



VIABILIDADE CELULAR APÓS CHOQUE TÉRMICO EM LINFÓCITOS OBTIDOS DE LINFONODOS MESENTÉRICOS DE RATOS EXPOSTOS AO GLIFOSATO¹

Laura Braun Eickhoff², Luis Felipe Pedrolo Hickmann³, Samara Cristine Knebel⁴, Anna Karolina Kretschmann Florencio de Souza Bagetti⁵, Laura Schleder Correa⁶, Thiago Gomes Heck⁷

¹ Projeto de pesquisa institucional do Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI

² Membro do Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI, bolsista CNPq do projeto, acadêmica do curso de Medicina, laura.eickhoff@sou.unijui.edu.br

³ Membro do Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI, bolsista PIBIC-FAPERGS do projeto, acadêmico do curso de Medicina, luis.hickmann@sou.unijui.edu.br

⁴ Membro do Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI, Mestranda do Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde, samara.knebel@sou.unijui.edu.br

⁵ Membro do Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI, Bolsista PIBIC-UNIJUI, acadêmica do curso de Medicina, anna.bagetti@sou.unijui.edu.br

⁶ Membro do Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde, laura.schleder@sou.unijui.edu.br

⁷ Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI, Docente no Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde e Programa de Pós-Graduação em Modelagem Matemática e Computacional, docente do curso de Medicina, thiago.heck@unijui.edu.br

Introdução: A cultura de células primárias é uma técnica amplamente usada em estudos pré-clínicos que permite o estudo do metabolismo, da fisiologia e toxicologia, considerando variáveis não acessíveis *in vivo*. A técnica baseia-se geralmente na suspensão de células retiradas de um tecido original para manutenção sob condições laboratoriais controladas. A manutenção da viabilidade celular é essencial para este estudo, assim como é uma variável de avaliação da toxicidade em resposta a tratamentos ou exposição a agentes químicos, como o glifosato. O Glifosato, N-(fosfometil) glicina, é o herbicida mais utilizado no mundo, e o uso agrícola de herbicidas à base de glifosato (GBHs) aumentou significativamente desde a introdução de culturas geneticamente modificadas e tolerantes a herbicidas em 1996. Tendo em vista o amplo uso de GBH, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou que a dose de Ingestão Diária Aceitável (IDA) do herbicida para humanos é de 0,5 mg/kg de peso corporal por dia. Não há evidências sobre efeitos da exposição à GBH na resposta celular ao estresse em cultura de células. **Objetivos:** Avaliar se exposição ao Glifosato altera a viabilidade de linfócitos após teste de resposta celular ao estresse. **Metodologia:** Doze Ratos Wistar machos (idade: 4-5 meses) foram divididos em 2 grupos: Controle (C, n=6) e Glifosato (G, n=6). A exposição ao glifosato ocorreu através do consumo da água (0,5 mg/kg, IDA) pelos animais durante 12 semanas. A solução de glifosato foi preparada semanalmente e armazenada na mesma temperatura que a água controle. Após o período de exposição, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésicos (xilazina ~30 mg/kg de cetamina ~300 mg/kg via i.p.), e os linfonodos mesentéricos foram retirados



cirurgicamente. Foi realizada a cultura dos linfócitos, os quais foram suspensos em meio de cultura (RPMI 1640, 5% de soro fetal bovino, 5,5 mM glicose e penicilina 100 U/ml - estreptomicina 100 µl/ml). Os linfócitos foram incubados em banho-maria à 37°C ou 42°C durante 2 horas. Após esse período, as amostras foram incubadas (~10⁷ células por poço) por 6 horas na incubadora de CO₂ (37°C, 5% CO₂). A contagem das células e a viabilidade celular foram realizadas no início (antes do desafio térmico) e após as 6h de incubação com CO₂, utilizando o corante Azul de tripan em câmara de Neubauer em microscópio (40x). O cálculo do número de células viáveis é realizado multiplicando-se o número de células viáveis contadas no quadrante central pelo fator de diluição (FD) e em seguida por 10⁴, que é o fator de correção do volume do hemocitômetro. A viabilidade celular é calculada a partir da divisão entre o número de células viáveis (vivas) pelo número de células totais (coradas e não coradas) presentes no quadrante central. Os dados coletados foram analisados no programa GraphPad Prism versão 8.0.1. Os dados foram analisados quanto à normalidade com o teste Shapiro-wilk e posteriormente foi realizado o Teste T de Student não pareado. Considerou-se a diferença estatística significativa se P < 0,05. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão de cada grupo. O presente estudo foi aprovado pela CEUA-UNIJUÍ protocolo 028/24. **Resultados:** Os linfócitos obtidos dos animais expostos ao glifosato, quando ressuspensos para cultura de células, não apresentaram diferença quanto à viabilidade celular (média ± dp, %) (C = 94,55 ± 3,96 vs. G = 93,80 ± 4,75, P = 0,772). Ademais, a viabilidade da cultura celular não foi alterada mesmo após as células serem submetidas ao banho maria de 2 horas a 37°C e a incubação de 6 horas nesta temperatura (C = 94,62 ± 4,70 vs. G = 96,58 ± 3,20, P = 0,418). Por fim, após serem submetidos ao estresse térmico de 42°C e a incubação por 6 horas a 37°C, também não houve diferença quanto à viabilidade entre os grupos (C = 94,47 ± 4,47 vs. G = 95,77 ± 4,15, P = 0,630). **Conclusões:** A exposição prévia dos animais ao glifosato na dose IDA, não alterou a viabilidade de linfócitos em cultura celular mesmo após o desafio de estresse térmico. **Palavras-chave:** “Agrotóxicos”, “Linfócitos”, “Glifosato” e “Resposta ao Choque Térmico”. **Agradecimentos:** CNPq, Processos 407329/2016-1 444286/2024-1, 403136/2024-5, 405546/2023-8, 307926/2022-2 de TGH, CAPES, PIBIC e UNIJUÍ. **Referências:** Philippeos, C., Hughes, R. D., Dhawan, A., & Mitry, R. R. (2012). Introduction to cell culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 806, 1–13. Makame KR, Masese SN, Ádám B, Nagy K. Oxidative Stress and Cytotoxicity Induced by Co-Formulants of Glyphosate-Based Herbicides in Human Mononuclear White Blood Cells. *Toxics*. 2023;11(12):976. Published 2023 Dec 1. doi:10.3390/toxics11120976. Nota Técnica Nº 23/2018/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA. Processo nº 25351.056754/2013-17. Nota Técnica Preliminar sobre as conclusões da reavaliação do Glifosato com as respectivas recomendações e proposta de minuta de RDC a ser submetida à consulta pública, (2018). Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular cell*, 40(2), 253–266.