proto-oncogene e o gene supressor de tumor são fundamentais dentro de um processo oncológico. Em geral, estes genes regulam o ciclo vital

celular, o proto-oncogene promove crescimento, diferenciação e proliferação celular, enquanto o gene supressor de tumor o inibe. Em caso de mutação, o proto-oncogene pode ocasionar multiplicações excessivas, enquanto o gene supressor de tumor favorece a formação do câncer quando é inativado por mutações (BALUZ; DO CARMO; ROSAS, 2002).

O material genético pode danificar-se de várias maneiras, como por meio de mutações espontâneas que se formam devido às trocas químicas dos nucleotídeos, como também por meio de substâncias mutagênicas que são agentes químicos capazes de promover alterações genéticas levando ao câncer. Dentre elas estão os conservantes em carnes e embutidos, agrotóxicos, a luz ultravioleta do sol, substâncias químicas presentes no fumo, radiações ionizantes e bebidas alcoólicas. Diversos estudos investigativos apontam a genotoxicidade dos herbicidas, pesticidas e fungicidas, e o seu potencial cancerígeno (PRADO, 2014).

1.2. Glifosato: o herbicida mais utilizado no Brasil

O glifosato, n-(fosfometil) glicina, é um herbicida não-seletivo comumente aplicado para controlar plantas daninhas. O composto é um ingrediente ativo do Roundup, produto da Monsanto. O herbicida atua inibindo a enzima EPSPS (5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintase) que sintetiza os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, indispensáveis para o crescimento das plantas. O produto é operado em diversas culturas pelo mundo, no Brasil, as principais são do arroz, café, cana de açúcar, milho, soja e trigo (CÂMARA et al., 2015; DE AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

Dados do último relatório de comercialização de agrotóxicos do IBAMA mostraram que em 2019 foram vendidas 217.592,24 toneladas do composto. Em 2020, a ANVISA publicou um relatório de reavaliação da toxicidade do herbicida e estabeleceu que a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do composto deve ser no máximo 0,5 mg/kg pc (ANVISA, 2019; TONELADAS, 2019).

O herbicida é pulverizado e absorvido na planta através de suas folhas e caulículos. O composto é somente aplicado em plantas geneticamente modificadas para resistência ao Round Up Ready e matar exclusivamente plantas daninhas (DE AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) revisa periodicamente a carcinogenicidade de produtos químicos industriais e alimentos. Em 2015, a IARC também caracterizou o glifosato como provavelmente cancerígeno. O estudo foi baseado em evidências de câncer em humanos e animais experimentais (CARVALHO; PARENTE, 2010).

1.3. Glifosato e seu potencial cancerígeno

De acordo com os dados da ONG estadunidense Sustainable Pulse, o glifosato está totalmente ou parcialmente banido em 21 países. Dentre os países que proibiram totalmente o uso estão Malawi e Togo na África; Vietnã, Sri Lanka e Omã, na Ásia; Arábia Saudita, Kuwait, Emirados Árabes, Catar e Bahrain, no Oriente Médio. (SUSTAINABLE PULSE, 2021).

Embora nos Estados Unidos o uso do composto seja permitido, a empresa Bayer responde a mais de 18 mil ações nos tribunais que relacionam o uso do herbicida com o surgimento de doenças como o câncer, e em vários destes não ganharam o caso. Em 2020, a organização americana Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) alegou que o glifosato não é carcinogênico e nem mutagênico (GRIGORI, 2021; STUDY et al., 2021).

Em 2015, a EFSA (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar) determinou que não há evidências fortes de citotoxicidade e genotoxicidade referente ao composto (EFSA, 2015). Em contrapartida, no mesmo ano, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), compartilhou evidências de carcinogenicidade em animais experimentais e sistemas

in vitro, que definiu o herbicida em seu relatório como provavelmente carcinogênico para humanos (IARC 2015).

Em 2016, a Reunião Conjunta FAO / OMS sobre Resíduos de Pesticidas (JMPR) afirmou que o glifosato não é carcinogênico em ratos porém o seria em camundongos em doses muito altas, excluindo os mesmos riscos para humanos da exposição ao glifosato por meio da dieta (FAO / OMS, 2016). A ANVISA declarou em seu relatório mais recente que não há evidência suficiente para classificar o glifosato quanto à carcinogenicidade (STUDY et al., 2021). Por fim, em 2017, a União Europeia estendeu o uso de glifosato a partir de 15 de dezembro de 2017 por mais 5 anos (EUROPEAN COMMISSION, 2017)

Apesar de tais deliberações, diversos ensaios para avaliação da toxicidade do glifosato apresentam aumento da frequência de micronúcleos, desenvolvimento de danos ao DNA e também a indução do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Esta presente revisão avalia as implicações dessas conseqüências e o potencial carcinogênico. A formação de micronúcleos (MN) e outras anomalias nucleares, como pontes núcleo plasmáticas (NPBs) e botões nucleares (NBUDs), são biomarcadores de eventos genotóxicos e manifestações de instabilidade cromossômica que são comumente encontradas no câncer. A alta frequência deste biomarcador em pacientes com câncer não tratados e em indivíduos afetados por doenças congênitas, são fatores que apoiam a hipótese da associação entre a frequência de MN e o desenvolvimento de câncer (BONASSI et al., 2011).

Os danos genotóxicos gerados por alterações físicas ou químicas no DNA das células, podem afetar a interpretação e a transmissão da informação genética. Por exemplo, as espécies reativas de oxigênio (ROS) constituem um grupo de moléculas capazes induzir diretamente danos ao DNA através da oxidação de bases de nucleosídeos. Estas se caracterizam por conterem oxigênio de vida curta, altamente reativas, que podem induzir

danos ao DNA e afetar a resposta de reparação ao dano. O acúmulo de ROS também promove lesões no DNA mitocondrial, quebras de fita e degradação (SRINIVAS et al., 2019).

Desta forma, o DNA pode ser danificado por uma variedade de fatores exógenos e endógenos, incluindo produtos químicos, radiação, radicais livres, alterações topológicas, como também por meio da atuação de agentes biológicos como vírus e bactérias. Com isso, a investigação continua sobre os efeitos da grande variedade de poluentes químicos a que a população humana vem sendo exposta com o avanço de técnicas industriais e agrícolas se faz necessária, para fins de controle e adequação de políticas públicas em saúde coletiva.

2. OBJETIVO

Compreender o potencial genotóxico do glifosato e suas implicações cancerígenas a partir da revisão e análise de publicações científicas.

3. METODOLOGIA

3.1. Busca de dados

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura, por meio da busca de artigos científicos. A busca foi realizada nas bases de dados eletrônicas PUBMED, SCIELO e Google Acadêmico, e foram empregados dois grupos comando. O primeiro, contendo termos relativos à exposição de interesse (*glyphosate*), e o segundo composto por termos relativos ao desfecho de interesse (*cancer, DNA damage, mutation, genotoxicity*). Para combinação dos termos em cada grupo, foi utilizado o operador *booleano* “AND”.

3.2. Seleção de artigos

Foram selecionados estudos que investigassem o efeito genotóxico do glifosato em modelos animais para promover uma discussão sobre as conclusões geradas pelos autores. Foram considerados manuscritos publicados na língua inglesa e portuguesa, com JCR acima de 2, para verificar artigos publicados com impactos locais e globais.

3.3. Desenvolvimento de gráficos

Foram contabilizados os artigos publicados na última década que investigassem a toxicidade do herbicida glifosato, para construção de um gráfico no *software* Excel com intuito de avaliar o número crescente de publicações. Também foi realizado a construção de um gráfico que mostrasse o fator de impacto das revistas dos artigos utilizados para a análise neste presente estudo.

4. RESULTADOS

4.1. Evolução das publicações sobre efeitos genotóxicos do glifosato em modelos animais

Os gráficos abaixo apresentam o número de artigos publicados por ano na última década.

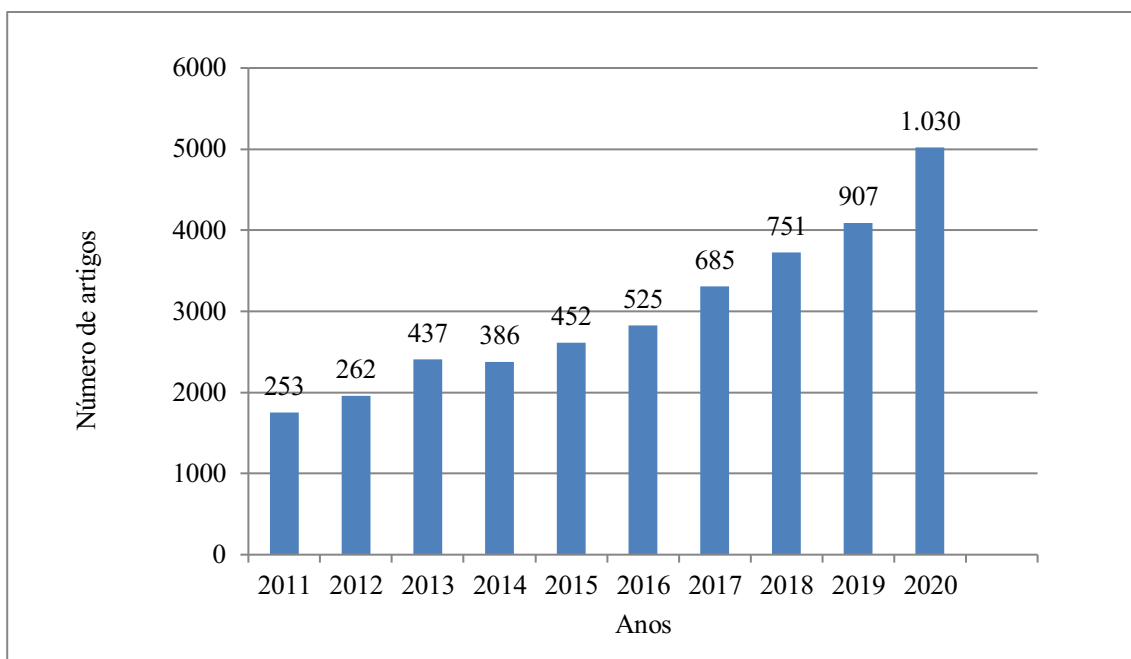


Figura 1 - Quantidade de artigos sobre a ação genotóxica do glifosato na última década

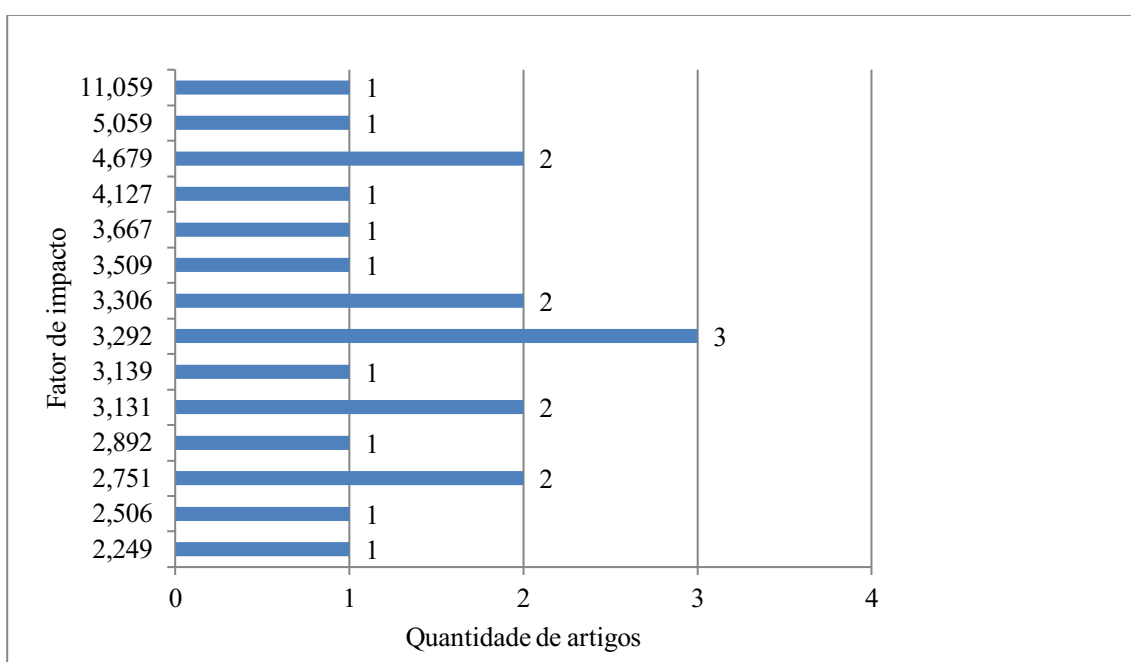


Figura 2 - Fator de impacto das revistas das publicações avaliadas no presente trabalho

Foram selecionados no total 20 artigos que investigaram o potencial tóxico do glifosato e suas implicações genotóxicas e possivelmente cancerígenas. Dentro os artigos, sete destes estudos são com humanos ou células humanas *in vitro* como modelo. No quadro 1 apresenta-se um estudo que avaliou a exposição ao glifosato e seu possível desencadeamento

de Linfoma de non-Hodgkin. Os demais seis estudos utilizaram diferentes tipos de células humanas para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do herbicida.

Quadro 1 - Estudos com humanos e células humanas *in vitro*

Modelo	Investigação	Conclusões do artigo	Referências
<i>Homo sapiens</i>	Linfoma de non-Hodgkin	Evidências limitadas	(PAHWA et al., 2019)
<i>Homo sapiens in vitro</i>	Citotoxicidade em células do fígado, pulmão e nervosas	Declara que não houve citotoxicidade relevante	(HAO et al., 2019)
<i>Homo sapiens in vitro</i>	Citotoxicidade e alteração genética em células do epitélio bucal	Aumento de aberrações nucleares que refletem danos ao DNA, aumento da frequência de micronúcleos e dano na membrana da célula epitelial	(KOLLER et al., 2012).
<i>Homo sapiens in vitro</i>	Efeitos do glifosato no DNA, na proliferação celular e no estresse oxidativo na linhagem celular HepG2	Dano ao DNA, formação de aduto, efeito aneugênico e clastogênico	(KAŠUBA et al., 2017)
<i>Homo sapiens in vitro</i>	Indução de crescimento de células cancerígenas da mama	Afirma a contribuição para o crescimento de células mamárias cancerígenas via receptores de estrogênio	(THONGPRAKAI SANG et al., 2013)
<i>Homo sapiens in vitro</i>	Efeito do glifosato no DNA e na regulação da expressão de genes de células mononucleares de sangue periférico	Danos ao DNA, possível regulação negativa da expressão do gene p53 e ativar proto-oncogenes ou sequências retrotransponíveis	(KWIATKOWSKA et al., 2017)

<i>Homo sapiens in vitro</i>	Testes citogenéticos	Danos ao DNA com aberrações cromossômicas	(MAÑAS et al., 2009)
------------------------------	----------------------	---	----------------------

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Para este trabalho também foram selecionadas publicações que usaram camundongos como organismos modelo, devido a possibilidade de conseguir administrar estudos *in vivo*, a facilidade em se manipular e desenvolver análises que podem se estender aos humanos por analogia. Dentre esses artigos presentes no quadro 2, têm-se quatro estudos com a espécie *Mus musculus*, sendo três *in vivo* e um *in vitro*.

Quadro 2 - Estudos com cobaias.

Modelo	Investigação	Conclusão do artigo	Referências
<i>Mus musculus</i>	Efeito do glifosato na indução de câncer de pele em camundongos	Glifosato apresenta atividade promotora de tumor, mas não apresenta tumorigênese	(GEORGE et al., 2010)
<i>Mus musculus</i>	O efeito de indução do glifosato em promover mielomas múltiplos em camundongos	O glifosato promove a progressão de mielomas múltiplos	(WANG et al., 2019)
<i>Mus musculus</i>	Ensaio citogenético da genotoxicidade do glifosato	Pequeno aumento de espécies reativas de oxigênio, que não foram o suficiente para causar dano hepático	(MAÑAS et al., 2009)
<i>Mus musculus in vitro</i>	Efeitos clastogênicos do glifosato em células da medula óssea de camundongos	Incidência significativa de aberração cromossômica e indução de micronúcleos	(PRASAD et al., 2009)

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Para o presente estudo também foram coletadas publicações que avaliaram o efeito do glifosato em modelos de animais silvestres. O quadro 3 apresenta um estudo aplicado ao peixe *Channa punctatus*, dois estudos em anuros, dois estudos com crocodilo *Caiman latirostris*, sendo um *in vivo*, e por fim um estudo com embriões do lagarto tegu *Salvator merianae*.

Quadro 3 - Estudos realizados com animais silvestres

Ordem	Investigação	Conclusão	Referências
(Pisces)	Capacidade do glifosato em gerar genotoxicidade e estresse oxidativo no peixe <i>Channa punctatus</i>	Estimulou o estresse oxidativo e dano genotóxico	(NWANI et al., 2013)
(Amphibia)	Efeito do glifosato no tecido hepático e nos eritrócitos do anuro <i>Leptodactylus latinasus</i>	Anormalidades nucleares em eritrócitos, aumento da formação de micronúcleos	(PÉREZ-IGLESIAS et al., 2016)
(Amphibia)	Efeito citotóxico e genotóxico do glifosato no anuro <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	Glifosato induz genotoxicidade e citotoxicidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> em <i>E.johnstonei</i>	(MOURA; HOUTEN, 2010)
(Reptilia)	Efeito do glifosato na indução de micronúcleos em eritrócitos de <i>Caiman latirostris</i>	Aumento da frequência de micronúcleos e danos ao DNA (retardando o crescimento)	(LÓPEZ GONZÁLEZ et al., 2013)
(Reptilia)	Determinar os efeitos do glifosato nos eritrócitos de <i>Caiman latirostris in ovo</i>	Danos ao DNA em eritrocitos, aumento da frequência de micronúcleos e má formação do organismo modelo	(POLETTA et al., 2009)

<u>(Reptilia)</u>	Efeito do glifosato em embriões de lagarto tegu (<i>Salvator merianae</i>)	Anormalidade estrutural externa, dano ao DNA	(SCHAUMBURG et al., 2016)
-------------------	--	--	---------------------------

Fonte:Elaborado pela autora (2021).

Na coleta de publicações também foram considerados trabalhos que avaliaram os efeitos do glifosato em um dos organismos modelo mais utilizados e vantajosos de se trabalhar, a mosca *Drosophila melanogaster*. O quadro 4 apresenta estudos que avaliaram o impacto do herbicida em condições como no ciclo de vida, na resposta antioxidante, e também quanto a alterações genéticas.

Quadro 4 - Estudos realizados com *Drosophila melanogaster* como modelo

Modelo	Investigação	Conclusão do artigo	Referências
<i>Drosophila melanogaster</i> Cepa: Oregon-R	Efeitos do herbicida glifosato na fertilidade e no ciclo de vida	A vida útil dos machos e o número de pupas foram reduzidos na progênie	(GALIN; AKHTYAMOVA; PASTUKHOVA, 2019)
<i>Drosophila melanogaster</i> Cepa: Harwhich	Efeito do glifosato em relação ao estresse oxidativo	Mortalidade aguda, aumento da expressão gênica do sistema de defesa antioxidante	(DE AGUIAR et al., 2016)
<i>Drosophila melanogaster</i> Cepas:mwh e a cepa flare-3: flr ³ / In(3LR)TM3	Uso do teste de mancha de asa de <i>Drosophila</i> para avaliar o efeito de herbicidas	Houve mutação genética e mitótica	(KAYA et al., 2000)

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

5. DISCUSSÃO

A quantidade de publicações que estudam a toxicidade do glifosato vem sendo amplificada a cada ano (Figura 1). Dentre as razões do estudo crescente deste herbicida, pode-

se considerar o fato de ser o mais utilizado no Brasil e no mundo, e possuir uma toxicidade questionável, em que o dissenso entre publicações e organizações é recorrente. As possíveis repercussões do composto para a saúde humana fazem a necessidade de se averiguar com previsão a sua toxicidade um grande incentivo para estudos investigativos. Deste modo, a cada ano os estudos gerados fomentam progressivamente a continuação da busca por evidências que negam ou confirmam a atividade tóxica do herbicida.

Na seleção dos artigos escolhidos foram priorizadas publicações que avaliaram a ação da toxicidade direta do glifosato, sendo a maior parte dessas publicações bastante recentes e desenvolvidas na última década. Outro fator de seleção foram a boa estruturação dos parâmetros e ensaios, métricas estatísticas e o aprofundamento da discussão. Para esses artigos também se pode afirmar que os resultados e as conclusões foram cautelosos e cientificamente coerentes com os dados obtidos.

A publicação analisada com maior fator de impacto (11.059) estudava o efeito de indução do glifosato em promover mielomas múltiplos em camundongos, observou a progressão de mielomas. A concisão dos resultados justifica este sendo o maior fator de impacto analisado. A pesquisa relatou também disfunção de diversos órgãos e lesões ósseas líticas e danos renais. Gamopatia monoclonal benigna com aumento de igG sérica, anemia e presença de células plasmáticas no baço e na medula óssea foram observados em camundongos do tipo selvagem.

O nexa causal entre Linfoma de non-Hodgkin e a exposição ao glifosato, foram avaliados mais de 1690 casos de LNH (Quadro 1). Os resultados mostraram que 113/1690 (7%) dos casos, os indivíduos já haviam manipulado o composto, assim houve exposição ao herbicida. Avaliações aplicadas a humanos têm-se suas limitações, e uma destas para essa particular avaliação é a dificuldade de identificar os ingredientes ativos nas amostras clínicas.

Assim as investigações *in vivo* em seres humanos, são mais limitadas as estatísticas das manifestações aparentes, porém dificulta o rastreamento da real origem, o que limita afirmar uma relação estritamente causal (PAHWA et al., 2019; COSTA; MELLO; FRIEDRICH, 2017).

Para os estudos com *Homo sapiens in vitro* (Quadro 1), a citotoxicidade e genotoxicidade foi notada mesmo quando em valores estatísticos considerados pelo autor de baixa toxicidade, como para Hao et al. (2019) que avaliou a citotoxicidade em células humanas do fígado, pulmão e nervosas. Nos demais estudos *in vitro* com humanos a aparição de danos ao DNA e aberrações cromossômicas com aumento da frequência dos micronúcleos (MNi) foram comumente relatadas, o que são biomarcadores relevantes para determinar o potencial cancerígeno.

Dois dos estudos com humanos também apontaram a capacidade do composto em aumentar a proliferação de celular de linhagens cancerosas, o que reflete mais um aspecto do agrotóxico em ser um possível contribuinte para a atividade carcinogênica. O estudo de Kasuba et al. (2017) aplicado à linhagem celular HepG2, em que foi observado um aumento de 9% da proliferação em comparação com o controle após 4 horas de tratamento. Thongprakaisang et al. (2013) detectou a indução do crescimento de células cancerígenas da mama por glifosato (Quadro 1).

O efeito do glifosato no DNA e na regulação da expressão de genes de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foi observado por Kwiatkowska et al. (2017) no qual foi relatado que o produto ocasiona danos ao DNA, gerando quebra de fita simples e dupla e a formação de locais lábeis alcalinos (Quadro 1). A regulação negativa da expressão do gene p53 e ativação proto-oncogenes ou sequências retrotransponíveis, examinadas podem induzir alterações genômicas por inserção e recombinação homóloga. Essas modificações se

não forem reconstituídas, pode levar a mutações que podem causar instabilidade genética e desenvolvimento de tumor.

Dessa forma, no quadro com estudos aplicados a humanos tem-se tanto evidências corroborativas quanto contrapostas à hipótese de toxicidade. O contrassenso dentro da diversidade de análises exprime a necessidade de reavaliações e constante expansão de novos dados. O aparecimento de micronúcleos e os danos genéticos refletem em mutações, que quando não reparadas desencadeiam o desenvolvimento de irregularidades possivelmente indutoras de tumor.

O bioensaio de carcinogenicidade com camundongos promovido por George et al. (2010) indicou que o glifosato induz a proliferação celular bem como interfere na regulação do ciclo celular e confirma que a sua atividade promotora de tumor mas não iniciadora de tumor falhando ao induzir tumorigênese após o teste para carcinogênico (Quadro 2). O que converge com dois estudos em células humanas que relatou a habilidade do composto em exacerbar a proliferação celular. Dessa forma, é possível reflexionar a respeito de que a atividade promotora de tumor pela proliferação celular observada nestes artigos pode ser a mais pertinente implicação cancerígena relacionada ao herbicida.

Dentro os estudos com camundongos, o ensaio citotóxico de Mañas et. al. (2009) avaliou o potencial do glifosato em provocar estresse oxidativo (Quadro 2). Nos mecanismos de defesas celulares as enzimas antioxidantes fornecem proteção contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS), em caso de desregularização de alguma dessas enzimas esses mecanismos podem ser seriamente afetados. Uma vez que a quantidade de enzimas antioxidantes está comprometida, pode ocorrer acúmulo de espécies reativas de oxigênio que podem atuar diretamente no material genético promovendo danos (SRINIVAS et al., 2019). Contudo, não houve alterações celulares por peroxidação lipídica (TBARs) nos fígados, pulmões e rins de camundongos.

Esses resultados negativos para a determinação de estresse oxidativo em camundongos diferem do efeito causado pelo glifosato no estudo com o peixe *C. punctatus* em que o composto propagou uma resposta oxidativo levando a lipoperoxidação (LPO) elevada, enzimas antioxidantes suprimidas e dano genotóxico (Quadro 3). As análises estatísticas desse mesmo estudo também mostraram um aumento significativo de micronúcleos após exposição ao glifosato. (NWANI et al., 2013).

O efeito clastogênico do glifosato foi avaliado em células da medula óssea de camundongos, a frequência da porcentagem de células aberrantes no tratamento com glifosato aumentaram significativamente em relação ao controle (Quadro 2). Sendo este mais um estudo que corrobora a evidência de genotoxicidade. Deste modo, os ensaios com cobaias também apontaram efeito genotóxico ao observarem danificações ao DNA. Compreende-se que as mutações desencadeadas por danos genéticos podem ter caráter potencial para uma transformação maligna, por essa razão implicações genotóxicas são consideradas em averiguações carcinógenas (PRASAD et al., 2009).

Para os experimentos com animais silvestres, segundo os dados estatísticos por Pérez-Iglesias et al. (2016) verificou-se um aumento significativo de micronúcleos em *L. latinasus* quando expostos ao glifosato, o que desencadeou anormalidades nucleares em eritrócitos (Quadro 3). Já a investigação a respeito da toxicidade do herbicida para neonatos da rã de desenvolvimento direto *E. johnstonei*, mostrou que o composto produziu efeitos citotóxicos e genotóxicos, contudo, o reparo do DNA *in vivo* reduziu a quantidade de danos ao DNA (Quadro 3). A exposição *in vivo* e *in vitro* de eritrócitos de *E. johnstonei* à formulação de glifosato propagou quebras de DNA de uma maneira dependente da dose. O dano ao DNA inicialmente aumentou com a duração da exposição e posteriormente diminuiu, sugerindo que os eventos de reparo do DNA estavam ocorrendo durante as exposições *in vivo* e *in vitro* (MOURA; HOUTEN, 2010).

O réptil *Caiman latirostris* utilizado como modelo para avaliação, apresentou um aumento significativo na frequência de micronúcleos ($p < 0,05$) e tendência de menor crescimento nos grupos expostos ao glifosato em relação ao controle negativo (Quadro 3). A formulação também induz efeitos genotóxicos em filhotes de *C. latirostris* expostos *in vivo*, com aumento da frequência de micronúcleos em ambos os grupos (RU1 e RU2) em relação ao controle negativo (CN), e apresentando um efeito dependente da concentração (LÓPEZ GONZÁLEZ et al., 2013).

Nos estudos com *Caiman latirostris* *in ovo* por Poletta et al. (2009), os ovos foram expostos a diferentes concentrações sub-letais de glifosato (Quadro 3). No momento da eclosão foram coletadas amostras de sangue para realização de testes em eritrócitos para avaliar os danos causados no DNA. Foi observado um aumento significativo nos danos ao DNA de acordo com as diferentes concentrações de glifosato aplicadas. Dentre as malformações observadas, estão olhos protuberantes, menor mandíbula, pés dianteiros com apenas dois dedos e pés traseiros com apenas um. Em outro grupo, dois jacarés apresentaram também malformações: um deles apresentava a frente pés com apenas três dedos e o outro tinha a mesma característica com patas traseiras com quatro dedos articulados. É importante ressaltar os efeitos genotóxicos encontrados pelo teste do Micronúcleo que evidenciaram o aumento da frequência conforme a concentração de glifosato.

Para recém nascidos do lagarto tegu após exposição no estágio embrionário houve aumento significativo ao dano do DNA para todas as concentrações superiores a 100 µg / RU ovo para DI, nenhum efeito dependente da concentração foi observado (Quadro 3). Para as frequências MN e NAs em animais expostos não foram observadas diferenças. Conclui-se que quando submetidos a concentrações subletais os danos no DNA induzidos em eritrócitos interferem no desenvolvimento e sobrevivência dos embriões e filhotes (SCHAUMBURG et al., 2016).

Explorando as pesquisas com os animais silvestres avaliados, verificou-se de modo recorrente o aumento da frequência de micronúcleos nos modelos animais, assim como muitos desses também relataram danos ao DNA. De acordo com a Bonassi. et al. (2011) os danos ao DNA e aberrações cromossômicas gerados por micronúcleos, são manifestações genotóxicas com capacidade latente de vir a contribuir para mutações indesejadas de caráter desencadeador de tumor.

Para Galin et al. (2019) utilizando-se de *D. melanogaster* em diferentes concentrações de glifosato para avaliar o potencial citotóxico, foi observado uma redução na expectativa de vida de machos, número de pupas e imagos na progênie da população natural e cepa Oregon-R quando submetidos a uma maior concentração, enquanto não foram observados efeitos adversos sobre os parâmetros estudados quando submetidos a menores concentrações (Quadro 4).

No trabalho realizado por De Aguiar et al. (2016) foram realizados testes nas moscas da linhagem harwich expostas para quantificação dos níveis de espécies reativas ao oxigênio (ROS), capacidade oxidante contra radicais peroxoila (ACAP) e peroxidação lipídica (LPO) (Quadro 4). Também foram avaliados a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e a expressão mRNA de genes antioxidantes. Observou-se que os níveis de ROS sofreram redução enquanto a expressão gênica do sistema de defesa antioxidante sofreu aumento.

A ativação precoce do sistema de defesa antioxidante em *D. melanogaster* em virtude da exposição pode prevenir danos subsequentes causados (Quadro 4). Foi observado que o herbicida promoveu uma forte indução do sistema de defesa antioxidante das moscas expostas, entretanto não foi quantificado nenhuma alteração significativa na peroxidação lipídica (DE AGUIAR et al., 2016)

Entre os estudos com *D. melanogaster* também foi selecionado um trabalho em que era aplicado o teste de asa como ensaio avaliativo. O teste aplicado foi o *SMART (Somatic mutation and recombination test)* que analisa a perda de heterozigosidade de genes marcadores que caracterizam fenótipos identificados nas asas de *Drosophila melanogaster*. O método faz o uso de células somáticas e pode ser feito em uma só geração. Esse ensaio é recorrentemente utilizado para avaliar um amplo espectro de agentes genotóxicos de diferentes classes químicas. A presença de pontos de mancha na asa do inseto após a administração do composto, configura que houve mutação genética (GRAF, U. et. al., 1984). Para o estudo com este método houve um pequeno aumento, porém significativo na frequência de pequenos pontos de manchas únicas e totais, demonstrando mutação genética e mitótica (KAYA et al., 2000).

Apesar da fácil manipulação da *Drosophila melanogaster* como organismo modelo, ciclo de vida rápido e custo baixo de cultivo, ainda há escassez de ensaios relacionados à toxicidade do glifosato. Diante disso, pode-se analisar que nos artigos examinados foi conferida a capacidade citotóxica do composto ao reduzir a progênie e expectativa de vida, assim como a habilidade em intensificar a resposta antioxidante, como também de induzir mutações.

Não foram encontrados estudos epigenéticos avaliando a toxicidade do glifosato. Ensaio nesta área poderiam contribuir para compreensão das implicações cancerígenas do composto, o que reflete a necessidade de se expandir ainda mais os ensaios investigativos para fomentar a discussão a respeito das repercussões para saúde humana.

Contudo, é necessário ponderar sobre os ensaios que apenas fornecem dados de danos ao DNA, vistos que podem ainda ser reparados e não transmitidos às células-filhas e, portanto, podem não resultar em mutações. Dessa forma, efeitos genotóxicos podem ser

transitórios, enquanto efeitos mutagênicos são persistentes e geralmente não podem ser reparados. Testes genotóxicos constituem parte da avaliação do peso da evidência, entretanto testes mais robustos para detecção de mutagenicidade possuem maior consistência para inferir implicações cancerígenas (STUDY et al., 2021).

É preciso considerar que estudos in vivo são mais substanciais, pois consideram os mecanismos de proteção do indivíduo e as barreiras que impedem a substância de alcançar as células relevantes. Para nossas avaliações também é importante salientar que estudos em mamíferos reproduzem melhor as características dos seres humanos do que estudos em espécies não mamíferas (STUDY et al., 2021).

6. CONCLUSÃO

Os diversos estudos que investigam o potencial tóxico do glifosato e suas possíveis implicações cancerígenas em modelos, apresentam diferentes resultados e conclusões a respeito do potencial cancerígeno do composto. As avaliações dos artigos científicos produzidos nos últimos anos apresentam diversas nuances e considerações muitas vezes distintas, embora pode ser notado nos trabalhos selecionados a predominância de estudos que confirmam a genotoxicidade. Contudo, ainda não há um consenso definitivo sobre seus efeitos, sendo necessário que os estudos investigativos continuem e se aprofundem nos próximos anos visto o tamanho impacto que pode ocasionar na saúde mundial.

7. REFERÊNCIAS

ANVISA. Voto nº 016/2019/2019/sei/dire2/anvisa. v. 2019, n. 0496978, p. 16–18, 2019.

BALUZ, K.; DO CARMO, M. DAS G. T.; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 4, p.

597–607, 2002.

BERNARDES, N. B. et al. Câncer de Mama X Diagnóstico / Breast Cancer X Diagnosis. **ID on line REVISTA DE PSICOLOGIA**, v. 13, n. 44, p. 877–885, 2019.

BONASSI, S. et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: Evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 93–100, 2011.

CÂMARA, A. A. DA S. et al. Propriedades estruturais, eletrônicas e vibracionais da molécula do herbicida Glifosato. n. June, p. 283–291, 2015.

CARVALHO, D. D. E. Q.; PARENTE, P. P. **2ª Edição Revista e Atualizada**. [s.l: s.n.].

COSTA, V. I. DO B. DA; MELLO, M. S. DE C. DE; FRIEDRICH, K. Exposição ambiental e ocupacional a agrotóxicos e o linfoma não Hodgkin. **Saúde em Debate**, v. 41, n. 112, p. 49–62, 2017.

DE AGUIAR, L. M. et al. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defense responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 185–186, p. 94–101, 2016.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

DE AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quimica Nova**, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.

EUROPEAN COMMISSION (2017) Health and Food Safety Directorate General. Summary report of the Appeal Committee – **Phytopharmaceuticals – Plant protection Products – Legislation**.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2015) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate (EFSA-Q-2014-00546, EFSA-Q-2015-00279, approved on 30 October 2015 by **European Food Safety Authority**).

FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR) (2016) Summary report for diazinon, glyphosate, malathion. Geneva, Switzerland: food and agriculture organization of the United Nations/Geneva, **World Health Organization (WHO)**. pp 2.

GALIN, R. R.; AKHTYAMOVA, I. F.; PASTUKHOVA, E. I. Effect of Herbicide Glyphosate on *Drosophila melanogaster* Fertility and Lifespan. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 167, n. 5, p. 663–666, 2019.

GEORGE, J. et al. Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin: A proteomic approach. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 951–964, 2010.

GRAF, U. et. al. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, 6: 153-188, 1984.

GRIGORI, P. México proíbe herbicida Glifosato e outros países do continente limitam seu uso. Disponível em: <<https://portrasdoalimento.info/2021/01/28/mexico-proibe-herbicida-glifosato-e-outros-paises-do-continente-limitam-seu-uso/>>. Acesso em: 28 maio. 2021.

HAO, Y. et al. Evaluation of the cytotoxic effects of glyphosate herbicides in human liver, lung, and nerve. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 54, n. 9, p. 737–744, 2019.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) Working Group (2015) Glyphosate. In: Some Organophosphate Insecticides and Herbicides: Diazinon, Glyphosate, Malathion, Parathion, and Tetrachlorvinphos. **IARC Monogr** 112:321–399

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). <http://www.inca.gov.br> (acesso em maio de 2021).

KAŠUBA, V. et al. Effects of low doses of glyphosate on DNA damage, cell proliferation and oxidative stress in the HepG2 cell line. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 23, p. 19267–19281, 2017.

KAYA, B. et al. Use of the *Drosophila* Wing Spot Test in the Genotoxicity Testing of Different Herbicides. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 465, n. 1–2, p. 77–84, 2000.

KOLLER, V. J. et al. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 5, p. 805–813, 2012.

KWIATKOWSKA, M. et al. DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (*in vitro* study). **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 93–98, 2017.

LÓPEZ GONZÁLEZ, E. C. et al. Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed *in vivo* to Roundup® (glyphosate) concentrations used in agriculture. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 105, n. 2, p. 131–134, 2013.

MAÑAS, F. et al. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 37–41, 2009.

MOURA, M. DE; HOUTEN, B. VAN. Review Article. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 405, n. April, p. 391–405, 2010.

NWANI, C. D. et al. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 539–547, 2013.

PAHWA, M. et al. Glyphosate use and associations with non-hodgkin lymphoma major histological sub-types: Findings from the North American pooled project. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, v. 45, n. 6, p. 600–609, 2019.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M. et al. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus*

latinasus. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 10, p. 9852–9861, 2016.

POLETTA, G. L. et al. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 672, n. 2, p. 95–102, 2009.

PRADO, B. B. F. DO. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 21–24, 2014.

PRASAD, S. et al. Clastogenic Effects of Glyphosate in Bone Marrow Cells of Swiss Albino Mice. **Journal of Toxicology**, v. 2009, n. 5, p. 1–6, 2009.

SCHAUMBURG, L. G. et al. Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 71–78, 2016.

SRINIVAS, U. S. et al. ROS and the DNA damage response in cancer. **Redox Biology**, v. 25, n. December 2018, p. 101084, 2019.

SUSTAINABLE PULSE. Glyphosate Herbicides Now Banned or Restricted in 21 Countries Worldwide. Disponível em: <<https://sustainablepulse.com/2019/05/28/glyphosate-herbicides-now-banned-or-restricted-in-17-countries-worldwide-sustainable-pulse-research/#.YLFvltJKjIV>>. Acesso em: 28 maio. 2021.

STUDY, A. H. et al. NOTA TÉCNICA No 12 / 2020 / SEI / CREA V / GEMAR / GGTOX / DIRE3 / ANVISA. p. 1–13, 2021

THONGPRAKAI SANG, S. et al. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 129–136, 2013.

TONELADAS 2019 - **INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE – IBAMA**. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em março de 2020.

WANG, L. et al. Glyphosate induces benign monoclonal gammopathy and promotes multiple myeloma progression in mice. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2019.