

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE UM HERBICIDA NATURAL NA LINHAGEM DE CÉLULAS NEURAIS HUMANAS SH-SY5Y

Leticia Nominato-Oliveira
leticia.nominato@aluno.fpp.edu.br
Juliana Ferreira da Silva
Larissa Lechinovski
Ana Carolina de Deus Bueno Krawczyk
Izonete Cristina Guiloski

RESUMO

Introdução: O uso de altas concentrações de herbicidas pré-emergentes em culturas agrícolas resulta na seleção de características fenotípicas mais vantajosas para as ervas daninhas. Neste sentido, a resistência adquirida em relação a grande parte dos herbicidas comumente utilizados, revela a necessidade de minimizar o risco que esse fenômeno pode causar à segurança alimentar global. Assim, novos produtos foram desenvolvidos com fins de substituir esses herbicidas. O Herbicida Natural (HN) é composto, principalmente, por extrato de capim ANNONI, óleo de citronela, extrato de pínus, extrato de plátano e extrato de óleo de Neen, e tem sido utilizado por agricultores no Brasil. Contudo, estudos acerca de sua toxicidade e efeitos a longo prazo ainda são escassos, e tendo em vista o possível risco para a saúde da população faz-se necessário um aprofundamento na compreensão de seus efeitos tóxicos. Para tanto foi utilizada uma linhagem celular de neuroblastoma SH-SY5Y. Essa linhagem possui morfologia epitelial e realiza duplicação em aproximadamente 48 horas. Os herbicidas glifosato e a atrazina, com citotoxicidade já conhecida, foram usados neste estudo para fins de comparação, ou seja, como controles positivos. O glifosato é um herbicida não seletivo pós-emergente muito aplicado nas culturas brasileiras que atua inibindo uma enzima essencial para a síntese de aminoácidos aromáticos, sem os quais a sobrevivência da planta é impossível. A atrazina é um herbicida de amplo espectro usado globalmente, é capaz de inibir o processo de fotossíntese, inviabilizando a planta, sabe-se que esse herbicida é capaz de causar danos ao sistema endócrino além de levar a alterações em sistema nervoso, principalmente em níveis dopaminérgicos.

Objetivos: Este estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade e possíveis alterações bioquímicas causadas pelo Herbicida Natural em células SH-SY5Y.

Métodos: As células SH-SY5Y foram cultivadas com meio DMEM/F12, acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. A exposição foi realizada com três concentrações do HN (HN1: 0,6; HN2: 1,56 and HN3: 3,12 µL/mL), sendo que a maior concentração, HN3, é equivalente à usada na agricultura. As concentrações de glifosato e atrazina foram ambas de 1µg/L, que é a máxima concentração permitida pela legislação em água. Também foi mantido um grupo controle negativo com apenas o meio de cultivo. As células foram expostas por 24 e 72 horas com posterior execução dos testes de citotoxicidade e bioquímicos (atividade do sistema antioxidante e neurotoxicidade). A citotoxicidade foi determinada pelo teste com o reagente Presto Blue™ que avalia o metabolismo celular. Para tanto, as células foram cultivadas em placas de 96 poços e após a exposição, o reagente foi adicionado (10µL por poço), e as placas incubadas por 90 min e lidas a 570 e 600 nm em espectrofotômetro. Para avaliação de neurotoxicidade foi mensurada a atividade da Acetilcolinesterase (AChE) por ensaio colorimétrico com reagente de Ellman. A alteração do sistema antioxidante foi

medida através da atividade das enzimas Superóxido dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPx) e Glutathione S-transferase (GST), além dos níveis de Glutathione reduzida (GSH). A análise estatística dos resultados foi efetuada com o programa *GraphPad Prism*. A normalidade dos dados foi testada por Shapiro-Wilk, sendo que para dados paramétricos foi realizada ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey e para dados não paramétricos foi utilizado Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Resultados: Os resultados demonstraram redução de aproximadamente 40% da viabilidade celular na maior concentração do herbicida natural, em ambos os tempos de exposição (24 e 72 horas). A maior concentração do herbicida natural também apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos controles positivos atrazina e glifosato. Em 24 horas, HN3 elevou a atividade da enzima SOD. Também após 24 h, a atividade da enzima AChE sofreu um aumento após exposição às concentrações HN2 e HN3. Houve também um aumento na AChE em 72 horas de exposição, porém causada por uma concentração mais baixa do HN. HN2 ainda causou uma elevação na atividade de GPx após 24 horas de exposição. HN1 apenas levou ao aumento dos níveis de GSH, após 72 horas de exposição. Não foi observada diferença entre os herbicidas glifosato e atrazina em relação ao controle em nenhum dos parâmetros analisados.

Conclusão: O sistema antioxidante e a atividade da Acetilcolinesterase foram induzidos após exposição a todas as concentrações do HN em ambos os tempos analisados (24 e 72 horas). Com base nesses resultados, é possível observar que o HN causou alteração na homeostase celular e a avaliação de outros mecanismos de citotoxicidade é importante para que haja mais esclarecimento sobre sua segurança. Ademais, é notável a necessidade de outros estudos sobre o tema, utilizando diferentes métodos, concentrações e ensaios, com o propósito de elucidar outros riscos à saúde.

PALAVRAS-CHAVE: Herbicida Natural, SH-SY5Y, citotoxicidade, neurotoxicidade.

REFERÊNCIAS

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **SH-SY5Y**. 2022. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/crl-2266>>. Acesso em: 02 set. 2022.

BUSI, R. et al. Herbicide-resistant weeds: from research and knowledge to future needs. **Evolutionary Applications**, v. 6, n. 8, p. 1218-1221, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/eva.12098>>. Acesso em: 02 set. 2022.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHER-STONE, R.M.; A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.** v. 7 p. 88-95, 1961. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)>. Acesso em: 02 set. 2022.

FAVARETTO, A. et al. New Phytotoxic Cassane-like Diterpenoids from *Eragrostis plana*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 67, n. 7, p. 973–1981, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06832>>. Acesso em: 02 set. 2022.

FUNKE, T.; HAN, H.; HEALY-FRIED, M. L.; SCHÖNBRUNN, E. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 35, p. 13010-13015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.0603638103>>. Acesso em: 02 set. 2022.

GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, 1998. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(98\)00072-5](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(98)00072-5)>. Acesso em: 02 set. 2022.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the Several Activities of the Glutathione. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0)>. Acesso em: 02 set. 2022.

MA, K. et al. Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells via microglial activation. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 11, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c5mb00432b>>. Acesso em: 02 set. 2022.

MARTÍNEZ, M. et al. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. **Environment International**, v. 135, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105414>>. Acesso em: 02 set. 2022.

PAGLIA, D.E; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal Lab. Clin. Med** v. 70, p. 158-69, 1967. Disponível em: <<https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214367900765>>. Acesso em: 02 set. 2022.

SEDLAK, J. e LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and non protein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)>. Acesso em: 02 set. 2022.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, v. Appendix 3, n. 1, p. A.3B.1-A.3B.2, 1 mar. 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>>. Acesso em: 02 set. 2022.

TRAVLOS, I.; PRADO, R.; CHACHALIS, D.; BILALIS, D. J. Herbicide Resistance in Weeds: Early Detection, Mechanisms, Dispersal, New Insights and Management Issues. **Frontiers in Ecology and Evolution**, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00213>>. Acesso em: 02 set. 2022.