

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS
SUSTENTÁVEIS

DAIANE KREWER OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM GLIFOSATO E ROUND-UP®
EM LINHAGENS DE GLIOMA

CERRO LARGO
2021

DAIANE KREWER OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM GLIFOSATO E ROUND-UP®
EM LINHAGENS DE GLIOMA**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis

Linha de Pesquisa: Qualidade Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lauren Lúcia Zamin
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Suzymeire Baroni

**CERRO LARGO
2021**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Oliveira, Daiane Krewer

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM GLIFOSATO E
ROUND-UP® EM LINHAGENS DE GLIOMA / Daiane Krewer
Oliveira. -- 2021.

75 f.:il.

Orientadora: Prof.^a. Doutora Lauren Lúcia Zamin
Co-orientadora: Prof.^a. Doutora Suzyemeire Baroni
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e
Tecnologias Sustentáveis, Cerro Largo, RS, 2021.

1. Glioblastoma, Herbicida, Citotoxicidade,. 2. GBMs,
A-172, C6. 3. Possíveis efeitos do Round-up® e do GLY
sobre linhagens de GBM humano e de rato.. I. Zamin,
Lauren Lúcia, orient. II. Baroni, Suzyemeire, co-orient.
III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DAIANE KREWER OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM GLIFOSATO E ROUND-UP®
EM LINHAGENS DE GLIOMA**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis

Área de Concentração: Monitoramento, Controle e Gestão Ambiental

Linha de Pesquisa: Qualidade Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lauren Lúcia Zamin

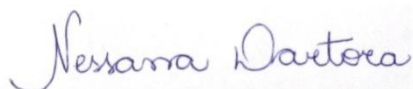
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Suzymeire Baroni

Esta Dissertação foi defendida e aprovada pela banca em: 21/06/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr^a. Lauren Lúcia Zamin - UFFS



Prof. Dr^a. Nessana Dartora - UFFS



Prof. Dr. Daniel Joner Daroit - UFFS

DEDICATÓRIA

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”.

(Roger Von Oech)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, companheiro de jornada ao longo desses anos. Aos meus pais pelo apoio e pelo incentivo aos estudos, por acreditarem nos meus sonhos e sonharem junto comigo, sem vocês nada seria possível.

Ao meu namorado, Cleiton Rodrigo Rauber, que soube compreender minha ausência e auxiliar quando necessário, sendo sempre muito compreensivo e parceiro nessa caminhada pela busca do saber.

Especialmente a minha Orientadora Professora Dr^a. Lauren Lúcia Zamin, por acreditar em mim, oportunizando esta pesquisa e me acompanhando sempre que necessário, além de suas valiosas contribuições científicas para o trabalho. Você é um exemplo de companheirismo e parceria, obrigada pela sua dedicação e paciência.

Agradeço a minha co-orientadora professora Dr^a. Suzymeire Baroni, pela prestatividade, sua aceitação em me auxiliar neste período com contribuições de extrema valia nesta fase da pesquisa.

A UFFS- Universidade Federal da Fronteira Sul por proporcionar o programa de Pós-graduação, oportunizando a realização desta pesquisa junto a professores de extrema qualificação.

A Coordenação, ao Colegiado, aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, que deram suporte às várias atividades que beneficiaram direta e indiretamente este trabalho.

Ao Rodrigo e especialmente a Roberta por diversas vezes terem me auxiliado nas atividades laboratoriais, você demonstrou ser uma grande companheira e amiga, obrigada!

Aos meus amigos (as) e colegas do PPGATS, que mesmo não nos vendo, devido a pandemia, compartilhamos sempre aquela força *online* e boas vibrações, pois sabemos das dificuldades e da luta de cada um para a realização pessoal e profissional que almejamos.

A UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo suporte quanto ao fornecimento das linhagens celulares para a realização dos testes laboratoriais.

Agradeço ainda a todos os amigos e pessoas que estiveram presentes ao longo da minha vida, no trabalho, na sociedade e na jornada acadêmica, servindo de

exemplo e inspiração, que com bons exemplos, me instigaram a buscar meus objetivos e não desistir.

A vocês minha gratidão!

RESUMO

Glioblastomas (GBMs) são Gliomas primários de Grau IV que podem acometer todas as faixas etárias, sendo mais frequentes na população adulta e próxima aos 60 anos de idade. Com péssimo prognóstico, esta neoplasia se caracteriza por células altamente invasivas do sistema nervoso, com proliferação excessiva e resistente aos poucos tratamentos existentes. A expectativa de vida para pacientes com GBM pode chegar a meses, mesmo após cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Assim, este estudo partiu do pressuposto do uso de agrotóxicos estar atrelado à incidência de tumores, com a hipótese de que Round-up® e o Glifosato (GLY) possuem efeitos citotóxicos em linhagens de GBM, tendo efeito sobre o comportamento celular dos mesmos. O GLY é um herbicida de amplo espectro, pós-emergente, potencializado com misturas de surfactantes, que facilitam a absorção do composto pelas plantas. Round-up® é o herbicida à base de GLY mais conhecido no mercado. Neste trabalho, utilizamos as linhagens de GBM A-172 (humano) e C6 (rato) para a realização de diferentes testes variando o tempo de exposição aos tratamentos (24, 48 e 72 horas; 28 dias) e concentrações de GLY e Round-up® (0,0025 %, 0,005 % e 0,01 %), com o objetivo de avaliar a citotoxicidade desses compostos, verificar o potencial dos tratamentos agudo e crônico, e a indução à senescência, processo que se caracteriza como antitumoral. Demonstramos pela primeira vez que o Round-up® e o GLY apresentaram efeitos citotóxicos em linhagens de GBM, diminuindo a viabilidade celular, o número de células, a formação de colônias e a duplicação populacional, principalmente na dose de 0,01 % de Round-up®. Não encontramos resultados significativos em relação à indução de senescência pelos tratamentos utilizados. Os resultados também apontaram que estes efeitos foram mais pronunciados ao realizar o tratamento com Round-up® do que com o GLY.

Palavras-chave: Glioblastoma, Herbicida, Citotoxicidade

ABSTRACT

Glioblastomas (GBMs) are Grade IV primary gliomas that can affect all age groups, being more frequent in the adult population and those close to 60 years of age. With a poor prognosis, this neoplasm is characterized by highly invasive cells of the nervous system, with excessive proliferation and resistant to the few existing treatments. Life expectancy for patients with GBM can reach months, even after surgery, radiotherapy and chemotherapy. Thus, this study assumed that the use of pesticides is linked to the incidence of tumors, with the hypothesis that Round-up® and Glyphosate (GLY) have cytotoxic effects on GBM strains, having on their cellular effect. GLY is a broad-spectrum, post-emergence herbicide, potentiated with mixtures of surfactants, which facilitate the absorption of the compound by plants. Round-up® is the best known GLY-based herbicide on the market. In this work, we used the GBM strains A-172 (human) and C6 (rat) to perform different tests varying the exposure time to treatments (24, 48 and 72 hours; 28 days) and GLY and Round-up® procedures. up® (0.0025%, 0.005% and 0.01%), with the objective of evaluating a compound cytotoxicity, verifying the potential of acute and chronic treatments, and the induction of senescence, a process that stands out as an antitumor process. We demonstrated for the first time that Round-up® and GLY have cytotoxic effects on GBM strains, decreasing cell viability, cell number, colony formation and population doubling, mainly at the 0.01% dose of Round-up®. We did not find results obtained in relation to the induction of senescence by the treatments used. The results also showed that these effects were more pronounced when performing treatment with Round-up® than with GLY.

Keywords: Glioblastoma, Herbicide, Cytotoxicity

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características e Estatísticas Relacionadas a alguns Gliomas.....	20
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Características das células tumorais.....	18
Figura 2- Senescência desencadeada por estímulos diversos.	19
Figura 3- GBM primário e secundário – origem e alterações genéticas.....	21
Figura 4- Frequentes alterações em 3 vias de sinalização críticas em GBMs.	23
Figura 5- Imagem de uma TC ou MRI em um paciente com GBM frontoparietal esquerdo.	25
Figura 6 – Estrutura química da molécula de GLY.....	29
Figura 7- Metabólitos, Ácido Aminometil Fosfônico (AMPA) e Sarcosina a partir da degradação por bactérias do solo.	30
Figura 8- Caminho do Ácido Chiquímico e efeito do GLY.	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AANN: *American Association of Neuroscience Nurses*

AMPA: Ácido Aminometilfosfônico

ANOVA: Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: *American Type Culture Collection*

DL50: Dose Letal de 50%

DMEM: Meio *Eagle* Modificado por *Dulbecco*

DMSO: Dimetilsulfóxido

EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

EP: Erro Padrão

EPSPs: *5 Enol-Piruvil Shiquimato Fosfato Sintase*

ER α : Receptor de Estrogênio alfa

GBH: *Glyphosate based herbicide*

GBM: Glioblastoma

GLY: Glifosato

GOX: Glifosato oxidoreductase (enzima responsável por metabolizar o herbicida GLY)

Gy: *Gray* (unidade no Sistema Internacional de Unidades (SI) de dose absorvida)

HEPES: Agente tamponante de Ácido Sulfônico

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IDH1 e IDH2: Isocitrato desidrogenase 1 e 2

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária E Abastecimento

MGMT: Metilguanina - metiltransferase

MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

N(t): Número de células por poço na hora da passagem

N(to): Número das células plaqueadas na passagem inicial

OMS: Organização Mundial da Saúde

PI3K: (fosfatidilinositol 3 cinase – *phosphoinositide 3 kinase*) enzimas de sinalização intracelular e regulação do ciclo celular

p-16: Proteína de retardo de divisões celulares

p-53: Proteína citoplasmática de tumor

PBS: Tampão Fosfato Salino

PD: *Population doubling*

PTEN: *Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10*

QT: Quimioterapia

RMI- Ressonância Magnética Intracoronária

ROS: *Reactive Oxygen Species*

RT: Radioterapia

SAG: *Senescence-associated genes*

SFB: Soro Fetal Bovino

SHMT: Serina hidroximetiltransferase

SNC: Sistema Nervoso Central

SOX2: Marcador de células tronco

TC- Tomografia Computadorizada

Tmz: Temozolomida

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

X-Gal: β -galactosidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 HIPÓTESE	15
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo Geral	15
1.2.2 Objetivos Específicos	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS SOBRE CÂNCER.....	17
2.2 GLIOMAS: CARACTERÍSTICAS E FATORES DE RISCO.....	19
2.2.1 Tratamentos disponíveis	25
2.3 AÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO	27
3 RESULTADOS	33
3.1 ESTUDO 1.....	33
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	73

1 - INTRODUÇÃO

Os Gliomas são os tumores mais frequentes do Sistema Nervoso Central (SNC), correspondendo a 70 % destes tumores. O Glioma mais frequente é o Glioblastoma (GBM), com incidência de 7 casos a cada 100 mil pessoas. Os GBMs têm maior incidência sobre a população adulta, geralmente a mais idosa, a partir dos 65 anos de idade (JALALI; MUNSHI, 2009; LOUIS et al. 2007).

Os GBMs são compostos por astrócitos neoplásicos pouco diferenciados, geralmente localizados nos hemisférios cerebrais, tronco cerebral, cerebelo e medula espinhal.

Estes tumores são os mais malignos, apresentando os piores prognósticos entre os tumores do SNC. Pacientes acometidos com esta doença apresentam uma das piores expectativas de sobrevida, podendo vir a óbito em poucos meses. A taxa de sobrevida varia de acordo com a progressão da doença, sendo em torno de 15 a 20 meses. Pacientes com GBMs recorrentes podem ter sobrevida de até 6 meses (GRUBER; BUSTER, 2004).

De difícil tratamento, os GBMs são basicamente direcionados à ressecção cirúrgica, quimioterapia (QT) e radioterapia (RT). A ressecção cirúrgica traz conforto aos pacientes devido à diminuição da massa tumoral, embora as células infiltrantes permaneçam no local da lesão. Essas células infiltrantes podem levar a recorrência da doença mais tarde.

O tratamento de RT pode causar necrose nos tecidos cerebrais, o que limita o grau de uso da radiação. O tratamento com Temozolamida (Tmz), um agente quimioterápico alquilante, até o presente momento tem complementado a RT. A Tmz tem sido o quimioterápico mais utilizado na terapia adjuvante para o tratamento de GBMs. Devido às características adaptativas dos GBMs, a Tmz, apesar de eficiente, confere um aumento na sobrevida global dos pacientes de 12 a 14 meses, quando comparados a pacientes que realizam tratamentos somente com RT.

Mesmo assim a taxa de mortalidade se caracteriza elevada para esta neoplasia, devido à sua agressividade e resistência aos tratamentos, o que instiga a busca por novas estratégias terapêuticas.

Alguns estudos se baseiam no uso do composto ativo Glifosato (GLY), e seu metabólito Ácido Aminometilfosfônico (AMPA) para inibir a proliferação celular e

induzir alterações nos níveis de expressão de genes envolvidos no ciclo celular (LI et al. 2013).

O herbicida GLY é um organofosfato, formado por apenas uma molécula de glicina e uma de fosfometila, denominado *N-(fosfometil)* glicina (WHO, 1994). Sintetizado no ano de 1950 (WILLIAMS et al. 2000), o GLY apresenta o AMPA como seu principal metabólito. O AMPA é metabolizado no solo a partir da ação dos microorganismos (DICK; QUINN, 1995).

Em plantas, a ação do GLY é basicamente interromper a ação da via do ácido chiquímico. O ácido chiquímico é responsável pela síntese dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina, essenciais para a sobrevivência da planta (COUTINHO; MAZO, 2005; WILLIAMS et al. 2000).

Em mamíferos, o GLY seria excretado inalterado devido à ausência do ácido chiquímico (MYERS et al. 2016). Já o Round-up®, com ação mais intensa, é um herbicida à base de GLY, podendo ser mais mutagênico que seu próprio composto ativo devido à presença de surfactantes (COX, 1998).

Este trabalho visa o estudo do potencial antitumoral dos compostos Round-up® e GLY. Pretende-se verificar a influência desses químicos no comportamento celular de linhagens de GBM Humano e de rato, avaliar efeito antitumoral, estimar taxas de duplicação da população celular, e observar ainda a evolução tumoral, frente aos tratamentos aplicados.

1.1 HIPÓTESE

Round-up® e GLY possuem efeitos citotóxicos em linhagens de GBM, tendo efeito sobre o comportamento celular dos mesmos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar os possíveis efeitos do Round-up® e do GLY sobre linhagens de GBM humano e de rato.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se os tratamentos com Round-up® e GLY estão diminuindo a viabilidade celular e o número de células em linhagens de GBM humano e de rato;
- Acompanhar o crescimento da linhagem de GBM humano após o tratamento com Round-up®;
- Estimar a taxa de duplicação celular da população após o tratamento com Round-up® e GLY em linhagens de GBM humano;
- Investigar a formação de colônias frente ao tratamento com Round-up® em linhagens de GBM humano;
- Avaliar os efeitos do Round-up® e GLY sobre a indução de senescência celular em linhagens de GBM humano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS SOBRE CÂNCER

Em uma das definições, câncer é um conjunto de manifestações clínicas patológicas, caracterizado pela perda do controle do crescimento celular e o ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. A carcinogênese, de modo geral é um processo lento, com manifestações clínicas computadas ao longo dos anos (RIBEIRO et al. 2003).

O câncer é considerado uma doença genética, uma vez que resulta de alterações, mutações gênicas e aberrações cromossômicas. Essas alterações ocorrem em genes que estão comprometidos com o controle da proliferação e diferenciação celular (protooncogenes e genes supressores de tumor) e genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA (genes mutadores) (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Todos os tipos de cânceres compartilham traços comuns, que regem a transformação de células normais em células cancerosas: i. As células cancerosas podem estimular o seu próprio crescimento (auto-suficiência em sinais de crescimento); ii. Elas resistem a sinais inibidores que poderiam impedir o seu crescimento (insensibilidade aos sinais anti- crescimento); iii. Elas resistem à morte celular programada (apoptose); iv. Elas podem se multiplicar indefinidamente; v. Elas estimulam o crescimento de vasos sanguíneos para fornecer nutrientes aos tumores; vi. Elas invadem o tecido local e se espalham para outros tecidos (metástase); vii. Elas possuem uma grande desregulação do metabolismo energético; viii. Elas conseguem escapar da vigilância imunológica; ix. Elas geram um grande processo inflamatório; x. Elas apresentam instabilidade do genoma e mutagênese (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

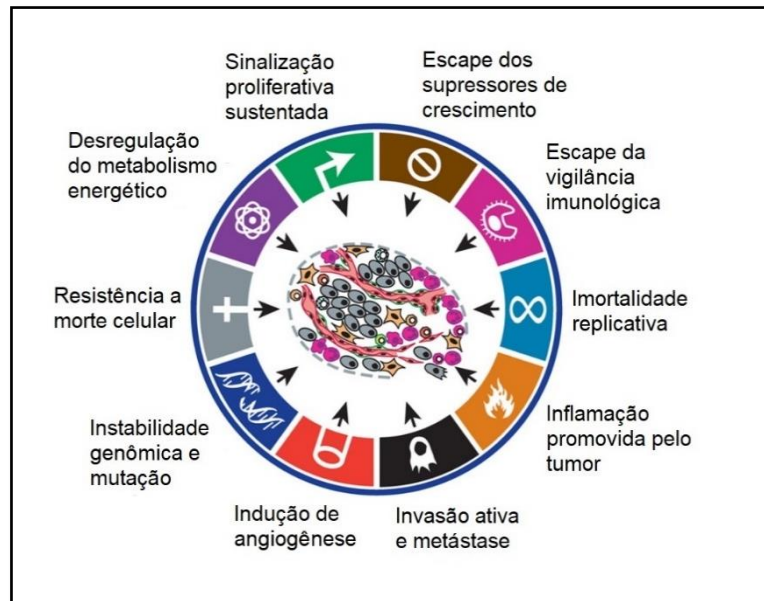


Figura 1- Características das células tumorais, segundo Hanahan e Weinberg (2011).

Um dos processos relacionados à tumorigênese é a senescência celular. Primeira vez testada por Dimri et al. (1995) através do biomarcador para atividade da β -galactosidase (x-Gal), forneceu evidências *in situ* de que as células senescentes podem persistir e se acumular com a idade *in vivo*, apresentando falhas na síntese de DNA.

O envelhecimento é uma característica normal dos organismos biológicos, marcado por falhas na função das células e hiperplasias, devido a estresses extrínsecos. A perda de função biológica de células em degeneração permite que muitas delas adquiram funções aberrantes caracterizando em letalidade. Essas características de degeneração e envelhecimento estão atreladas ao estresse celular, e conseqüentemente à senescência (CAMPISI, 2013).

A senescência se caracteriza por células metabolicamente ativas mas com incapacidade de proliferação celular, que sofrem alterações morfológicas, variando tamanho e forma celular achatada, aumento da enzima x-Gal, alteração no perfil transcricional da célula e parada no ciclo celular (CAMPISI, 2007; DIMRI et al. 1995).

Quando as células entram em fase de senescência, aumenta a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e proteases, chamados de SAGs (*senescence-associated genes*). Os oncogenes são um dos mecanismos pelo qual a senescência pode ser induzida (Figura 2). Essas características sugerem que a resposta à senescência e a senescência são

mecanismos de prevenção do câncer que evoluem para suprimir o desenvolvimento de câncer e para promover a reparação de tecidos (CAMPISI, 2013).

A senescência ocorre pelo encurtamento dos telômeros, quando se refere a senescência replicativa ou por danos ao DNA, ativação de oncogene e formação de radicais livres devido a estresses extrínsecos (SERRANO; BLASCO, 2001).

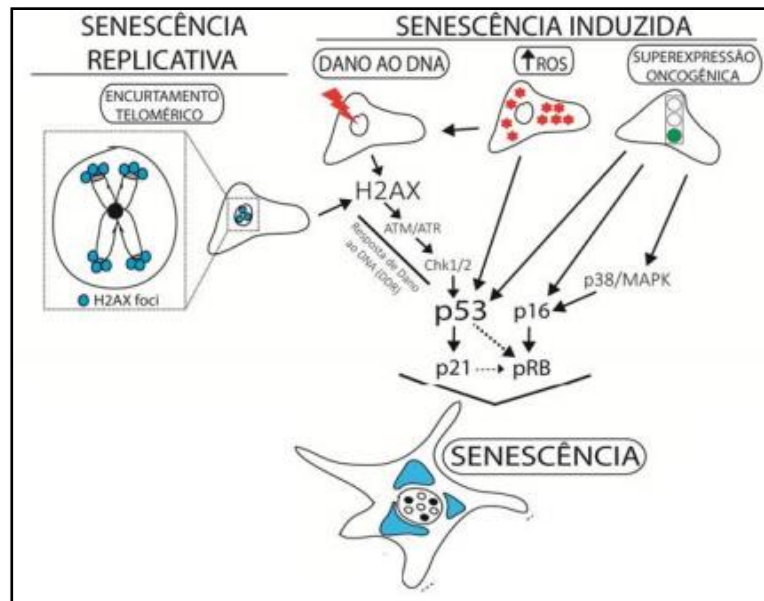


Figura 2- Senescência desencadeada por estímulos diversos (MENEGOTTO, 2014).

2.2 GLIOMAS: CARACTERÍSTICAS E FATORES DE RISCO

Os Gliomas são os tumores mais frequentes do SNC. Eles correspondem a 70% de todos os tumores cerebrais primários, sendo o GBM o mais comum e, de longe, o mais maligno de todos. O GBM corresponde a 16 % de todos os tumores cerebrais primários e neoplasias do SNC. Atinge a população adulta surgindo em média por volta dos 64 anos de idade, embora possa ocorrer em qualquer faixa etária, inclusive em crianças (THAKKAR et al. 2014). A incidência anual de Gliomas malignos é aproximadamente 07 casos para cada 100 mil pessoas (JALALI; MUNSHI, 2009; LOUIS et al. 2007). A incidência é levemente maior em homens do que em mulheres (1,6 para 1) e em caucasoides (ELLOR et al. 2014).

Para o ano de 2020 estimavam-se para o estado do Rio Grande do Sul 950 novos casos de câncer do SNC, enquanto para o Brasil a ocorrência de 11.100 novos casos. Destes casos, os Gliomas são o tipo histológico mais frequente e representam

cerca de 40 % a 60 % de todos os tumores primários do SNC, sendo mais comum na faixa etária adulta (INCA, 2020).

Os Gliomas são classificados segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas e Gliomas mistos (geralmente oligoastrocitomas). Os astrocitomas são classificados como pilocítico (grau I), difuso (grau II), anaplásico (grau III) ou GBM (grau IV) em ordem crescente de anaplasia. Algumas características e estatísticas relacionadas a esta classificação estão mostradas na Tabela 1 (LOUIS et al. 2001; OKADA et al. 2009).

Tabela 2- Características e Estatísticas Relacionadas a alguns Gliomas.

	Grau OMS	Histologia	Porcentagem aproximada de todos os gliomas	Características	Sobrevida estimada após 5 anos
	Benigno	Ependimoma	5,2%	- Pode ter crescimento lento ou rápido; - Geralmente localizado nos ventrículos, mas pode se estender a medula espinhal; - Comum em crianças; pico de ocorrência entre 5 e 34 anos de idade.	65%
Baixo grau	I	Astrocitoma pilocítico	5,1%	- Crescimento lento, geralmente benigno, formando cisto; - Muito comum no cérebro, podendo crescer no nervo óptico, tronco encefálico e cerebelo; - Frequente em crianças e adolescentes.	98%
	II	Oligodendroglioma Astrocitoma Oligoastrocitoma	28%	- Tende a crescer lentamente; - Raramente encontrado fora do cérebro; - Comum em homens e mulheres entre 20 e 50 anos.	50%
Alto grau	III	Astrocitoma anaplásico Oligodendroglioma anaplásico Oligoastrocitoma anaplásico	6,7%	- Cresce mais rápido e agressivamente que o do grau II; - Tende a invadir o tecido vizinho; - Mais comum em homens e entre 30 e 50 anos.	30%
	IV	GBM	55%	- Pode se desenvolver diretamente ou progredir a partir de um glioma de baixo grau; - Altamente invasivo no cérebro; - Mais comum em adultos mais velhos do que crianças e mais comum em homens.	Menor que 5%

*Fonte: Adaptado de Davis (2018).

Compostos por astrócitos neoplásicos pouco diferenciados, os GBMs estão localizados preferencialmente nos hemisférios cerebrais (OKADA et al. 2009), podendo afetar ainda o tronco cerebral, cerebelo e medula espinhal. Segundo a

American Association of Neuroscience Nurses – (AANN) (2014), em 61 % dos casos, os gliomas primários ocorrem nos quatro lobos do cérebro: frontal (25 %), temporal (20 %), parietal (13 %) e occipital (3 %).

Os GBMs podem ser classificados como primários, quando surgem sem um precursor conhecido; ou secundário, onde um tumor de baixo grau se transforma ao longo do tempo em GBM. A maioria dos GBMs é primária, e esses pacientes tendem a ser mais velhos e ter pior prognóstico do que os pacientes com GBMs secundários (Figura 3) (WILSON et al. 2014).

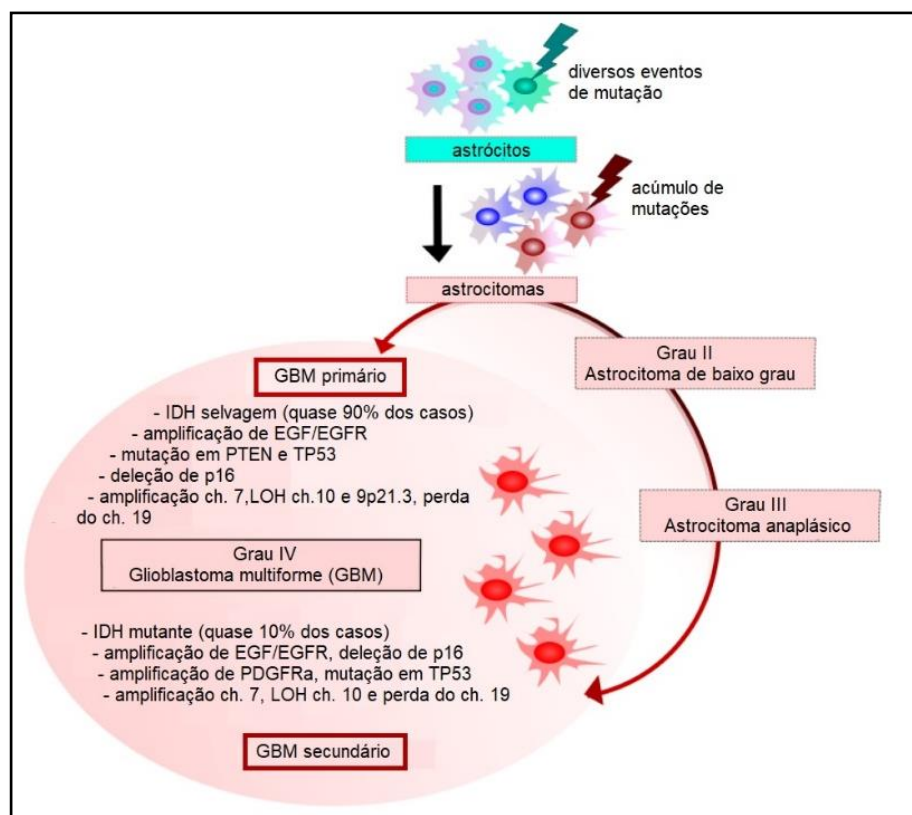


Figura 3- GBM primário e secundário – origem e alterações genéticas. Ch – cromossomo; LOH – perda da heterozigiosidade. Adaptado de (PAWLOWSKA et al. 2018).

Originalmente, pensava-se que os GBMs eram derivados apenas de células gliais; no entanto, as evidências sugerem que eles podem surgir de vários tipos de células com propriedades semelhantes às células-tronco neurais. Essas células estão em vários estágios de diferenciação de células-tronco para neurônios e glia, com variações fenotípicas determinadas, em grande parte, por alterações moleculares nas

vias de sinalização e não por diferenças no tipo de origem celular (PHILLIPS et al. 2006).

Além disso, foram identificados quatro subtipos de GBM (clássico, pró-neural, neural e mesenquimal), cada um com padrões diferentes de progressão da doença e resultados de sobrevivência (BRENNAN et al. 2013; VERHAAK et al. 2010; WANG et al. 2015).

Aproximadamente 5 % dos pacientes com GBM têm uma história familiar de Gliomas (FARRELL; PLOTKIN, 2007). O evento mutacional é um processo lento que inicia em uma única célula, em genes determinantes. Posteriormente se desenvolvem em múltiplos estágios através da acumulação de alterações genéticas que vão transformando uma célula normal em célula cancerígena (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Anormalidades genéticas complexas combinadas com fatores ambientais desconhecidos predisõem indivíduos ao desenvolvimento de Gliomas (HOFER et al. 2014). Nenhuma única mutação explica a tumorigênese dos Gliomas. Essa diversidade molecular e as constantes modificações ao longo do tempo são as explicações para a resiliência tumoral e conseqüentemente a resistência à terapia (WEATHERS; GILBERT, 2016).

Mais de 600 genes foram sequenciados a partir de mais de 200 amostras de tumores humanos, como resultado do perfil genômico e do projeto Atlas do Genoma do Câncer. Este sequenciamento revelou o complicado perfil genético do GBM e estabeleceu um conjunto de três núcleos de vias de sinalização (Figura 4). Essas vias são comumente ativadas, quais sejam, a via da proteína tumoral p53, a via de sinalização do receptor tirosina quinase/Ras/fosfoinosítídeo 3-quinase, e a via do retinoblastoma (PARSONS et al. 2008).

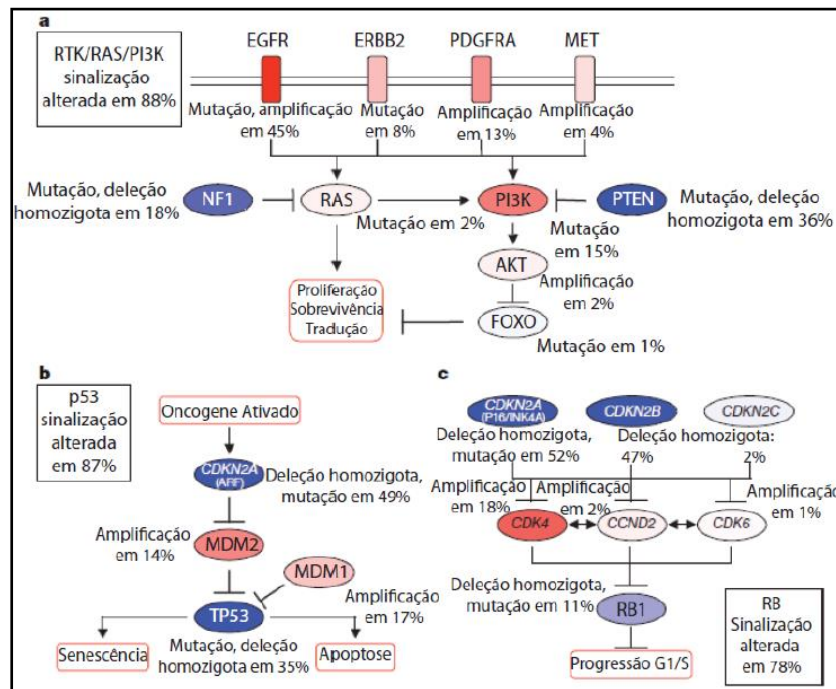


Figura 4- Frequentes altera es em 3 vias de sinaliza o críticas em GBMs. a-c: Altera es nas sequências primárias e mudanças significantes no número de cópia dos componentes das vias de sinaliza o RTK, RAS/PI3K (fosfatidilinositol 3 cinase – *phosphoinositide 3 kinase*) (a), p-53(b) e RB(c). Vermelho indica altera es genéticas ativadoras, com genes frequentemente alterados em vermelho mais intenso. Azul indica altera es inativadoras, com genes frequentemente alterados em azul escuro correspondendo a maior porcentagem de altera o. CCND2 – ciclina D2; NF1 – neurofibromatose 1 (*neurofibromatosis 1*); FOXO – *forkhead Box-containing protein O*; ERBB2 – homólogo 2 do oncogene viral da leucemia eritroblástica (*v-erb-b2 erythroblasticleukemia viral oncogene homolog 2*); MET - fator de transi o mesenquimal-epitelial, (*mesenchymal-epithelialtransitionfactor*); AKT – Homóloga Celular ao Oncogene Viral v-AKT (Também conhecida como PKB – Proteína cinase B). Adaptado de (CANCER GENNOME ATLAS, 2008; ZAMIN, 2010).

A maioria dos GBMs primários e secundários tem altera es nessas vias, dando origem a prolifera o celular descontrolada e maior sobrevivência celular (Figura 2). Além disso, permitem também que as células tumorais escapem dos pontos de checagem do ciclo celular, evitem a senescência e não promovam a apoptose (CHEN et al. 2012).

As alterações genéticas típicas do GBM primário são a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), as mutações da PTEN e a perda do cromossomo 10q. No GBM secundário, as mutações da isocitrato desidrogenase 1 (IDH1), as mutações da p53 e a perda do cromossomo 19q são frequentemente observadas (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015; WILSON et al. 2014; YOUNG et al. 2015).

Os GBMs secundários são mais comuns entre pacientes jovens. Eles surgem como tumores de baixo grau e podem evoluir durante alguns anos. Caracterizam-se pela presença de mutações no gene supressor de tumor p53, alterações nas vias p-16 e retinoblastoma, além de aberrações no número da cópia do DNA (WATANABE et al. 1996).

Esforços para identificar associações específicas desta doença com a exposição ambiental e ocupacional têm sido em grande parte inconclusiva e fraca. A radiação ionizante é um dos poucos fatores de risco conhecidos que demonstram um risco aumentado de desenvolvimento de Glioma (ELLOR et al. 2014). O GBM induzido por radiação é tipicamente observado anos após a indicação da radiação terapêutica para outro tumor ou condição (JOHNSON et al. 2015).

Outras exposições ambientais como: cloreto de vinila, pesticidas, fumo, refino de petróleo e fabricação de borracha sintética têm sido vagamente associados ao desenvolvimento de Gliomas. Campos eletromagnéticos, formaldeído e radiação não ionizante de telefones celulares não provaram levar ao desenvolvimento de GBM (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015).

Algumas doenças genéticas específicas, como neurofibromatose 1 e 2, esclerose tuberosa, síndrome de Li - Fraumeni, retinoblastoma e síndrome de Turcot, podem aumentar o risco de desenvolvimento de Glioma. No entanto, menos de 1% dos pacientes com Glioma têm uma doença hereditária conhecida (ELLOR et al. 2014).

Os principais marcadores genético-moleculares relacionados ao diagnóstico de Gliomas são a codeleção 1p/19q, mutações no gene da Isocitrato desidrogenase (IDH) 1 e 2 e metilação de MGMT (STUPP et al. 2010). As mutações no gene da IDH 1 e 2 são considerados marcadores de Gliomas de baixo grau (COLMAN et al. 1995). Já a metilação do MGMT apresenta valor prognóstico e preditivo de resposta à QT (BRASIL, 2019).

A metilação da região promotora do gene MGMT resulta no silenciamento epigenético da metiltransferase. A metiltransferase é responsável pela reparação

genética, o que aparenta ser um fator de prognóstico prevalente nos Gliomas de estágio II-IV. Ela conduz à acumulação de mutações e instabilidade cromossômica apesar de se verificar uma frequência menor à medida que a malignidade dos tumores aumenta (HOFER; LASSMAN, 2010).

O diagnóstico destes tumores pode incluir uma Tomografia Computadorizada (TC) ou Ressonância Magnética Intracoronária (RMI) (Figura 5). Na RMI, quase todos os GBMs aumentam com contraste de gadolínio e mostram uma massa de forma irregular com um anel denso de realce e centro hipointenso de necrose. A necrose é uma característica marcante do GBM, e a presença de necrose é necessária para que um tumor cerebral seja de grau IV (AANN, 2014). Edema vasogênico circundante (que pode causar efeito de massa), hemorragia e distorção ou deslocamento ventricular também podem estar presentes nas imagens de diagnóstico (ELLOR et al. 2014; JOHNSON et al. 2015).

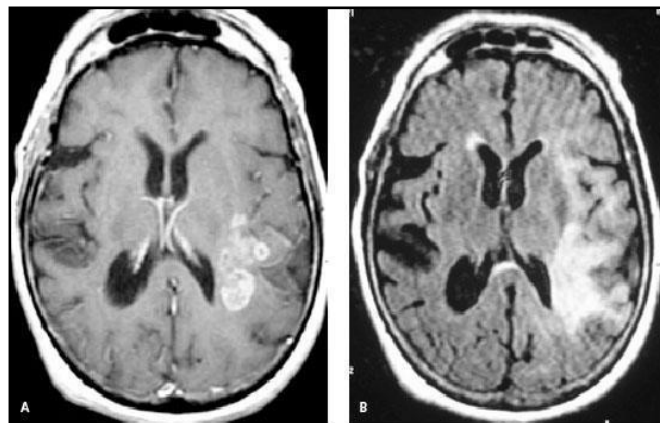


Figura 5- Imagem de uma TC ou RMI em um paciente com GBM frontoparietal esquerdo. A) Massa aumentada e multilobulada no lobo temporal esquerdo. (B) Imagem de recuperação de inversão atenuada por fluido, revelando o sinal luminoso de edema vasogênico no lobo temporal, estendendo-se para o lobo parietal esquerdo (CHANDANA et al. 2008).

Os sintomas mais comuns apresentados pelos pacientes com GBM são cefaléia, déficit neurológico e aumento da pressão intracraniana. Uma convulsão é o sintoma de apresentação em até 25 % dos pacientes e pode ocorrer em um estágio posterior da doença em até 50 % dos pacientes (PERRY et al. 2006; SCHIFF et al. 2014).

2.2.1 Tratamentos disponíveis

A terapia padrão para o GBM recém-diagnosticado inclui a ressecção cirúrgica segura máxima, seguida pela radiação. A radiação concomitante é feita com Tmz, um agente quimioterápico alquilante oral, adjuvante da QT que aumenta a sobrevida de pacientes diagnosticados (YAMANAKA; SAYA, 2009).

Mesmo com os avanços na ressecção cirúrgica, o prognóstico para pacientes com GBM permanece ruim, com uma sobrevida média de 15 meses (THAKKAR et al. 2014; WALID, 2008). Apesar da ressecção inicial máxima e terapia multimodal, cerca de 70 % dos pacientes com GBM terão progressão da doença dentro de um ano do diagnóstico (STUPP et al. 2005). Menos de 5 % dos pacientes sobrevivem cinco anos após o diagnóstico (Tabela 1) (OSTROM et al. 2014).

Devido à grande invasividade, a ressecção cirúrgica extensa e completa dos GBM torna-se difícil, uma vez que esses tumores estão frequentemente em áreas eloquentes do cérebro. Essas áreas incluem regiões que controlam a fala, a função motora e os sentidos. Devido a esses fatores, a ressecção radical da massa tumoral primária não é curativa. Assim muitas células tumorais infiltrantes invariavelmente permanecem dentro do cérebro circundante, levando à progressão ou recorrência da doença mais tardia (WILSON et al. 2014).

Ainda assim, a ressecção cirúrgica proporciona benefício em relação ao efeito de massa e redução do volume tumoral (KELES et al. 2004).

O tratamento com radiação leva em consideração a capacidade de absorção dos tecidos. Embora muitos pacientes de modo geral suportariam uma dose maior de radiação, os tecidos cerebrais saudáveis podem necrosar, devido à baixa tolerância (DAVIS; STOIBER, 2011).

Em GBMs recorrentes o uso de QT e corticosteróides podem ser usados como alternativa para melhorar a qualidade de vida e controlar os sintomas e déficits neurológicos associados ao edema peritumoral. Contudo, o tempo e dose de uso deve ser o menor possível, devido aos efeitos colaterais do uso prolongado (FRANCESCHI et al. 2009; MARQUES; SANTOS, 2018). Muitos pacientes recebem corticosteróides em diagnóstico para ajudar a controlar o edema vasogênico e aliviar os sinais e sintomas que o acompanham (DAVIS, 2016).

A maioria dos Gliomas de alto grau responde melhor ao tratamento com terapia combinada baseada em RT e QT. A dose de RT pós-cirúrgica é de 60 Gy em 30 frações, concomitante à Tmz via oral, na dose 75 mg/m² de tumor por dia, durante

toda a RT, seguida de Tmz 150 a 200 mg/m² de tumor por cinco dias, a cada 28 dias, por seis meses (STUPP et al. 2005; VALDUVIECO et al. 2012).

Pacientes portadores de GBMs recorrentes após seis ciclos de Tmz ou com tempo livre do fármaco podem ser submetidos à reexposição com Tmz no esquema convencional de Stupp (STUPP et al. 2005).

Medidas como cirurgia, RT e QT, ainda não são suficientemente eficazes para frear a progressão da doença. A sobrevida máxima é alcançada nos doentes que são submetidos a uma ressecção total, seguida de RT e Tmz, sendo que esta sobrevida ainda continua a ser de apenas 20 meses (WOLBERS, 2014).

Pacientes que possuem a enzima MGMT, responsável pelo reparo do DNA por remover o grupo metil da posição O-6 dos resíduos de guanina que são adicionados pela Tmz (SPIEGL-KREINECKER et al. 2010), possuem tumores mais resistentes a este tratamento.

A Tmz tem seu benefício aumentado em pacientes com a metilação da região promotora do gene da MGMT. Entre os pacientes com GBM e a metilação de MGMT que foram tratados com Tmz, a sobrevida média é de 21.7 meses e a sobrevida aos 2 anos é de 46 %. No caso dos pacientes sem a metilação de MGMT a sobrevida média foi de 12.7 meses e a sobrevida aos 2 anos foi de 13.8 % (HEGI et al. 2005).

2.3 AÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO

Controlar as plantas indesejadas na agricultura é uma prática muito antiga, desde as civilizações gregas. Óleo de oliva, cicuta, sal, cloreto de mercúrio, nicotina, sulfato de cobre, ácido sulfúrico, arsenito de sódio, bissulfureto de carbono, óleo bruto de petróleo, tricloreto de arsênio são alguns exemplos utilizados até meados de 1940 (ZIMDAHL, 2010).

O uso de agrotóxicos no Brasil primeiramente esteve relacionado a saúde pública. Eram utilizados no combate de vetores e parasitas. Foi então a partir dos anos de 1960, após estímulos e incentivos de Crédito Rural e Pacotes Tecnológicos por parte do Governo para como os setores agrícolas, que seu uso teve início na agricultura. Este foi o marco em que as práticas alternativas de controle de pragas acabaram praticamente se extinguindo (JOBIM et al. 2010).

O herbicida GLY é um dos mais utilizados no mundo, representando 60 % do mercado mundial de herbicidas não seletivos, contabilizando um total de US\$ 1,2 bilhão/ano com vendas do produto (AMARANTE JUNIOR et al. 2002).

Entre os anos de 2001 e 2008 o Brasil foi o maior consumidor mundial de agrotóxicos, e, em 2009, o consumo ultrapassou um milhão de toneladas, representando na época 5,2 kg de agrotóxico por habitante (LONDRES, 2011).

Os agrotóxicos são formados por diversos componentes químicos com interesse voltado à proteção da cultura e combate de organismos nocivos à produção (MILDEMBERG et al. 2017). Esses diversos componentes químicos que integram as moléculas de agrotóxicos são avaliados e aprovados pela legislação brasileira, através da Lei N° 7.802/89. Esta lei contempla parâmetros para proibição de um agrotóxico que apresente características de carcinogenicidade, mutagenicidade e teratogenicidade, que provoque distúrbios hormonais ou danos no aparelho reprodutor ou ainda apresente características que causem danos ao meio ambiente (GRISOLIA, 2005).

O processo de registro dos agrotóxicos pelo Ministério da Agricultura completa-se após as avaliações de eficácia agrônômica por este Ministério, de toxicidade à saúde humana pelo Ministério da Saúde e de periculosidade ao Meio Ambiente pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (GRISOLIA, 2005).

Os agroquímicos são divididos em classes de acordo com composição e controle como: herbicidas, inseticidas, rodenticidas, fungicidas, fumigantes, nematicidas, acaricidas e desfolhantes. Além disso, são classificados em quatro classes de acordo a periculosidade avaliada tanto para o ser humano quanto para o meio ambiente (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

Essas classes estão baseadas nos testes de Dose Letal (DL50) para matar 50 % da população, sendo: Classe I: composto químico altamente perigoso ao meio ambiente; Classe II: composto químico muito perigoso ao meio ambiente; Classe III: composto químico perigoso ao meio ambiente; Classe IV: composto químico pouco perigoso ao meio ambiente (RIBAS; MATSUMURA, 2009). O GLY pertence à classe IV (ANVISA, 2003).

O GLY é um organofosfato, sintetizado no ano de 1950, com capacidade herbicida reconhecida 20 anos após (WILLIAMS et al. 2000).

No ano de 1971 a Monsanto entrou com o pedido de patenteamento da substância denominada como *N-phosphonomethyl-glycine* cujas propriedades eram fitotóxicas, ou seja, um herbicida, sendo a mesma concedida no ano de 1974, sob o número US 3.799.758 (FRANZ, 1974).

A dose de ingestão diária aceitável do GLY é de 0,042 mg por massa corpórea. Em ratos o valor da DL 50 oral é de 5600 mg/kg⁻¹ para a empresa Monsanto e de 4230 mg/kg⁻¹ para a OMS (AMARANTE JUNIOR et al. 2002).

O GLY é formado apenas por uma molécula de glicina e uma de fosfometila, denominado *N-(fosfometil) glicina*, fórmula molecular C₃H₈NO₅P (Figura 6), m.m. = 169,1 g/mol. Na sua forma pura, o GLY é um pó, branco, inodoro, com densidade específica de 1,704 g/cm³ a 20 °C, solubilidade em água de 11,6 g/L, a 25 °C e pH 2,5 em solução a 1% (WHO, 1994), e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol, entre outros (TOMLIN et al.1994).

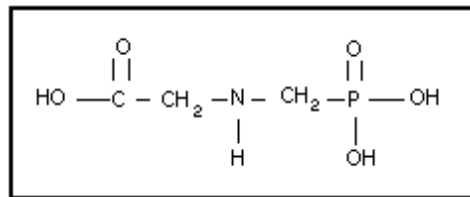


Figura 6 – Estrutura química da molécula de GLY (WILLIAMS et al. 2000).

O GLY é um herbicida de ação pós-emergente, classificado como não seletivo e de ação sistêmica, que atua tanto em espécies de folhas largas e estreitas, controlando mais de 100 espécies de plantas daninhas em culturas anuais e mais de 60 espécies perenes de plantas daninhas (DILL et al. 2010; GALLI et al. 2005).

Quando aplicado em doses menores, o herbicida GLY pode atuar como um regulador de crescimento de plantas e dessecante (FAO; WHO, 2016).

Quando ocorre aplicação de GLY, parte deste composto químico é diretamente absorvido na região clorofilada das plantas (folhas e tecidos verdes). Outra parte é transportada pelo floema e para os tecidos meristemáticos. Outra parte ainda do herbicida se deposita no solo. Esta por sua vez é rapidamente degradada em outros compostos químicos. Já o composto absorvido pelas plantas será liberado ao solo também de forma degradada em outros metabólitos, como é o caso do AMPA. Porém esta liberação ocorre de forma gradual, de acordo com a decomposição realizada pelos vegetais, o que varia de um a outro (GALLI et al. 2005).

No combate de ervas daninhas a aplicação de GLY no sistema radicular das plantas é insignificante. Este somente tem efeito em contato direto com a folhagem (WILLIAMS et al. 2000).

No solo a degradação do GLY ocorre de forma rápida pelos microorganismos que o utilizam como fonte de energia e fósforo. Nesse processo produz-se o AMPA como o principal metabólito, e a sarcosina como metabólito intermediário na rota alternativa (Figura 7) (DICK; QUINN, 1995).

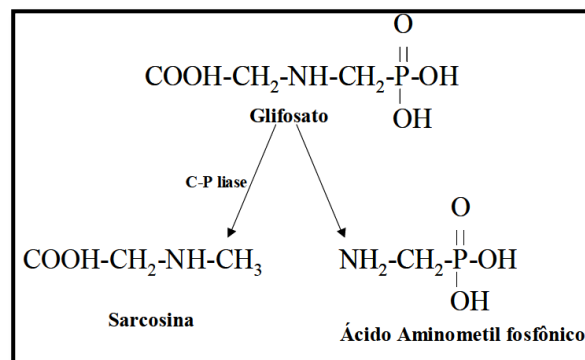


Figura 7- Metabólitos, Ácido Aminometil Fosfônico (AMPA) e Sarcosina a partir da degradação por bactérias do solo (DICK; QUINN, 1995).

A adsorção do GLY com o solo ocorre a partir da troca de ligantes com os óxidos de ferro e alumínio e as pontes de hidrogênio formadas entre o GLY e as substâncias húmicas presentes no solo (FENG; THOMPSON, 1990).

Na água o GLY não se degrada rapidamente, mas se dissipa pela união aos sedimentos ou se decompõem em AMPA na presença da microbiota, pela degradação microbiológica (MORAES; ROSSI, 2010).

O princípio ativo GLY tem se destacado no comércio de herbicidas, pois, é o único capaz de inibir a enzima *Enol-Piruvil Shiquimato Fosfato Sintase* (EPSP). Ele suspende a síntese de três aminoácidos essenciais para a planta – triptofano, fenilalanina e tirosina (Figura 8). Desta forma as plantas tratadas com GLY acabam morrendo lentamente, em poucos dias ou semanas. Devido ao transporte por todo o sistema, nenhuma parte da planta sobrevive (COUTINHO; MAZO, 2005; WILLIAMS et al. 2000).

Estudos muito antigos enfatizam ser o GLY de uso seguro para animais e humanos, devido à influência direta da ação do GLY ocorrer na via do ácido Chiquímico. Essa via é exclusiva de plantas, e alguns microorganismos (MYERS et al. 2016).

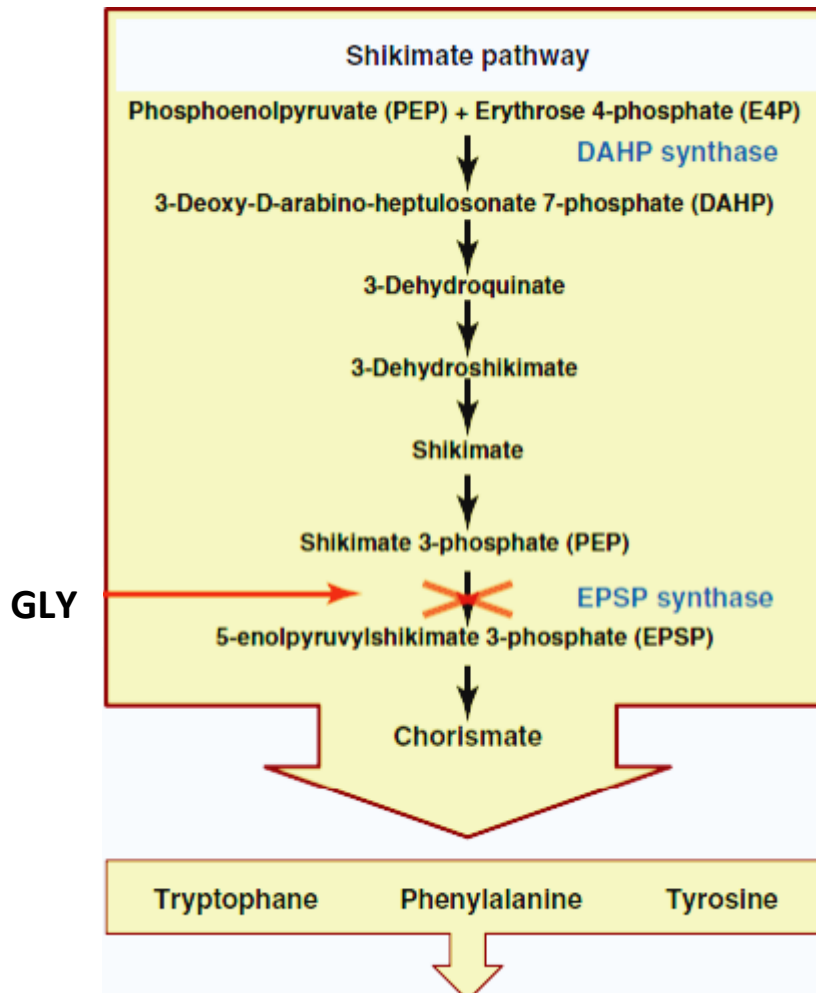


Figura 8- Caminho do Ácido Chiquímico e efeito do GLY, adaptada de Aziz, (2020).

Em humanos ainda, alguns estudos apontam que o uso de GLY pode estar associado a alterações celulares. Estas alterações estariam relacionadas a células já mutadas, como as cancerígenas. Esses compostos químicos são atrelados a inibição do crescimento celular das mesmas. Já o uso do AMPA além de inibir o crescimento celular é capaz de induzir alterações nos níveis de expressão de genes envolvidos no ciclo celular e apoptose (LI et al. 2013).

O Round-up® é um herbicida amplamente utilizado e comercializado pela Monsanto. Seu princípio ativo é o GLY, um herbicida de amplo espectro com o interesse no combate de plantas daninhas (HAO et al. 2019).

Este produto é uma das principais formulações comerciais. O sal mais comum de sua composição é a isopropilamina, mas vários outros sais podem ser utilizados como trimetilsulfônio, potássio, amônia, monoetanolamina e dimetilamina (DILL et al. 2010).

No Brasil, a linha Round-up® de herbicidas à base de GLY da Monsanto encontra-se devidamente registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA para fins agrícolas; E no IBAMA para fins não agrícolas. Os registros são concedidos com base nas avaliações agronômicas, toxicológicas e ambientais realizadas pelo MAPA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA e IBAMA, respectivamente, em conformidade com a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto no 98.816, de 11 de janeiro de 1990, este substituído pelo Decreto no 4.074, de 4 de janeiro de 2002 e Portarias e Instruções Normativas pertinentes (GALLI et al. 2005).

Segundo as organizações ligadas às indústrias de biotecnologia, estima-se que mais de 75 % das lavouras transgênicas cultivadas no Brasil são de soja da Monsanto tolerante ao Round-up®, a base de GLY (LONDRES, 2011).

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) a cultura de soja foi a que mais cresceu no Brasil nos últimos 30 anos. Nos anos de 1970 a 2003, o crescimento da produção foi de 333 %, de 45 para quase 190 milhões de toneladas. No ano de 2004 se tornou o segundo maior produtor mundial de soja com 50 milhões de toneladas de grãos (EMBRAPA, 2004).

Com o desenvolvimento da Soja transgênica (Soja Round-up® Ready) resistente ao GLY é possível aplicar somente este ingrediente ativo, em pós emergência, sendo que antes necessitava de misturas formuladas para o combate de ervas daninhas antes da semeadura. Esta tecnologia soma ao número de ferramentas no controle de pragas. Deve-se ainda observar as espécies resistentes a esse herbicida, complementando o cultivo com o manejo adequado das mesmas e a rotação de cultura de soja (EMBRAPA, 2013).

3 RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão apresentados sob a forma de um artigo científico. O referido artigo é apresentado na Seção 3.1, e identificado como Estudo I.

O Estudo I (Seção 3.1) tem como título “**Avaliação do efeito do tratamento com Glifosato e Round-up® em linhagens de Glioma**”, trata sobre o estudo realizado com Gliomas humanos (linhagem A-172) e de rato (linhagem C6), o qual será submetido ao periódico Brazilian Journal of Health Review (anexo 1).

3.1 ESTUDO I

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM GLIFOSATO E ROUND-UP® EM LINHAGENS DE GLIOMA

EVALUATION OF THE EFFECT OF THE TREATMENT WITH GLYPHOSATE AND ROUND-UP® ON GLIOMA LINES

RESUMO: O Glifosato (GLY) foi sintetizado no ano de 1950, inicialmente com propriedades fitotóxicas e com capacidade herbicida reconhecida somente em 1970. O GLY é um organofosfato, formado por apenas uma molécula de glicina e uma de fosfometila, denominado N-(fosfometil) glicina, usado em todo o mundo, para diminuir perdas de produtividade agrícola. Pode ainda ser misturado a surfactantes, substâncias que facilitam a sua absorção, potencializando ainda mais seus efeitos. Round-up® é o herbicida a base de GLY mais conhecido no mercado. Muitos estudos demonstram a citotoxicidade de GLY e Round-up® em células de câncer. Glioblastomas (GBMs), são tumores primários comuns no Sistema Nervoso Central (SNC), que correspondem a 16 % de todos os tumores cerebrais primários e neoplasias do SNC. GBMs são mais frequentes na população adulta, geralmente a partir dos 60 anos de idade, apresentando os piores diagnósticos, resultando em uma sobrevida muito baixa. Atualmente os principais tratamentos aplicados contra os tumores são desenvolvidos a base de Temozolamida (Tmz), ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Nesse estudo, com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de GLY e Round-up®, partimos da utilização de linhagens de GBMs humano e de rato. Realizou-se diferentes testes com variação de tempo (24, 48 e 72 horas) e concentrações de GLY e Round-up® (0,0025 %, 0,005 % e 0,01 %). Demonstramos pela primeira vez que o Round-up® e o GLY apresentaram efeitos citotóxicos em linhagens de GBMs, diminuindo a viabilidade celular, o número de células, a formação de colônias e a duplicação populacional. Os resultados também apontaram que estes efeitos foram mais pronunciados ao realizar o tratamento com Round-up® do que com o GLY.

Palavras-chave: Glioblastoma, Herbicida, Citotoxicidade

ABSTRACT: Glyphosate (GLY) was synthesized in 1950, but its phytotoxic properties and herbicidal capacity were recognized only in 1970. GLY is an organophosphate, formed by one molecule of glycine and one of phosphonomethyl, called N- (phosphonomethyl) glycine, used around the world, to reduce losses in agricultural productivity. It can also be mixed with surfactants, substances that facilitate its absorption, further enhancing its effects. Round-up® is the best known GLY-based herbicide on the market. Many studies demonstrate the cytotoxicity of GLY and Round-up® on cancer cells. Glioblastomas (GBMs), are common primary tumors in the Central Nervous System (CNS), which account for 16% of all primary brain tumors and CNS neoplasms. GBMs are more frequent in the adult population, usually after 60 years of age, with the worst diagnoses altered, resulting in a very low survival rate. Currently, the main requirements against tumors are developed based on Temozolamide (Tmz), surgical resection, radiotherapy and chemotherapy. In this study, with the aim of evaluating the cytotoxicity of GLY and Round-up®, we started from the use of human and rat GBM strains. Different tests were performed with variation of time (24, 48 and 72 hours) and GLY and Round-up® procedures (0.0025%, 0.005% and 0.01%). We demonstrate for the first time that Round-up® and GLY have cytotoxic effects on GBM strains, decreasing cell viability, cell number, colony formation and population doubling. The results also showed that these effects were more pronounced when performing treatment with Round-up® than with GLY.

KEY WORDS: Glioblastoma, Herbicide, Cytotoxicity

1 INTRODUÇÃO

Gliomas são tumores que se originam nas células da glia, (NDUBAKU; DE BELLARD, 2008), sendo o Glioblastoma (GBM) o mais agressivo e caracterizado pela extensa vascularização e mau prognóstico (QUAIL; JOYCE, 2017; WAN *et al.*, 2020).

O GBM corresponde a 16% de todos os tumores cerebrais primários e neoplasias do Sistema Nervoso Central (SNC) (THAKKAR *et al.*, 2014). Sua incidência atinge mais a população adulta, a partir dos 65 anos, ocorrendo 7 casos de GBMs a cada 100 mil pessoas, (JALALI; MUNSHI, 2009; LOUIS *et al.*, 2007).

Aproximadamente 5 % dos pacientes têm uma história familiar de Gliomas (FARRELL; PLOTKIN, 2007). O evento mutacional é um processo lento que inicia em uma única célula, em genes determinantes. Posteriormente se desenvolvem em múltiplos estágios através da acumulação de alterações genéticas que vão transformando uma célula normal em célula cancerígena (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

A terapia padrão para o GBM recém-diagnosticado inclui a ressecção cirúrgica segura máxima, seguida pela radiação. A radiação concomitante é feita com Temozolamida (Tmz), um agente quimioterápico alquilante oral, adjuvante da quimioterapia (QT) que aumenta a sobrevida de pacientes diagnosticados (YAMANAKA; SAYA, 2009).

Estes tratamentos, incluindo cirurgia, radioterapia (RT) e (QT), não são considerados suficientemente eficazes na progressão da doença (WOLBERS, 2014). Devido à grande invasividade, a ressecção cirúrgica extensa e completa dos GBMs se torna difícil, visto que na maioria das vezes esses tumores estão alojados em áreas eloquentes do cérebro. Essas áreas incluem regiões que controlam a fala, a função motora e os sentidos. Devido a esses fatores, a ressecção radical da massa tumoral primária não é curativa. Assim muitas células tumorais infiltrantes invariavelmente permanecem dentro do cérebro circundante, levando à progressão ou recorrência da doença mais tardia (WILSON *et al.*, 2014).

Apesar da ressecção inicial máxima e terapia multimodal, cerca de 70 % dos pacientes com GBM terão progressão da doença dentro de um ano do diagnóstico (STUPP *et al.*, 2005). Menos de 5 % dos pacientes sobrevivem cinco anos após o diagnóstico (OSTROM *et al.*, 2014).

Embora essa neoplasia resista a diversos tratamentos caracterizando uma taxa de mortalidade elevada, ainda assim a ressecção cirúrgica proporciona benefícios em relação ao efeito de massa reduzindo o volume tumoral, promovendo bem-estar aos pacientes, mesmo que temporário (KELES *et al.*, 2004).

Diversos motivos instigam a busca por novas estratégias terapêuticas, entre elas estão os estudos envolvendo Glifosato (GLY) e Round-up® que afetam a sobrevivência das células devido a desregulação do ciclo celular, alterações causadas no metabolismo que modificam o consumo de oxigênio mitocondrial, aumentam os níveis de *Reactive Oxygen Species* (ROS), induzem hipóxia, impedem o reparo de DNA, causam mutações e levam a morte celular (STUR, 2019).

O GLY é formado apenas por uma molécula de glicina e uma de fosfometila, denominado *N-(fosfometil)* glicina. Quando no ambiente, a degradação do GLY ocorre pelos micróbios no solo em dióxido de carbono (CO₂) e ácido aminometilfosfônico (AMPA) pela GLY oxidoreductase (GOX) via metabolismo oxidativo (RIBEIRO *et al.*, 2015). O AMPA é o principal metabólito, produzido na degradação do GLY sendo a sarcosina um metabólito intermediário na rota alternativa (DICK; QUINN, 1995).

Em mamíferos, o GLY não é metabolizado de forma eficiente, sendo praticamente eliminado de forma inalterada através da urina (MYERS *et al.*, 2016), embora pequenas porções de AMPA tem sido quantificadas em amostras de sangue após envenenamento com GLY (MOTOJYUKU *et al.*, 2008).

Este trabalho estudou o efeito citotóxico do Round-up® e do GLY em linhagens de gliomas. Pretendeu-se verificar a influência desses químicos no comportamento celular de

linhagens de Gliomas Humano e de rato, com o objetivo de encontrar efeito antitumoral em tratamentos realizados, além de estimar taxas de duplicação da população e indução de senescência celular.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Manutenção e cultura celular: Neste estudo foram utilizadas as linhagens de GBM de ratos C6 e de GBM humano A-172, gentilmente doadas pelo Dr. Guido Lenz, professor do departamento de Biofísica da UFRGS, obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC). Estas linhagens foram mantidas a 37 °C/5 % de CO₂ em atmosfera umidificada, em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB) (A172) ou 5 % SFB (C6), NaHCO₃ 3,7 g/L, agente tamponante de ácido sulfônico (HEPES) 2 g/L, Penicilina/Estreptomicina 1 % e Anfotericina 0,1 %. Quando as células atingiram a confluência, $\frac{3}{4}$ delas foram trispinizadas e centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em meio contendo dimetilsulfóxido (DMSO) 5 % e soro fetal bovino. Após este procedimento, as células foram imediatamente congeladas em freezer a -80 °C. Após 24 h, estas células foram estocadas em nitrogênio líquido. O $\frac{1}{4}$ restante foi recultivado para dar seguimento aos experimentos.

Tratamento agudo: Foi realizado o tratamento agudo das linhagens A-172 e C6 com Round-up®, obtido do mercado e GLY obtido da Sigma Chemical e solubilizadas em água Mili-Q. As linhagens foram tratadas com estes compostos por 24, 48 e 72 horas, nas seguintes doses: 0,0025 %, 0,005 % e 0,01 %. Após transcorrido o tempo previsto para o tratamento, foram realizados os ensaios de viabilidade celular e contagem celular.

Viabilidade Celular: As linhagens foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 10000 células/poço para a linhagem A-172 e 5000 células/poço para a linhagem C6. Após os tempos e os tratamentos indicados no item tratamento agudo, foi realizada a medida da viabilidade celular através do ensaio do MTT [*3-(4,5-diamethyl 2-thiazolyl) 2,5 diphenyl-2H-tetrazolium*] (MOSMANN, 1983). Após o tratamento, as células foram incubadas com MTT (Sigma) (5 mg/mL em DMEM) por 4 h em 37 °C/5 % de CO₂. A enzima desidrogenase das células metabolicamente ativas converte o substrato MTT em formazam, que produz um precipitado azul escuro. Após a remoção do meio, foi adicionado DMSO nos poços para extrair a coloração das células. A densidade óptica desta solução foi lida em um leitor de placas nos comprimentos de onda de 540 nm. Os dados foram referenciados como porcentagem do

controle.

Contagem celular: As linhagens foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 50000 células/poço para a linhagem A-172 e 25000 células poço para a linhagem C6. Após os tempos e tratamentos indicados no item tratamento agudo, foi realizada a contagem do número de células em câmara de Neubauer. Os dados foram referenciados como porcentagem do controle.

Acompanhamento do crescimento celular: A linhagem A-172 foi cultivada em baixa densidade em garrafas de cultivo e seu crescimento foi acompanhado pelo sistema *Cytosmart*®, que consiste num microscópio invertido acondicionado na incubadora e programado para fotografar as células a cada 15 min. O crescimento das células foi acompanhado por 5 dias, e quando as células cobriram 70 % da garrafa, foi realizado o tratamento com Round-up® 0,01 % por 24 h. Após a retirada do tratamento, seguiu-se a observação das células até 90 % de cobertura.

Tratamento crônico: O tratamento crônico foi aplicado na linhagem A-172, que foi plaqueada em uma densidade de 15000 células/poço em placa de 12 poços e tratadas nas seguintes doses: Round-up® e GLY 0,0025 %, 0,005 % e 0,01 % durante 5 dias. Após este período, as células foram tripsinizadas, contadas e replaqueadas em uma densidade de 10000 células por poço. Essas células foram mantidas em meio de cultivo sem tratamento por mais 23 dias e contadas e replaqueadas sempre que atingiam 80 % de confluência. Para estimar a taxa de duplicação da população (*PD-population doubling*) foi utilizada a seguinte fórmula: $PD = \frac{\log N(t) \log(N(t_0))}{\log 2}$, onde $N(t)$ é o número de células por poço na hora da passagem, $N(t_0)$ é o número das células plaqueadas na passagem inicial (ZAMIN *et al.*, 2009). A soma do PD foi plotada em um gráfico contra o tempo, num total de 28 dias.

Ensaio clonogênico: A linhagem A-172, após 5 dias de tratamento (Round-up® 0,0025 %, 0,005 % e 0,01 %), foi replaqueada em placa de 6 poços, numa densidade de 300 células/poço para formação de colônias. O crescimento das colônias foi observado durante 15 dias, sem tratamentos. Após esse período as células foram fixadas com metanol e em seguida coradas com cristal violeta (0,1 %) (FRANKEN *et al.*, 2006). As colônias foram contadas e o número de colônias do controle foi considerado 100 %.

Senescência Celular: A linhagem A-172 foi plaqueada em placa de 6 poços, numa densidade de 20000 células/poço e tratadas nas seguintes doses: Round-up® e GLY 0,0025 %, 0,005 % e 0,01 % durante 5 dias. Após este período as células foram lavadas com Tampão Fosfato Salino (PBS) e reincubadas por mais 7 dias. Após, as células foram lavadas em PBS,

fixadas em formaldeído 3 % por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas e incubadas com o marcador para a atividade da X-Gal (Sigma), contendo 1 mg/mL 5-bromo-4chloro-3-indolyl β -D-galactoside, 40 mM ácido cítrico/fosfato de sódio, pH 6,0, 5 mM de ferrocianeto de potássio, 5 mM ferricianeto de potássio, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl por 12-16 h em 37 °C (ZAMIN *et al.*, 2009). Após este período, as células foram fotografadas em microscópio ótico. Os resultados foram apresentados pela razão das células X-Gal positivas/total de células.

Análise estatística: Foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes, em triplicata, para cada protocolo. Após a obtenção dos dados, estes foram analisados em um programa de Estatística (Bioestat) e submetidos aos testes de Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando apresentaram um $p > 0,05$. Os gráficos foram apresentados a seguir com a média e o Erro Padrão (EP).

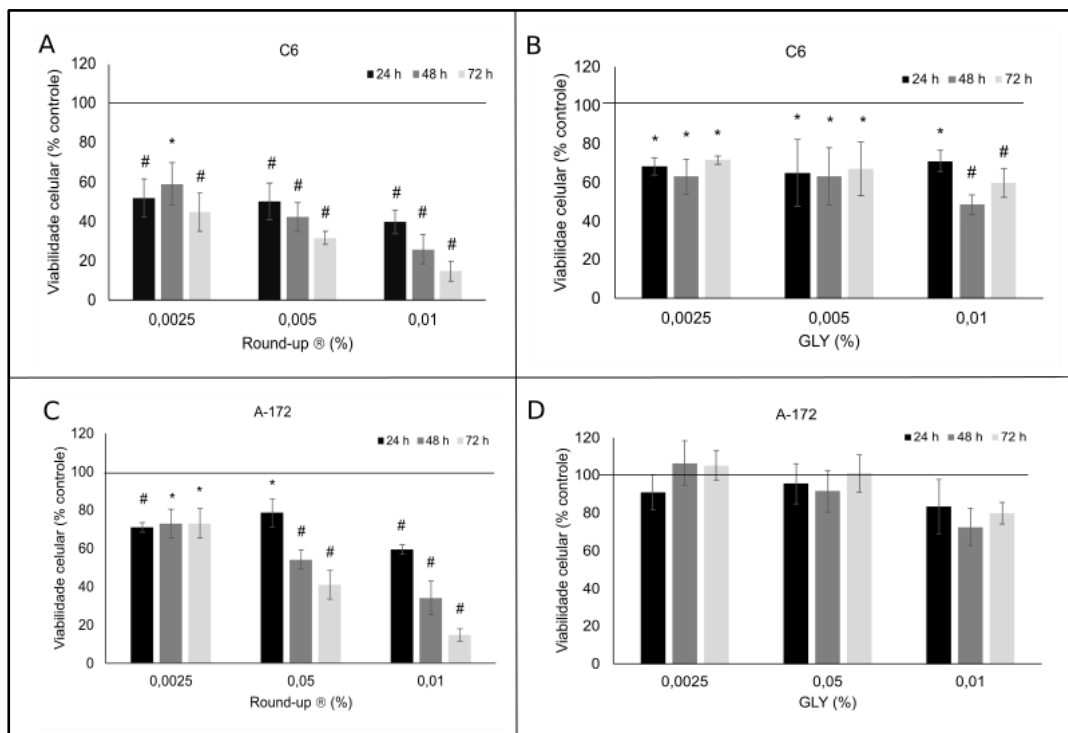
3 RESULTADOS

3.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS C6 E A-172 TRATADAS COM ROUND-UP® E GLY

Para verificar se o Round-up® e o GLY induziam citotoxicidade, foi avaliada a viabilidade celular nas linhagens C6 e A-172 tratadas com estes compostos (Figura 1). Os resultados obtidos demonstram uma diminuição da viabilidade celular em todos os tratamentos e em todos os tempos em relação ao grupo controle, com exceção da linhagem A-172 tratada com GLY, que apenas reduziu a viabilidade na dose de 0,01 %, porém de maneira não significativa.

Destaca-se para a maior toxicidade dos tratamentos realizados com Round-up® em todos os tempos e em ambas as linhagens (Figura 1A e 1C) em relação ao tratamento com GLY (Figuras 1B e 1D). Conforme a Figura 1C, em 72 h de tratamento com Round-up® 0,01 % a viabilidade celular foi reduzida significativamente para 14,96 % ao passo que o mesmo tempo e dose de GLY reduziu de forma não significativa a viabilidade para 79,83 % (Figura 1D).

Figura 1- Teste de Viabilidade celular com as linhagens C6 e A-172. As células foram tratadas com as doses indicadas: 0,0025 %, 0,005 % e 0,01 % de Round-up® e de GLY, por 24 h, 48 h e 72 h seguidas pelo método MTT. Em 1A está representado o gráfico com o resultado para a linhagem C6 tratada com Round-up®; Em 1B está representado o gráfico com o resultado para a linhagem C6 com o Tratamento de GLY; Em 1C está representado o gráfico com o resultado para a linhagem A-172 com o Tratamento de Round-up®; Em 1D está representado o gráfico com o resultado para a linhagem A-172 com o Tratamento de GLY. As barras representam média \pm EP. A linha representa o grupo controle, considerado 100 %. * $p < 0,05$ e # $p < 0,01$, em relação ao controle.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

3.2 OBSERVAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS DAS LINHAGENS C6 E A-172 APÓS O TRATAMENTO COM ROUND-UP® E GLY

Para analisar se os tratamentos realizados com Round-up® e o GLY diminuíam o número de células em linhagens de GBM humano e de rato, foi utilizado o método de contagem.

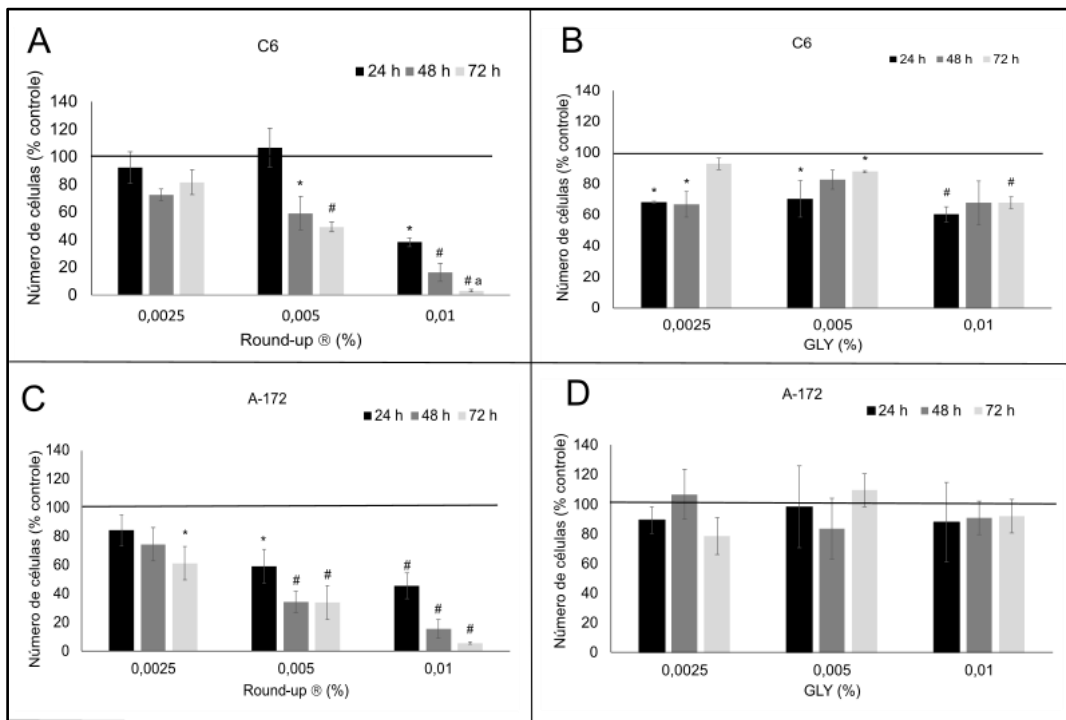
Os resultados para os tratamentos com Round-up® na linhagem C6 apresentaram uma diminuição significativa no número de células para a concentração 0,01 % em relação ao controle nos tempos de 24, 48 e 72 h (Figura 2A). Na concentração de 0,005 % foi significativo somente para os tempos de 48 e 72 h. Para as demais concentrações e tempos os resultados não

foram significativos. Destaca-se que a concentração 0,01 % no tempo de 72 h teve maior efeito em relação aos demais (Figura 2A).

Já os tratamentos realizados na linhagem C6 com GLY em relação ao grupo controle, tiveram diminuição significativa do número de células em todas as concentrações no tempo de 24 h, em 48 h somente para a concentração de 0,0025 % e no tempo de 72 h, nas concentrações de 0,005 e 0,01 % (Figura 2B).

Para a linhagem A-172 tratada com Round-up®, somente não houve redução significativa nos tratamentos realizados no tempo de 24 h e 48 h com a concentração de 0,0025 % (Figura 2C). Enquanto os tratamentos realizados com GLY não tiveram nenhuma redução significativa no número de células (Figura 2D), resultado similar ao observado para o teste de MTT (Figura 1D).

Figura 2- Avaliação do número de células das linhagens C6 e A-172 através do Método de Contagem. As células foram tratadas com Round-up® e GLY nas doses de 0,0025 %, 0,005 % e 0,01 % por 24 h, 48 h e 72 h. Em 2A está representado o gráfico com o resultado para a linhagem C6 tratada com Round-up®; Em 2B está representado o gráfico com o resultado para a linhagem C6 tratada com GLY; Em 2C está representado o gráfico com o resultado para a linhagem A-172 tratada com Round-up®; Em 2D está representado o gráfico com o resultado para a linhagem A-172 tratada com GLY. As barras representam média \pm EP. A linha representa o grupo controle, considerado 100 %. * $p < 0,05$ e # $p < 0,01$, em relação ao controle. a $p < 0,01$ em relação aos demais tratamentos no tempo de 72 h.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

3.3 ACOMPANHAMENTO DO CRESCIMENTO DA LINHAGEM A-172 APÓS TRATAMENTO COM ROUND-UP®

A fim de acompanhar o crescimento da linhagem celular A-172 após o tratamento com Round-up® por um período de 24 h, utilizou-se a técnica de vídeo por meio do sistema *Cytosmart*®.

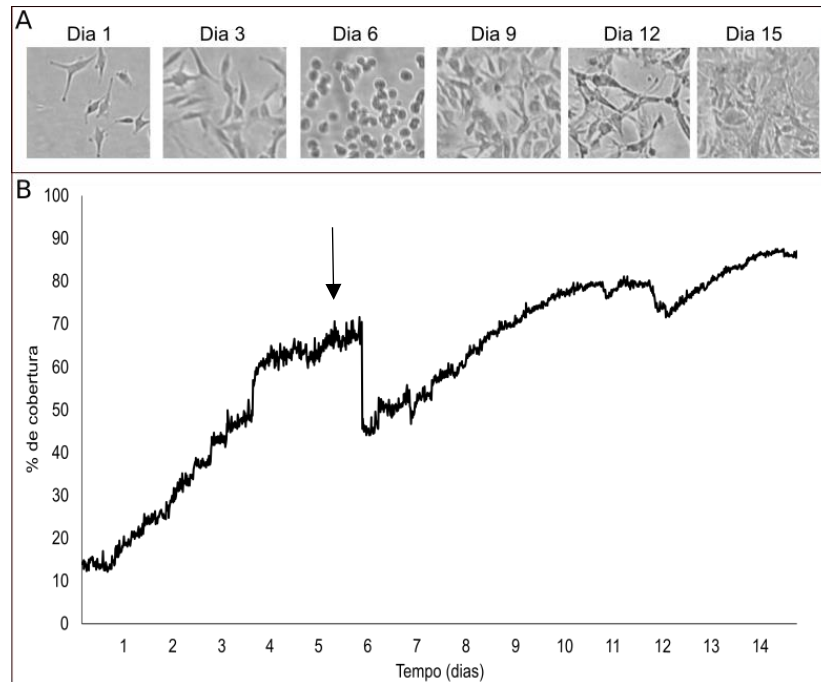
Na Figura 3A, estão representadas as imagens referentes aos 15 dias do experimento.

As primeiras imagens (Dia 1 e Dia 3), representam o crescimento inicial das células até a placa atingir cobertura de 70 %. No dia 6, observamos as células 24 h após o tratamento com Round-up® 0,01 %, onde podemos verificar uma alteração na morfologia celular. É possível ainda observar neste momento (Dia 6) uma queda na linha do gráfico (Figura 3B) referente à morte celular induzida pelo tratamento (representado pela seta↓).

Na sequência observa-se uma elevação na linha do gráfico, indicando o retorno do crescimento celular. Este crescimento pode ser observado nas imagens dos Dias 9, 12 e 15 quando a placa atinge cobertura final de 90 % (Figura 3A).

Ainda na Figura 3A, a imagem do Dia 12 aparentemente representa um menor número de células se comparadas com a imagem do Dia 9. Isso ocorre devido a todas as imagens representarem a mesma localização da garrafa, desconsiderando as migrações das células, enquanto o gráfico considera o valor de cobertura total.

Figura 3- Crescimento celular observado da linhagem A-172 tratada por 24 h com Round-up® 0,01 %, por meio de vídeo (sistema *Cytosmart*®). Em (A) estão demonstradas as imagens correspondentes a cada três dias do experimento, num total de 15 dias. Em (B) o gráfico de linha demonstra a taxa de cobertura (%) da placa pelas células, antes e depois do tratamento do experimento. A seta (↓) indica o momento do tratamento.



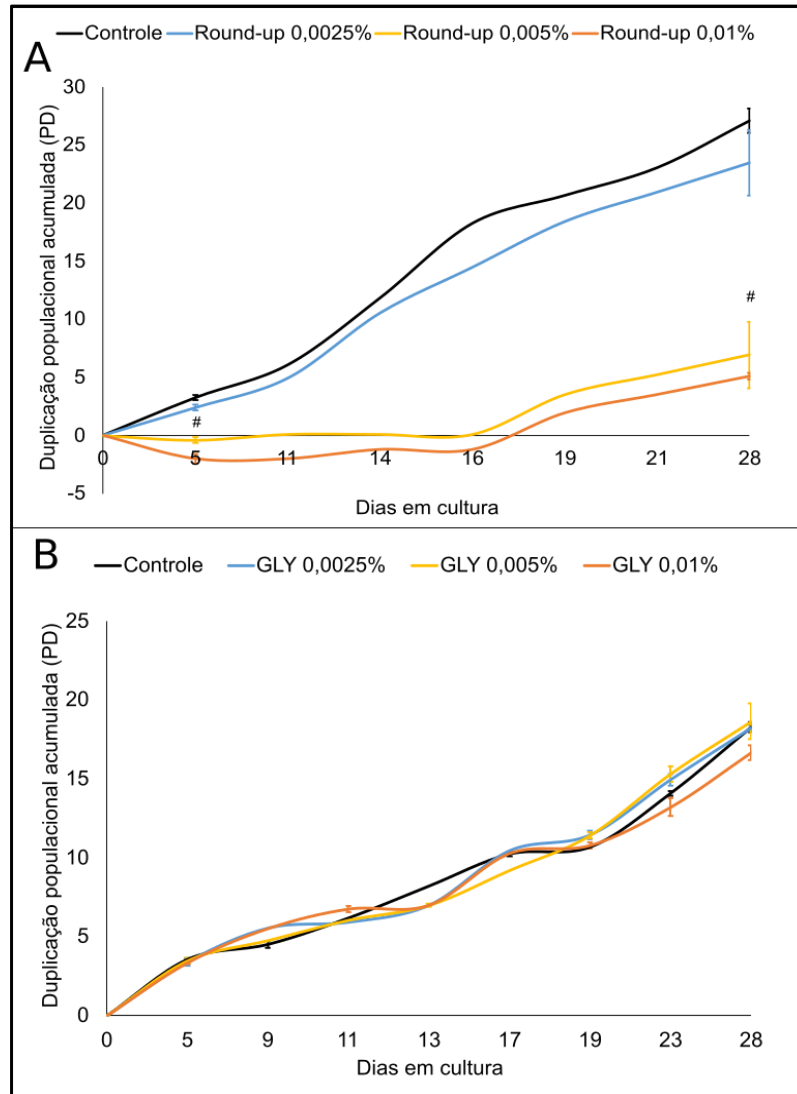
Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

3.4 VERIFICAÇÃO DA TAXA DE CRESCIMENTO DA LINHAGEM A-172 APÓS O TRATAMENTO REALIZADO COM ROUND-UP® E GLY

Para estimar a taxa de duplicação celular da população após o tratamento realizado com Round-up® e GLY em linhagens de GBM humano, foi utilizado o método de acompanhamento da duplicação populacional (PD – *population doubling*). Nessa técnica, as células da linhagem A-172 foram submetidas ao ciclo de tratamento similar ao utilizado na clínica, que corresponde a 5 dias de tratamento com 23 dias de intervalo para recuperação do paciente (STUPP *et al.*, 2010).

A Figura 4A, representa os tratamentos com Round-up®, no qual as células apresentam diminuição significativa na taxa de duplicação e crescimento, nas concentrações de 0,005 % e 0,01 % em relação ao Controle. Os tratamentos com GLY (Figura 4B) não tiveram resultado significativo quanto a taxa de crescimento.

Figura 4- Verificação do ciclo de tratamento com a linhagem A-172, tratada com Round-up® (4A) e GLY (4B), nas concentrações de 0,0025 %, 0,005 % e 0,01 %, por 5 dias e cultivadas por mais 23 dias - Método (PD – *population doubling*). As células foram contadas em câmara de Neubauer nos dias indicados. Os resultados representam a média \pm EP. ANOVA seguida de *Tukey*. # $p < 0,01$.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

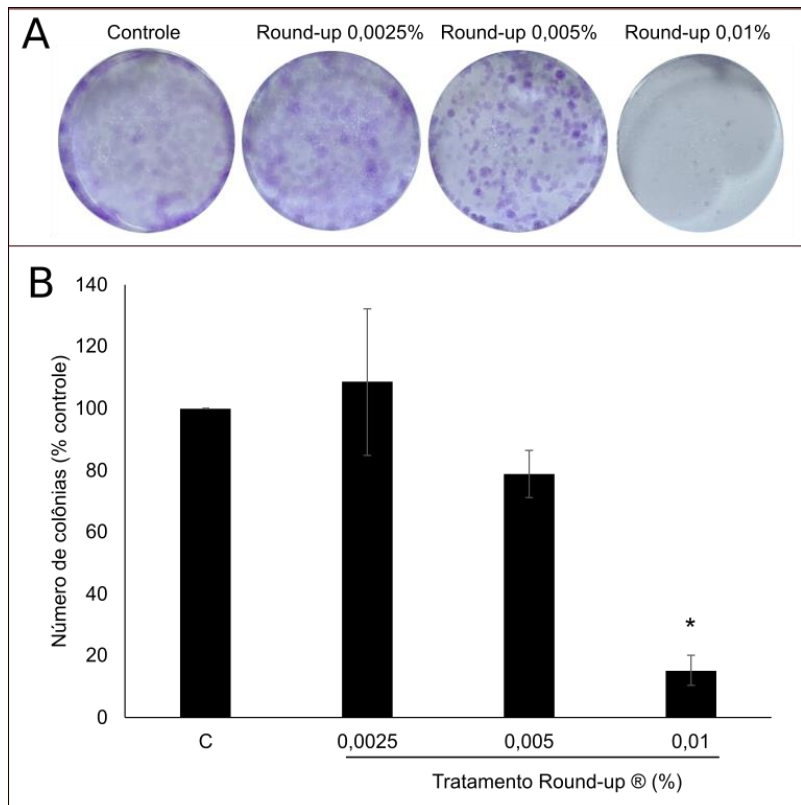
3.5 OBSERVAÇÃO DO NÚMERO DE COLÔNIAS DA LINHAGEM A-172 APÓS O TRATAMENTO COM ROUND-UP®

Neste ensaio, as células da linhagem de GBM A-172 foram submetidas ao tratamento com Round-up® nas doses de 0,0025 %, 0,005 % e 0,01 %, para analisar a formação de colônias, como mostra a Figura 5.

Na Figura 5B, verifica-se que somente os tratamentos realizados na concentração de 0,01 %, diminuíram a formação de colônias significativamente em relação ao controle. Na concentração de 0,005 %, a diminuição também ocorreu, embora de maneira não

estatisticamente significativa. Essa diminuição no número de colônias está representada na Figura 5A, onde a concentração de 0,01 % se destaca sobre as demais.

Figura 5- Observação da formação de colônias na linhagem A-172 após o tratamento com Round-up® nas doses de 0,0025 %, 0,005 % e 0,01 % por 5 dias. (A) Imagens representativas das colônias coradas com cristal violeta com seus respectivos tratamentos, fotografadas com câmera digital. (B) Gráfico de barras com os respectivos números de colônias após cada tratamento realizado (média \pm EP). ANOVA seguida de *Tukey*. * $p < 0,05$.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

3.6 INVESTIGAÇÃO DA INDUÇÃO DE SENESCÊNCIA POR GLY E ROUND-UP® NA LINHAGEM A-172

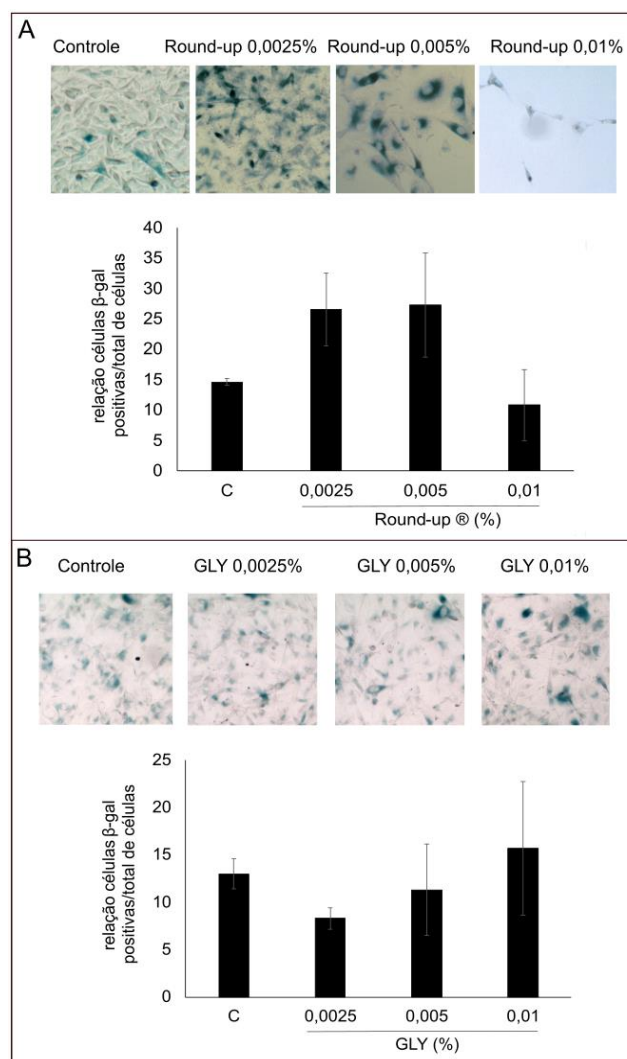
Para avaliar os efeitos do Round-up® e GLY sobre a indução de senescência celular em linhagens de GBM humano, foi mensurada a produção da X-Gal ácida, um marcador bioquímico para acidificação de lisossomos (DIMRI *et al.*, 1995) e indicativo de senescência.

No gráfico de barras (Figura 6A) o ensaio de SA-X-Gal mostrou um leve aumento na senescência em relação ao Controle para as doses de 0,0025 e 0,005 % embora não significativo. Na parte superior da Figura 6A, estão alinhadas as imagens, onde verifica-se que no tratamento de 0,01 % sobraram poucas células para fotografar, sendo que as mesmas apresentam morfologia alterada, mostrando-se com aspecto estrelado e com o tamanho aumentado,

indicativo de indução de senescência celular (FILIPPI-CHIELA *et al.*, 2013). Essas mesmas alterações podem ser observadas para o tratamento de 0,005 %.

O gráfico da Figura 6B representa os tratamentos realizados com GLY, sendo que apenas a concentração de 0,0025 % apresenta uma leve diminuição na indução de senescência, em relação ao grupo controle, não sendo significativo junto com os demais tratamentos. Na parte superior da Figura 6B, as imagens representadas dos tratamentos apresentam semelhança com a imagem do grupo controle.

Figura 6- Senescência celular observada em células de GBMs da linhagem A-172 tratadas por 5 dias com Round-up® e GLY nas doses de 0,0025 %, 0,005 % e 0,01 %. (A) A parte superior demonstra imagens representativas observadas a luz visível (A: 100 X) marcadas para β -gal, tratadas com Round-up®, seguida do gráfico de barras com a média \pm EP da proporção de células positivas para SA-X-Gal para o total de células. Em (B) demonstra-se as imagens representativas observadas a luz visível (A: 100 X) marcadas para X-Gal em células tratadas com GLY, seguida do gráfico de barras com a média \pm EP da proporção de células positivas para SA-X-Gal para o total de células. ANOVA seguida de *Tukey*.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstramos pela primeira vez que o Round-up® e o GLY apresentaram efeitos citotóxicos em linhagens de GBM, diminuindo a viabilidade celular, o número de células, a formação de colônias e a duplicação populacional. Os resultados também apontaram que estes efeitos foram mais pronunciados ao realizar o tratamento com Round-up® do que com o GLY.

Agostini *et al.*, (2019) sugerem que o GLY pode induzir o crescimento em células ER α + (Receptor de Estrogênio alfa positivo) como é o caso de células tumorais de mama. Já o Round-up® afeta a sobrevivência das células causando alterações metabólicas, falta de oxigênio mitocondrial, interferência nas reparações do DNA, hipóxia, mutações e morte celular. Round-up® é um herbicida a base de GLY, e quando misturado com surfactantes tem seu potencial de absorção e citotoxicidade ampliado (STUR *et al.*, 2019).

Os adjuvantes utilizados na produção de Round-up®, facilitam a absorção de GLY em células através da membrana plasmática, aumentando a eficiência, a estabilidade e a bioacumulação, demonstrando que o Round-up® é mais eficiente que seu princípio ativo, sugerindo um efeito sinérgico (BENACHOUR *et al.*, 2007; GASNIER *et al.*, 2009; RICHARD *et al.*, 2005). Estes adjuvantes não são descritos no rótulo dos produtos comerciais a base de glifosato e podem ser os responsáveis pelo maior efeito citotóxico observado.

No estudo realizado por Stur *et al.*, (2019), o GLY induziu a proliferação celular de linhagens de câncer de mama ER +, enquanto que o Round-up® levou as células a morte devido ao efeito tóxico que causou. Neste trabalho as linhagens MCF-7 e MDA-MB-468 foram tratadas com AMPA e Round-up®. A linhagem MDA-MB-468 (ER-) exibiu alterações quando expostas a ambos os tratamentos, enquanto células MCF-7 (ER+) exibiram alterações só com Round-up®. Várias vias relacionadas com a reparação de danos de DNA, excisão de bases e nucleotídeos, emparelhamentos incorretos, foram incluídos na análise, sendo que não foram alterados pelo tratamento com AMPA. Em comparação, o tratamento com Round-up® afetou todos eles, em especial a via de reparação de excisão de bases, em que os genes afetados foram todos regulados negativamente. O Round-up® causou ainda altos níveis de morte celular em ambas as linhagens celulares em todos os tempos analisados, se mostrando mais tóxico que o AMPA (STUR *et al.*, 2019).

Também na linhagem MCF-7 de câncer de mama, Mesnage *et al.*, (2017) demonstraram que GLY induziu a proliferação de células dependentes de estrogênio e Round-up® apresentou um efeito mais tóxico.

Os herbicidas a base de glifosato (*Glyphosate based herbicide* – GBH) têm sido identificados como mimetizantes do efeito estrogênico, o que pode aumentar o risco para câncer de mama devido ao desbalanço hormonal; além disso, alguns pesticidas têm causado tumor de mama em animais (ANDERSEN *et al.*, 2002; MNIF *et al.*, 2011; RUDEL *et al.*, 2007).

Estudos realizado por Li *et al.*, (2013), com várias linhagens de células cancerosas, observou que o GLY e o AMPA inibiram o crescimento celular em oito das dez linhagens testadas em concentrações de até 50 mM. Estas linhagens, incluindo quatro de câncer de próstata (C4-2B, LNCaP, DU-145 e PC-3), duas de câncer de ovário (SKOV-3 e OVCAR-3), uma (HeLa) de câncer cervical e uma de câncer de pulmão (A549). Além disso, a exposição ao GLY em uma concentração de 50 mM reduziu a viabilidade celular em LNCaP (27 %), CA-2B (73 %), DU-145 (39 %), Células PC-3 (37 %), SKOV-3 (28 %), OVCAR-3 (59 %), HeLa (25 %) e A549 (17 %).

Esses resultados mostraram que os tratamentos inibiram a proliferação das células, mas não as imortalizava, o que sugere que as células de câncer altamente proliferativas são mais sensíveis a estas drogas do que as de crescimento mais lento (LI *et al.*, 2013).

Em linhagem celular placentária humana derivada de coriocarcinoma (JEG3) os testes realizados com Round-up® observaram que os GBHs reduzem a viabilidade celular pelo menos duas vezes mais que o GLY sozinho e este efeito aumentou com o tempo (RICHARD *et al.*, 2005).

Benachour *et al.*, (2007) avaliaram os efeitos de Round-up® e GLY em linhagem celular de placenta JEG3-coriocarcinoma humano e linhagem de rim embrionário humano HEK293, mostrando que o Round-up® é mais tóxico para células HEK293 do que o GLY. Além disso se fez mais eficiente em todos os casos, o que sugere um efeito adicional provocado pelos adjuvantes, que permitem a penetração na célula e a estabilização do produto. O efeito de Round-up® aumentou com o tempo, já o GLY se torna tóxico apenas após o tempo de 48 horas nas células mais sensíveis de HEK293.

Na linhagem HepG2 humana foi relatado um aumento na mortalidade de maneira tempo dependente devido à exposição a GBH (Express ® 7,2 g / L; Bioforce ® 360 g / L; GT ® 400 g / L; e GT + ® 450 g / L). Quando tratadas com GLY puro, o resultado não demonstrou ação tóxica. Isso é possível devido à inexistência dos adjuvantes ou substâncias semelhantes a detergentes que permitem penetração e estabilidade, amplificando a ação do GLY (GASNIER *et al.*, 2010).

Em linhagens (HepG2, A549 e SH-SY5Y) de neuroblastoma humano a citotoxicidade causada por GBHs (Round-up®), foi significativa, reduzindo a viabilidade de HepG2 e A549

e apresentando uma toxicidade considerável nas células SH-SY5Y, de forma dose-dependente. No entanto, neste estudo, o ingrediente ativo sozinho (GLY) não teve toxicidade significativa nas células (HAO *et al.*, 2019).

Ainda na linhagem celular HepG2 Chaufan *et al.*, (2014) observaram que a exposição a GLY e AMPA não afetou a viabilidade celular até 1000 mg/L, enquanto o tratamento com GBHs induziu uma rápida diminuição da viabilidade celular dependendo da concentração e do tempo de exposição. Essa formulação a base de GLY teve efeitos tóxicos desencadeando a ativação de caspase 3/7 induzindo a via de apoptose nesta linhagem celular. Estes resultados confirmam que as formulações de GLY têm adjuvantes que atuam em conjunto com ingredientes ativos e causando efeitos tóxicos que não são vistos somente com o GLY.

Células cancerosas apresentam uma elevada procura por glicina, aminoácido não essencial. As células que se proliferam rapidamente utilizam glicina do meio externo, já as de proliferação lenta são autosuficientes (DE ALMEIDA *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2013). Reduzindo a produção de glicina, conseqüentemente tem-se um efeito tóxico sobre as células de proliferação rápida (STUR *et al.*, 2019). AMPA é um análogo da glicina que pode diminuir a síntese de glicina intracelular através da inibição de serina hidroximetiltransferase (SHMT), a enzima responsável por catalisar a conversão de glicina para serina e vice-versa (ANDERSON; STOVER, 2009; BALUZ *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2013).

Estes testes demonstraram que os análogos de glicina podem inibir a proliferação e promover apoptose em células cancerosas, em concentrações de até 50 mM sem atingir as células normais. Maiores concentrações de produtos químicos podem afetar as células normais e produzir efeitos colaterais (ANDERSON; STOVER, 2009; BALUZ *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2013).

Em testes realizados com a linhagem de Glioma U87 tornada resistentes a herbicida e U87 normais foi utilizado o tratamento com os quimioterápicos cisplatina, 5-fluorouracil e Tmz, que induziram estresse oxidativo em células U87 normais, sendo menos citotóxicos para U87 resistentes. Desta forma, estas células foram se tornando resistentes a herbicidas pela aplicação repetida de uma mistura de baixa dose de clorpirifosetil, deltametrina, metirame e pesticidas de GLY e isto resultou na indução a resistência a agentes quimioterápicos. Foi observada a redução de apoptose nas células U87 resistentes em comparação com as células normais. A durabilidade desta resistência resulta em características de mutações ou alterações epigenéticas adquiridas (DOGANLAR *et al.*, 2020).

Devido aos efeitos citotóxicos causados pelo Round-up® e pelo GLY nas linhagens A-172 e C6, avaliou-se se estes compostos seriam capazes de induzir senescência nestas células.

Embora não haja estudos que relatem o efeito do GLY e do Round-up® na atividade da x-Gal, estudos demonstram que estes compostos podem alterar vias que podem desencadear a senescência (BARBOSA *et al.*, 2010; STUR *et al.*, 2019). A senescência descreve células metabolicamente ativas, sem capacidade proliferativa, devido a um estresse celular. A senescência pode ser induzida pelo encurtamento de telômeros, e por fatores extrínsecos que interferem na oncogênese, danos ao DNA e formação de radicais livres (SERRANO; BLASCO, 2001).

Neste trabalho, não foi encontrado efeito significativo na indução de senescência pelos tratamentos nos tempos e doses testados. No entanto, o tratamento com Round-up® aumentou a indução de senescência nas doses de 0,0025 e 0,005 %, embora de forma não estatisticamente significativa. Podemos também observar nas imagens da Figura 6A, as alterações morfológicas típicas deste processo, como aumento do tamanho celular (DIMRI *et al.*, 1995).

Já estas doses para o GLY levaram a uma menor incidência de senescência (não significativa). Este efeito aparentemente controverso, reforça o duplo papel da senescência na tumorigênese pois as mesmas células senescentes que evitam a proliferação de células passíveis de mutação, suprimindo o desenvolvimento de câncer, são as mesmas que podem ser responsáveis pela reparação de tecidos e a tumorigênese (CAMPISI, 2013; OHTANI *et al.*, 2012).

Células em fase de senescência aumentam a expressão dos SAGs, que codificam citocinas, quimiocinas e fatores de remodelamento da matriz extracelular contribuindo para a tumorigênese (OHTANI *et al.*, 2012).

A alta expressão de SAGs está associada com piores prognósticos em pacientes com câncer, podendo expressar o dobro de sobrevida em pacientes com baixo escore de senescência (COPPOLA *et al.*, 2014).

Segundo Stoczynska-Fidelus *et al.*, (2014) Gliomas senescentes são positivos para o marcador de células tronco SOX2, indicando que essas células podem se renovar, sendo responsáveis na maioria das vezes pela reincidência tumoral.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho realizou diversos testes e demonstrou pela primeira vez os efeitos citotóxicos de GLY e Round-up® em linhagens de GBM, tanto para a linhagem humana A-172 como a de ratos C6. Foi possível verificar a diminuição da viabilidade celular, o número de

células, a formação de colônias e a duplicação populacional. Round-up® ainda apresentou um efeito mais pronunciado que os tratamentos realizados com GLY.

Na luta contra o câncer, buscou-se por evidências que contribuam para a diminuição dos mesmos. Na linhagem C6 destacamos que o Round-up® apresentou na maioria dos tempos e concentrações uma diminuição significativa no número de células em relação ao controle e ao tratamento com GLY. Já na linhagem A-172 somente o Round-up® apresentou resultados significativos para a diminuição de células. O mesmo ocorreu em relação a viabilidade celular onde somente o tratamento realizado com GLY para a linhagem A-172 não teve resultados significativos.

Ao acompanhar o crescimento da linhagem A-172 podemos evidenciar que o tratamento com Round-up® confere a morte celular bruscamente, mas possivelmente devido ao tempo de tratamento ser somente 24 h, tem-se o retorno do crescimento celular. No teste a longo prazo o tratamento de Round-up® também se destaca em relação ao GLY.

No tratamento de senescência, Round-up® novamente apresenta mais evidências e características de células senescentes, embora a senescência pareça “uma faca de dois gumes”, ela representa uma via de defesa do organismo em relação à supressão de tumores.

SUPORTE FINANCEIRO: As autoras agradecem a FAPERGS (Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a UFFS (Universidade Federal da Fronteira Sul) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI, L. P.; DETTOGNI, R. S.; DOS REIS, R. S.; STUR, E.; DOS SANTOS, E. V. W.; VENTORIM, D. P.; GARCIA, F. M.; CARDOSO, R. C.; GRACELI, J. B.; LOURO, I. D. Effects of glyphosate exposure on human health: Insights from epidemiological and in vitro studies. **Science of The Total Environment**, v. 705, n. 135808, 26 nov. 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135808. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31972943/>. Acesso em: 21 maio 2021.

ANDERSEN, H. R.; VINGGAARD, A. M.; RASMUSSEN, T. H.; GJERMANDSEN, I. M.; BONEFELD-JORGENSEN, E. C. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 179, n.1, p.1-12, 15 fev. 2002. DOI: 10.1006/taap.2001.9347. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041008X01993470?via%3Dihub>. Acesso em: 21 maio 2021.

ANDERSON, D. D.; STOVER, P. J. SHMT1 and SHMT2 Are Functionally Redundant in Nuclear De novo Thymidylate Biosynthesis. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5839, 9 jun. 2009. DOI:

10.1371/journal.pone.0005839. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19513116/>. Acesso em: 21 maio 2021.

BALUZ, K., DO CARMO, M. 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. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/rbc/n_48/v04/pdf/revisao5.pdf. Acesso em: 14 maio 2021.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENA, R. C. G.; DE PAULA, S. O. MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, jul./ago. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000400013. Acesso em: 20 maio 2021.

BENACHOUR, N.; SIPAHUTAR, H.; MOSLEMI, S.; GASNIER, C.; TRAVERT, C.; SÉRALINI, G. E. Time-and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. **Arch. Environ. Contam. Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 126-133, jul. 2007. DOI: 10.1007/S00244-006-0154-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17486286/>. Acesso em: 20 maio 2021.

CAMPISI, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. **Annual Review of Physiology**, v. 75, n. 1, p. 685-705, fev. 2013. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23140366/>. Acesso em: 20 maio 2021.

CHAUFAN, G.; COALOVA, I.; RÍOS DE MOLINA, M. D. C. Glyphosate Commercial Formulation Causes Cytotoxicity, Oxidative Effects, and Apoptosis on Human Cells: Differences with Its Active Ingredient. **International Journal of Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 29-38, 16 jan. 2014. DOI: 10.1177/1091581813517906. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1091581813517906>. Acesso em: 22 maio 2021.

COPPOLA, D.; BALDUCCI, L.; CHENE, D.-T., LOBODAK, A., NEBOZHYNH, M., STALLERF, A., FULPE, W. J., DALTONB, W., YEATMANB, T., BREMB, S. Senescence-associated-gene signature identifies genes linked to age, prognosis, and progression of human gliomas. **Journal of Geriatric. Oncology**, v. 5, n. 4, p. 389-399, out. 2014. DOI: 10.1016/j.jgo.2014.08.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25220188/>. Acesso em: 21 maio 2021.

DE ALMEIDA, L. K. S., PLETSCHKE, B. I., FROST, C. L. Moderate levels of glyphosate and its formulations vary in their cytotoxicity and genotoxicity in a whole blood model and in human cell lines with different estrogen receptor status. **3 Biotech**, v. 8, n. 438, p. 1-15, 4 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1464-z> PMID: 30306007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-018-1464-z#citeas>. Acesso em: 21 maio 2021.

DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, n. 3 p. 545-550, 24 out. 1995. DOI: 10.1007/bf00218464. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00218464>. Acesso em: 21 maio 2021.

DIMRI, G. P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M.; SCOTT, G.; ROSKELLEY, C.; MEDRANO, E. E.; LINSKENS, M.; RUBELI, I.; PEREIRA-SMITH, O.; PEACOCKE, M.; CAMPISI, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 20, p. 9363–9367, 26 set. 1995. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9363. Disponível em: <https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC40985&blobtype=pdf> Acesso em: 21 maio 2021.

DOGANLAR, O.; DOGANLAR, Z. B.; KURTDERE, A. K.; CHASAN, T.; OK, E. S. Chronic exposure of human glioblastoma tumors to low concentrations of a pesticide mixture induced multidrug resistance against chemotherapy agents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 202, n. 110940, p. 1-14, 23 jun. 2020. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110940. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014765132030779X>. Acesso em: 22 maio 2021.

FARRELL, C. J.; PLOTKIN, S. R. Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, von Hippel-Lindau, and Other Syndromes. **Neurologic Clinics**, v. 25, n.4, p. 925-946, nov. 2007. DOI: 10.1016/j.ncl.2007.07.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17964021/>. Acesso em: 22 maio 2021.

FILIPPI-CHIELA, E. C.; THOMÉ, M. C.; SILVA, M. M. B.; PELEGRINI, A. L.; LEDUR, P. F.; GARICOCHEA, B.; ZAMIN, L. L.; LENZ, G. Resveratrol abrogates the Temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the Temozolomide-induced senescence in glioma cells. **BMC Cancer**, v. 13, p.147-160, 22 mar. 2013. DOI: 10.1186/1471-2407-13-147. Disponível em: <https://europepmc.org/article/PMC/3635906>. Acesso em: 22 maio 2021.

FRANKEN, N. A. P.; Rodermond, H. M.; Stap, J.; Haveman, J.; Van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2315-2319, 21 dez. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.339>. Acesso em 01 julho 2021.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M. C.; SÉRALINI, G. E.; Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 3, n. 262, p. 184-191, 21 ago. 2009. DOI: 10.1016/j.tox.2009.06.006 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19539684/>. Acesso em: 22 maio 2021.

GASNIER, C. N.; BENACHOUR, E.; CLAIR, C.; TRAVERT, F.; LANGLOIS, C.; LAURANT, C.; DECROIX - LAPORTE, SÉRALINI, G. E. Dig1 Protects against Cell Death Provoked by Glyphosate -Based Herbicides in Human Liver Cell Lines. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 5, n. 29, p. 1-13, 27 out. 2010. DOI: 10.1186/1745-6673-5-29. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20979644/>. Acesso em: 22 maio 2021.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n.1, p. 57-70, 7 jan. 2000. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2800%2981683-9>. Acesso em: 22 maio 2021.

HAO, Y.; CHEN, H.; XU, W.; GAO, J.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; TAO, L. Round-up® confers cytotoxicity through DNA damage and Mitochondria-Associated apoptosis induction. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 917-923, set. 2019. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.05.128. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749119312291?via%3Dihub>. Acesso em: 22 maio 2021.

JALALI, R.; MUNSHI, A. Therapy for glioma: Indian perspective. **Indian Journal of Cancer**, v. 46 n. 2, p. 127-131, abr - jun 2009. DOI: 10.4103/0019-509x.49150. Disponível em: <https://www.indianjcancer.com/article.asp?issn=0019-509X;year=2009;volume=46;issue=2;spage=127;epage=131;aulast=Munshi>. Acesso em: 22 maio 2021.

KELES, G. E.; LAMBORN, K. R.; CHANG, S. M.; PRADOS, M. D.; BERGER, M. S. Volume of residual disease as a predictor of outcome in adult patients with recurrent supratentorial glioblastomas multiforme who are undergoing chemotherapy. **Journal of Neurosurgery**, v. 100, n. 1, p. 41-46, jan. 2004. DOI: 10.3171/jns.2004.100.1.0041. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14743910/>. Acesso em: 22 maio 2021.

LI, Q.; YOU, Z.; LAMBRECHTS, M. J.; ZHANG, Q.; LIU, S.; GE, D.; YIN, R.; XI, M. Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, p. 635-643, 23 jul. 2013. DOI: 10.2147/dddt.s49197. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23983455/>. Acesso em: 22 maio 2021.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97-109, ago. 2007. DOI: 10.1007/s00401-007-0243-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17618441/>. Acesso em: 22 maio 2021.

MESNAGE, R.; PHEDONOS, A.; BISERNI, M.; ARNO, M.; BALU, S.; CORTON, C.; UGARTE, R.; ANTONIOU, M. N.; Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 30-42, out. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.025>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691517303976>. Acesso em: 22 maio 2021.

MNIF, W.; HASSINE, A. I. H.; BOUAZIZ, A.; BARTEGI, A.; THOMAS, O.; ROIG, B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. **Int J Environ Res Public Health**, v. 8, n. 6, p. 2265–2303, 20 maio 2011. DOI: 10.3390/ijerph8062265. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/8/6/2265>. Acesso em: 22 maio 2021.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol Methods**, v. 65(1-2), p. 55-63, dez. 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4). Disponível em: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays - ScienceDirect. Acesso em: 01 julho 2021.

MOTOJYUKU, M.; SAITO, T.; AKIEDA, K.; OTSUKA, H.; YAMAMOTO, I.; INOKUCHI, S. Determination of glyphosate, glyphosate metabolites, and glufosinate in human serum by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 875, n. 2, p. 509-514, 15 nov. 2008. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.10.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1570023208007447?via%3Dihub>. Acesso em: 22 maio 2021.

MYERS, J. P.; ANTONIOU, M. N.; BLUMBERG, B.; CARROLL, L.; COLBORN, T.; EVERETT, L. G.; HANSEN, M.; LANDRIGAN, P. J.; LANPHEAR, B. P.; MESNAGE, R.; VANDENBERG, L. N.; VOM SAAL, F. S.; WELSHONS, W. V.; BENBROOK, C. M. Concerns over Use of Glyphosate - Based Herbicides and Risks Associated with Exposures: A Consensus Statement. **Environmental Health**, v. 15, n. 19, p. 1-13, 17 fev. 2016. DOI: 10.1186/s12940-016-0117-0. Disponível em: <https://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12940-016-0117-0>. Acesso em: 22 maio 2021.

NDUBAKU, U.; DE BELLARD, M. E. Glial cells: Old cells with new twists. **Acta Histochemica**, v. 110, n. 3, p. 182-195, 18 dez. 2008. DOI: 10.1016/j.acthis.2007.10.003 Disponível em: <http://europepmc.org/article/PMC/2365468>. Acesso em: 22 maio 2021.

OHTANI, N. A.; TAKAHASHI, D. J. MANN, D. J.; HARA, E. Cellular senescence: a double-edged sword in the fight against cancer. **Experimental Dermatology**, v. 21, p. 1-4, 24 maio 2012. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2012.01493.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0625.2012.01493.x>. Acesso em: 22 maio 2021.

OSTROM, Q. T.; NBAUCHET, L.; DAVIS, F. G.; DELTOUR, L.; FISCHER, J. L.; LANGER, C. E.; PEKMEZCI, M.; SCHWARTZBAUM, J. A.; TURNER, M. C.; WALSH, K. M.; WRENSCH, M. R.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. The epidemiology of glioma in adults: A “state of the science” review. **Neuro Oncol**, v.16, p. 896- 913, jul. 2014. DOI: 10.1093/neuonc/nou087. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24842956/>. Acesso em: 22 maio 2021.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. **Cancer Cell**, v. 31, n. 3, p. 326-341, 13 mar. 2017. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.02.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28292436/>. Acesso em: 22 maio 2021.

RIBEIRO, D. N.; NANDULA, V. K.; DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O.; REDDY, K. N.; SHAW, D. R. Possible Glyphosate Tolerance Mechanism in Pitted Morningglory (Ipomoea Lacunosa L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1689-1697, 27 jan. 2015. DOI: 10.1021/jf5055722. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25625294/>. Acesso em: 22 maio 2021.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G. E. Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 716-720, jun. 2005. DOI: 10.1289/ehp.7728. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.7728>. Acesso em: 22 maio 2021.

RUDEL, R. A.; ATTFIELD, K. R.; SCHIFANO, J. N.; BRODY, J. G. Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention. **Cancer Supplement**, v. 109, n. 12, p. 2635–2666, 14 maio 2007. DOI: 10.1002/cncr.22653 Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cncr.22653>. Acesso em: 22 maio 2021.

SERRANO, M.; BLASCO, M. A. Putting the stress on senescence. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 6, p. 748-753, 1 dez. 2001. DOI: 10.1016/s0955-0674(00)00278-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955067400002787>. Acesso em: 22 maio 2021.

STOCZYNSKA-FIDELUS, E., OCH. W., RIESKE, P., BIENKOWSKI. M., BANASZCZYK. M., WINIECKA-KLIMEK. M., ZIEBA. J., JANIK. K., ROSIAK. K., TREDA. C., STAWSKI. T., RADOMIAK-ZALUSKA. A., PIASKOWSKI. S., Spontaneous in vitro senescence of glioma cells confirmed by an antibody against IDH1R132H. **Anticancer Res.**, v. 34 n. 6 p. 2859-2867, jun. 2014. PMID: 24922649 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24922649/>. Acesso em: 22 maio 2021.

STUR, E.; ARISTIZABAL-PACHON, A. F.; PERONNI, K. C.; AGOSTINI, L. P.; WAIGEL, S.; CHARIKER, j.; MILLER, D. M.; THOMAS, S. D.; REZZOUG, F.; DETTOGNI, R. S.; dos REIS, R. S.; SILVA JUNIOR, W. A.; LOURO, I. D. Glyphosate - based herbicides at low doses affect canonical pathways in estrogen positive and negative breast cancer cell lines. **PLos One**, v. 14, n. 7, p. 1-13, 11 jul. 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0219610. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0219610>. Acesso em: 22 maio 2021.

STUPP, R.; MASON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M. J. B.; BELANGER, K.; BRANDES, A. A.; MAROSI, C.; BOGDAHN, U.; CURSCHMANN, J.; JANZER, R. C.; LUDWIN, S. K.; GORLIA, T.; ALLGEIER, A.; LACOMBE, D. CAIRNCROSS, G. J.; EISENHAEUER, E.; MIRIMANOFF, R. O. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n.10, p. 987-996, 10 mar. 2005. DOI: 10.1056/nejmoa043330. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa043330>. Acesso em: 22 maio 2021.

STUPP, R.; TONN, J. C.; BRADA, M.; PENTHEROUDAKIS, G. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 21, (s5), p. 190-193, maio 2010. DOI: 10.1093/annonc/mdq187. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20555079/>. Acesso em: 22 maio 2021.

THAKKAR, J. P., DOLECEK, T. A., HORBINSKI, C., OSTROM, Q. T., HORBINSKI. C.; OSTROM , Q. T.; LIGHTNER, D. D.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S.; VILLANO, J. L. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v. 23, n. 10, p. 1985-1996, out. 2014. DOI: 10.1158/1055-9965.epi-14-0275. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25053711/>. Acesso em: 22 maio 2021.

WAN, W.; ZHANG, X.; HUANG, C.; CHEN, L.; YANG, X.; BAO, K.; PENG, T. Monensin inhibits glioblastoma angiogenesis via targeting multiple growth factor receptor signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 530, n. 2, p. 479-484, 17 set. 2020. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.05.057. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X20309657?via%3Dihub>. Acesso em: 22 maio 2021.

WILSON, T. A.; KARAJANNIS, M. A.; HARTER, D. H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. **Surgical Neurology International**, v. 5, n. 1, p. 64, 8 maio 2014. DOI: 10.4103/2152-7806.132138. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5123811/>. Acesso em: 22 maio 2021.

WOLBERS, J. G.; Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. **Chinese Journal of Cancer**, v. 33, n. 1, p. 8-15, jan. 2014. DOI: 10.5732/cjc.013.10219. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24384236/>. Acesso em: 22 maio 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental health criteria 159; glyphosate**. Geneva: WHO, 1994. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40044/9241571594-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 22 maio 2021.

YAMANAKA, R.; SAYA, H. Molecularly targeted therapies for glioma. **Annals of Neurology**, v. 66, n. 6, p. 717-729, 29 jun. 2009. DOI: 10.1002/ana.21793. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.21793>. Acesso em: 22 maio 2021.

ZAMIN, L. L.; FILIPPI-CHIELA, E. C.; DILLENBURG-PILLA, P.; HORN, F.; SALBEGO, C.; LENZ, G. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. **Cancer Science**, v. 100, n. 9, p. 1655-1662, 11 ago. 2009. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01215.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1349-7006.2009.01215.x>. Acesso em: 22 maio 2021.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Pela primeira vez foi demonstrado os efeitos citotóxicos de GLY e Round-up® em linhagens de GBMs, por meio da realização de testes que possibilitaram retratar a diminuição da viabilidade celular, o número de células, a formação de colônias e a duplicação populacional, tendo o Round-up® uma manifestação mais promissora nos tratamentos.

Quanto a alguns dos testes aplicados com Round-up®, detectou-se bruscamente a morte celular, seguida pela proliferação celular novamente. Esta proliferação celular pós-tratamento provavelmente tenha ocorrido devido ao curto período pelo qual as células foram tratadas. Sendo assim nosso estudo poderia ser amplificado, testando doses mais baixas e a longo prazo, além de realizar tratamentos com AMPA, possibilitando assim a comparação entre os diferentes compostos, testando ainda a influência dos mesmos na indução da produção de radicais livres.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Consulta Pública nº. 84, de 31 de outubro de 2003.** Brasil: ANVISA, 2003. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B5780-1-0%5D.PDF> Acesso em 14 de julho de 2020.

ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D. T.; Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 152, p. 63-82, ago. 2015. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163725815000960?via%3Dihub>. Acesso em: 26 maio 2021.

AMARANTE JUNIOR, O. P. DE.; SANTOS, T. C. R. DOS.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 26 ago. 2002. DOI: 10.1590/s0100-40422002000400014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/Z9DJG6fy8ZQR79ch8cdxwVP/?lang=pt>. Acesso em: 26 maio 2021.

AMERICAN ASSOCIATION OF NEUROSCIENCE NURSES. **Care of the adult patient with a brain tumor.** Chicago: AANN, 2014. Disponível em: http://aann.org/uploads/Publications/CPGs/AANN14_AB_T_Module_FINAL.pdf. Acesso em: 26 maio 2021.

AZIZ, Z. A. **Efeitos Toxicológicos do Glifosato.** 2020. 70 P. Dissertação De Mestrado (Ciências Farmacêuticas). Instituto Universitário Egas Moniz – IUEM. Portugal. 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Relatório de Recomendação: Diretrizes Diagnóstico Terapêuticas (DDT) - Tumor Cerebral no Adulto.** Brasília: CONITEC, 2019. 305p. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Consultas/2019/Relatorio_DDT_TumorCerebralAdulto_CP77_2019.pdf. Acesso em: 17.08.2020.

BRENNAN, C. W., VERHAAK, R. G. W., MCKENNA, A., CAMPOS, B., NOUSHMEHR, H., SALAMA, S. R., ZHENG, S.; CHAKRAVARTY, D.; SANBORN, J. Z.; BERMAN, S. H.; BEROUKHIM, R.; BERNARD, B.; WU, C. J.; GENOVESE, G.; SHMULEVICH, I.; SLOAN, J. B.; ZOU, L.; VEGESNA, R.; SHUKLA, S. A.; CIRIELLO, G.; YUNG, W.K.; ZHANG, W.; SOUGNEZ, C.; MIKKELSEN, T.; ALDAPE, K.; BIGNER, D. D.; MEIR, E. G. V.; PRADOS, M.; SLOAN, A.; BLACK, K. L.; ESCHBACHER, J.; FINOCCHIARO, G.; FRIEDMAN, W.; ANDREWS, D. W.; GUHA, A.; IACOCCA, M.; O'NEILL, B. P.; FOLTZ, G.; MYERS, J.; WEISENBERGER, D. J.; PENNY, R.; KUCHERLAPATI, R.; PEROU, C. M.; HAYES, D. N.; GIBBS, R.; MARRA, M.; MILLS, G. B.; LANDER, E.; SPELLMAN, P.; WILSON, R.; SANDER, C.; WEINSTEIN, J.; MEYERSON, M.; GABRIEL, S.; LAIRD, P. W.; HAUSSLER, D.; GETZ, G.; CHIN, L.; TCGA RESEARCH NETWORK. The somatic genomic landscape of glioblastoma. **Cell**, v. 155, n. 2, p. 462-477, 10 out. 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.034. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24120142/>. Acesso em: 26 maio 2021.

CAMPISI, J.; D' ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 729-740, set. 2007. DOI: 10.1038/nrm2233. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17667954/>. Acesso em: 26 maio 2021.

CAMPISI, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. **Annual Review of Physiology**, v. 75, n. 1, p. 685-705, fev. 2013. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23140366/>. Acesso em: 20 maio 2021.

CANCER GENOME ATLAS RESEACH NETWORK. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1061-1068, 23 out. 2008. DOI: 10.1038/nature07385. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18772890/>. Acesso em: 26 maio 2021.

CHANDANA, S. R.; MOVVA, S.; ARORA, M.; SINGH, T. Primary Brain Tumors in Adults. **Am Fam Physician**, v. 77, n. 10, p. 1423-1430, maio 2008. PMID: 18533376.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18533376/>. Acesso em: 26 maio 2021.

CHEN, J.; MCKAY, R.M.; PARADA, L.F. Malignant glioma: Lesions from genomics, mouse models, and stem cells. **Cell**, v. 149, n.1, p. 36-47, 2012. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.009. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2812%2900338-8>. Acesso em: 26 maio 2021.

COLMAN, S. D.; WILLIAMS, C. A.; WALLACE, M. R.; Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene. **Nature Genetics**, v. 11, n. 1, p. 90-92, 01 set. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng0995-90>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng0995-90/#citeas>. Acesso em: 26 maio 2021.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1038-1045, 12 dez. 2005. DOI: 10.1590/s0100-40422005000600019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/yNyGrTWjHPzFMhRxSYFwtSz/?lang=pt>. Acesso em: 26 maio 2021.

COX. C. Glyphosate Factsheet. **Journal of pesticide Reform**, v. 108, n. 3, 1998. Disponível em: <http://www.eastbaypesticidealert.org/Glyphosate%20Factsheet%201.htm>. Acesso em: 26 maio 2021.

DAVIS, M. E.; STOIBER, A. M. Glioblastoma multiforme: Enhancing survival and quality of life. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 15, n. 3, p. 291-297, jun. 2011. DOI: 10.1188/11.cjon.291-297. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21624864/>. Acesso em: 26 maio 2021.

DAVIS, M. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 20, n.5, S2-S8, 01 out. 2016. DOI: 10.1188/16.cjon.s1.2-8. Disponível em: <https://cjon.ons.org/cjon/20/5/supplement/glioblastoma-overview-disease-and-treatment>. Acesso em: 26 maio 2021.

DAVIS, M. E. Epidemiology and Overview of Gliomas. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 34, n. 5, p. 420-429, dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2018.10.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S074920811830069X>. Acesso em: 26 maio 2021.

DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, n. 3 p. 545-550, 24 out. 1995. DOI: 10.1007/bf00218464. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00218464>. Acesso em: 21 maio 2021.

DILL, G. M.; SAMMONS, R. D.; FENG, P. C. C.; KOHN, F.; KRETZMER, K.; MEHRSHEIKH, A.; BLEEKE, M.; HONEGGER, J. L.; FARMER, D.; WRIGHT, D.; HAUPFEAR, E. A. Glyphosate: Discovery, Development, Applications, and Properties. In: Nandula, V. K. **Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management**. Hoboken: Wiley, 2010, cap. 1, p.1–33. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=en&lr=&id=aRGw5VDUdfYC&oi=fnd&pg=PA1&ots=NVyYSUgXvU&sig=ONBWvbW6sFRDIVRaPHxU6LiAmtA&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 26 maio 2021.

DIMRI, G. P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M.; SCOTT, G.; ROSKELLEY, C.; MEDRANO, E. E.; LINSKENS, M.; RUBELI, \.; PEREIRA-SMITH, O.; PEACOCKE, M.; CAMPISI, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 20, p. 9363–9367, 26 set. 1995. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9363. Disponível em: <https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC40985&blobtype=pdf> Acesso em: 21 maio 2021.

ELLOR, S. V.; PAGANO-YOUNG, T. A.; AVGEROPOULOS, N. G.; Glioblastoma: Background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. **The Journal of Law, Medicine, and Ethics**, v. 42, n. 2, p. 171-182, 16 jul. 2014. DOI:

10.1111/jlme.12133. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25040381/>. Acesso em: 26 maio 2021.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2005**. 1ª. ed. Londrina: Embrapa Soja. Sistemas de Produção 6, 2004. 239p. ISSN 1677-8499 Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54294/1/Sistemas-de-Producao-6.pdf>. Acesso em: 26 maio 2021.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2014**. 1ª. ed. Londrina: Embrapa Soja. Sistemas de Produção 16, 2013. 265p. ISSN 2176-2902. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95489/1/SP-16-online.pdf>. Acesso em: 26 maio 2021.

FARRELL, C. J.; PLOTKIN, S. R. Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, von Hippel-Lindau, and Other Syndromes. **Neurologic Clinics**, v. 25, n.4, p. 925-946, nov. 2007. DOI: 10.1016/j.ncl.2007.07.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17964021/>. Acesso em: 22 maio 2021.

FENG, J. C.; THOMPSON, D. G. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 2. Persistence in foliage and soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n.4, p. 1118-1125, 01 abr. 1990. DOI: 10.1021/jf00094a046. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf00094a046>. Acesso em: 26 maio 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint Fao/Who Meeting on Pesticide Residues**. Geneva: FAO/WHO, 2016. Disponível em: <https://www.who.int/foodsafety/jmprsummary2016.pdf?ua=1>. Acesso em: 26 maio 2021.

FRANCESCHI, E.; TOSONI, A.; BARTOLINI, S.; MAZZOCCHI, V.; FIORAVANTI, A.; BRANDES, A. A. Treatment options for recurrent glioblastoma: pitfalls and future

trends. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 9, n. 5, p. 613-619, maio 2009. DOI: 10.1586/era.09.23. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19445578/>. Acesso em: 26 maio 2021.

FRANZ, J. E. **N-phosphonomethyl-glycine phytotoxicant compositions**. United States Patent Ser. N°. 170,385, 1974. Disponível em: <https://www.freepatentsonline.com/4840659.pdf>. Acesso em: 26 maio 2021.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C.; RODRIGUES, J. D.; GUAGGIO, J. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. São Paulo: Monsanto do Brasil, 2005. 60 p. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Plantas_daninhas_glifosatoID-VCQ0aRyNYE.pdf. Acesso em: 16 jun. 2020.

GRISOLIA, C. K. Agrotóxicos; mutações, câncer e reprodução. Brasília: ELBRA, 2005. 394p. In KUPSKE, C. **Exposição ao Glifosato e incidência de Câncer em Agricultores Familiares do Município de Cerro Largo - RS**. 2018. 95p. Dissertação (Mestrado em Ambiente e tecnologias Sustentáveis - PPGATS). Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo - RS, 2018.

GRUBER, M. L.; BUSTER, W. P. Temozolomide in Combination With Irinotecan for Treatment of Recurrent Malignant Glioma. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 27 n.1, p. 33-38, fev. 2004. DOI: 10.1097/01.coc.0000045852.88461.80. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14758131/>. Acesso em: 22 maio 2021.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n.1, p. 57-70, 7 jan. 2000. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2800%2981683-9>. Acesso em: 22 maio 2021.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 4 mar. 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376230/>. Acesso em: 20 maio 2021.

HAO, Y.; CHEN, H.; XU, W.; GAO, J.; YANG, Y.; ZHANG, Y.; TAO, L. Round-up® confers cytotoxicity through DNA damage and Mitochondria-Associated apoptosis induction. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 917-923, set. 2019. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.05.128. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749119312291?via%3Di> hub. Acesso em: 22 maio 2021.

HEGI, M. E.; DISERENS, A.-C.; GORLIA, T.; HAMOU, M.-F.; DE TRIBOLET, N.; WELLER, M.; KROS, J. M.; HAINFELLNER, J. A.; MASON, W.; MARIANI, L. BROMBERG, J. E. C.; HAU, P.; MIRIMANOFF, R. O.; CAIRNCROSS, J. G.; JANZER, R. C.; STUPP, R. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n.10, p. 997-1003, 10 mar. 2005. DOI: 10.1056/nejmoa043331. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa043331>. Acesso em: 20 maio 2021.

HOFER, S.; LASSMAN, A. B. Molecular markers in gliomas: impact for the clinician. **Targeted Oncology**, v. 5, n. 3, p. 201-210, set. 2010. DOI: 10.1007/s11523-010-0157-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20809335/>. Acesso em: 20 maio 2021.

HOFER, S.; RUSHING, E.; PREUSSER, M.; MAROSI, C. Molecular biology of high-grade gliomas: what should the clinician know? **Chin J Cancer**, v. 33, n. 1: p. 4-7, jan. 2014. DOI: 10.5732/cjc.013.10218. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3905084/>. Acesso em: 25 jul. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>. Acesso: 20 maio. 2021.

JALALI, R.; MUNSHI, A. Therapy for glioma: Indian perspective. **Indian Journal of Cancer**, v. 46 n. 2, p. 127-131, abr - jun 2009. DOI: 10.4103/0019-509x.49150. Disponível em: <https://www.indianjcancer.com/article.asp?issn=0019-509X;year=2009;volume=46;issue=2;spage=127;epage=131;aulast=Munshi>. Acesso em: 22 maio 2021.

JOBIM, P. F. C.; NUNES, L. N.; GIUGLIANI, R.; DA CRUZ, I. B. M. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos?: Uma contribuição ao debate. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 277-288, jan. 2010. DOI: 10.1590/s1413-81232010000100033. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/4jgjRK9mbMrQYWrWyHxvxcs/?lang=pt>. Acesso em: 22 maio 2021.

JOHNSON, D. R.; FOGH, S. E.; GIANNINI, C.; KAUFMANN, T. J.; RAGHUNATHAN, A.; THEODOSOPOULOS, P. V.; CLARKE, J. L. Case-Based Review: newly diagnosed glioblastoma. **Neuro-Oncology Practice**, v. 2, n. 3, p. 106-121, set. 2015. DOI: 10.1093/nop/npv020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31386093/>. Acesso em: 22 maio 2021.

KELES, G. E.; LAMBORN, K. R.; CHANG, S. M.; PRADOS, M. D.; BERGER, M. S. Volume of residual disease as a predictor of outcome in adult patients with recurrent supratentorial glioblastomas multiforme who are undergoing chemotherapy. **Journal of Neurosurgery**, v. 100, n. 1, p. 41-46, jan. 2004. DOI: 10.3171/jns.2004.100.1.0041. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14743910/>. Acesso em: 22 maio 2021.

LI, Q.; YOU, Z.; LAMBRECHTS, M. J.; ZHANG, Q.; LIU, S.; GE, D.; YIN, R.; XI, M. Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, p. 635-643, 23 jul. 2013. DOI: 10.2147/dddt.s49197. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23983455/>. Acesso em: 22 maio 2021.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para a ação e defesa da vida**. 1ª ed. Rio de Janeiro: AS-PTA. Assessoria e serviços a projetos em agricultura alternativa, 2011. 190 p. Disponível em: <https://br.boell.org/sites/default/files/agrotoxicos-no-brasil-mobile.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2020.

LOUIS, D. N.; HOLLAND, E. C.; CAIRNCROSS, J. G. Glioma Classification: a molecular reappraisal. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 3, p. 779-786,

set. 2001. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)61750-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11549567/>. Acesso em: 20 ago. 2020.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97-109, ago. 2007. DOI: 10.1007/s00401-007-0243-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17618441/>. Acesso em: 22 maio 2021.

MARQUES D. F.; SANTOS, M. Gliomas de Alto Grau. In: Santos, M.; Corrêa, T. S.; Faria, L. D. B. B.; dos Reis, P. E. D.; Pinheiro, R. N. **Diretrizes Oncológicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. Cap. 2, p. 35-44.

MENEGOTTO, P. R. **Silenciamento do Receptor do Peptídeo liberador de Gastrina (GRPR) induz Senescência em Glioblastoma multiforme A-172**. 2014. 47 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biomedicina) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2014.

MILDEMBERG, R. A. R.; ONOFRE, P. G.; RIBAS, J. L. C. Teratogenia e Agrotóxico. **Saúde e Desenvolvimento**, v. 11, n. 9, p. 109-122, 2 out. 2017. Disponível em: [file:///C:/Users/Daiane/Downloads/781-Texto%20do%20artigo-2860-1-10-20171002%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Daiane/Downloads/781-Texto%20do%20artigo-2860-1-10-20171002%20(3).pdf). Acesso em: 22 maio 2021.

MORAES, P. V. D.; ROSSI, P. Comportamento ambiental do glifosato. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 9, n. 3, p. 22-35, 2010. Disponível em: <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201712/06131757-comportamento-ambiental-do-glifosato.pdf>. Acesso em: 22 maio 2021.

MYERS, J. P.; ANTONIOU, M. N.; BLUMBERG, B.; CARROLL, L.; COLBORN, T.; EVERETT, L. G.; HANSEN, M.; LANDRIGAN, P. J.; LANPHEAR, B. P.; MESNAGE, R.; VANDENBERG, L. N.; VOM SAAL, F. S.; WELSHONS, W. V.; BENBROOK, C. M. Concerns over Use of Glyphosate - Based Herbicides and Risks Associated with Exposures: A Consensus Statement. **Environmental Health**, v. 15, n. 19, p. 1-13, 17

fev. 2016. DOI: 10.1186/s12940-016-0117-0. Disponível em: <https://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12940-016-0117-0>. Acesso em: 22 maio 2021.

OKADA, H.; KOHANBASH, G.; ZHU, X.; KASTENHUBER, E. R.; HOJI, A.; UEDA, R.; FUJITA, M. Immunotherapeutic approaches for glioma. **Crit Rev Immunol**, v. 29, n. 1, p. 1-42, 2009. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v29.i1.10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19348609/>. Acesso em: 27 maio 2021.

OSTROM, Q. T.; NBAUCHET, L.; DAVIS, F. G.; DELTOUR, L.; FISCHER, J. L.; LANGER, C. E.; PEKMEZCI, M.; SCHWARTZBAUM, J. A.; TURNER, M. C.; WALSH, K. M.; WRENSCH, M. R.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. The epidemiology of glioma in adults: A “state of the science” review. **Neuro Oncol**, v.16, p. 896- 913, jul. 2014. DOI: 10.1093/neuonc/nou087. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24842956/>. Acesso em: 22 maio 2021.

PARSONS, D. W.; JONES, S.; ZHANG, X.; LIN, J. C. H.; LEARY, R. J.; ANGENENDT, P.; MANKOO, P.; CARTER, H.; SIU, I. M.; GALLIA, G. L.; OLIVI, A.; MCLENDON, R.; RASHEED, B. A.; KEIR, S.; NIKOLSKAYA, T.; NIKOLSKY, Y.; BUSAM, D. A.; TEKLEAB, H.; DIAZ JR. L. A.; HARTIGAN, J.; SMITH, D. R.; STRAUSBERG, R. L.; MARIE, S. K. N.; SHINJO, S. M. O.; YAN, H.; RIGGINS, G. J.; BIGNER, D. D.; KARCHIN, R.; PAPADOPOULOS, N.; PARMIGIANI, G.; VOGELSTEIN, B.; VELCULESCU, V. E.; KINZLER, K. W. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1807-1812, 26 set. 2008. DOI: 10.1126/science.1164382. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18772396/>. Acesso em: 27 maio 2021.

PAWLOWSKA, E.; SZCZEPANSKA, J.; SZATKOWSKA, M.; BLASIAK, J. An Interplay between Senescence, Apoptosis and Autophagy in Glioblastoma Multiforme - Role in Pathogenesis and Therapeutic Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 889, 17 mar. 2018. DOI: 10.3390/ijms19030889. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29562589/>. Acesso em: 27 maio 2021.

PERRY, J.; ZINMAN, L.; CHAMBERS, A.; SPITHOFF, K.; LLOYD, N.; LAPERRIERE, N. The use of prophylactic anticonvulsants in patients with brain tumours - A systematic review. **Current Oncology**, v. 13, n. 6, p. 222-229, 01 dez. 2006. PMID: 22792022. Disponível em: <http://europepmc.org/article/PMC/3394608>. Acesso em: 27 maio 2021.

PHILLIPS, H. S.; KHARBANDA, S.; CHEN, R.; FORREST, W. F.; SORIANO, R. H.; WU, T. D.; MISRA, A.; NIGRO, J. M.; COLMAN, H.; SOROCEANU, L.; WILLIAMS, P. M.; MODRUSAN, Z.; FEUERSTEIN, B. G.; ALDAPE, K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 3, p. 157-173, mar. 2006. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.02.019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16530701/>. Acesso em: 27 maio 2021.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e ensino. **Liberato**, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009. Disponível em: http://revista.liberato.com.br/ojs_lib/index.php/revista/article/view/142/132. Acesso em: 27 maio 2021.

RIBEIRO, L. R. Genética do Câncer humano. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. Cap. 2, p. 29-48. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=rjynd4Yg8alC&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 27 maio 2021.

SCHIFF, D.; LEE, E.Q.; NAYAK, L.; NORDEN, A. D.; REARDON, D. A.; WEN, P. Y. Medical management of brain tumors and the sequelae of treatment. **Neuro-Oncology**, v. 17, n. 4, p. 488-504, 30 out. 2014. DOI: 10.1093/neuonc/nou304. Disponível em: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/17/4/488/2280725>. Acesso em: 27 maio 2021.

SERRANO, M.; BLASCO, M. A. Putting the stress on senescence. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 6, p. 748-753, 1 dez. 2001. DOI: 10.1016/s0955-0674(00)00278-7. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955067400002787>. Acesso em: 22 maio 2021.

SPIEGL-KREINECKER, S.; PIRKER, C.; FILIPITS, M.; LÖTSCH, D.; BUCHROITHNER, J.; PICHLER, J.; SILYE, R.; WEIS, S.; MICKSCHE, M.; FISCHER, J.; BERGER, W. O6 Methylguanine DNA methyltransferase protein expression in tumor cells predicts outcome of temozolomide therapy in glioblastoma patients. **Neuro Oncol**, v. 12, n. 1, p. 28-36, jan. 2010. DOI: 10.1093/neuonc/nop003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20150365/>. Acesso em: 27 maio 2021.

STUPP, R.; MASON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M. J. B.; BELANGER, K.; BRANDES, A. A.; MAROSI, C.; BOGDAHAN, U.; CURSCHMANN, J.; JANZER, R. C.; LUDWIN, S. K.; GORLIA, T.; ALLGEIER, A.; LACOMBE, D. CAIRNCROSS, G. J.; EISENHAEUER, E.; MIRIMANOFF, R. O. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n.10, p. 987-996, 10 mar. 2005. DOI: 10.1056/nejmoa043330. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa043330>. Acesso em: 22 maio 2021.

STUPP, R.; TONN, J. C.; BRADA, M.; PENTHEROUDAKIS, G. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 21, (s5), p. 190-193, maio 2010. DOI: 10.1093/annonc/mdq187. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20555079/>. Acesso em: 22 maio 2021.

THAKKAR, J. P., DOLECEK, T. A., HORBINSKI, C., OSTROM, Q. T., HORBINSKI, C.; OSTROM, Q. T.; LIGHTNER, D. D.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S.; VILLANO, J. L. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v. 23, n. 10, p. 1985-1996, out. 2014. DOI: 10.1158/1055-9965.epi-14-0275. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25053711/>. Acesso em: 22 maio 2021.

TOMLIN, C. The Pesticide Manual: Incorporating the Agrochemicals Handbook. 10. Ed. Farnham: British crop protection council, 1994. Apud AMARANTE JUNIOR, O. P.

DE.; SANTOS, T. C. R. DOS.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 26 ago. 2002. DOI: 10.1590/s0100-40422002000400014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/Z9DJG6fy8ZQR79ch8cdxwVP/?lang=pt>. Acesso em: 26 maio 2021.

VALDUVIECO, I.; VERGER, E.; BRUNA, J.; CARAL, L.; PUJOL, T.; RIBALTA, T.; BOGET, T.; OLEAGA, L.; PINEDA, E.; GRAUS, F. Impact of radiotherapy delay on survival in glioblastoma. **Clinical and Translational Oncology**, v. 15, n. 4, 278-282, 24 jul. 2012. DOI: 10.1007/s12094-012-0916-x. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12094-012-0916-x>. Acesso em: 27 maio 2021.

VERHAAK, R.G.; HOADLEY, K. A.; PURDOM, E.; WANG, V.; QI, Y.; WILKERSON, M. D.; MILLER, R.; DING, L.; GOLUB, T.; MESIROV, J. P.; ALEXE, G.; LAWRENCE, M.; O'KELLY, M.; TAMAYO, P.; WEIR, B. A.; GABRIEL, S.; WINCKLER, W.; GUPTA, S.; JAKKULA, L.; FEILER, H. S.; HODGSON, G.; JAMES, C. D.; SARKARIA, J.N.; BRENNAN, C.; KAHN, A.; SPELLMAN, P. T.; WILSON, R. K.; SPEED, T. P.; GRAY, J. W.; MEYERSON, M.; GETZ, G.; PEROU, C. M.; HAYES, D. N.; THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n.1, p. 98-110, 19 jan. 2010. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.12.020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20129251/>. Acesso em: 27 maio 2021.

WALID, M. S. Prognostic factors for long-term survival after glioblastoma. **The Permanente Journal**, v. 12, n. 4, p.45-48, 1 jan. 2008. DOI: 10.7812/tpp/08-027. Disponível em: <https://europepmc.org/article/PMC/3037140>. Acesso em: 27 maio 2021.

WANG, H.; XU, T.; JIANG, Y.; XU, H.; YAN, Y.; FU, D.; CHEN, J. The challenges and the promise of molecular targeted therapy in malignant gliomas. **Neoplasia**, v. 17, p. 239-255, mar. 2015. DOI: 10.1016/j.neo.2015.02.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25810009/>. Acesso em: 27 maio 2021.

WATANABE, K.; TACHIBANA, O.; SATO, K.; YONEKAWA, Y.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Overexpression of the EGF Receptor and p53 Mutations are Mutually Exclusive in the Evolution of Primary and Secondary Glioblastomas. **Brain Pathology**, v. 6, n. 3, p. 217-223, jul. 1996. DOI: 10.1111/j.1750-3639.1996.tb00848.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8864278/>. Acesso em: 27 maio 2021.

WEATHERS, S. S.; GILBERT, M. R. Toward Personalized Targeted Therapeutics: An Overview. **Neuro therapeutics**, v. 14, n. 2, p. 256-264, 19 dez. 2016. DOI: 10.1007/s13311-016-0496-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13311-016-0496-5>. Acesso em: 27 maio 2021.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n.2, p. 117-165, abr. 2000. DOI: 10.1006/rtp.1999.1371 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10854122/>. Acesso em: 27 maio 2021.

WILSON, T. A.; KARAJANNIS, M. A.; HARTER, D. H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. **Surgical Neurology International**, v. 5, n. 1, p. 64. 8 maio 2014. DOI: 10.4103/2152-7806.132138. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5123811/>. Acesso em: 22 maio 2021.

WOLBERS, J. G.; Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. **Chinese Journal of Cancer**, v. 33, n. 1, p. 8-15, jan. 2014. DOI: 10.5732/cjc.013.10219. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24384236/>. Acesso em: 22 maio 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental health criteria 159; glyphosate**. Geneva: WHO, 1994. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40044/9241571594-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 22 maio 2021.

YAMANAKA, R.; SAYA, H. Molecularly targeted therapies for glioma. **Annals of Neurology**, v. 66, n. 6, p. 717-729, 29 jun. 2009. DOI: 10.1002/ana.21793. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.21793>. Acesso em: 22 maio 2021.

YOUNG, R. M.; JAMSHIDI, A.; DAVIS, G.; SHERMAN, J. H. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. **Annals of Translational Medicine**, v. 3, n. 9, p. 121, 9 jun. 2015. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.10. Disponível em: <https://atm.amegroups.com/article/view/6698/7506>. Acesso em: 27 maio 2021.

ZAMIN, L. L. **Resveratrol e quercetina: Avaliação da atividade antitumoral e dos mecanismos de ação em linhagens de Gliomas *in vitro* e em um modelo de implante de Gliomas *in vivo***. 2010. 154 p. Tese de Doutorado (Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Porto Alegre. 2010.

ZIMDAHL, R. L. Development of herbicides after 1945. In **A History of Weed Science in the United States**. Burlington: Elsevier, 2010. Cap. 6, p. 79-113. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381495-1.00006-2>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123814951000062>. Acesso em: 27 maio 2021.

ANEXOS

ANEXO 01: Normas da Revista BJHR - Brazilian Journal of Health Review

Diretrizes para Autores

A BJHR aceita apenas artigos originais, não publicados em outras revistas.

Aceitamos artigos apresentados em eventos, desde que a informação seja disponibilizada pelos autores.

Os padrões para formatação e preparação de originais são:

- Máximo de 20 páginas;
- Fonte Times New Roman tamanho 12, espaçamento entre linhas 1,5;
- As Figuras e Tabelas devem aparecer junto com o texto, editáveis, em fonte 10, tanto para o conteúdo quanto para o título (que deve vir logo acima dos elementos gráficos) e fonte (que deve vir logo abaixo do elemento gráfico).
- Título em português e inglês, no início do arquivo, com fonte 14;
- Resumo, juntamente com palavras-chave, com espaçamento simples, logo abaixo do título;
- O arquivo submetido não deve conter a identificação dos autores.

Após o recebimento dos originais, o editor faz uma revisão prévia da adequação do conteúdo e verificação de plágio e envia, no prazo de uma semana após o recebimento, para análise de pelo menos dois revisores externos, que podem: aceitar o artigo, aceitar com modificações, exigir modificações e solicita nova versão para correção ou recusa do artigo.

Esta revista adota como política editorial as diretrizes de boas práticas de publicação científica da Associação Nacional de Pesquisa e Pós-Graduação em Administração (ANPAD), disponíveis em: http://www.anpad.org.br/diversos/boas_praticas.pdf

Taxa de publicação:

- Esta revista não cobra taxa de inscrição;
- Este trabalho cobra a publicação de artigos, no valor de R \$ 490,00 por artigo a ser publicado.

Condições para submissão:

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".
2. O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF.
3. URLs para as referências foram informadas quando possível.
4. O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página Sobre a Revista.
6. Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em Assegurando a avaliação pelos pares cega foram seguidas.