

**Julia Maria Saraiva Duarte**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE DE HERBICIDAS E O EFEITO DA  
EXPOSIÇÃO NO PERFIL DE METILAÇÃO EM LINHAGEM CELULAR DE PULMÃO.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Henrique Cesar Santejo Silveira

Barretos, SP  
2018

**Julia Maria Saraiva Duarte**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE DE HERBICIDAS E O EFEITO DA  
EXPOSIÇÃO NO PERFIL DE METILAÇÃO EM LINHAGEM CELULAR DE PULMÃO.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Henrique Cesar Santejo Silveira

Barretos, SP  
2018

D812a Duarte, Julia Maria Saraiva.

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade de herbicidas e o efeito da exposição no perfil de metilação em linhagem celular de pulmão. / Julia Maria Saraiva Duarte.

108 f. : il.

Orientador: Dr. Henrique Cesar Santejo Silveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2018.

1. Glifosato. 2. Hexazinona. 3. Atrazina. 4. 2,4-D. 5. Metilação do DNA. 6. Genotoxicidade. I. Autor. II. Silveira, Henrique Cesar Santejo. III. Título.

CDD 616.994

#### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570  
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

## FOLHA DE APROVAÇÃO

## **DECLARAÇÃO DE SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Auxílio à Pesquisa – Regular (processo número 2016/23412-0).

Também do projeto Avaliação de risco e conscientização do câncer ocupacional em trabalhadores rurais na região de Barretos patrocinado pela Organização Pan-Americana da Saúde (carta acordo BR/LOA/ BR/LOA/1500043.001).

E também ao projeto Pesquisa, Prevenção e Educação do Câncer Ocupacional nas Regiões de Campinas e Interior do Estado de São Paulo, patrocinado pelo Ministério Público do Trabalho.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

## **DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES**

“Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.”

“Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos. Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.”

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Que me dão todo o suporte para que pudesse concluir os meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos **meus pais, Claudionor e Silvia**, pois sem eles não seria capaz de chegar tão longe. Agradeço pela confiança e apoio que eles me deram e me dão nas minhas decisões, pelo investimento que eles fizeram a minha educação, pelo amor e palavras de sabedoria que sempre me fortalecem. Agradeço a paciência e compreensão que tiveram por ter passado meses longe, e as vezes dias sem ligar, que mesmo sem entender com profundidade o que eu fiz no meu mestrado, sempre se esforçaram para entender minha dedicação que tive para concluí-lo. E junto deles meus padrastos **Josely e Eurandes**, que me trataram como filha e também me ajudaram e deram suporte aos meus pais para que me auxiliassem a enfrentar mais esse desafio.

Agradeço as **minhas irmãs, meus sobrinhos, tios e minha vizinha Eliete** por sempre me enviarem vibrações positivas e muito carinho e por toda compreensão por esses anos distantes.

Agradeço ao **meu namorado Pedro e sua família** por terem me acolhido e apoiado ao longo desses dois anos e por terem me dado um suporte emocional para conseguir concluir mais essa etapa da minha vida acadêmica.

Agradeço a todos os **amigos do CPOM** por esses anos de companheirismo e lutas diárias de aprendizados, em especial a Thais S., Letícia Ferro, Cássia B., Mariana K, Maraina B., Izabella Faria, Felipe, Angela, Pamella, Rodrigo, Nayara, Cris C., Isabela G., Diones, Renata, Murilo, Anninha, Marina, Edilene, Lu, Weder, André L . Aos **amigos de Barretos** por terem me acolhido em suas casas e me tratarem como da família, em especial a Adriana e Alexandra Ueno e sua família, a Isa e ao Jesus, Ana Laura Ribeiro e sua Família. Agradeço as minhas amigas de **time o Barretos Bulls Feminino** por esses dois anos de companheirimos, treinos e amizade. Aos **amigos de Fortaleza** em especial a Naiana, André, Vitor G., Melquiades, Terceiro, Edson, Jéssica, thaís por terem me ajudado, sempre lembrarem de mim e amizarem a distância de casa. Aos **Amigos de Ribeirão Preto, SP** que me ajudaram muito desde que sai de casa, em especial a Carol Bessão e o Vitor Leão.

Agradeço a **equipe de biólogos** do CPOM. Ao André, Izabella F, Carol, Adriana e Renato pelas conversas científicas e ajuda pessoal em especial ao Renato por ter ajudado para conclusão do trabalho.



Agradeço ao **meu Orientado Dr. Henrique** pela a oportunidade e credibilidade cedida a mim para a realização e obtenção do título de mestrado. Agradeço ao grupo de **pesquisa Fatores ambientais**, Cássia B, Rhafaela, Renata, Amanda e Mariana.

Agradeço ao **IEP**. A miliene e ao Martins (**biblioteca**), por toda a ajuda e ao longo desses três anos acabaram se tornando amigos. A **secretaria da pós graduação**, Brenda e Dely, por todo o apoio prestado. Ao **EPIT**, Joyce e Dorion, por toda ajuda prestada nos relatórios. Agradeço a **Cíntia, secretária**, por toda paciência que tem conosco, alunos da pós, e pela ajuda ao longo desses anos.

A todos os pesquisadores do CPOM, incluindo o Dr. Rui Reis.

Agradeço a **Dra. Sheila** (INCA-RJ), **Dr. Luís Felipe Pinto** (INCA- RJ) e **Dra. Cláudia** (UNESP) pela parceria realizada, que foi essencial para a conclusão desse projeto.

Agradeço a **Banca de acompanhamento** , Dra Deyse e Dra Celine, que foram essenciais ao longo desses dois anos, por terem ajudado na melhoria do projeto até a conclusão dessa dissertação.

Agradeço a **FAPESP**, pois sem o concedimento da bolsa de pesquisa não teria conseguido realizar meu mestrado. E a **Organização Pan-Americana da Saúde** e ao **Ministério Público Trabalho** pelo suporte financeiro ao projeto de pesquisa, que foi essencial para que este acontecesse.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Agrotóxicos	1
1.2 Legislação brasileira e internacional em relação ao uso de agrotóxicos	2
1.3 Herbicidas 2,4-D, atrazina, glifosato e hexazinona	3
1.3.1 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	4
1.3.2 Atrazina	5
1.3.3 Glifosato	6
1.3.4 Hexazinona	7
1.4 O risco da exposição ocupacional e o Limite de exposição ocupacional aos agrotóxicos	8
1.5 Os agrotóxicos e o câncer	9
1.5.1 Agrotóxico e genotoxicidade	10
1.5.2 Agrotóxico e epigenética	13
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>17</b>
<b>3 OBJETIVO</b>	<b>18</b>
3.1 Objetivo específico	18
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
4.1 Fluxograma do projeto	19
4.2 Substâncias analisadas	19
4.3 Cultura celular	20
4.4 Avaliação da citotoxicidade celular	21
4.4.1 Ensaio de viabilidade celular (MTS)	21
4.4.2 Sulforrodamina B	22
4.5 Avaliação da genotoxicidade celular	23
4.5.1. Ensaio do Micronúcleo	23
4.5.2 Análise da fosforilação da histona H2AX e clivagem de PARP por <i>Western Blot</i>	25
4.6 Avaliação da metilação do DNA por <i>microarrays</i>	26
4.6.1 Extração de DNA	26
4.6.2 Conversão de Bissulfito	27
4.6.3 Análise da metilação do DNA por <i>microarrays</i> e análise de bioinformática	28

<b>5 RESULTADOS</b>	31
<b>5.1 Avaliação da citotoxicidade dos herbicidas</b>	31
<b>5.1.1 Avaliação da citotoxicidade do herbicida Atrazina (ATZ)</b>	31
<b>5.1.2 Avaliação da citotoxicidade do herbicida hexazinona (HEX)</b>	32
<b>5.1.3 Avaliação da citotoxicidade do herbicida 2,4-D</b>	33
<b>5.1.3 Avaliação da citotoxicidade do herbicida glifosato</b>	35
<b>5.2 Avaliação da genotoxicidade dos herbicidas</b>	35
<b>5.2.1 Avaliação do ensaio de micronúcleo no <i>IN CELL Analyser</i></b>	35
<b>5.2.2 Avaliação da fosforilação de H2Ax e clivagem de PARP por <i>Western Blot</i></b>	37
<b>5.3 Avaliação da metilação dos herbicidas</b>	39
<b>5.3.1 Avaliação do perfil de metilação da linhagem HBE exposta ao herbicida ácido2,4-Diclorofenoacético (2,4-D)</b>	39
<b>5.3.1 Avaliação do perfil de metilação da linhagem HBE exposta ao herbicida Glifosato</b>	49
<b>6 DISCUSSÃO</b>	55
<b>7 CONCLUSÃO</b>	59
<b>8 REFERÊNCIA</b>	60
<b>ANEXOS</b>	75
<b>ANEXO A</b> - Lista de sítios diferencialmente me após o tratamento com o herbicida 2,4-D 0,2 µm em relação ao controle tratado com DMSO	75
<b>ANEXO B</b> - Lista de sítios diferencialmente meapós o tratamento com o herbicida 2,4-D 10 µm em relação ao controle tratado com DMSO.	79
<b>ANEXO C</b> - Lista de sítios diferencialmente meapós o tratamento com o herbicida gly10 µm em relação ao controle tratado com DMSO.	84
<b>ANEXO D</b> - Lista de sítios diferencialmente metilados após o tratamento com o herbicida gly 1000 µm em relação ao controle tratado com DMSO.	87

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Composição do agrotóxico comercial.	<b>2</b>
<b>Figura 2 -</b>	Estrutura molecular do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.	<b>4</b>
<b>Figura 3 -</b>	Estrutura molecular do herbicida Atrazina.	<b>5</b>
<b>Figura 4 -</b>	Estrutura molecular do herbicida glifosato.	<b>6</b>
<b>Figura 5 -</b>	Estrutura molecular do herbicida Hexazinona.	<b>7</b>
<b>Figura 6 -</b>	Multiestágios da carcinogênese.	<b>10</b>
<b>Figura 7 -</b>	Esquema dos efeitos genotóxicos ocasionados pela exposição aos agrotóxicos.	<b>11</b>
<b>Figura 8 -</b>	Esquema da fosforilação da histona H2AX e o recrutamento de proteínas de reparo e do ciclo celular.	<b>12</b>
<b>Figura 9 -</b>	Alterações cromossômicas que dão origem ao Micronúcleo.	<b>13</b>
<b>Figura 10 -</b>	Modelo representativo do processo de metilação do DNA.	<b>14</b>
<b>Figura 11 -</b>	Esquema das a) regiões gênicas, que compreendem as regiões promotoras, 5' UTR, 1° Exon, Corpo do gene e 3'UTR; e b) regiões de ilhas CpGs, representadas por: regiões <i>shore</i> e <i>shelf</i> (N = Norte e S=Sul), e a ilha CpG.	<b>15</b>
<b>Figura 12 -</b>	Fluxograma do projeto.	<b>19</b>
<b>Figura 13 -</b>	Esquema do processo celular do Ensaio MTS.	<b>21</b>
<b>Figura 14 -</b>	Fluxograma do ensaio de MTS.	<b>22</b>
<b>Figura 15 -</b>	Fluxograma do ensaio do Micronúcleo.	<b>23</b>
<b>Figura 16 -</b>	Células binucleadas e mononucleadas com micronúcleo.	<b>24</b>
<b>Figura 17 -</b>	Esquema de <i>beads</i> do ensaio de metilação Infinium 850k.	<b>30</b>
<b>Figura 18 -</b>	Avaliação da citotoxicidade do DMSO pelo ensaio de MTS nas linhagens celulares A549 (A) e HBE (B).	<b>31</b>
<b>Figura 19 -</b>	Avaliação da citotoxicidade da atrazina pelo ensaio de MTS. Efeitos da exposição ao princípio ativo Atrazina em 24h, 48h e 72h, respectivamente.	<b>32</b>

<b>Figura 20</b> -	Avaliação da citotoxicidade da Hexazinona pelo ensaio de MTS. Efeitos da exposição ao princípio ativo Hexazinona em 24h, 48h e 72h, respectivamente.	<b>32</b>
<b>Figura 21</b> -	Avaliação da citotoxicidade do 2,4-D pelo ensaio de MTS. Efeitos da exposição ao princípio ativo 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) em 24h, 48h e 72h, respectivamente.	<b>33</b>
<b>Figura 22</b> -	Avaliação da citotoxicidade do agrotóxico 2,4-D pelo ensaio de MTS. Efeitos da exposição ao agrotóxico comercial 2,4-Diclorofenoxiacético (Nortox, SP, Brasil) em 24h, 48h e 72h, respectivamente, na linhagem celular HBE.	<b>34</b>
<b>Figura 23</b> -	Avaliação da citotoxicidade do 2,4-D pelo ensaio de Sulforrodamina B. Efeitos da exposição ao ácido 2,4-Diclorofenoxiacético em 24h, 48h e 72h, respectivamente, na linhagem celular HBE.	<b>34</b>
<b>Figura 24</b> -	Avaliação da citotoxicidade do glifosato pelo ensaio de MTS. Efeitos da exposição ao princípio ativo glifosato (gly) em 24h, 48h e 72h, respectivamente.	<b>35</b>
<b>Figura 25</b> -	Gráfico representando as médias de porcentagem de micronúcleo e desvio padrão	<b>37</b>
<b>Figura 26</b> -	Efeitos dos herbicidas glifosato e 2,4-D na linhagem celular HBE através do <i>western blot</i> das proteínas H2AX fosforilado e clivagem do PARP	<b>38</b>
<b>Figura 27</b> -	<i>Heatmap</i> de sítios CpG diferencialmente metilados após o tratamento 0,4 $\mu$ m em relação ao controle tratado com DMSO	<b>39</b>
<b>Figura 28</b> -	Distribuição das sondas hiper e hipometiladas após o tratamento com 2,4-D 0,4 $\mu$ m em relação ao controle de acordo com a proximidade a ilhas CpG (A) e região gênica (B).	<b>40</b>
<b>Figura 29</b> -	Análise de enriquecimento de processos biológicos e funções moleculares utilizando o banco de dados <i>Gene Ontology</i> após o tratamento com 2,4-D 0,4 $\mu$ m em relação ao controle.	<b>41</b>
<b>Figura 30</b> -	Genes com mais de uma sonda diferencialmente metilada entre o grupo 2,4-D 0,4 $\mu$ m e o grupo controle	<b>43</b>
<b>Figura 31</b> -	- <i>Heatmap</i> de sítios CpG diferencialmente metilados após o tratamento 10 $\mu$ m em relação ao controle tratado com DMSO	<b>44</b>

<b>Figura 32 -</b>	Distribuição das sondas hiper e hipometiladas após o tratamento com 2,4-D 10 $\mu$ m em relação ao controle de acordo com a proximidade a ilhas CpG (A) e região gênica (B).	<b>45</b>
<b>Figura 33-</b>	Análise de enriquecimento de processos biológicos e funções moleculares utilizando o banco de dados Gene Ontology após o tratamento com 2,4-D 10 $\mu$ m em relação ao controle	<b>46</b>
<b>Figura 34-</b>	Gene RAPGEF2 (Rap guanine nucleotide exchange factor 2) com mais de uma sonda diferencialmente metilada entre o grupo 2,4-D 10 $\mu$ m e o grupo controle	<b>48</b>
<b>Figura 35-</b>	<i>Heatmap</i> de sítios CpG diferencialmente metilados após o tratamento glifosato 10 $\mu$ m em relação ao controle tratado com DMSO	<b>49</b>
<b>Figura 36-</b>	Análise de enriquecimento de processos biológicos e funções moleculares utilizando o banco de dados Gene Ontology após o tratamento com gly 10 $\mu$ m em relação ao controle	<b>50</b>
<b>Figura 37-</b>	Distribuição das sondas hiper e hipometiladas após o tratamento com gly 10 $\mu$ m em relação ao controle de acordo com a proximidade a ilhas CpG (A) e região gênica (B).	<b>51</b>
<b>Figura 38 -</b>	<i>Heatmap</i> de sítios CpG diferencialmente metilados após o tratamento glifosato 1000 $\mu$ m em relação ao controle tratado com DMSO	<b>52</b>
<b>Figura 39 -</b>	Distribuição das sondas hiper e hipometiladas após o tratamento com gly 1000 $\mu$ m em relação ao controle de acordo com a proximidade a ilhas CpG (A) e região gênica (B).	<b>53</b>
<b>Figura 40 -</b>	Análise de enriquecimento de processos biológicos e funções moleculares utilizando o banco de dados <i>Gene Ontology</i> após o tratamento com gly 1000 $\mu$ m em relação ao controle.	<b>54</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Lista de agrotóxicos e concentrações a serem utilizadas nos experimentos de acordo com o limite de exposição ocupacional.	<b>20</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Informações dos anticorpos utilizados	<b>25</b>
<b>Tabela 3 -</b>	Média da porcentagem avaliada em dois experimentos.	<b>36</b>
<b>Tabela 4 -</b>	Comparação da média das porcentagens de Micronúcleo (MN) em células Binucleadas (BN) entre o veículo (DMSO) e os herbicidas.	<b>36</b>
<b>Tabela 5 -</b>	Lista de genes diferencialmente metilados após o tratamento com o herbicida 2,4D 0,4 $\mu\text{m}$ contidos na via de sinalização de endocitose	<b>42</b>
<b>Tabela 6 -</b>	Lista de genes diferencialmente metilados após o tratamento com o herbicida 2,4D 10 $\mu\text{m}$ contidos na via de sinalização de junções celulares.	<b>47</b>
<b>Tabela 7 -</b>	Lista Sítios Diferenciados Metilados (SDM) em comum com o tratamento 2,4D 0,4 $\mu\text{m}$ e 2,4D 10 $\mu\text{m}$ .	<b>48</b>
<b>Tabela 8 -</b>	Lista Sítios Diferenciados Metilados (SDM) em comum com o tratamento gly 10 $\mu\text{m}$ e gly 1000 $\mu\text{m}$ .	<b>54</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoacético
5MeC	5-metil-citosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATZ	Atrazina
CGIs	Ilhas CpGs, do inglês <i>cpg island</i>
CH <sub>3</sub>	Radical metil
DNMT1	DNA metiltransferase 1
DNMT3a	DNA metiltransferase 3a
DNMT3b	DNA metiltransferase 3b
DNMTs	DNAs metiltransferases
EPA	Agência de Proteção Ambiental, do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América, do inglês <i>United States of America</i>
FAO	Organização Alimentar e Agrícola, do inglês <i>Food and Agricultural Organization</i>
GLY	Glifosato
HEX	Hexazinona
IA	Ingrediente ativo
IARC	Agência Internacional de pesquisa em Câncer, do inglês <i>International Agency For Research on Cancer</i>
IBAMA	Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LEO	Limites de exposição ocupacional
LT	Limites de Tolerância
MCPP	Ácido metil chlorofenoxipropionico
MN	micronúcleos
MP	material particulado



OECD	Organização para o Desenvolvimento da Cooperação Econômica, do inglês <i>Organization for Economic Cooperation Development</i>
PA	Princípio ativo
PAC	Programa de Aceleração do Crescimento
PIB	Produto Interno Bruto
SAM	S-adenosilmetionina
TSS	Sítio de início de transcrição, do inglês <i>transcription start site</i>
TSS1500	Região -200 a -1500 nt <i>upstream</i> a região TSS
TSS200	Região de início do TSS até -200 nt
SRB	Sulforrodamina B

## RESUMO

**Duarte JMS.** *Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade de herbicidas e o efeito da exposição no perfil de metilação em linhagem celular de pulmão.* Dissertação de (mestrado). Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2018.

**JUSTIFICATIVA:** O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo. Os princípios ativos mais utilizados no país são o glifosato (GLY), atrazina (ATZ), 2,4-D e hexazinona (HEX), o que também ocorre na região de Barretos onde estes herbicidas estão no topo do *ranking* em consumo. Estudos recentes têm evidenciado o acometimento de vários tipos de câncer, incluindo o de pulmão em indivíduos expostos aos agrotóxicos. Sendo assim, alguns tipos de agrotóxicos desencadeiam lesões no DNA exercendo um papel mutagênico, ocasionando danos estruturais ou funcionais em nível cromossômico e de DNA. Por outro lado, alguns estudos demonstram que estes agentes químicos podem contribuir para a desregulação no perfil de expressão gênica que pode ser provocado por meio de alterações epigenéticas.

**OBJETIVO:** O objetivo do trabalho foi avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade dos herbicidas e o efeito da exposição no perfil de metilação em linhagens celulares de pulmão. **MATERIAL E**

**MÉTODOS:** Para avaliação da citotoxicidade foi utilizado o ensaio de MTS para os agrotóxicos GLY, ATZ e 2,4-D e HEX expostos nas linhagens celulares de pulmão HBE e A549 nos tempos de 24, 48 e 72 horas. As concentrações utilizadas para maioria dos herbicidas seguiram-se os Limites de exposição ocupacional (inalatórios) preconizados pelas agências regulamentadoras. Além disso, foi utilizado para o 2,4-D também o ensaio de sulforrodamina B. Na avaliação da genotoxicidade foi utilizada a metodologia de micronúcleo por *high content screening* utilizando-se o equipamento *IN CELL Analyzer*. Também realizamos a análise de fosforilação de H2AX realizada por *Western Blot*, nesta etapa optamos pela análise dos herbicidas GLY nas concentrações de 10 uM e 1000 uM e 2,4-D nas concentrações de 0,04 uM e 10 uM na linhagem celular HBE. Além disso, foi avaliada a clivagem da proteína PARP. Nestas mesmas condições, para as análises de metilação todos os DNAs foram extraídos e realizada a conversão bissulfito e realizada as marcações dos arranjos com o *Kit Infinium HD Assay Methylation (Illumina)*. **RESULTADOS:** Foi verificado o aumento da viabilidade celular encontrado em três herbicidas (ATZ, GLY e 2,4-D) no tempo de 72 horas na linhagem HBE

quando exposta a baixas concentrações, o que não ocorreu com a linhagem tumoral A549. Foi observado diminuição da viabilidade na concentração mais alta para 2,4-D e ATZ, com excessão do GLY que ocorreu um aumento da viabilidade mesmo em 1000 uM comparado ao controle. Analisou-se a viabilidade do 2,4-D pelo ensaio de sulforrodamina B e não foi observado alterações de citotoxicidade. Para o herbicida HEX não observou-se alterações na viabilidade celular em todas as condições nos diferentes tempos. No ensaio de micronúcleo (MN) verificou-se que o GLY não promoveu aumento da frequência. Por outro lado, o 2,4-D na concentração de 10 uM ocorreu aumento da frequência de MN quando comparado ao controle. Nas análises de *Western Blot* observou-se aumento da expressão relativa da proteína H2AX fosforilada no tempo de 72 horas para as altas concentrações e também para clivagem da proteína PARP para o GLY. No 2,4-D ocorreu o aumento da expressão da proteína H2AX fosforilada na concentração elevada de 10 uM no tempo de 72 horas. Nas análises de metilação de DNA foram obtidos perfis de metilação diferentes entre as condições para ambos os agrotóxicos. Foram encontrados 411 sítios diferencialmente metilados (SDM) na exposição ao herbicida 2,4-D e 189 SDM na exposição ao GLY. Encontramos 23 SDM entre a concentração 0,04 µM e 10 µM do 2,4-D e 9 SDM entre as concentrações 10 µM e 1000 µM do GLY que são comuns entre as condições. Por outro lado, a maioria dos genes encontrados após a exposição de 72 horas dos herbicidas glifosato e 2,4-D estão envolvidos em processos biológicos e metabólicos. Apesar da semelhança dos processos biológicos, os sítios diferencialmente metilados observados são diferentes. Além disso, foi possível revelar sítios comuns de acordo com o perfil de metilação entre as concentrações. Além disso, foi observado que a maioria dos genes diferencialmente metilados em GLY e 2,4-D estão envolvidos em processos biológicos e metabólicos. Ainda revelamos SDM envolvidos nos processos de carcinogênese, reparo de DNA e transcrição. **CONCLUSÃO:** Nossos resultados, foram os primeiros a demonstrar a citotoxicidade, genototoxicidade e alterações no perfil de metilação de DNA em linhagem celular de pulmão quando expostas aos herbicidas GLY e 2,4-D. Estes resultados sugerem que independente dos danos ao DNA, os herbicidas podem regular processos epigenéticos importantes para o metabolismo celular, envolvendo processos biológicos diferentes podendo contribuir para o processo de iniciação da carcinogênese.

**Palavras chave:** Glifosato, Hexazonona, Atrazina, 2,4-D, Metilação do DNA, Genotoxicidade

## ABSTRACT

**Duarte JMS.** *Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity of herbicides and the effect of exposure on the methylation profile in lung cell line.* Dissertation de (Master's degree). Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2018.

**Justification:** Brazil is the largest consumer of pesticides in the world. The main active principle utilized in the country are glyphosate (GLY), atrazine (ATZ), 2,4-D and hexazinone (HEX), the also occurs in the Barretos region where these herbicides are at the top of the ranking. Recent studies shown the involvement of several types of cancer, including lungs in individuals exposed to pesticides. Thus, some types of pesticides trigger DNA damage by playing a mutagenic role, causing structural or functional damages at the chromosomal and DNA level. Moreover, some studies show that these chemical agents can contribute to deregulation of the gene expression profile that may be caused by epigenetic changes. **Aim:** The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity, genotoxicity of the herbicides and the effect of exposure on the methylation profile in lung cell lines. **Material and Methods:** To evaluate cytotoxicity, the MTS assay for GLY, ATZ and 2,4-D and HEX pesticides were used in the HBE and A549 lung cell lines at 24, 48 and 72 hours. The concentrations used for most herbicides were established by occupational (inhalation) exposure limits recommended by regulatory agencies. In addition, the sulforhodamine B assay was also used for 2,4-D. In the genotoxicity evaluation, the micronucleus methodology was used by High content screening using the IN-CELL Analyzer. We also performed the analysis of H2AX phosphorylation by Western blot, in this step we opted for the analysis of pesticides GLY at concentrations of 10 uM and 1000 uM and 2,4-D in the concentrations of 0.04 uM and 10 uM in the HBE cell line. Furthermore, cleavage of PARP protein was evaluated. In these same conditions, for the methylation analysis all the DNAs were extracted and bisulphite conversion was carried out and the microarrays were performed with the Infinium HD Assay Methylation Kit (Illumina). **Results:** The increase of the cell viability was found in three herbicides (ATZ, GLY and 2,4-D) in 72 hours in the HBE cell line when exposed to low concentrations, which did not occur with the A549 tumor line. It was observed the decrease in viability at the highest concentration to 2,4-D and ATZ, with the exception that the GLY where the increased viability when at 1000 nM compared to the control occurred. The viability of 2,4-D was analyzed by the sulforhodamine B assay and

no cytotoxicity changes were observed. For HEX herbicide no changes in cell viability were observed in all conditions at different times. In the micronucleus (MN) assay, it was found that GLY did not increase the frequency. On the other hand, the 2,4-D in the concentration of 10  $\mu$ M an increase of the MN frequency when compared to the control occurred. In the Western Blot analysis, the relative expression of phosphorylated H2AX protein was increased at 72 hours for high concentrations and also for cleavage of PARP protein for GLY. The 2,4-D was increased expression of phosphorylated H2AX protein in high concentration of 10  $\mu$ M in time of 72 hours. In the DNA methylation experiments were obtained different methylation profiles between the conditions for both pesticides. 411 differentially methylated sites (DMS) on 2,4-D exposure and 189 DMS on GLY exposure were obtained. We found 23 SDM between the concentration 0.04  $\mu$ M and 10  $\mu$ M of 2,4-D and 9 SDM between the 10  $\mu$ M and 1000  $\mu$ M concentrations of GLY that are common among these conditions. On the other hand, most of the genes found after 72-hours exposure of GLY and 2,4-D herbicides are involved in biological and metabolic processes. Despite the similarity of biological processes, the differentially methylated sites observed are different. Furthermore, it was observed that the majority of genes differentially methylated in GLY and 2,4-D are involved in metabolic processes and biological. Furthermore, SDM were revealed involved in the carcinogenesis, DNA repair and transcription process. **Conclusion:** Our results were the first to demonstrate the cytotoxicity, genotoxicity and DNA methylation profile changes in lung cell line when exposed to GLY and 2,4-D herbicides. These results suggest that independent of DNA damage, herbicides can regulate epigenetic processes important for cellular metabolism, involving different biological processes and may contribute to the initiation of carcinogenic processes.

**Keywords:** glyphosate, atrazine, hexazinone, 2,4-D, DNA methylation, , *genotoxicity*

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o crescimento da produção agrícola se intensificou no final da década de 70, principalmente nas regiões sul, sudeste e o centro-oeste do país <sup>1</sup>. Este crescimento trouxe ao país indústrias produtoras de bens de capital, de insumos modernos e a redistribuição do latifúndio <sup>2, 3</sup>. Esse fenômeno também conhecido como Revolução Verde ocasionou transformações nas formas, processos e relações de trabalho <sup>4</sup>, caracterizando o agronegócio.

O agronegócio ou *agrobusiness* é uma atividade próspera, segura e rentável do ponto de vista econômico <sup>5</sup>. Atualmente, este setor possui representatividade em torno de 24% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, e somente o Estado de São Paulo é responsável por 15% do PIB total <sup>6</sup>. O interior paulista está entre os maiores produtores de laranja, carne bovina e cana-de-açúcar, que envolve a produção do etanol e do açúcar, movimentando grande parte da economia do Estado <sup>7</sup>.

O crescimento agrícola e o estímulo das políticas públicas no Brasil, tal como a isenção fiscal e o Programa de Aceleração do Crescimento (PAC), proporcionaram o aumento da produção e do consumo de agrotóxicos ao longo dos anos <sup>8-10</sup>. Este crescimento tornou o país, desde 2008, líder mundial no consumo de agrotóxicos, que ultrapassa a marca de 1 milhão de toneladas, equivalente a um consumo médio de 5,2 quilos de veneno agrícola por habitante por ano <sup>11-13</sup>.

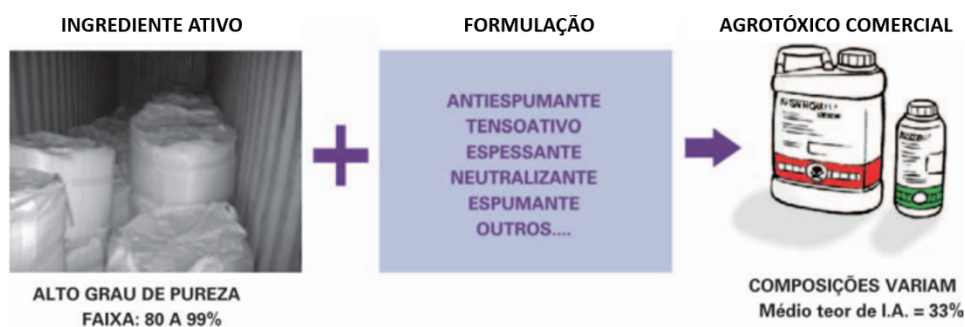
A utilização intensa destes agentes químicos é responsável por inúmeras doenças, tornando-se um grande problema de saúde pública <sup>11</sup> e ambiental, uma vez que estes agentes contaminam a água <sup>14, 15</sup>, o solo e os alimentos <sup>16-19</sup>.

### 1.1 Agrotóxicos

Os agrotóxicos são amplamente utilizados em nosso ambiente <sup>20</sup>, principalmente no Brasil e a liberação do uso de organismos geneticamente modificados <sup>21</sup> foi responsável por colocar o país no topo do *ranking* mundial no consumo de agrotóxicos <sup>22</sup>, destacando os herbicidas glifosato, ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D), hexazinona e atrazina como os agrotóxicos mais utilizados no Brasil, no Estado de São Paulo, incluindo a região de Barretos <sup>23</sup>.

Os agrotóxicos são uma mistura heterogênea constituída de agentes químicos sintéticos produzidos laboratorialmente (Figura 1), visando prevenir efeitos de pragas <sup>24</sup>. A produção destes químicos é sucedida em duas etapas: a) manufatura, que produz o ingrediente ativo (IA) ou princípio ativo (PA) de forma sintética, sendo esta a substância que irá atuar no seu

alvo e b) formulação, que, por diluição em solventes (mistura física de vários ou de um herbicida e “componentes não ativos”), auxilia o transporte desses princípios ativos até o seu alvo <sup>13, 24, 25</sup>. Essas formulações permitem uma ação mais eficaz e de maior seletividade <sup>26, 27</sup>.



**Figura 1** - Composição do agrotóxico comercial (Imagem adaptada: Rabelo et al.; 2010 <sup>28</sup>).

Os agrotóxicos, dependendo da sua formulação, podem ser semi-voláteis ou formar precipitados rapidamente, sendo classificados de acordo com o grupo químico (exemplo, organofosforados, organoclorados, glicina substituída), alvo (herbicidas, fungicidas e inseticidas) e o modo de ação no organismo alvo (exemplo, inibidor dos canais de cálcio) <sup>13, 24, 25</sup>.

## 1.2 Legislação brasileira e internacional em relação ao uso de agrotóxicos

A agricultura detém quase 50% da mão de obra mundial <sup>29</sup>. O meio ambiente e a saúde dos trabalhadores devem ser protegidos dos efeitos adversos de substâncias tóxicas no local de trabalho. E, devido ao grande uso de agrotóxicos e sua toxicidade intrínseca, se torna necessária uma avaliação rigorosa antes do mesmo ser comercializado, o que requer uma legislação específica e complexa, como ocorre na maioria dos países.

No Brasil, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são os órgãos governamentais responsáveis por avaliar e classificar os agrotóxicos e estimar o potencial de periculosidade ambiental <sup>30</sup>. Estes órgãos levam em consideração suas propriedades (exemplo, propriedades físico-químicas, densidade, solubilidade, constante de dissociação, pressão de vapor, meia vida), associadas aos testes toxicológicos, ecotoxicológicos e dados obtidos na literatura, para estimar como

estas substâncias irão se comportar no ambiente <sup>28</sup>. Caso haja alguma irregularidade, as empresas são responsáveis por fazer as devidas alterações.

A classificação segundo o IBAMA leva duas categorias, e estas aparecem nos rótulos das embalagens de cada agrotóxico:

- Classificações dos agrotóxicos referentes aos perigos que estes podem causar ao ambiente resultam em diferentes classes toxicológicas: Classe I, produtos impeditivos de obtenção de registro, produtos altamente perigosos ao meio ambiente; Classe II, produtos muito perigosos ao meio ambiente; Classe III, produtos perigosos ao meio ambiente; Classe IV, produtos pouco perigosos ao meio ambiente <sup>31</sup>.
- Classificação referente aos efeitos dos agrotóxicos à saúde humana resulta também em classes toxicológicas e identificações por cor: Classe I (faixa vermelha) extremamente tóxico; Classe II (faixa amarela), altamente tóxico; Classe III (faixa azul), medianamente tóxico; Classe IV (faixa verde) pouco tóxico <sup>31</sup>.

Nos Estados Unidos da América (EUA, do inglês *United States of America*), a entidade reguladora é a Agência de Proteção Ambiental (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*). Por outro lado, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) é um braço da Organização Mundial da Saúde que avalia a carcinogenicidade de compostos ou substâncias classificando-os como carcinógenos. Outras organizações também responsáveis ou que auxiliam nas avaliações são: a Organização Alimentar e Agrícola (FAO, do inglês *Food and Agricultural Organization*), e a Organização para o Desenvolvimento da Cooperação Econômica (OECD, do inglês *Organization for Economic Cooperation Development*).

### **1.3 Herbicidas 2,4-D, atrazina, glifosato e hexazinona**

Os herbicidas são substâncias químicas capazes de controlar grupos de plantas daninhas de modo não-seletivo ou seletivo <sup>32</sup>. Os herbicidas não-seletivos, como por exemplo o glifosato, não atuam em um grupo específico de plantas, sendo conhecidos como herbicidas de ação total <sup>33</sup>. Já os herbicidas seletivos são capazes atuar em um grupo de plantas, como por exemplo, as monocotiledôneas <sup>32</sup>. Um dos mecanismos de ação dos herbicidas seletivos é através da mimetização do hormônio auxina, que ocasiona alterações metabólicas na planta. Dentre as auxinas sintéticas, existem quatro grupos químicos: fenoxialcanoatos (2,4-D, 2,4-

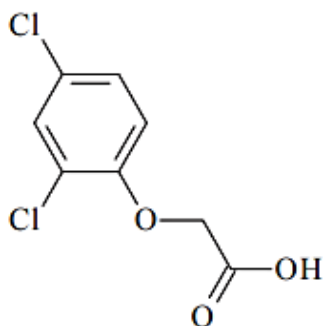


DB, MCPA e MCPB), benzoatos (dicamba), piridinacarboxilatos (*clopyralid*, *fluroxipyr*, *picloram* e *triclopyr*) e quinolinocarboxilatos (quinclorac e quinmerac) <sup>34, 35</sup>.

Outra classificação dos herbicidas é de acordo com o seu manejo, que pode ser de pré-emergência e/ou pós-emergência. A aplicação do herbicida pré-emergência é utilizada antes da presença de ervas daninhas ocorrendo antes ou depois da semeadura, e a aplicação pós-emergência ocorre durante a germinação das sementes semeadas e estágios iniciais das plantas daninhas <sup>32</sup>.

### 1.3.1 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

O 2,4-D (Figura 2) é utilizado por mais de 60 anos, foi o primeiro herbicida sintético a ser desenvolvido comercialmente <sup>36</sup>. Pertencente ao grupo ácido hidrocarboneto aromático clorado, este herbicida é classificado como um herbicida hormonal e mimetiza a ação da auxina em espécies de dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas, que incluem gramíneas e culturas de folhas estreitas como trigo, milho, arroz e cereais similares <sup>35</sup>. Song Y. <sup>37</sup> relata que a exposição a baixas concentrações do herbicida 2,4D em plantas promove o crescimento, e sua exposição a altas concentrações induz um crescimento excessivo e anormal <sup>38, 39</sup>.



**Figura 2** - Estrutura molecular do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Este herbicida apresenta várias formulações comerciais e pode ser encontrado sozinho ou associados a outros herbicidas, por exemplo, *dicamba*<sup>®</sup> (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico), *mecoprop*<sup>®</sup> (ácido metil chlorofenoxipropionico, MCP), *mecoprop-P*<sup>®</sup> (O (R) - (+) enantiômero do mecoprop), MCPA<sup>®</sup> (ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético), *picloram*<sup>®</sup> (ácido 4-amino-3,5,6 tricloropicolínico) e *clopyralid*<sup>®</sup> (ácido 3,6-dicloro-piridina-2-carboxílico) <sup>40</sup>.

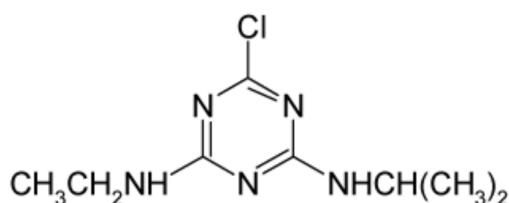
Recentemente o ácido 2,4-diclorofenoxiacético foi classificado como possivelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2B) pela IARC Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency For Research on Cancer*), e como nível toxicológico I de acordo com a ANVISA. Atualmente, o uso anual ocupa o primeiro e o quinto lugar entre os herbicidas nos mercados residenciais e agrícolas, respectivamente nos Estados Unidos<sup>41</sup>. O 2,4-D tem uma meia-vida no ambiente de 2 a 13 dias<sup>42</sup> e é rapidamente eliminado do corpo humano sem ser metabolizado ou acumulado no tecido<sup>43</sup>. Os principais sistemas alvos do 2,4-D são: o sistema nervoso central e o sistema cardiovascular<sup>44</sup>.

Apesar da toxicidade de 2,4-D, os mecanismos de ação possivelmente envolvidos na carcinogenicidade, mutagenicidade ou genotoxicidade ainda não são totalmente compreendidos.

### 1.3.2 Atrazina

A atrazina (ATZ) (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) (figura 3) é um agrotóxico pertencente à família das triazinas (2-chloro-s-triazine)<sup>45</sup> utilizado amplamente na agricultura como pré e pós-emergência nas culturas de abacaxi, cana-de-açúcar, milho, pinus, seringueira, sisal e sorgo, e classificado toxicologicamente como nível III pela ANVISA. Este herbicida é moderadamente persistente no ambiente, sendo encontrado em águas da superfície e subterrâneas<sup>46, 47</sup>, o que pode ocasionar uma exposição não-ocupacional.

Gammon et al.<sup>48</sup> estabeleceram que os valores de dosagem absorvidos pelo organismo durante a exposição ocupacional variou entre 1,8-6,1 ug/kg/dia, persistindo no corpo durante 24 horas. Em outro estudo, demonstrou-se que os metabólitos da ATZ foram detectados na urina após 48 horas do contato com o herbicida<sup>49</sup>.



**Figura 3** - Estrutura molecular do herbicida Atrazina.

Estudos epidemiológicos associam a exposição às triazinas com risco aumentado para o câncer de ovário e mama em mulheres <sup>50, 51</sup>, próstata <sup>52</sup> e linfoma não Hodgkin <sup>53</sup>. Estudos *in vitro* demonstraram que o herbicida atrazina não se acopla ou não ativa o receptor de estrogênio, mas regula a atividade da aromatase em células de tumor sensíveis ao estrogênio e que pode desencadear diversos efeitos na carcinogênese <sup>54</sup>. Também há evidências que a exposição *in vitro* <sup>55, 56</sup> a atrazina gera danos à fita de DNA, ocasionando instabilidade genômica, porém outros estudos sugerem que a exposição a este agrotóxico causa um efeito genotóxico mínimo <sup>57, 58</sup>.

Dado as evidências e ao potencial da atrazina de interferir na reprodução e causar câncer, a União Europeia banuiu o seu uso <sup>59</sup>, porém no Brasil ainda é liberado a comercialização.

### 1.3.3 Glifosato

O glifosato (GLY) (Figura 4) é um herbicida sistêmico não-seletivo utilizado como pós-emergência nas culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, entre outros, conhecido comercialmente como *Roundup* e popularmente como mata-mato. Comercializado com diversas formulações, este é classificado toxicologicamente como IV segundo a ANVISA e provavelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2A) pela IARC. Este herbicida pertence à primeira linha e é amplamente utilizado no mundo, sendo um dos principais poluentes de rios e águas superficiais <sup>60, 61</sup>. Dessa forma, este composto pode contaminar organismos, incluindo os seres humanos, por meio de alimentos, vias respiratórias e da contaminação do ecossistema <sup>62-64</sup>.

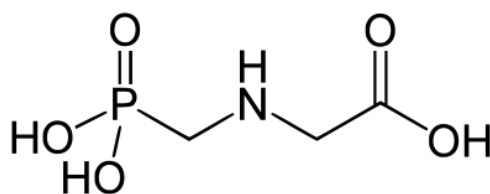


Figura 4 - Estrutura molecular do herbicida glifosato.

A ampla utilização do GLY é agravada pela utilização de plantas comestíveis geneticamente modificadas que são produzidas para tolerar altas doses deste composto <sup>65, 66</sup>. Gasnier *et al.* <sup>65</sup> verificaram efeitos citotóxicos e danos no DNA na linhagem celular de

carcinoma de fígado humano HepG2 causados pelo glifosato, verificando não só o princípio ativo, mas também as formulações comerciais.

De Farge *et al.* <sup>67</sup> testaram o efeito do glifosato e algumas formulações comerciais como disruptor endócrino e estabeleceram a diminuição da atividade da aromatase em células de coriocarcinoma de placenta humana. Mesnage *et al.* <sup>68</sup> realizaram análises do transcriptoma em linhagens celulares de rim e fígado de camundongos expostos a doses crônicas de glifosato e revelaram genes super expressos envolvidos no *splicing* de RNA mensageiro, pequenos RNAs nucleares, controle da estrutura da cromatina, além de vias envolvidas na modulação de mTOR.

Dessa forma, é importante determinar o real impacto do princípio ativo glifosato e também das suas formulações em outros tipos de células humanas e determinar a possível relação com o epigenoma, o que pode elucidar o seu papel como provável carcinógeno.

#### 1.3.4 Hexazinona

A hexazinona (HEX) (Figura 5) foi registrada pela primeira vez em 1976 para uso como herbicida industrial em vias de acesso ferroviário, rodoviário e de serviços públicos, e áreas de armazenamento <sup>69</sup>. Este herbicida pertence à família das triazinonas e é utilizado principalmente na cultura de cana-de-açúcar com manejo de pré e pós-emergência. Este é classificado como grupo toxicológico III pela ANVISA.

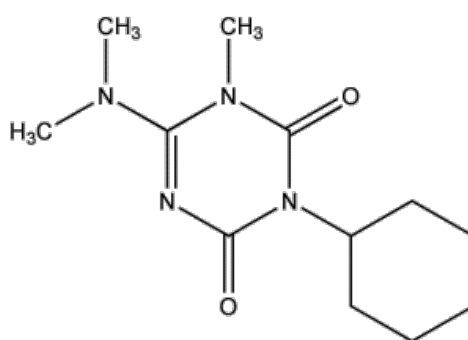


Figura 5 - Estrutura molecular do herbicida Hexazinona.

Estudos realizados em células de ovário de Hamster Chinês (CHO) e em *Salmonella typhi* demonstram baixa citotoxicidade e mutagenicidade à exposição a hexazinona <sup>70</sup>. Pouco se sabe sobre os aspectos moleculares deste herbicida, fazendo-se necessário um maior entendimento sobre o seu mecanismo de ação.

#### **1.4 O risco da exposição ocupacional e o Limite de exposição ocupacional aos agrotóxicos**

Os agricultores são os indivíduos mais expostos aos agrotóxicos, certamente devido a ocupação. Estudos epidemiológicos revelam uma incidência aumentada de alguns tipos de cânceres entre os agricultores dos Estados Unidos <sup>71, 72</sup>, tais como câncer de pele, tumores de próstata, tumores de mama e ovário, tumores cerebrais, câncer de pulmão, linfoma não-Hodgkin, leucemias e mielomas múltiplos <sup>13</sup>.

A exposição aos agrotóxicos ocorre, principalmente, durante atividades laborais <sup>29, 73, 74</sup>. Estima-se, também, que em todos os setores da agricultura, desde a produção, transporte e aplicação, haja um grau de exposição ocupacional <sup>29, 75</sup>. Um levantamento realizado por Bolognesi <sup>24</sup> descreve uma associação positiva entre a exposição aos agrotóxicos e a presença de alterações cromossômicas, trocas de cromátides-irmãs e micronúcleos (MN) em uma população ocupacionalmente exposta (produtores de agrotóxicos, aplicadores, agricultores e floricultores). Estes danos estão diretamente relacionados a processos de instabilidade genômica <sup>76</sup> e podem variar de acordo com o grau de exposição e o contato com os agrotóxicos, que pode ser acentuado devido a falhas na segurança do trabalho, como o manuseio inadequado <sup>77</sup>.

A formulação, o local, modo de aplicação dos agrotóxicos, frequência de uso, higiene pessoal, mau uso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) e derramamentos acidentais são alguns dos fatores de exposição que podem interferir no tipo de exposição sofrida pelos indivíduos <sup>78-81</sup>. As primeiras vias de contato dos agrotóxicos são por inalação (via respiratória) ou por absorções dérmicas, seguidas das exposições digestivas e por contato ocular <sup>82, 83</sup>. A exposição respiratória em agricultores chega a totalizar 10% em relação às outras exposições ocupacionais <sup>82</sup>. Essa exposição pode ocorrer devido a algumas dessas substâncias serem incolores, inodoras e voláteis, além de poderem ser inaladas através de material particulado (MP) contaminado e por uso dos métodos de pulverização e spray <sup>74, 84, 85</sup>.

Estas exposições ocupacionais podem desencadear, a curto prazo, problemas à saúde como irritações, intoxicações e/ou problemas crônicos e, a longo prazo, distúrbios neurológicos, alterações no sistema reprodutivo, abortos, malformações, desregulação hormonal, efeitos sobre o sistema imunológico e câncer <sup>13</sup>.

Um número grande de pesticidas estão ligados com a causa de vários tipos de cânceres, segundo investigações epidemiológicas <sup>20</sup> e, devido ao amplo uso dos agrotóxicos e de sua

toxicidade, torna-se necessária uma avaliação criteriosa e uma legislação específica e complexa para comercialização destes produtos.

Os toxicologistas levam em consideração os efeitos agudos e crônicos causados pelos agentes químicos. Assim, avaliam os riscos que estes causam para a saúde no ambiente de trabalho e combinam isso com avaliações de exposição para caracterizar o risco de efeitos adversos para a saúde. Estes profissionais propõem limites de exposição ocupacional (LEO) para reduzir os riscos a níveis aceitáveis e estes variam de país para país e até mesmo entre instituições <sup>86, 87</sup>. Os LEOs são atualizados periodicamente e a tendência é que estes valores sejam cada vez menores conforme elucidação dos efeitos das substâncias químicas <sup>87</sup>.

No Brasil, os LEOs são denominados Limites de Tolerância (LT) e estão estabelecidos nos Anexos 11 e 12 da Norma Regulamentadora nº 15 LT do Ministério do Trabalho e Emprego <sup>32</sup>.

### **1.5 Os agrotóxicos e o câncer**

O câncer está entre as doenças que mais acometem a população mundial <sup>88</sup>. Somente no Brasil calcula-se que para os anos de 2018-2019 surjam cerca de 600 mil novos casos <sup>89</sup>. A exposição a algumas substâncias químicas ambientais pode contribuir consideravelmente para o surgimento dessas neoplasias. Acredita-se que a exposição a substâncias cancerígenas aconteça principalmente no ambiente de trabalho. Estima-se que de 2% a 8% dos cânceres em todo o mundo são consequência da exposição ocupacional <sup>90, 91</sup>.

É de fundamental importância a identificação de fatores ambientais que possam aumentar o risco de câncer em humanos e, desde 1971, o Programa de Monografias da IARC (*International Agency For Research On Cancer*) já avaliou quase 1000 substâncias. Estas avaliações são baseadas em revisões sistemáticas, bioensaios e testes experimentais *in vitro* e *in vivo*, nos quais verificam possíveis mecanismos que possam estar envolvidos na carcinogênese humana <sup>92</sup>. Em 2015, o IARC publicou a Monografia volume 112 que classificou o herbicida glifosato e os inseticidas malationa e diazinona como prováveis agentes carcinogênicos para humanos (Grupo 2A) e os inseticidas tetraclorvinfós e parationa como possíveis agentes carcinogênicos para humanos (Grupo 2B) <sup>93</sup>. Vale destacar que a malationa, a diazinona e o glifosato são autorizados e amplamente utilizados no Brasil como inseticidas em campanhas de saúde pública para o controle de vetores e na agricultura <sup>22</sup>.

A indução do câncer por substâncias químicas exógenas envolve o acúmulo de vários eventos moleculares (alterações genotóxicas e epigenéticas, dentre outros) e celulares

(alteração da proliferação celular, inflamação, dentre outros) para que ocorra uma transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica maligna<sup>94, 95</sup>. Esse processo de malignização leva tempo para que ocorra e está sujeito a influência de vários fatores, desde a capacidade da célula reparar os danos ou entrar em apoptose ou sofra um ataque do sistema imunológico, entre outros<sup>96</sup> (Figura 6). Estes processos da carcinogênese podem deixar marcas características que possibilitam o biomonitoramento de indivíduos expostos aos agentes químicos.



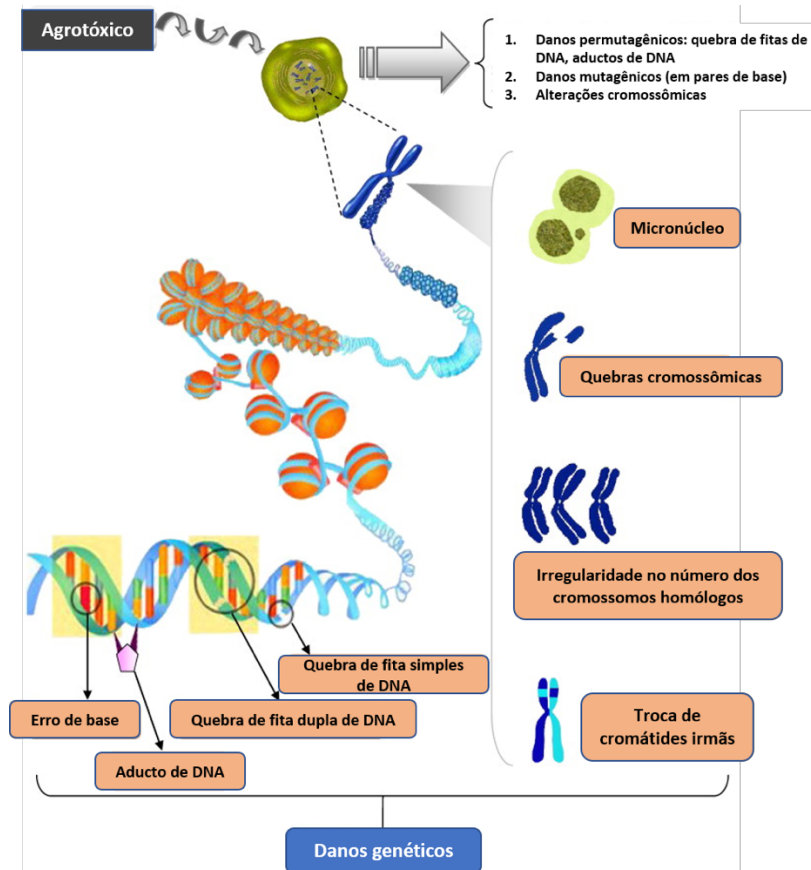
**Figura 6** - Multiestágios da carcinogênese ( Imagem adaptada: Klauning, 2011<sup>96</sup>).

Os ensaios de biomonitoramentos já são bastante utilizados em diversos países para avaliar populações expostas a diversos agentes químicos, como o agrotóxico, com enfoque em análises de modificações genômicas. Por outro lado, são fundamentais os estudos utilizando-se linhagens celulares, determinando a citotoxicidade e a genotoxicidade *in vitro* com o intuito de elucidar o risco associado à exposição aos compostos específicos ou classes de compostos<sup>24, 77, 97</sup>.

### 1.5.1 Agrotóxico e genotoxicidade

A exposição das células a alguns agrotóxicos acarreta uma instabilidade genômica. Essa instabilidade do genoma é definida como uma taxa aumentada de mutações adquiridas pelo genoma<sup>98</sup>, que podem ser desencadeadas por danos genotóxicos. A genotoxicidade é um processo de interação entre agentes químicos com alvos celulares e/ou com o DNA, formando aductos de DNA, quebras de fita simples e/ou duplas de DNA, mutações pontuais e

alterações estruturais e numéricas a nível cromossômico <sup>99, 100</sup> (Figura 7). Estas alterações, se não reparadas, podem desempenhar um papel importante na carcinogênese.



**Figura 7** - Esquema dos efeitos genotóxicos ocasionados pela exposição aos agrotóxicos (Imagem adaptada: Mustafalou et. Al <sup>101</sup>)

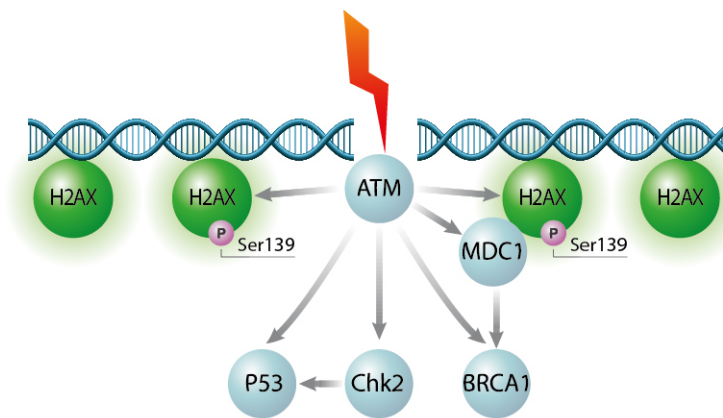
O potencial genotóxico de um químico é um fator de risco para efeitos a curto e longo prazo, tais como, carcinogênico, reprodutivo e de doenças degenerativas <sup>101</sup>. Diversas são as metodologias utilizadas para a avaliação da genotoxicidade e determinação de um possível potencial carcinogênico dos químicos. Estes ensaios auxiliam a identificar defeitos herdados ou adquiridos no reparo do DNA de fita dupla, na replicação do DNA, no controle do ciclo celular ou na segregação dos cromossomos. Podemos citar, dentre estas metodologias o Teste de Micronúcleo, e a análise de fosforitação da H2AX.

A H2AX é uma variante da família das histonas H2A e constitui cerca de 2,5 a 25% do total de histonas no genoma de mamíferos <sup>102</sup>. A H2AX desempenha um papel importante na preservação da integridade do genoma, pois quando ocorre quebras de fita dupla no DNA a ser139 da H2AX torna-se imediatamente fosforilada ( $\gamma$ H2AX) ativando as vias de respostas aos



danos no DNA <sup>103</sup> (Figura 8). Vários estudos apontam que a  $\gamma$ H2AX é um evento precoce na resposta ao dano do DNA de fita dupla e está presente em lesões pré-neoplásicas <sup>103, 104</sup>.

A análise da fosforilação da histona H2AX é mais recente e um sensível teste de genotoxicidade. Estudo avaliando agrotóxicos demonstrou que a sua exposição a quatro linhagens celulares humanas (ACHN, SH-SY5Y, LS-174T e HepG2) ocasionou um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e da  $\gamma$ H2AX <sup>105</sup>. Hershman et al. (2017) avaliou 309 agrotóxicos e seus achados demonstraram que 19 desses compostos foram capazes de alterar o nível de fosforilação da H2AX <sup>106</sup>.

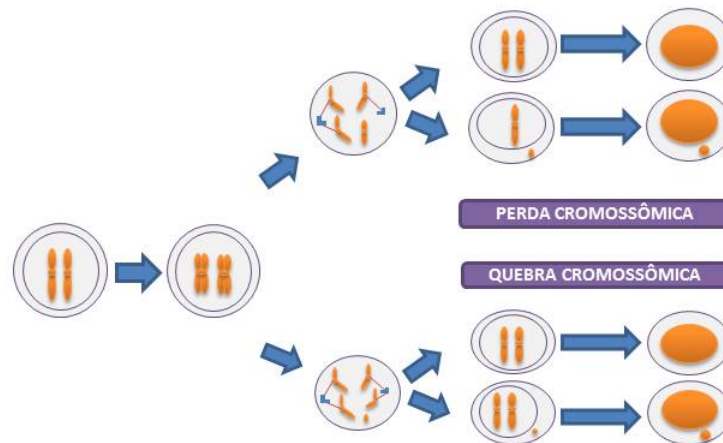


**Figura 8** - Esquema da fosforilação da histona H2AX e o recrutamento de proteínas de reparo e do ciclo celular. A fosforilação de H2AX é um evento precoce na resposta do quebra de fita dupla de DNA, levando a alterações estruturais no local danificado para promover o reparo do DNA. Após o início próximo à quebra por ATM, a amplificação ocorre pela propagação da ação da ligação de MDC1 que por sua vez, recruta o complexo MRN, ativando ainda mais o ATM. Isso gera um ciclo de feedback positivo para afastar a fosforilação da ruptura

Estudos realizado com a ATZ e mais cinco tipos de agrotóxicos na linhagem celular de mama (MCF7) e linfócitos aumentou Fosforilação de H2AX ( $\gamma$  H2AX) e formação de focos de  $\gamma$  H2AX nos núcleos das células <sup>55, 107</sup>.

O teste do Micronúcleo é um teste citogenético que avalia a exposição de células a agentes químicos, a fim de detectar alterações a níveis cromossômicos <sup>108</sup>. Este teste foi descrito pela primeira vez em 1975 por Schimidt W. <sup>109</sup>. Os MN são pequenos corpos de cromatina extra nucleares envolvidos por um envelope nuclear <sup>110</sup>. E são originados a partir de fragmentos cromossômicos ou perdas cromossomos inteiros, que durante a divisão celular foram expulsos do núcleo principal <sup>110</sup> (Figura 9). Os MN são detectados com o uso de uma substância chamada Citocalasina B que bloqueia a citocinese permitindo o acúmulo de células

binucleadas . A análise em células binucleadas possibilita uma medida mais precisa da frequência de células com MN, sendo necessário avaliar o dobro de células mononucleadas para observar o mesmo nível de danos nas binucleadas <sup>108</sup>.



**Figura 9** - Alterações cromossômicas que dão origem ao Micronúcleo.

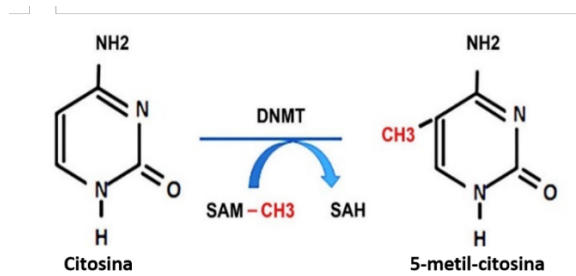
Estudos de genotoxicidade *in vitro* realizados com diversos tipos de agrotóxicos detectaram quebras de fita dupla de DNA em linhagens celulares humanas de tireóide e de fígado e outros tipos celulares, <sup>55, 56, 111-113</sup>. Estudos também demonstram que a exposição aos herbicidas glifosato e 2,4,-D *in vitro* ocasionou surgimento de alterações cromossômicas e as alterações nos níveis de estresse oxidativo <sup>114-116,117</sup>, ocasionando instabilidade genômica *in vitro* .

### 1.5.2 Agrotóxico e epigenética

Novas evidências demonstram que substâncias químicas além de modificar as sequências de DNA também tem a capacidade de ocasionar alterações nos padrões epigenéticos das células <sup>118</sup>. As modificações epigenéticas modulam a expressão dos genes sem modificar a sequência do DNA, permitindo ou não o acesso da maquinaria de transcrição genética ao sítio de transcrição do gene <sup>119</sup>. As modificações epigenéticas consistem na metilação da molécula de DNA, modificações das histonas e RNAs não codificantes <sup>30, 120</sup> e essas modificações são hereditárias <sup>121</sup>.

A metilação do DNA regula muitos processos celulares, tornando-se essencial para o desenvolvimento normal e manutenção da homeostase celular <sup>122, 123</sup>. A metilação do DNA é uma modificação covalente, que consiste na adição do radical metil (CH<sub>3</sub>) ao carbono 5' da

citosina. Essa adição do radical metil é mediada pelas enzimas DNAs metiltransferases (DNMTs), utilizando a S-adenosilmetionina (SAM) como doadora do radical metil e assim originando uma 5-metil-citosina (5MeC) (Figura 10). As 5MeC ocorrem tipicamente no contexto de dinucleotídeos CpGs e representa 2-5% de todas as citosinas em genomas de mamíferos <sup>118</sup>.

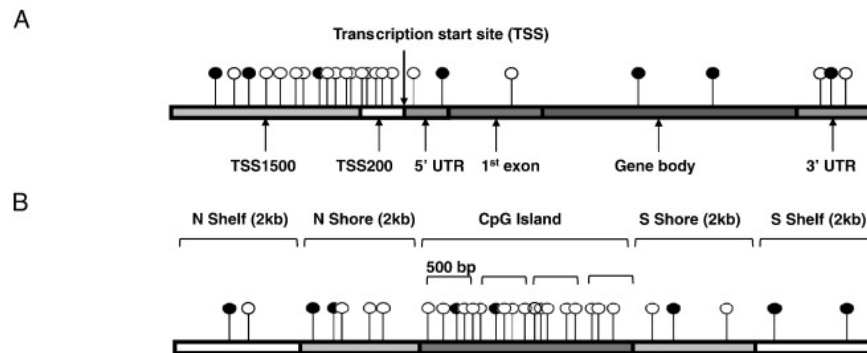


**Figura 10** - Modelo representativo do processo de metilação do DNA.

A metilação do DNA é frequentemente associada ao silenciamento gênico (figura 10) e é resultante de dois processos: o primeiro é a manutenção dos processos de metilação e desmetilação que ocorrem durante a replicação do DNA com auxílio da DNA metiltransferase 1 (DNMT1), que proporciona uma preservação do perfil de metilação do tecido. O segundo são os processos de metilação e desmetilação *de novo* mediados pelas DNA metiltransferase 3a (DNMT3a) e DNA metiltransferase 3b (DNMT3b), que normalmente acontecem durante a embriogênese <sup>124, 125</sup>.

Estima-se que o genoma humano contenha aproximadamente 29.000.000 de sequências CpG e a sua distribuição ocorre de forma não aleatória. As regiões contendo CpG metilados são encontradas em menor frequência em todo o genoma, predominantemente em **regiões repetitivas** do genoma (ex. LINE, SINE). Já os CpGs não metilados apresentam-se em maior frequência e estão localizados preferencialmente em regiões de **ilhas CpGs** (CGIs, do inglês *CpG islands*) no estado normal das células. As CGIs são regiões ricas em CGs, apresentam um comprimento de pelo menos 500kb, com um conteúdo de C+G maior que 55% e a razão entre o número de sítios CpG observado/esperado é superior a 0,65 <sup>126</sup> e se sobrepõem cerca de 60-70% das regiões promotoras de todos os genes humanos <sup>125</sup>. Outras regiões, tais como, **regiões shore** que flanqueiam até 2kb *up* e *downstream* as ilhas CpGs e apresentam uma densidade mais baixa de CpGs (Irizarry et al., 2009), e as **regiões shelves** são as regiões que flanqueiam *up* e *downstream* as **regiões shore** e também apresentam 2 kb <sup>127</sup> (Figura 11.b).

As **regiões promotoras** apresentam uma região denominada **sítio de início de transcrição** (TSS, do inglês *transcription start site*). A **TSS200** ou TSS proximal é a região de início do TSS até -200 nt e a **TSS1500** ou TSS distal é a região -200 a -1500 nt *upstream* a região TSS <sup>128</sup>. O **corpo do gene** (do inglês *Gene body*) é a região *downstream* ao **1º éxon** e de maneira geral apresenta-se amplamente metilado em células normais <sup>125</sup> (Figura 11.a).



**Figura 11 - Representação esquemática de regiões CpG. A) regiões gênicas**, que compreendem as regiões promotoras, 5' UTR, 1º Exon, Corpo do gene e 3'UTR; e **B) regiões de ilhas CpGs**, representadas por: regiões *shore* e *shelf* (N = Norte e S=Sul), e a ilha CpG (Fonte: Bibikova,2011 <sup>127</sup>).

As alterações no perfil de metilação do DNA genômico são encontradas em diversas doenças <sup>129, 130</sup>, como o câncer, e essas alterações são frequentemente utilizados como biomarcadores <sup>131</sup>. As alterações na metilação do DNA podem refletir em uma condição de estresse celular, associado com alterações no processo de apoptose, no controle do ciclo e na proliferação celular. Isto pode levar ao acúmulo de danos genéticos e epigenéticos persistentes, após sucessivas exposições a possíveis agentes carcinogênicos <sup>132</sup>.

No câncer, as principais alterações epigenéticas conhecidas englobam a hipermetilação de regiões promotoras de genes supressores tumorais e hipometilação genômica global <sup>133</sup>. A hipermetilação de **regiões promotoras** de genes supressores tumorais são caracterizadas por representar um dos primeiros passos envolvidos na carcinogênese humana <sup>134</sup>. As **regiões shore** geralmente encontram-se hipermetiladas. Os **elementos repetitivos** têm-se tornado cada vez mais reconhecidos como uma importante classe de reguladores da expressão gênica <sup>122, 135, 136</sup>, e compreendem quase a metade de todo o genoma, sendo encontrados ativados quando hipometilado <sup>136</sup>.

Diversas técnicas são utilizadas para a detecção da metilação do DNA. A conversão do DNA por bissulfato de sódio é a chave para o desenvolvimento de muitas metodologias, uma

vez que durante o processo as citocinas não metiladas são convertida em uracila e permite que as citosinas metiladas permaneçam inalteradas. Somente após essa etapa, metodologias como, pirosequenciamento, PCR em tempo real, *microarray* de DNA, são capazes de mensurar a metilação nos dinucleotídeos CpGs. Essas análises podem ser fundamentais para o descobrimento de mecanismos envolvidos na carcinogênese, que podem ser provocados pela exposição aos agrotóxicos.

Estudos realizados por Zhang et al.2012 <sup>137,138</sup> avaliaram as alterações do perfil de metilação utilizando a metodologia de *microarrays* em linhagem celular eritroleucêmica (K562) exposta a agrotóxicos (fonofos, paration, terbufos, clorpirifós, diazinon, malation, forato e diuron) nos quais, foram demonstrado uma alteração no padrão de metilação em algumas regiões promotoras de genes relacionados a carcinogênese. Em pelo menos três agrotóxicos testados (Fonofos, paration e terbufos) foram encontrados hipermetilação regiões promotoras de 712 genes. Essas alterações foram possivelmente mediadas pela exposição aos agrotóxicos testados.

Um estudo recente realizado com zebrafish demonstrou que a atrazina pode diminuir a expressão e atividade de DNMTs, levando a diminuição dos níveis de metilação do DNA <sup>139</sup>. Um outro estudo analisando o glifosato demonstrou que este herbicida, em altas concentrações, foi capaz de causar alterações na metilação e induzir danos ao DNA em células de leucócito humano <sup>140</sup>.

## 2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a região brasileira que consome mais agrotóxico é a Sudeste, com destaque para o Estado de São Paulo. Os princípios ativos mais utilizados no Brasil são o glifosato, atrazina, 2,4 -D e hexazinona, o que também ocorre na região de Barretos onde estes herbicidas estão no topo do *ranking* em consumo. O glifosato e 2,4-D foram classificados recentemente pela IARC como provavelmente e possivelmente carcinogênicos, respectivamente. Também, sabe-se que a exposição a agentes químicos ambientais pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de câncer. O câncer de pulmão é um dos mais frequentes em trabalhadores com exposição a carcinógenos no ambiente de trabalho. Sendo assim, a ocupação pode contribuir para o desenvolvimento deste tipo de câncer. No entanto, os mecanismos de atuação dos agrotóxicos e a sua relação com câncer não estão totalmente esclarecidos, indicando a importância de estudos nesta área de investigação. Apesar de existirem alguns estudos reportando a genotoxicidade dos agrotóxicos *in vitro* e *in vivo*, são escassos os trabalhos que correlacionam a exposição a agrotóxicos e o efeito destes em células pulmonares e suas possíveis alterações no padrão epigenético. Além disso, o conhecimento dos efeitos dos agrotóxicos na metilação do DNA é limitado e alterações na metilação não são consideradas nos testes de carcinogenicidade realizados pela EPA ou IARC. Assim, estudos que envolvam a ampla avaliação do perfil de metilação do DNA podem contribuir para elucidar novos mecanismos envolvidos na carcinogênese.

### 3 OBJETIVO

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade de herbicidas e o efeito da exposição no perfil de metilação em linhagem celular de pulmão.

#### 3.1 Objetivo específico

- Avaliar a citotoxicidade na presença dos agrotóxicos glifosato, atrazina e 2,4 D nas linhagens celulares A549 e HBE, utilizando o teste de MTS.
- Implementar a metodologia de micronúcleo por *High content screening* para avaliação da genotoxicidade na presença dos herbicidas glifosato e 2,4-D na linhagem HBE.
- Análise da fosforilação da histona H2AX como teste de genotoxicidade e a clivagem da proteína PARP, na linhagem HBE na presença dos herbicidas glifosato e 2,4-D.
- Avaliar do perfil de metilação da linhagem celular HBE expostas aos herbicidas glifosato e 2,4-D do genoma pela metodologia de *microarrays (Methylation arrays Illumina)*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Fluxograma do projeto

O projeto ocorreu em três etapas centrais (Figura 12) após as células serem expostas aos agrotóxicos: 1) Análise da citotoxicidade, 2) Análise da genotoxicidade e 3) Avaliação da metilação do DNA.

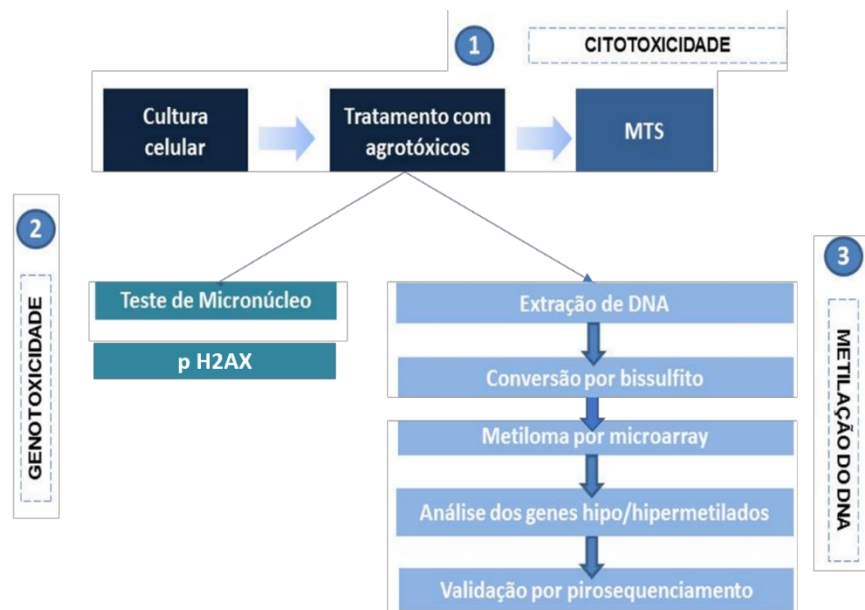


Figura 12 - Fluxograma do projeto .

### 4.2 Substâncias analisadas

As substâncias analisadas foram os princípios ativos do glifosato, atrazina, hexazinona e 2,4-D (Cas No.45521, 45330, 36129 e 36607; Sigma-Aldrich,SP,Brasil), diluídos em DMSO 1% de acordo com a literatura <sup>141</sup>. Todos os ensaios foram realizados com sete concentrações, divididas em dois grupos: a primeira, em relação ao Limite de Exposição Ocupacional (LEO); e a segunda, um gradiente de concentrações.

O primeiro grupo de concentrações apresentou três concentrações iniciais baseadas no LEO (Tabela 1): concentração um foi a concentração LEO de cada agrotóxico determinado pela ACGIH (*American Conf. of Governmental Industrial Hygienists*)<sup>142</sup>, agência no qual a legislação brasileira se baseia (Normativa 7 <sup>9, 143</sup>) e pela *U. S. Department Of Agriculture Forest*



*Service*<sup>144</sup>; a concentração dois foi a metade do LEO; e a concentração três foi o dobro do LEO conforme descrito na Tabela 1. E o segundo grupo foi um gradiente de concentrações: 0,1 µm, 1 µm e 10 µM.

**Tabela 1.** Lista de agrotóxicos e concentrações a serem utilizadas nos experimentos de acordo com o limite de exposição ocupacional.

<b>Agrotóxico</b>	<b>[ ] limite µm</b>	<b>[ ] limite x2 µm</b>	<b>[ ] limite/2 µm</b>
<b>2,4-D</b>	0,04 <sup>143, 142</sup>	0,07	0,02
<b>Atrazina</b>	0,02 <sup>143, 142</sup>	0,05	0,01
<b>Hexazinona</b>	0,08 <sup>143</sup>	0,16	0,04
<b>Glifosato</b>	-	-	-
<sup>143</sup> Normativa 7, legislação brasileira			
<sup>142</sup> ACGIH ( <i>American Conf. of Governmental Industrial Hygienists</i> )			
<sup>144</sup> U. S. Department Of Agriculture Forest Service			

### 4.3 Cultura celular

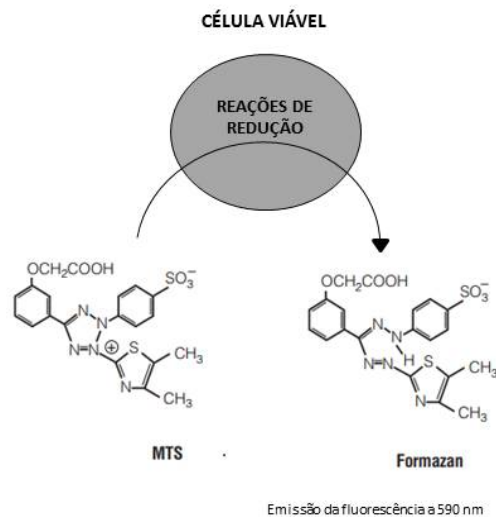
As linhagens que foram utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Professor Lester Kobzic (Harvard School of Public Health), sendo elas de adenocarcinoma de pulmão (A549) e de epitélio brônquio humano (HBE).

As células foram cultivadas em estufa a 37° C, em garrafas de cultura com meio DMEM (do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*) com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB do inglês *fetal calf serum*), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Quando as células atingiram aproximadamente 80% de confluência, elas foram lavadas com PBS (do inglês *phosphate buffer saline*) e tripsinizadas. A suspensão de células foi ajustada para as concentrações apropriadas para cada experimento.

#### 4.4 Avaliação da citotoxicidade celular

##### 4.4.1 Ensaio de viabilidade celular (MTS)

O ensaio de viabilidade celular em solução aquosa, *CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, SP, Brasil) é um método colorimétrico que determina a viabilidade celular através do composto tetrazólio [3 - (4,5-dimetil-2-il) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal interno; MTS]. O ensaio baseia-se na biorredução do composto tetrazólio por células viáveis em um produto colorido chamado formazan, que é solúvel em meio de cultura (Figura 13).



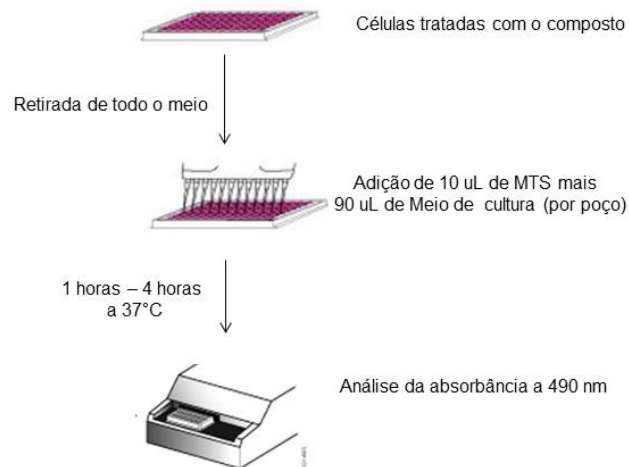
**Figura 13** - Esquema do processo celular do Ensaio MTS. Este é um método colorimétrico que permite mensurar de forma quantitativa a porcentagem de células viáveis presente no meio a partir da biorredução da molécula de MTS em formazan a partir de uma célula viável. Este processo ocorre na mitocôndria com auxílio de elétrons.

Para este ensaio (Figura 14), as células foram tripsinizadas com 0,25% de tripsina-EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) após a terceira passagem e semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade de  $5 \times 10^3$  células/poços com meio DMEM com 10% SFB. Após o período de adesão das células de 20 horas, foram adicionados novos meios (DMEM+0,5% SFB) com adição dos compostos e as células foram incubadas novamente por 24h, 48h e 72h.

Logo após a incubação, o meio com tratamento foi retirado e adicionado 10  $\mu$ l do reagente de MTS mais 90  $\mu$ l de DMEM com 0,5% de SFB a cada poço e as células foram

incubadas a 37°C por um período de 1-3 horas. A absorbância foi medida em leitor de placa de ELISA (*Varioskan Flash-Thermoscientific*) a 490 nm.

Os dados foram obtidos e normalizados em relação à sobrevivência média das amostras tratadas com o controle (0,1%). Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e experimental.



**Figura 1** - Fluxograma do ensaio de MTS. As células são plaqueadas e tratadas em uma placa com 96 poços. Após o período do tratamento, o meio é trocado por outro com a solução de MTS, passa por uma incubação até a célula viável metabolizar o composto e em seguida é transferido para o equipamento para a quantificação da absorbância.

Para a análise estatística foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5*, utilizando o teste *One-way ANOVA* (post-test *TuKey*).

#### 4.4.2 Sulforrodamina B

O ensaio de Sulforrodamina B (SRB) foi realizado de acordo com Vichai et al. 2006<sup>145</sup>, é utilizado para a determinação da densidade celular, com base na medição do teor de proteína celular. Para a realização desta metodologia a linhagem HBE foi cultivada em placas de 96 poços a uma densidade de  $5 \times 10^3$  células/poço e exposta ao herbicida 2,4-D, nos tempos de 24h, 48h e 72 h. Após o período de incubação o meio com tratamento foi aspirado, e os poços com as células foram lavados com PBS. Em seguida, foram adicionados 100 ul de TCA 10% gelado e incubado por 1 hora a 4 °C. Após o período de incubação, os poços com células foram lavados 5 vezes com água corrente e deixados para secar por 24 horas. Logo após, foram adicionados 50 ul de SRB e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi

lavado rapidamente com ácido acético 1% e deixado secar todo o resquício de líquido. Foi adicionado 100 µl de Tris 10 nM, incubado por 5 minutos em um agitador e realizado a leitura (570nm, com background de 690 nm).

Para a análise estatística foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5*, utilizando o teste *One-way ANOVA* (post-test *T*)

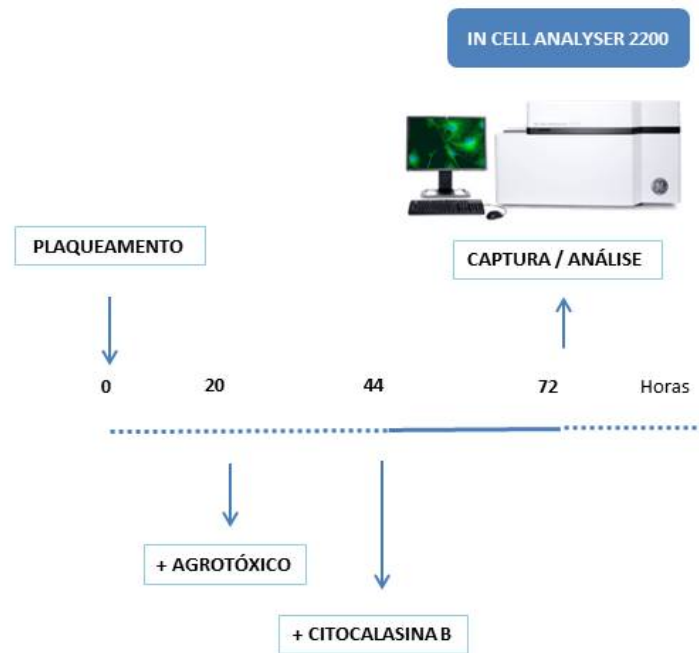
## **4.5 Avaliação da genotoxicidade celular**

### **4.5.1. Ensaio do Micronúcleo**

O ensaio do micronúcleo foi padronizado conforme instruções do fabricante seguindo o protocolo *Analyzis of in vitro micronucleus assay using the IN Cell analyzer 2200 micronuclei formation analysis module* <sup>146, 147</sup>. O microscópio de fluorescência *IN Cell analyzer 2200* permite uma análise em larga escala, no qual são realizadas várias capturas de imagens e em seguida analisado em um software que permite uma maior sensibilidade na contagem de células binucleadas em um menor tempo.

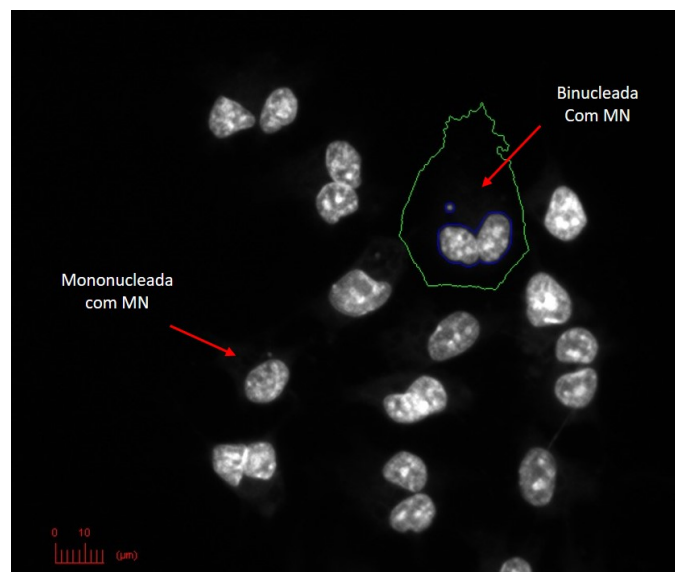
Para a realização desta metodologia (Figura 15) a linhagem HBE foi cultivada em placas de 96 poços (placa escura) a uma densidade de  $3,5 \times 10^3$  células/poço e expostas a dois herbicidas (Gly e 2,4-D, e o DMSO 1%, como controle do veículo. Posteriormente estas células foram incubadas e tratadas com 5 µm de citocalasina B, um inibidor de citocinese e novamente incubadas durante 24h. Após a incubação, os poços foram lavados com PBS e as células foram fixadas com etanol a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 µl/poço de FITC, um marcador de citoplasma. Finalmente as células foram lavadas com PBS afim de se retirar o excesso de sonda e adicionado 5µl/poço, de Hoechst 33342, com finalidade de marcar o núcleo celular.

As imagens foram capturadas no equipamento *IN Cell analyzer 2200*. Todas as aquisições de imagem seguem um padrão, onde são determinados 16 campos de captura de cada poço e com a distância entre os campos de x:300 e y:400, para que seja possível captar principalmente o meio do poço, onde as células estão mais espalhadas. Ao final da captura o equipamento libera um arquivo no formato .xdce para ser analisado por outro ao software.



**Figura 15.** Fluxograma do ensaio do Micronúcleo. Após 20 horas a adesão das células ao fundo da placa, as células são tratadas com os compostos, 24 horas depois há a adição da citocalasina B (bloqueia a citocinese) e mais 24 horas depois, as células são fixadas, coradas e capturadas pelo equipamento *IN CELL ANALYSER 2200*.

Para a análise das imagens adquiridas foi utilizado o software *Developer*, onde todos os parâmetros como, contagem de células, formação de células mononucleadas, binucleadas e formação de micronúcleos são ajustados (Figura 16).



**Figura 16** - Células binucleadas e mononucleadas com micronúcleo.

O protocolo desenvolvido para a análise foi realizado pela equipe da GE empresa responsável pelo equipamento. O software permite a exportação de uma tabela em formato Excel, onde podem ser realizados os cálculos estatísticos.

Para as análises estatísticas do ensaio de micronúcleo foi realizada uma média da porcentagem de dois experimentos e avaliado o desvio padrão das médias. Todas as médias de cada condição foram comparadas ao controle, ou seja, o veículo DMSO na concentração 0,1 % diluído em meio DMEN. Para as análises estatísticas foi utilizado o método não-paramétrico de Man-Whitney e considerado para as análises um valor de  $p < 0.05$

#### **4.5.2 Análise da fosforilação da histona H2AX e clivagem de PARP por *Western Blot***

Para avaliação da modulação das vias de sinalização intracelulares pelos compostos, a linhagem HBE foi cultivada em DMEM (10% SFB) em placas de cultura de 6 poços, na densidade de  $7 \times 10^5$  e mantidas em cultura até atingirem 85% de confluência. As células foram tratadas com os herbicidas GLY e 2,4-D com os compostos diluídos em DMEM (0,5%SFB), e mantidas em tratamento por 24 h e 72 h. Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e soltas com cell scraper (BD Biosciences, cód. 353086) em tampão de lise contendo 50 mM de Tris (PH 7.6-8.0), 150 mM NaCl, 5 mM de EDTA, 1 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM de NaF, 10 mM de pirofosfato de sódio, 1% NP-40, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de leupeptina, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de aprotinina, 1 mM de DTT, 0,01 M de EDTA e 1 mM de PMSF. As células foram incubadas por 60 minutos no gelo. O conteúdo proteico foi quantificado por Bradford. A análise de *Western blot* foi realizada utilizando um gel padrão de 10% SDS- PAGE (acrilamida/bis-acrilamida 29:1), levando 20  $\mu\text{g}$  de proteína por canaleta. A corrida foi realizada em condições desnaturantes, a 90 volts, em gel 14 x 16 cm, por 2 horas. Após a eletroforese, as bandas proteicas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Amersham Protram supported 0,45  $\mu\text{m}$  NC, GE Healthcare) utilizando-se tampão com 25 mM de Tris, 193 mM de glicina e 20% de metanol.

A transferência foi feita em cuba semi-seca (Trans-Blot Turbo- Biorad) por 30 minutos, sendo a amperagem estabelecida em função da área da membrana.

Após a transferência das bandas de proteínas, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 45 minutos em uma solução constituída de leite em pó desnatado a 5%, em tampão TBS-T (Tris Buffered Saline, 10 mM de tris-HCl pH 7,4 e 0,9% de NaCl, Tween 0,2%), à temperatura ambiente sob agitação leve e depois, lavada duas vezes em tampão TBS-tween

0,2%, por 10 minutos. Todos os anticorpos foram diluídos segundo as recomendações do fabricante e armazenados a -20°C. Os anticorpos utilizados neste trabalho estão mostrados na Tabela 2 com as respectivas informações e diluições utilizadas.

Tabela 2. Informações dos anticorpos utilizados.

<b>anticorpo</b>	<b>Concentração</b>	<b>origem</b>
<b>H2AX fosforilada</b>	1:1000	rabbit
<b>H2AX total</b>	1:1000	rabbit
<b>PARP</b>	1:1000	rabbit

#### **4.6 Avaliação da metilação do DNA por *microarrays***

##### **4.6.1 Extração de DNA**

A extração de DNA da linhagem celular HBE exposta aos princípios ativos glifosato e 2,4-D foram realizadas de acordo com o *kit QiAamp DNA mini Kit (Qiagen)*.

Após o período de 72 horas de exposição, todo o meio foi removido. Foi adicionado 200 µl de PBS e 200 µl de tampão de lise a cada poço e, em seguida foi realizada uma etapa de lise por atrito com a ponteira para que tivesse um melhor rendimento no DNA total. Após a lise manual, foi adicionado 50 µl de proteinase K a cada poço, para que as proteínas e DNAses fossem degradadas. Todo o volume foi transferido para um tubo *ependorf*, agitado no vortex por 15 segundos e aquecido a 56°C por 10 minutos a temperatura ambiente. Esse procedimento de aquecer e agitar também auxilia na lise celular. Posteriormente, foi adicionado 50µl de etanol 100% (gelado) para que a água presente entre os sulcos de DNA se retirasse, permitindo que o DNA se condensasse. Foi levado ao vortex por 15 segundos e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente. Após essa etapa, todo o conteúdo do tubo foi transferido para a coluna de sílica. A coluna foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto e 30 segundos. O tubo coletor foi trocado e foi adicionado 500 µl de Buffer AW1, centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto e 30 segundos. Novamente o tubo coletor foi trocado e adicionado o Buffer AW2 à coluna de sílica. Centrifugado a 8.000 rpm por 1 min e 30 segundos. O tubo coletor foi trocado novamente e centrifugado novamente a 14.000 rpm por 3 minutos, para retirar o excesso de reagente. Em seguida, foi eluído em 30 µl de água MiliQ e incubado por 5 minutos, e posteriormente centrifugado a 8.000 rpm por 1 min e 30 seg para eluição.

O DNA foi quantificado pelo equipamento Nanodrop 2000C (*ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Thermo Scientific* (ThermoScientific) para a análise da qualidade do material e pelo Qubit para a detecção da integridade e concentração do DNA.

#### 4.6.2 Conversão de Bissulfito

Foram utilizados os DNAs extraídos da linhagem HBE tratados com glifosato e 2,4-D e expostas durante 72 horas. A quantidade de DNA utilizado para a conversão de bissulfito foi de 500 ng. Dois kits foram utilizados para a realização da metodologia: **1) EZ-96 de metilação do DNA** (Zymo Research, Orange, CA), para a realização do *microarray* e **2) QUIAGEN**, para a realização do pirosequenciamento. O protocolo foi realizado de acordo com cada fabricante e os dois kits apresentam reagentes e etapas específicas.

- 1) **EZ-96 de metilação do DNA:** Foi adicionado 5 µl de *M-Dilution Buffer* à cada amostra de DNA e o volume foi ajustado para 50 µl com água MiliQ. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado 100 µl do *CT Conversion Reagent* e homogeneizado. Então, as amostras foram incubadas no escuro por 12-16h a 50°C. Após esse período as amostras foram incubadas novamente a 0-4°C por 10 minutos. Foi adicionado 400 µl *M-Binding Buffer* na coluna dentro do tubo coletor e em seguida, as amostras foram adicionadas à coluna contendo o *M-Binding Buffer*. A tampa foi fechada e a coluna foi invertida algumas vezes. Logo depois, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 30 segundos. O líquido do tubo coletor foi descartado. Foi adicionado 100 µl de *M-Wash Buffer* à coluna e centrifugado a 10.000 x g por 30 segundos. Depois, foi adicionado 200 µl *M-Desulphonation Buffer* à coluna e manter em temperatura ambiente (20-30 °C) por 15-20 min. E centrifugado a 10.000 x g por 30 segundos. Novamente, foi adicionado 200 µl *M-Desulphonation Buffer* à coluna e manter em temperatura ambiente (20-30 °C) por 15-20 min. E centrifugado a 10.000 x g por 30 segundos. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e então foi adicionado 10 µl de *M-Elution Buffer* diretamente na matriz da coluna e centrifugado a 10.000 x g por 30 segundos.
- 2) **QUIAGEN:** foi adicionado à cada amostra 85 µl de *Bissulfito Mix* e 35 µl de *DNA protec Buffer*. As amostras então foram homogeneizadas e levadas ao termociclador (*Denaturation* 5 minutos a 95°C; *Incubation* 25 minutos a 60°C; *denaturation* 5 minutos a 95°C; *Incubation* 85 minutos



a 60°C; denaturation 5 minutos a 95°C; Incubation 175 minutos a 60°C). Após a conversão completa, as amostras foram centrifugadas e transferidas para tubos de 1,5 ml. Foi adicionado 500 µl de *Buffer BL*, vortexado e um breve *spin*. As amostras então foram transferidas para a coluna, foi centrifugado por 1 minuto a velocidade máxima (14.000 rpm). O líquido do tubo coletor foi descartado e foi adicionados 500 µl de *Buffer BW* em cada coluna. Em seguida, foi centrifugado por 1 minuto a velocidade máxima (14.000rpm). O líquido do tubo coletor foi novamente descartado e foi adicionados 500µl de *Buffer BD* em cada coluna e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugado por 1 minuto a velocidade máxima (14.000rpm). Foi adicionado 500 µl de *Buffer BW* em cada coluna, centrifugado por 1 minuto a velocidade máxima (14.000rpm), esse passo foi repetido mais uma vez. As colunas foram transferidas para um novo tubo coletor, em seguida foi centrifugado por 1 minuto a velocidade máxima e remover todo líquido residual. As colunas foram levadas ao termobloco por 5 minutos à 56° C com a tampa aberta. As colunas então foram transfefridas para um tubo de 1,5 ml e adicionados 20µl de água MiliQ e centrifugada por 1 minuto a 12.000 rpm. As amostras convertidas foram armazenadas a -80°C.

#### 4.6.3 Análise da metilação do DNA por microarrays e análise de bioinformática

Para a realização do ensaio de metilação foi utilizado o Kit Infinium HD Assay Methylation (Illumina, SP). Foram utilizados as amostras de DNA convertidas pelo Kit da Zymo (tópico 4.6.2) das linhagem HBE exposta ao herbicida glifosato e ao 2,4-D e o controle (células expostas ao veículo DMSO). Todos os experimentos foram realizados no Instituto Nacional do Câncer (INCA) em colaboração com o Dr. Luis Felipe Pinto.

A primeira etapa da metodologia, consistiu em uma preparação das amostras, seguida da amplificação do DNA de genômico convertido. As amostras de DNA convertidas foram distribuídas em uma placa de 96 poços e em seguida, foi adicionado 20 µl de MA1 e 4 µl de 0,1N NaOH por poço. A placa foi selada, levada ao *vortex* a 1600 rpm por 1 minuto e em seguida foi dado um pulso de 280 x g. Após o período de incubação de 10 minutos, foi adicionado 68 µl de RPM e 75 µl de MSM por poço. A placa foi selada novamente, levada ao *vortex* a 1600 rpm por 1 minuto, centrifugada a 280 x g e incubada por 20-24 horas a 37°C. A segunda etapa consistiu na fragmentação do DNA através de processos enzimáticos. Após o período de incubação, foi incubado novamente por 30 minutos à temperatura ambiente, a placa foi centrifugada a 280 x g e o selo foi removido. Foi adicionado 50 µl de FMS por poço,

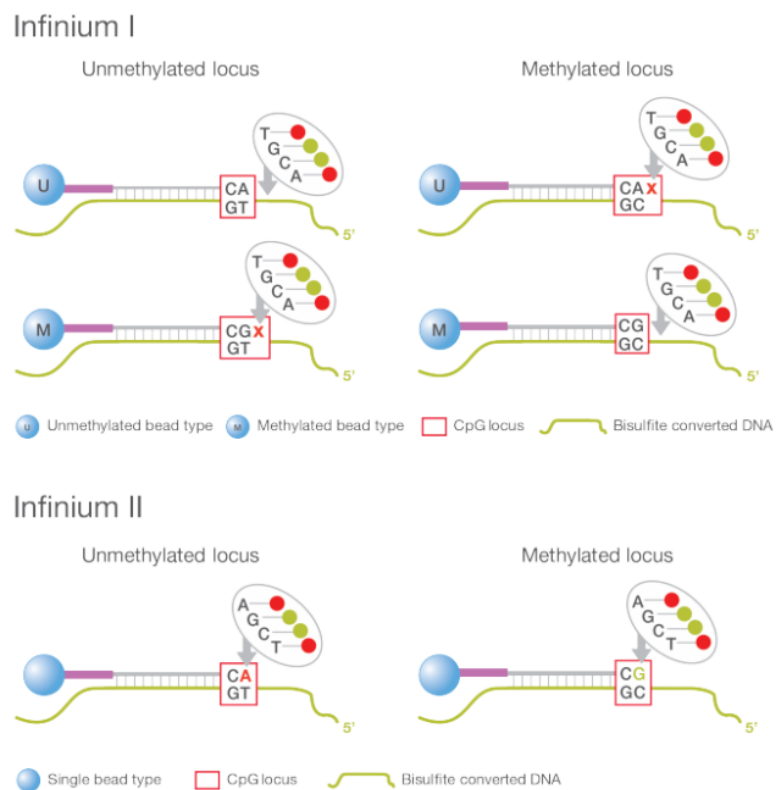
colocado um novo selo e a placa foi ao vortex a 1.600 rpm por 1 minuto, seguido de um pulso na centrífuga a 280 x g. A placa foi novamente selada a 37°C no termo bloco por 1 hora.

A terceira etapa da metodologia teve como objetivo precipitar as amostras de DNA. O DNA foi distribuído em uma placa de 96 poços e foram adicionados 100 µl de PM1 em cada poço, a placa foi selada, levada ao vortex a 1600 rpm por 1 minuto e incubada por 5 minutos a 37° C. Em seguida, a placa foi centrifugada a 280 x g por 1 minuto. Foi adicionado 300 µl de 100% de 2-propanol por poço, a placa foi selada cuidadosamente, invertida lentamente 10 vezes e incubada por 30 minutos a 4°C. Logo após a incubação, a placa foi centrifugada a 3000 x g a 4 °C por 30 minutos. Para retirar o líquido, a placa foi invertida rapidamente e bateu-se algumas vezes em um papel para que o líquido fosse absorvido e colocado invertido por 1 hora para os poços secarem por completo. A quarta etapa consistiu em ressuspender o DNA. Foi adicionado 46 µl de RA1 em cada poço, e selado pelo equipamento durante 3 segundos e incubado por 1 hora a 48°C. Logo em seguida, a placa foi levada ao vortex a 1800 rpm por 1 minuto e centrifugado a 280 x g. A quinta etapa foi a adição das amostras fragmentadas e ressuspendidas no *BeadChip*, que permite uma quantidade de 8 amostras por chip. A sexta etapa consistiu na hibridização do chip. As amostras junto aos chips foram incubadas por 16h-24h em uma câmara escura a 48°C. A sétima etapa consistiu na lavagem dos chips e preparo do robô. A oitava etapa consistiu na selagem e secagem das lâminas, seguidas da leitura.

Após a leitura e a avaliação dos controles internos, os arquivos IDAT foram utilizados para análises de bioinformática. Neste passo, foram utilizados os softwares RStudio, um programa de acesso gratuito e um software profissional do R, e o pacote 'ChAMP' do Bioconductor. Primeiro, o carregamento de dados brutos dos arquivos IDAT foi executado para calcular a intensidade das sondas. Sondas com um valor de p de detecção inferior a 0,01 ou com um *beadcount* inferior a 3 em pelo menos 5% das amostras foram removidas das análises. Em seguida, sondas não-CG, sondas nas quais o CpG ficam próximo a um SNP e sondas nas quais se alinha a múltiplos locais conforme definido em Nordlund *et. al* (2013)<sup>148</sup> foram removidas. As amostras que falharam em uma proporção de valor de p acima de 5% foram removidas das análises.

Após a exclusão de sondas e amostras de baixa qualidade, a normalização foi realizada pelo pacote 'chAMP'. Isto é necessário porque no *Illumina bead arrays*, as sondas vêm em dois modelos diferentes (chamados tipo I e tipo II), com diferentes químicas de hibridização (Figura

17). Este é um efeito técnico e é independente de variações causadas por diferenças nas características biológicas das sondas do tipo I e do tipo II.



**Figura 17** - Esquema de *beads* do ensaio de metilação Infinium 850k. O desenho do ensaio **Infinium I** emprega 2 tipos de *beads* por locus CpG. O primeiro tipo apresenta uma *bead* com o estado metilado (C) e um outro tipo de *bead* para o estado não metilado (T) do local CpG e cada um para os estados metilado e não metilado. O projeto **Infinium II** usa um tipo de *bead*, com o estado metilado determinado na etapa de extensão de base única após o CpG.

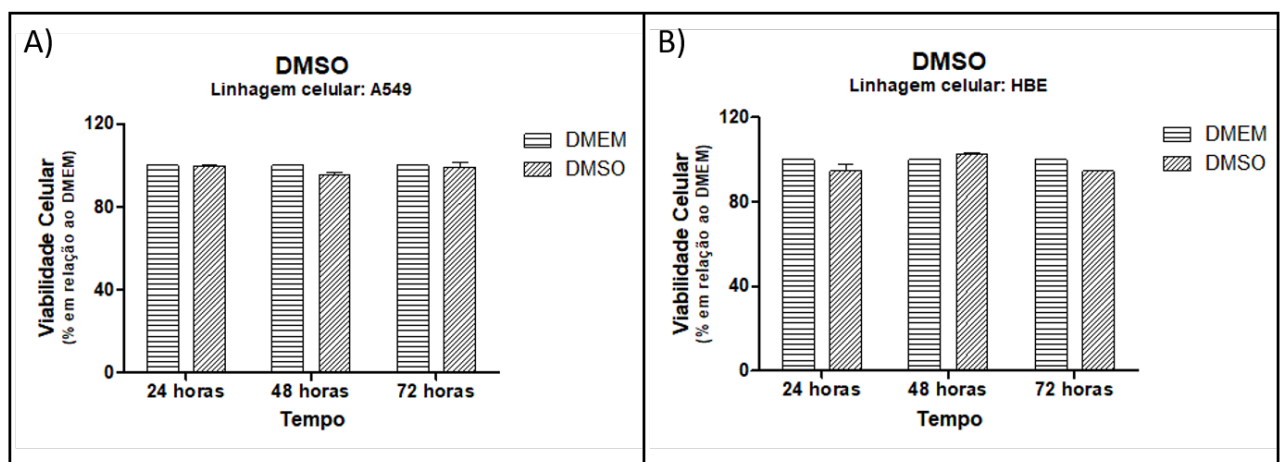
Sondas diferencialmente metiladas (SDM) entre grupos (tratado e controle) foram determinadas pelo cálculo do valor *p* para metilação diferencial usando um modelo linear e o método de Benjamini-Hochberg<sup>149</sup> foi usado para comparação múltipla de ajustamento. As sondas hiper e hipometiladas foram em seguida caracterizadas de acordo com a característica CpG (por exemplo, TSS200, TSS1500, corpo do gene) e proximidade da ilha CpG.

A análise de enriquecimento funcional foi realizada pela ferramenta *WEB-based Gene Set Analysis Toolket* (WebGestalt, <http://www.webgestalt.org/>). Foram selecionadas os seguintes parâmetros: organismo de interesse (hSapiens), método de interesse (*over representation Enrichment Analysis*, ORA), banco de dados funcionais (*Pathway*; KEGG), tipo de amostra (*gene symbol*), referência (*genome*).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da citotoxicidade dos herbicidas

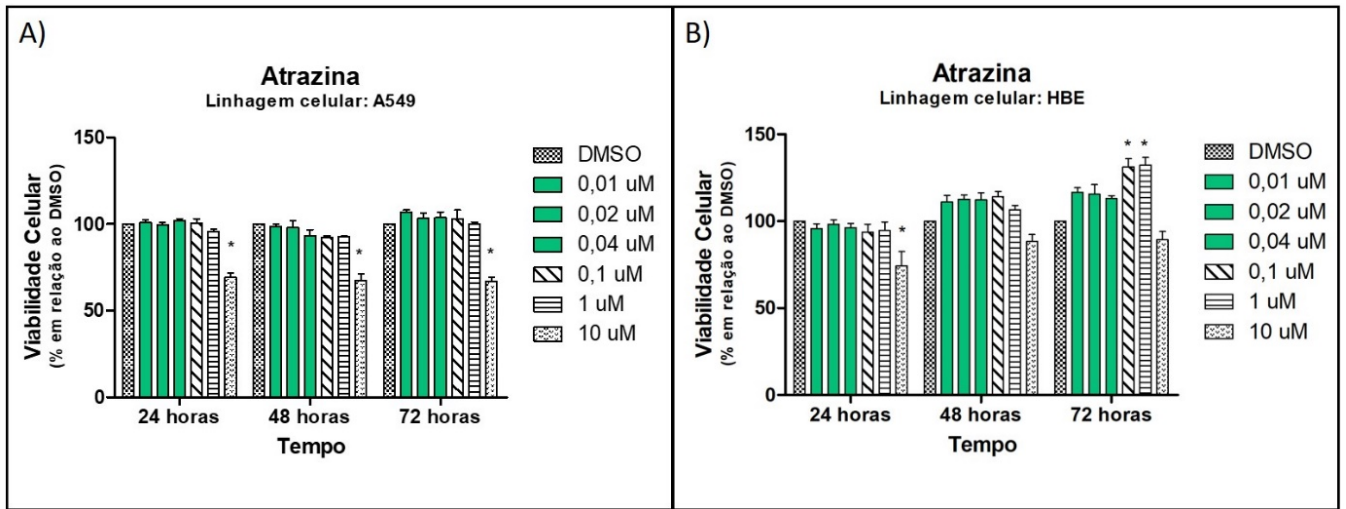
Para o desenvolvimento deste trabalho, foi realizada uma caracterização da exposição ao DMSO nas linhagens celulares de pulmão A549 e HBE através do ensaio de MTS (Figura 18), a fim de verificar a influência da toxicidade do veículo nas linhagens celulares HBE e A549. Conforme o esperado, não foi encontrado nenhum efeito citotóxico.



**Figura 18.** Avaliação da citotoxicidade do DMSO pelo ensaio de MTS nas linhagens celulares A549 (A) e HBE (B).

#### 5.1.1 Avaliação da citotoxicidade do herbicida Atrazina (ATZ)

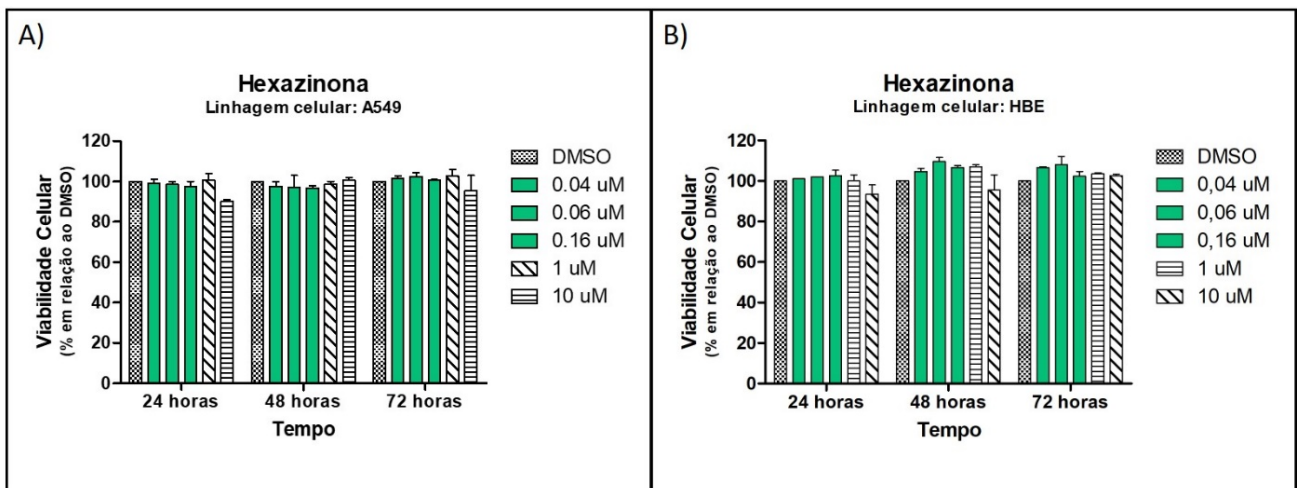
Na avaliação do herbicida atrazina, encontrou-se na linhagem pulmonar tumoral A549 uma diminuição da viabilidade celular na concentração 10  $\mu$ M nos tempos de 24h, 48h e 72h (Figura 19a). Na linhagem pulmonar normal HBE, ocorreu uma redução da viabilidade celular na concentração 10  $\mu$ M apenas no tempo de 24 horas. Porém, em 72 horas foi perceptível um aumento da viabilidade celular nas concentrações intermediárias (0,1  $\mu$ m e 1  $\mu$ m), com diferenças estatísticas significantes em relação ao controle (Figura 19b).



**Figura 19.** Avaliação da citotoxicidade da atrazina pelo ensaio de MTS. Efeitos da exposição ao princípio ativo **Atrazina** em 24h, 48h e 72h, respectivamente. **A)** Linhagem celular A549, **B)** Linhagem celular HBE. Concentração destacadas em verde escuro: Metade do LEO (esquerda), LEO (ao centro) e dobro do LEO (direita). \* Diferença estatística com o valor de  $p < 0.05$  em relação ao DMSO (two-way ANOVA).

### 5.1.2 Avaliação da citotoxicidade do herbicida hexazinona (HEX)

Para avaliação da hexazinona na linhagem pulmonar tumoral A549 (Figura 20a) e na linhagem pulmonar normal HBE (Figura 20b), nos tempos de 24h, 48h e 72 h não foi observado nenhuma mudança na viabilidade celular.

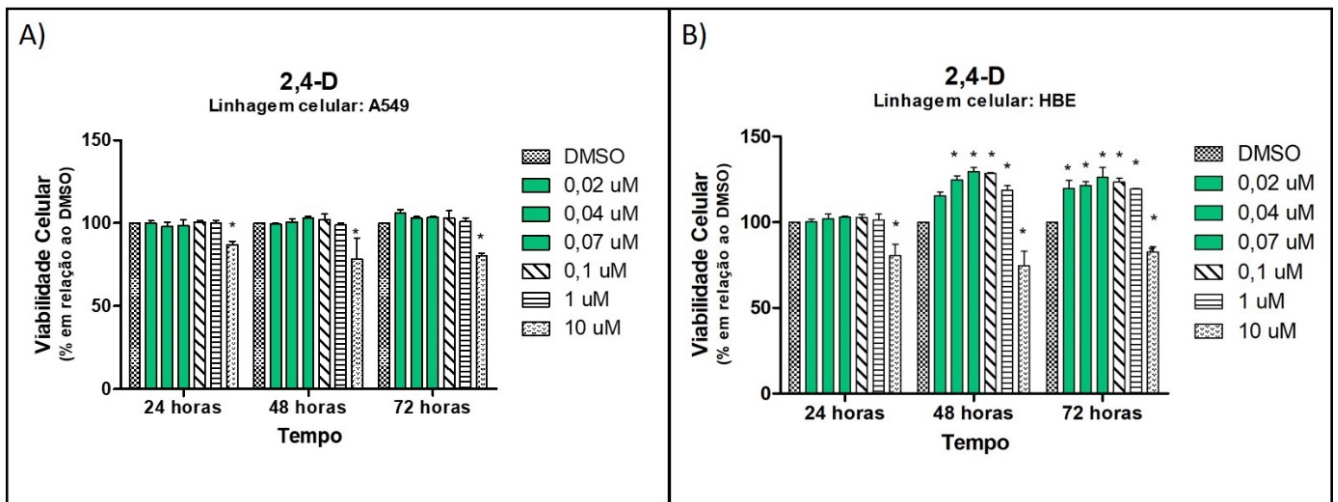


**Figura 20.** Avaliação da citotoxicidade da Hexazinona pelo ensaio de MTS. Efeitos da exposição ao princípio ativo **Hexazinona** em 24h, 48h e 72h, respectivamente. **A)** Linhagem celular A549, **B)** Linhagem celular HBE. Concentração destacadas em verde escuro: Metade do LEO (esquerda), LEO (ao centro) e dobro do LEO (direita). \* Diferença estatística com o valor de  $p < 0.05$  em relação ao controle (two-way ANOVA).

### 5.1.3 Avaliação da citotoxicidade do herbicida 2,4-D

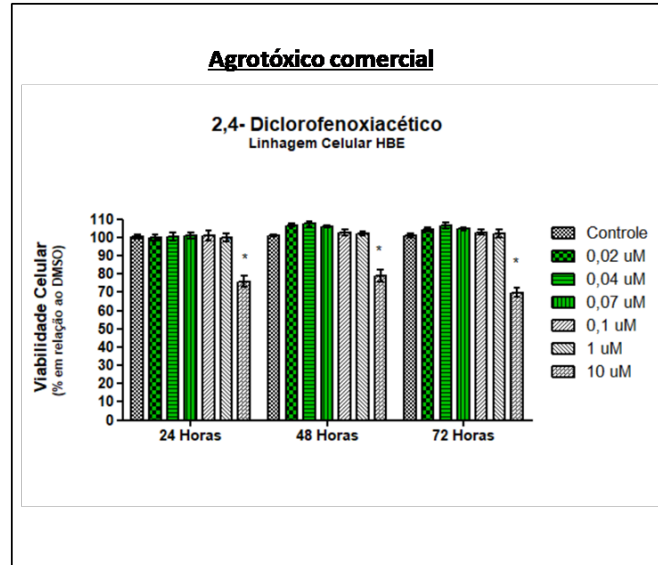
Nas avaliações do herbicida 2,4-D, observou-se na linhagem pulmonar tumoral A549 uma diminuição da viabilidade celular apenas na concentração 10  $\mu\text{m}$  no tempo de 24 horas, 48 horas e 72 horas (Figura 21a).

Em contraste, na linhagem pulmonar normal HBE (Figura 21b) após a exposição de 24 horas, 48 horas e 72 horas ao composto 2,4-D observou-se uma redução da citotoxicidade somente na concentração mais alta de 10  $\mu\text{m}$ . Porém, em 48 horas de exposição ocorreu um aumento da viabilidade celular nas concentrações de 0,04  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$ . O mesmo ocorreu em 72 horas, porém nas concentrações 0,02  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$ .



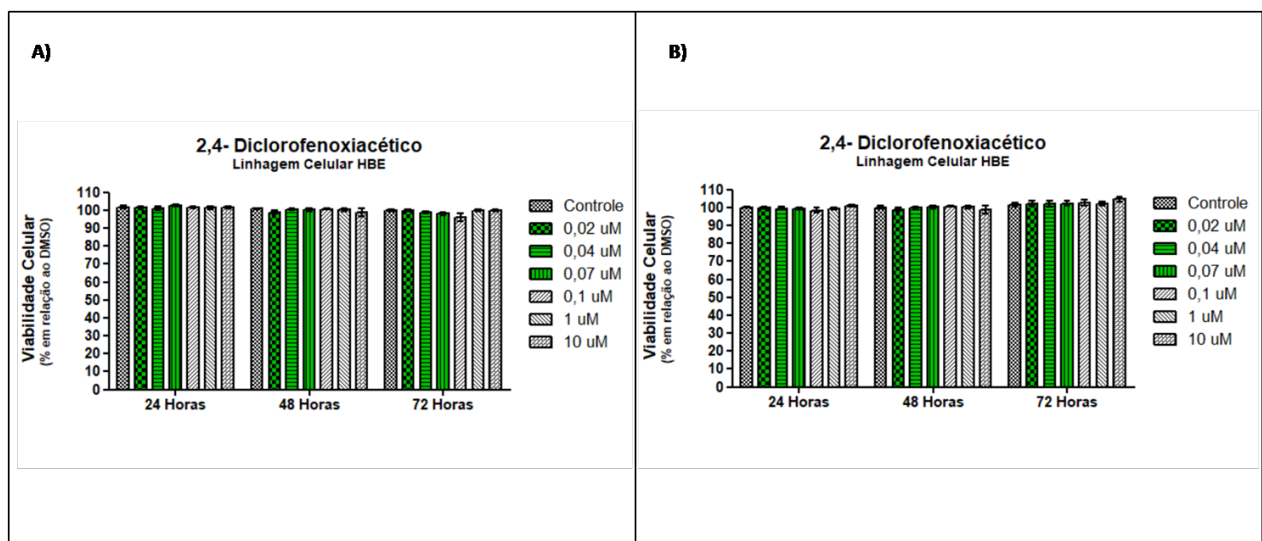
**Figura 21.** Avaliação da citotoxicidade do 2,4-D pelo ensaio de MTS. Efeitos da exposição ao princípio ativo **2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)** em 24h, 48h e 72h, respectivamente. **A)** Linhagem celular A549, **B)** Linhagem celular HBE. Concentração destacadas em verde escuro: Metade do LEO (esquerda), LEO (ao centro) e dobro do LEO (direita). \* Diferença estatística com o valor de  $p < 0.05$  em relação ao controle (two-way ANOVA).

Também foi realizado uma análise da exposição ao agrotóxico com formulação comercial de 2,4-D na linhagem celular normal de pulmão, HBE (Figura 24). Os experimentos verificaram uma redução da viabilidade celular em altas concentrações (10  $\mu\text{m}$ ) nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas.



**Figura 22.** Avaliação da citotoxicidade do agrotóxico 2,4-D pelo ensaio de MTS. Efeitos da exposição ao agrotóxico comercial **2,4-Diclorofenoxiacético** (Nortox, SP, Brasil) em 24h, 48h e 72h, respectivamente, na linhagem celular HBE. Concentração em verde escuro: LEO; Concentração em verde claro: Metade do LEO (esquerda) e dobro do LEO (direita). \* Diferença estatística com o valor de  $p < 0.05$  em relação ao controle (two-way ANOVA).

Quando utilizou-se outro método de citotoxicidade o ensaio de avaliação de Sulforrodamina B para avaliação do efeito de 2,4-D na linhagem HBE. Verificou-se que a exposição das células ao agrotóxico comercial e também no princípio ativo de 2,4-D nos tempos de 24h, 48h e 72 h não causou nenhuma alteração na viabilidade celular conforme demonstrado na figura 25.



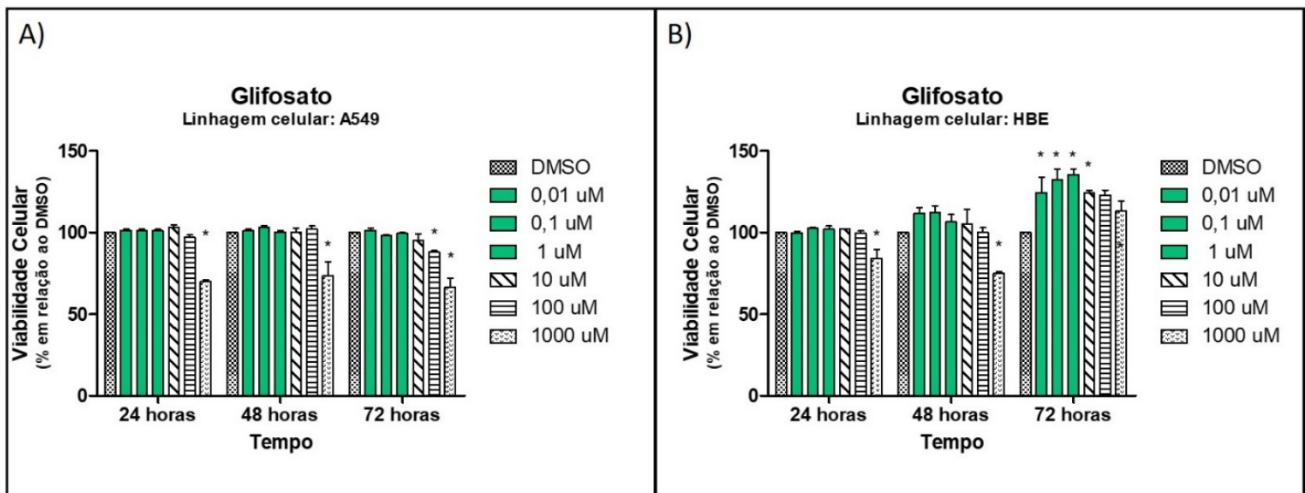
**Figura 23 -** Avaliação da citotoxicidade do 2,4-D pelo ensaio de Sulforrodamina B. Efeitos da exposição ao **ácido 2,4-Diclorofenoxiacético** em 24h, 48h e 72h, respectivamente, na linhagem celular HBE. **a)** Princípio ativo, **b)**

Agrotóxico comercial (Nortox, SP, Brasil). Concentração destacadas em verde escuro: Metade do LEO (esquerda), LEO (ao centro) e dobro do LEO (direita). Sem diferença estatística avaliada nos diferentes tempos.

### 5.1.3 Avaliação da citotoxicidade do herbicida glifosato

Nas avaliações do herbicida gly, observou-se na linhagem pulmonar tumoral A549 uma diminuição da viabilidade celular apenas na concentração 1000  $\mu\text{m}$  no tempo de 24, 48 e 72 horas e uma redução da viabilidade celular em 100  $\mu\text{m}$  em 72 horas (Figura 26a).

Na linhagem normal HBE ocorreu uma redução da viabilidade celular na concentração 1000  $\mu\text{m}$  nos tempos de 24 horas e 48 horas e um aumento da viabilidade celular das concentrações 0,01  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  em 72 horas de exposição (Figura 26b).



**Figura 24** - Avaliação da citotoxicidade do glifosato pelo ensaio de MTS. Efeitos da exposição ao princípio ativo **glifosato (gly)** em 24h, 48h e 72h, respectivamente. **A)** Linhagem celular A549, **B)** Linhagem celular HBE.

\* Diferença estatística com o valor de  $p < 0.05$  em relação ao controle (two-way ANOVA).

## 5.2 Avaliação da genotoxicidade dos herbicidas

### 5.2.1 Avaliação do ensaio de micronúcleo no *IN CELL Analyser*

O ensaio de Micronúcleo foi realizado com os herbicidas 2,4-D e glifosato, na linhagem HBE no tempo de exposição de 24 horas. Foram escolhidas duas concentrações para as análises de MN: para o gly foram utilizadas as concentrações 10  $\mu\text{m}$  e 1000  $\mu\text{m}$  e para o 2,4-D foram utilizadas as concentrações 0,04  $\mu\text{m}$  (LEO) e 10  $\mu\text{m}$ .

Na Tabela 3 foi demonstrada a média daporcentagem e desvio padrão em cada condição analisada entre dois experimentos.



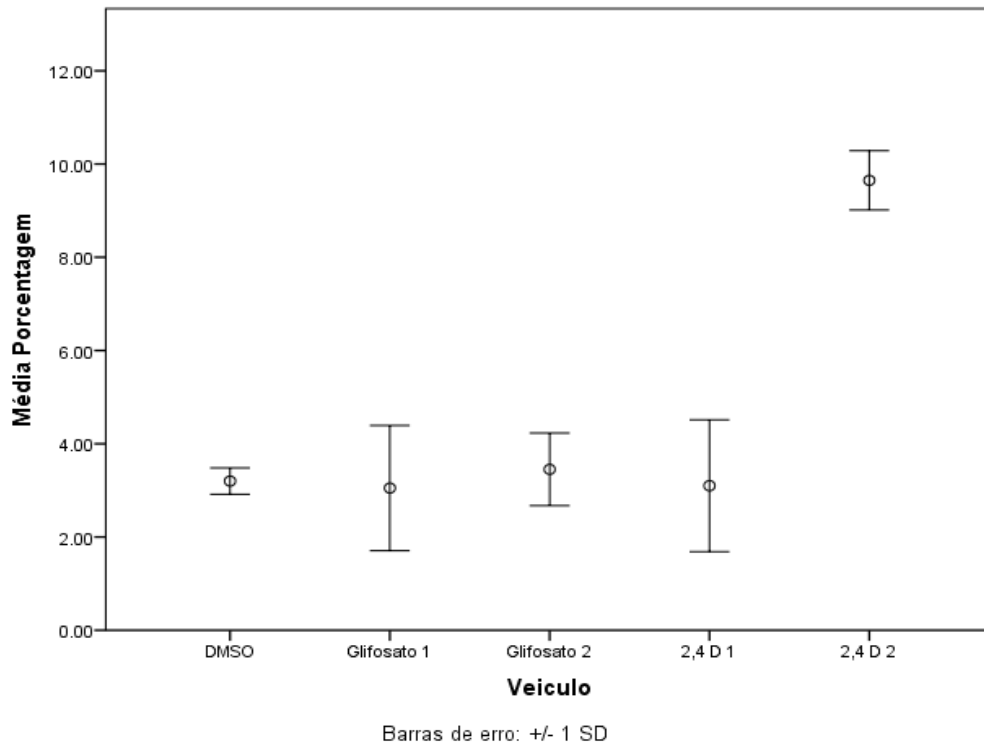
Tabela 3. Média da porcentagem avaliada em dois experimentos.

<b>Porcentagem de MN em BN</b>		
	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>DMSO</b>	3,20%	0,28%
<b>Glifosato 10 µm</b>	3,01%	1,42%
<b>Glifosato 1000 µm</b>	3,50%	0,71%
<b>2,4-D 0,04 µm</b>	3,04%	1,47%
<b>2,4-D 10 µm</b>	9,59%	0,58%

A segunda análise foi a comparação das médias de porcentagem dos dois experimentos, entre o veículo (DMSO) condição controle e cada herbicida, e entre as concentrações do mesmo herbicida (Tabela 28). A exposição do princípio ativo glifosato nas concentrações 10 µm e 1000 µm na linhagem HBE não ocasionou nenhum aumento da frequência de MN em comparação ao DMSO (Figura 25 e Tabela 4). Já a exposição ao 2,4-D ocasionou uma aumento significativo de MN na concentração 10 µm em relação a concentração LEO e ao DMSO (Figura 25 e Tabela 4).

Tabela 4. Comparação da média das porcentagens de Micronúcleo (MN) em células Binucleadas (BN) entre o veículo (DMSO) e os herbicidas. O teste estatístico utilizado para as análises foi o teste de Man-Whitney, considerando diferença estatística o valor de  $p < 0.05$ .

<b>Número de MN em BN</b>	
<b>Comparação</b>	<b><i>p</i>-valor</b>
<b>DMSO x Glifosato 10 µm</b>	0,7964
<b>DMSO x Glifosato 1000 µm</b>	0,7093
<b>Glifosato 10 µm x Glifosato 1000 µm</b>	0,5284
<b>DMSO x 2,4-D 0,04 µm</b>	0,7964
<b>DMSO x 2,4-D 10 µm</b>	<0,001
<b>2,4-D 0,04 µm x 2,4-D 10 µm</b>	<0,001



**Figura 25.** Gráfico representando as médias de porcentagem de micronúcleo e desvio padrão. DMSO (controle), Glifosato 1 (10 uM), Glifosato 2 (1000 uM), 2,4-D 1 (0,04 uM), 2,4-D 2 (10 uM). Experimentos realizados na presença dos herbicidas glifosato e 2,4-D na linhagem celular HBE.

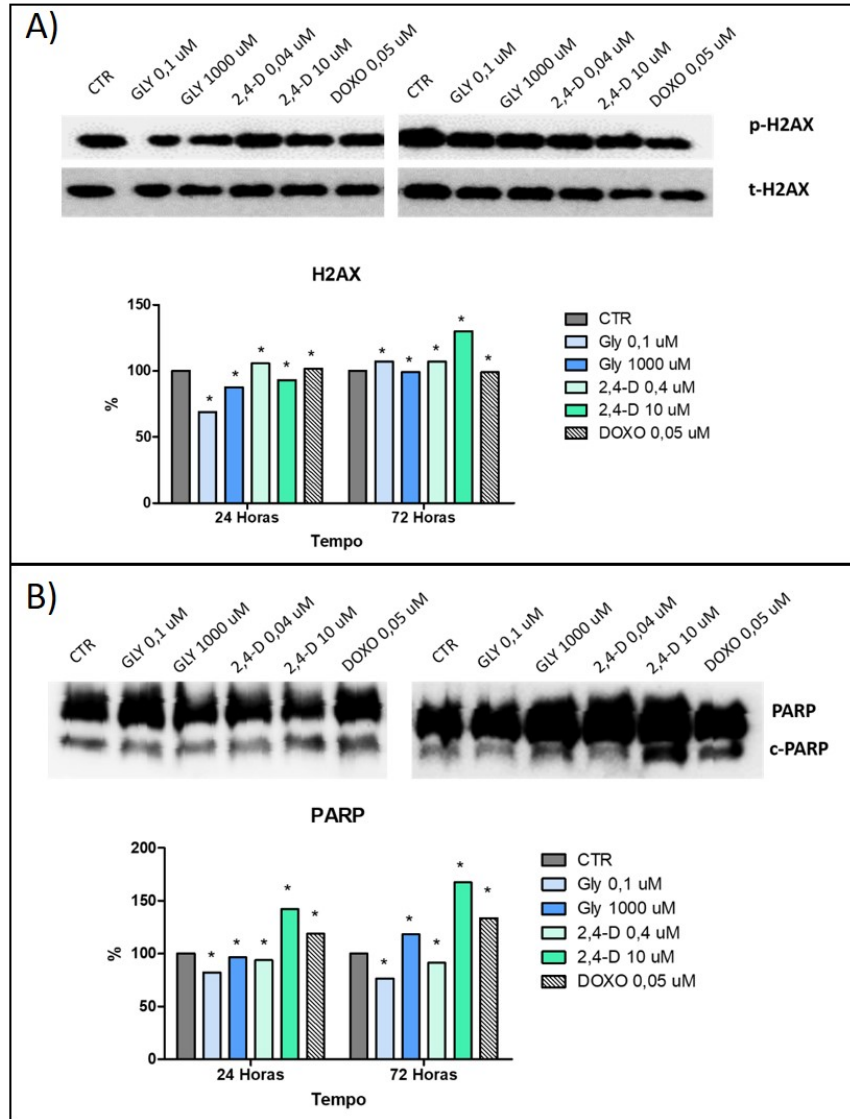
### 5.2.2 Avaliação da fosforilação de H2Ax e clivagem de PARP por *Western Blot*

Para as análises das proteínas utilizamos os mesmos herbicidas (gly e 2,4-D) e mesmas concentrações das analisadas no Micronúcleo, nos tempos de 24 horas e 72 horas na linhagem celular HBE.

O agrotóxico glifosado nas concentrações 10  $\mu\text{m}$  e 1000  $\mu\text{m}$  demonstraram uma redução da fosforilação da H2AX significativa em relação ao controle, no tempo de 24 horas (Figura 26a). O mesmo foi encontrado no PARP no tempo de 24 horas. Em 72 horas de exposição, ambas as concentrações apresentaram um aumento da expressão da H2AX fosforilada, porém a expressão do PARP (Figura 26b) só aumentou na concentração 1000  $\mu\text{m}$ , enquanto na concentração menor (10  $\mu\text{m}$ ) houve uma redução da expressão de PARP.

O herbicida 2,4-D (Figura 26a) apresentou, em 24 horas, um aumento da fosforilação da H2AX e uma redução da expressão de PARP na concentração 0,04  $\mu\text{m}$  (LEO) e na concentração 10  $\mu\text{m}$  ocorreu, o inverso, uma diminuição da fosforilação da H2AX e o aumento da expressão de PARP. No tempo de 72 horas, a concentração 0,04  $\mu\text{m}$  (LEO) se comportou

de forma semelhante a exposição de 24 horas, porém a concentração de 10  $\mu\text{m}$  aumentou significativamente a porcentagem relativa de proteínas da H2AX fosforilada e PARP.



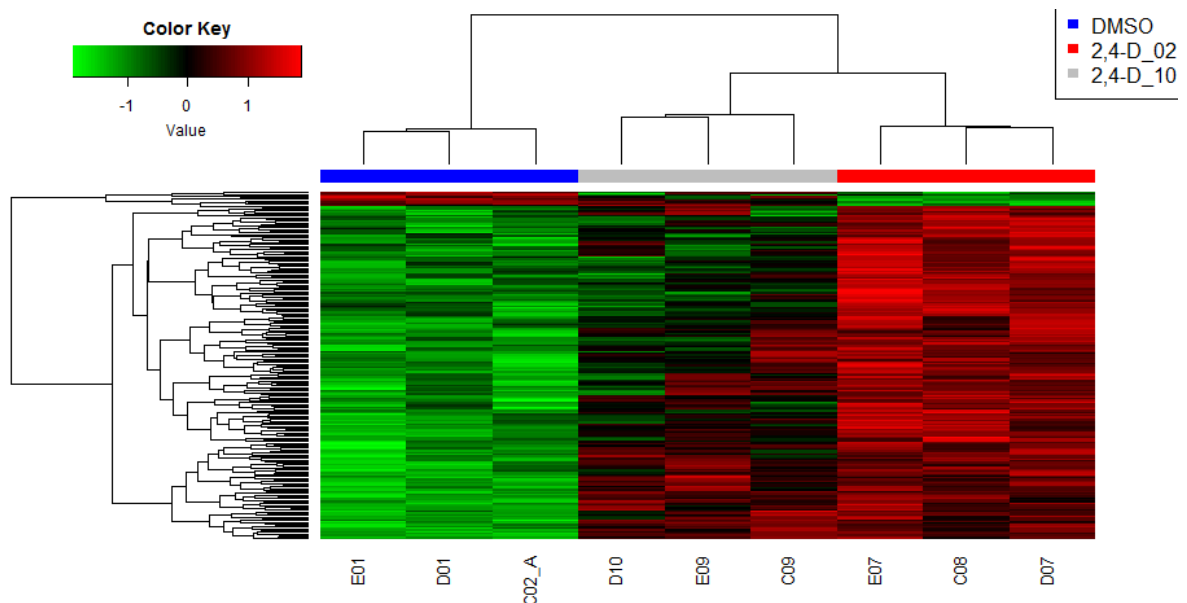
**Figura 26.** Efeitos dos herbicidas glifosato e 2,4-D na linhagem celular HBE através do *western blot* das proteínas H2AX fosforilado e clivagem do PARP. A) A análise de *Western blot* da fosforilação da histona H2AX (ser139) em células tratadas com DMSO, Glifosato (10  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$ ), 2,4-D (0,04  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ ) e Doxirrubicina (0,05  $\mu\text{m}$  – controle positivo) por 24h e 72 h. B) A análise de *Western blot* clivagem do PARP em células tratadas com DMSO, Glifosato (10  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$ ), 2,4-D (0,04  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ ) e Doxirrubicina (0,05  $\mu\text{m}$  – controle positivo) por 24h e 72 h. \* Diferença estatística com o valor de  $p < 0.05$  em relação ao controle (two-way ANOVA).

### 5.3 Avaliação da metilação dos herbicidas

A partir dos resultados apresentados no ensaio MTS foi escolhida a linhagem celular normal de pulmão (HBE) e dois herbicidas, 2,4-D e glifosato, para a análise da metilação por *microarray*. A linhagem HBE foi tratada e exposta aos herbicidas durante 72 horas.

#### 5.3.1 Avaliação do perfil de metilação da linhagem HBE exposta ao herbicida ácido 2,4-Diclorofenoacético (2,4-D)

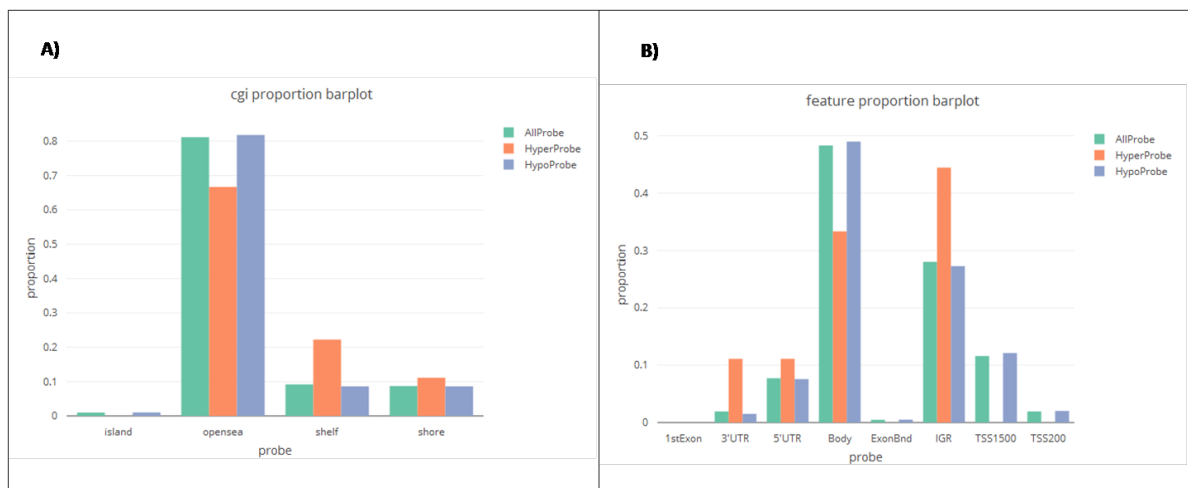
Para os ensaios de metilação por *microarray* utilizando-se o herbicida 2,4D, a linhagem celular normal de pulmão (HBE) foi exposta a duas concentrações (0,4  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ ) durante o período de 72 horas. Na comparação entre a dose 0,4  $\mu\text{m}$  e o controle (exposição a DMSO) foram encontrados 207 sítios diferencialmente metilados (SDM) ( $p < 0,05$  e delta de metilação  $> 10\%$ ) (Anexo A). Dentre os SDM 4,35% estavam hipometilados e 95,65% hipermetilados conforme pode ser observado na figura 27 pela predominância da cor vermelha no grupo tratado. Além disso, neste *heatmap* também podemos observar que as células tratadas com 2,4-D 10  $\mu\text{m}$  apresenta um perfil de metilação intermediário entre o controle e a menor dose.



**Figura 27. Heatmap de sítios CpG diferencialmente metilados após o tratamento 0,4  $\mu\text{m}$  em relação ao controle tratado com DMSO (valor de  $p < 0,05$ ; delta de metilação  $> 10\%$ ).** Cada coluna representa uma amostra, cada linha representa uma sonda diferencialmente metilada, e as amostras foram agrupadas de acordo com sua semelhança de perfil de metilação. Cores do *heatmap*: verde = menores níveis de metilação, vermelho= maiores níveis de metilação. Cores da legenda: Azul = Linhagem HBE tratada com DMSO (grupo controle); vermelho =

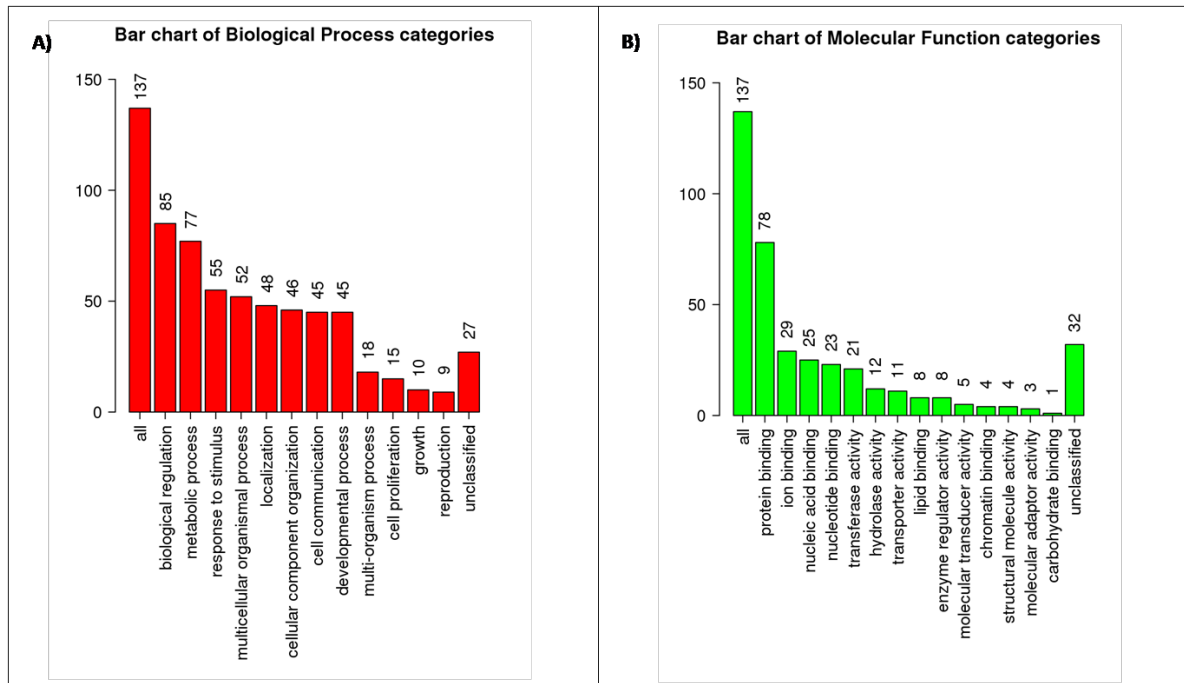
Linhagem HBE tratada com 2,4-D 0,4  $\mu\text{m}$  por 72 horas e cinza = Linhagem HBE tratada com 2,4-D 10  $\mu\text{m}$  por 72 horas.

Dentre as sondas hipometiladas não há uma proporção maior do que a esperada pela distribuição de sondas do microarranjo entre regiões de ilha, *opensea*, *shore* e *shelf*. Já entre as sondas hipermetiladas observamos uma menor proporção em regiões *opensea* e uma maior proporção em regiões *shore* e *shelf* (Figura 28a). Os SDM também foram avaliados de acordo com a sua região gênica e dentre as sondas hipometiladas foi encontrado um padrão de proporção semelhante ao padrão de sondas do microarranjo. E em relação às sondas hipermetiladas foi encontrado uma maior proporção nas regiões 3'UTR, 5'UTR e Regiões Intergênicas do Genoma (IGR, do inglês *Intergenic Genomic Region*) e uma menor proporção em regiões de corpo de gene e regiões promotoras (TSS200 e TSS1500) (Figura 28b).



**Figura 28.** Distribuição das sondas hiper e hipometiladas após o tratamento com 2,4-D 0,4  $\mu\text{m}$  em relação ao controle de acordo com a proximidade a ilhas CpG (A) e região gênica (B). Legenda de cores: proporção das sondas incluídas no microarranjo, laranja = proporção das sondas hipermetiladas e azul = proporção das sondas hipometiladas.

A partir da lista de genes diferencialmente metilados após o tratamento com 2,4-D 0,4  $\mu\text{m}$  (Anexa A) foi feita a análise de enriquecimento de processos biológicos e funções moleculares utilizando o banco de dados *Gene Ontology*. Na figura 29a podemos observar que a maior parte dos genes encontrados está envolvida com a regulação biológica da célula e processos metabólicos. Já em relação à função molecular os genes alterados em sua maioria codificam proteínas que se ligam as outras proteínas (figura 29b)



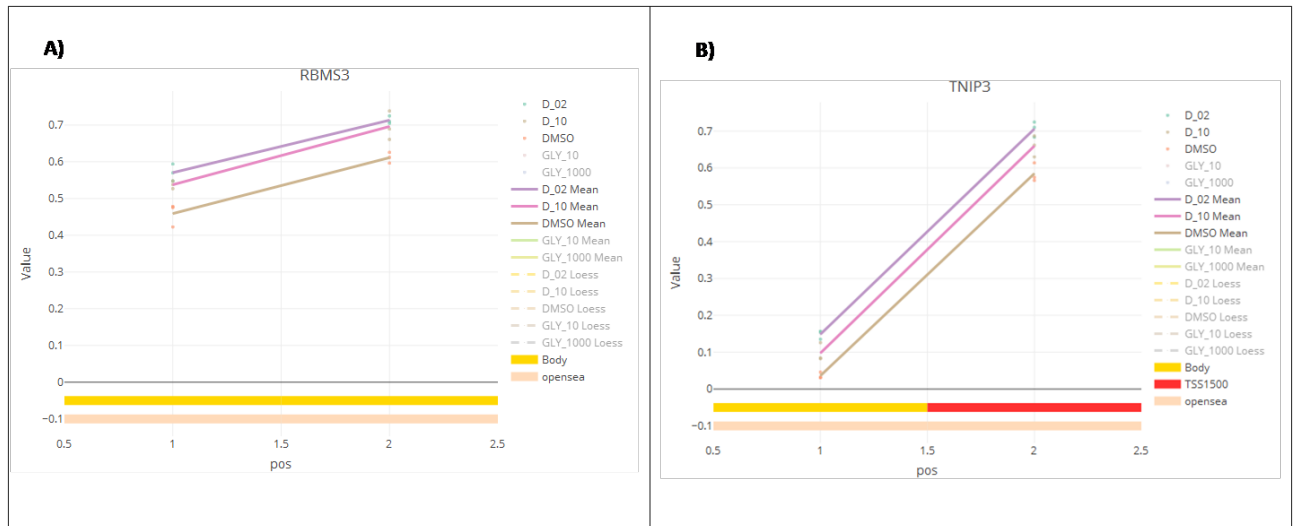
**Figura 29** - Análise de enriquecimento de processos biológicos e funções moleculares utilizando o banco de dados *Gene Ontology* após o tratamento com 2,4-D 0,4  $\mu\text{m}$  em relação ao controle. A) Lista dos processos biológicos dos genes diferencialmente metilados, B) Lista de funções moleculares dos genes diferencialmente metilados.

Em seguida foi realizada a análise de enriquecimento de vias de sinalização utilizando o banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e foi encontrada uma via enriquecida. A via de endocitose (FDR 0,017 e  $p= 5 \times 10^{-5}$ ), que contou com nove genes diferencialmente metilados (Tabela 5), sendo eles ARAP2, AP2A2, EGF, SPG20, IGF2R, CHMP3, PARD3, SMURF2, e SNX2.

**Tabela 5.** Lista de genes diferencialmente metilados após o tratamento com o herbicida 2,4D 0,4 µm contidos na via de sinalização de endocitose.

ID:hsa04144 Name: Endocytosis - Homo sapiens (human)				
C=260; O=9; E=1.78; R=5.07; PValue=5.4e-05; FDR=1.64e-02				
Userid	Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene	Delta Beta
ARAP2	ARAP2	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2	116984	0.101889098776065
AP2A2	AP2A2	adaptor related protein complex 2 alpha 2 subunit	161	0.107918297643655
EGF	EGF	epidermal growth factor	1950	0.108477940445596
SPG20	SPG20	spastic paraplegia 20 (Troyer syndrome)	23111	0.104613569245908
IGF2R	IGF2R	insulin like growth factor 2 receptor	3482	0.108516827573548
CHMP3	CHMP3	charged multivesicular body protein 3	51652	0.101149235482351
PARD3	PARD3	par-3 family cell polarity regulator	56288	-0.10066470763811
SMURF2	SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	64750	0.114489567518113
SNX2	SNX2	sorting nexin 2	6643	0.105151958616447
FDR = False Discovery Rate; < 0,05 ;				
C = Número de genes na via				
O = Observado				
R = Chance da via estar enriquecida				

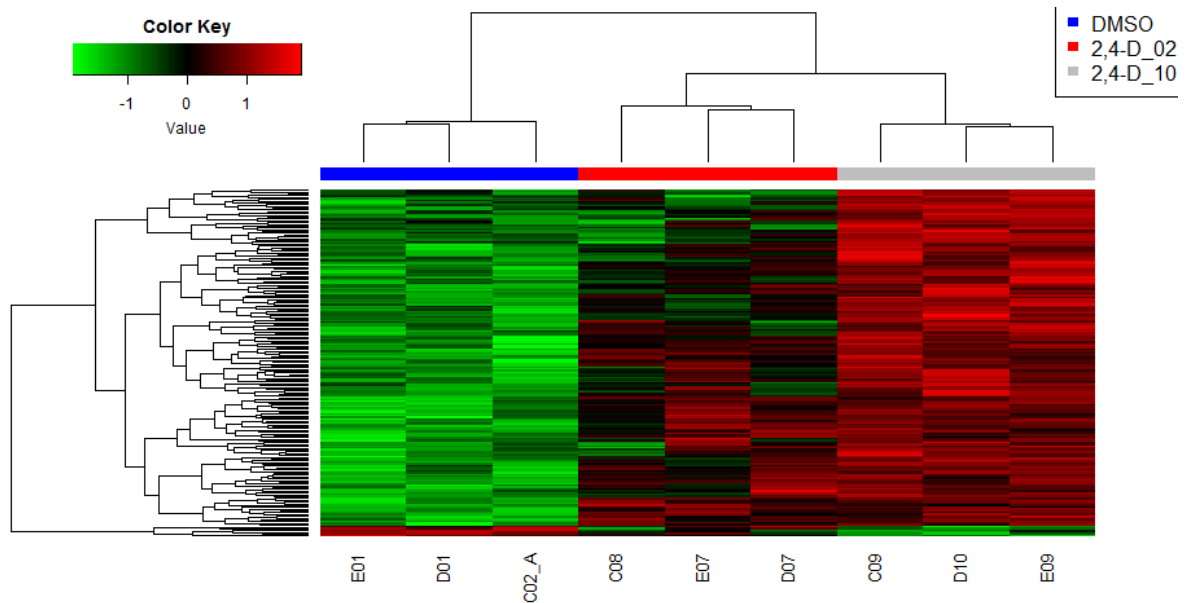
Na comparação entre o grupo tratado com 2,4-D 0,4 µm e o grupo controle foram encontrados dois genes com mais de uma sonda diferencialmente metilados (Figura 30), sendo eles RBMS3 (*RNA binding motif single stranded interacting protein 3*) e TNIP3 (*TNFAIP3 interacting protein 3*). Ambos os genes apresentaram hipermetilação após o tratamento em região de *opensea*.



**Figura 30. Genes com mais de uma sonda diferencialmente metilada entre o grupo 2,4-D 0,4  $\mu\text{m}$  e o grupo controle(A) Gene RBMS3 (RNA binding motif single stranded interacting protein 3) (B) TNIP3 (TNFAIP3 interacting protein 3).**Legenda das cores = verde : Linhagem HBE tratado com DMSO; rosa: Linhagem HBE tratado com 2,4-D 0,4  $\mu\text{m}$ ; roxo: Linhagem HBE tratado com 2,4-D 10  $\mu\text{m}$ .

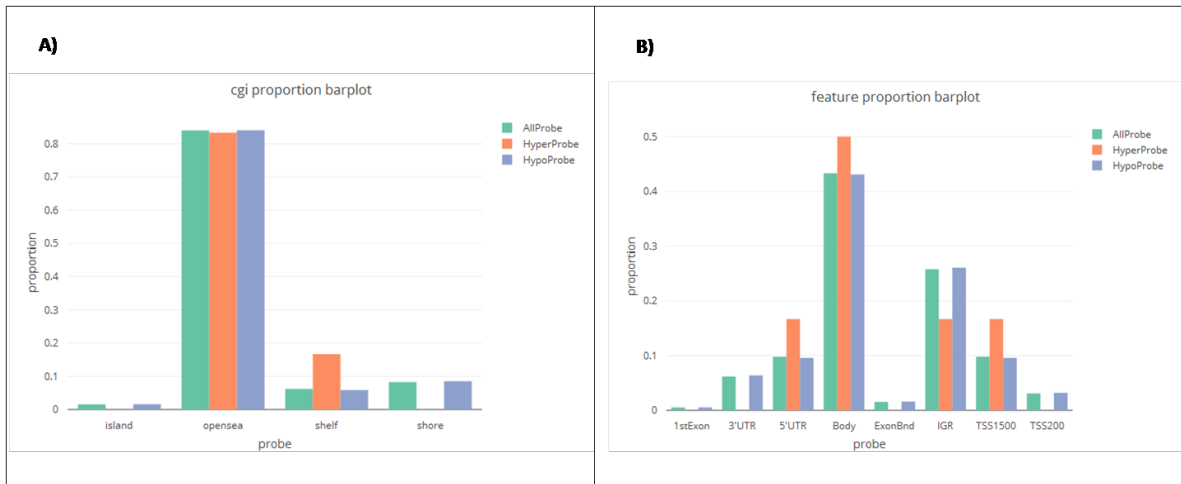
Na comparação entre a dose 10  $\mu\text{m}$  e o controle foram encontrados 194 sítios diferencialmente metilados (SDM) ( $p < 0,05$  e delta de metilação  $> 10\%$ ). Dentre os SDM 3,10% estavam hipometilados e 96,90 % hipermetilados conforme pode ser observado na figura 31 pela predominância da cor vermelha no grupo tratado. Além disso, neste *heatmap* também podemos observar que as células tratadas com 2,4-D 0,4  $\mu\text{m}$  apresentam um perfil de metilação intermediário entre o controle e a maior dose.





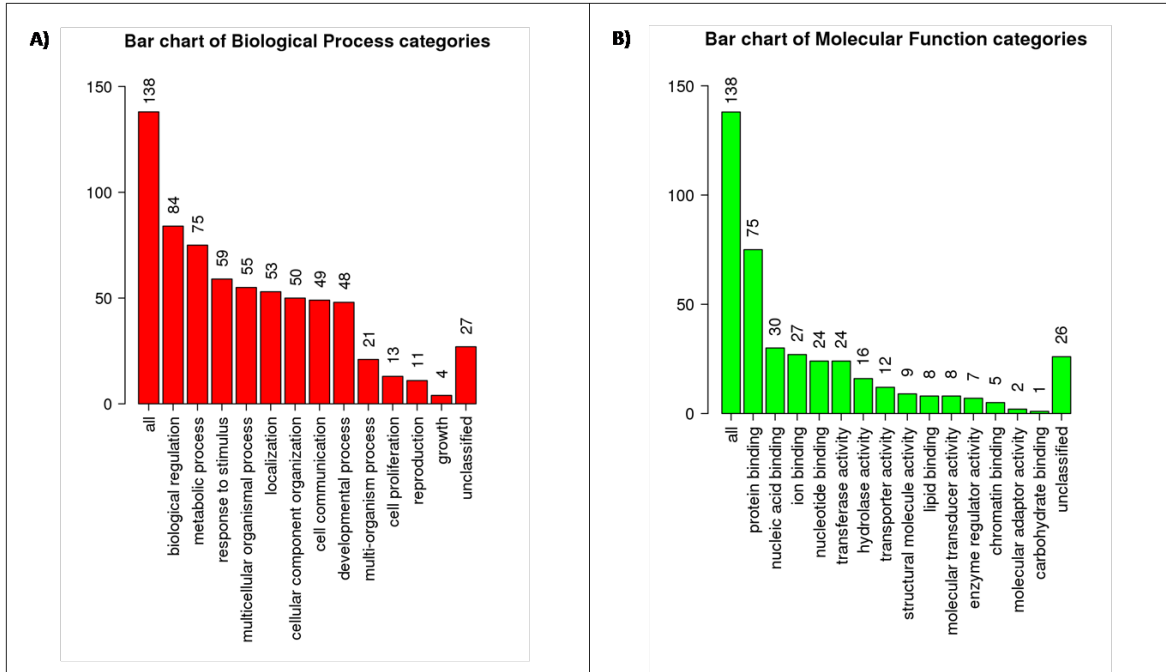
**Figura 31** - Heatmap de sítios CpG diferencialmente metilados após o tratamento 10  $\mu\text{m}$  em relação ao controle tratado com DMSO (valor de  $p < 0,05$ ; delta de metilação  $> 10\%$ ). Cada coluna representa uma amostra, cada linha representa uma sonda diferencialmente metilada, e as amostras foram agrupadas de acordo com sua semelhança de perfil de metilação. Cores do heatmap: verde = menores níveis de metilação, vermelho= maiores níveis de metilação. Cores da legenda: Azul = Linhagem HBE tratada com DMSO (grupo controle); vermelho = Linhagem HBE tratada com 2,4-D 0,4  $\mu\text{m}$  por 72 horas e cinza = Linhagem HBE tratada com 2,4-D 10  $\mu\text{m}$  por 72 horas.

Dentre as sondas hipometiladas não há uma proporção maior do que a esperada pela distribuição de sondas do microarranjo entre regiões de ilha, *opensea*, *shore* e *shelf*. Já entre as sondas hipermetiladas observamos uma menor proporção em regiões *opensea*, *shore* e ilha e uma maior proporção em regiões *shelf* (figura 32a). Os SDM também foram avaliados de acordo com a sua região gênica e dentre as sondas hipometiladas foi encontrado um padrão de proporção semelhante ao padrão de sondas do microarranjo. E em relação às sondas hipermetiladas foi encontrada uma maior proporção nas regiões 5'UTR, body e TSS1500 e uma menor proporção 3'UTR, Regiões Intergênicas do Genoma (IGR, do inglês *Intergenic Genomic Region*) e regiões promotoras (TSS200) (Figura 32b)



**Figura 32. Distribuição das sondas hiper e hipometiladas após o tratamento com 2,4-D 10 µm em relação ao controle de acordo com a proximidade a ilhas CpG (A) e região gênica (B).** Legenda de cores: proporção das sondas incluídas no microarranjo, laranja = proporção das sondas hipermetiladas e azul = proporção das sondas hipometiladas.

A partir da lista de genes diferencialmente metilados após o tratamento com 2,4-D 10 µm (Anexo B) foi feita a análise de enriquecimento de processos biológicos e funções moleculares utilizando o banco de dados *Gene Ontology*. Na figura 33a podemos observar que a maior parte dos genes encontrados está envolvida com a regulação biológica da célula e processos metabólicos. Já em relação à função molecular os genes alterados codificam proteínas que se ligam as outras proteínas (figura 33b).



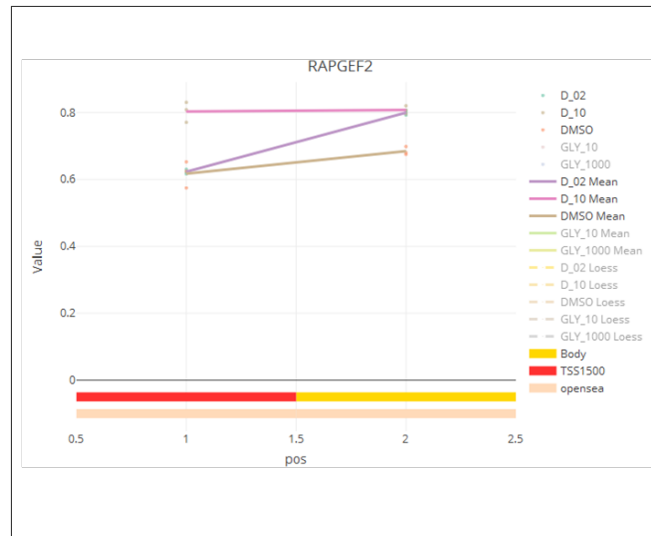
**Figura 33.** Análise de enriquecimento de processos biológicos e funções moleculares utilizando o banco de dados Gene Ontology após o tratamento com 2,4-D 10  $\mu\text{m}$  em relação ao controle. **A)** Lista dos processos biológicos dos genes diferencialmente metilados, **B)** Lista de funções moleculares dos genes diferencialmente metilados.

Em seguida foi feita a análise de enriquecimento de vias de sinalização utilizando o banco de dados KEGG e foi encontrado apenas uma via enriquecida. Sendo ela a via de junções celulares (*tight junction*) (FDR 0,022 e  $p = 7 \times 10^{-5}$ ), que contou com nove genes diferencialmente metilados, sendo eles EPB41, RRAS2, MYH15, PRKCH, PPP2R2D, ASH1L, PARD3 (Tabela 6).

**Tabela 6.** Lista de genes diferencialmente metilados após o tratamento com o herbicida 2,4D 10 µm contidos na via de sinalização de junções celulares.

ID:hsa04530 Name: Tight junction - Homo sapiens (human)				
C=139; O=7; E=1.05; R=6.69; PValue=7.29e-05; FDR=2.21e-02				
userid	Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene	deltaBeta
EPB41	EPB41	erythrocyte membrane protein band 4.1	2035	0.10690781923558
RRAS2	RRAS2	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	22800	0.13680532283824
MYH15	MYH15	myosin heavy chain 15	22989	0.111924592471413
PRKCH	PRKCH	protein kinase C ETA	5583	0.103581785568225
PPP2R2D	PPP2R2D	protein phosphatase 2 regulatory subunit Bdelta	55844	0.142714121406778
ASH1L	ASH1L	ASH1 like histone lysine methyltransferase	55870	0.136072894609256
PARD3	PARD3	par-3 family cell polarity regulator	56288	0.110923196751534
FDR = False Discovery Rate; < 0,05 ;				
C = Número de genes na via				
O = Observado				
R = Chance da via estar enriquecida				

Na comparação entre o grupo tratado com 2,4-D 10 µm e o grupo controle foi encontrado apenas um gene com mais de uma sonda diferencialmente metilados (Figura 34), sendo ele RAPGEF2 (*Rap guanine nucleotide exchange factor 2*).



**Figura 34.** Gene RAPGEF2 (Rap guanine nucleotide exchange factor 2) com mais de uma sonda diferencialmente metilada entre o grupo 2,4-D 10  $\mu$ m e o grupo controle.

Na comparação entre os sítios diferencialmente metilados encontrados nas doses 0,4  $\mu$ m e a dose 10  $\mu$ m em relação ao controle foram observados 23 Sítios Diferenciados Metilados (DMS) em comum.

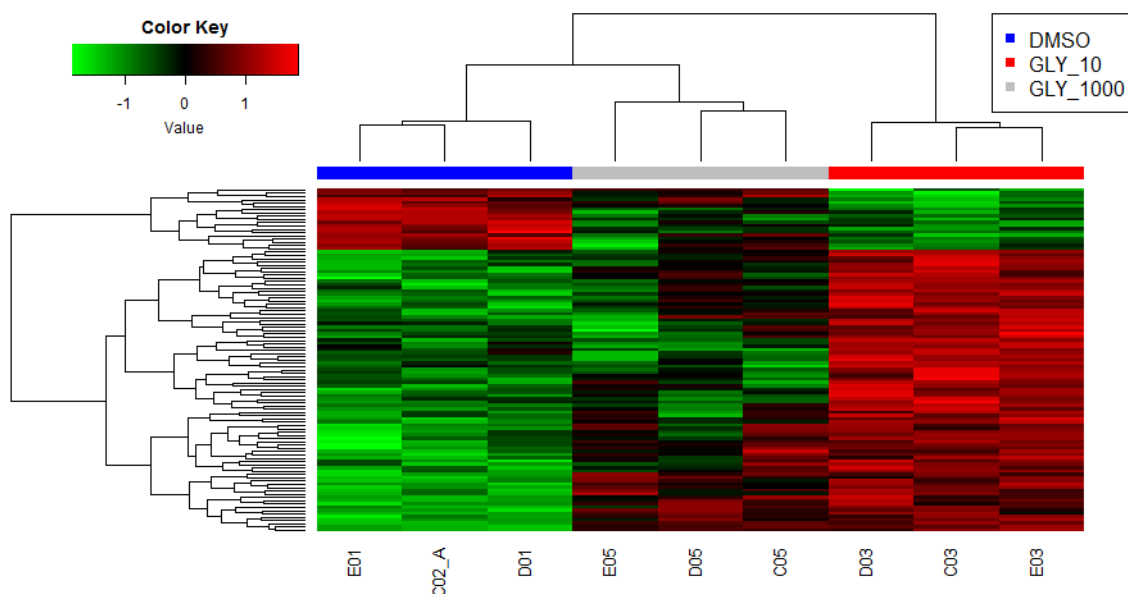
**Tabela 7.** Lista Sítios Diferenciados Metilados (DMS) em comum com o tratamento 2,4D 0,4  $\mu$ m e 2,4D 10  $\mu$ m.

Row.names	gene	feat.cgi	deltaBeta	P.Value
cg01188509	IGF2R	Body-shelf	0.108516827573548	0.000764849128688695
cg04120639	HIPK2	Body-opensea	0.134856890215372	0.000285908095382975
cg04945586	FAM189A2	TSS1500-shore	0.118108114334089	4.22054019250863e-05
cg06339463	TMX1	Body-opensea	0.16095594025112	0.000271786032379988
cg07764189	SLC16A10	Body-opensea	0.127828315905926	0.000120399651954645
cg07825983		IQR-opensea	0.113484103143745	0.000312372532766884
cg09951759	GPHN	Body-opensea	0.157631779630007	0.000305257630617246
cg10763425	FLYWCH1	5'UTR-shelf	-0.107644897277315	0.000367352080998572
cg10921743	PDE4D	3'UTR-opensea	0.138851569291634	5.31889730754637e-05
cg11248977	PRKCH	Body-opensea	0.101238380709226	0.000623867274493592
cg14083620		IQR-opensea	0.102393020429364	5.04257046717825e-05
cg14885394	CHAMP1	TSS1500-shore	0.126689620702938	2.01967023632166e-05
cg14998516	C16orf52	Body-opensea	0.14831207787841	0.000161337533090753
cg16354694		IQR-opensea	0.119160997606133	7.32342315398126e-05
cg17537151		IQR-opensea	0.111176742471498	0.00018218792593598
cg19123846	CAMKMT	Body-opensea	0.119166925860842	0.000859551247348598
cg19435443		IQR-opensea	0.124897792290371	3.50383190756406e-05

cg20115117	FOXP1	5'UTR-opensea	0.145117624511733	6.28239627351296e-06
cg24091982	SCOC	5'UTR-opensea	0.139981068672608	0.000614388104096495
cg24214585	PAFAH1B1	Body-opensea	0.133196467699169	7.19970660278062e-05
cg24273103	RAD54L	Body-opensea	0.105648871975617	0.000390585141218031
cg24884856	RAPGEF2	Body-opensea	0.115039177443453	5.03358827072789e-06
cg26858454		IGR-opensea	0.116558375565185	5.77305863172275e-05

### 5.3.1 Avaliação do perfil de metilação da linhagem HBE exposta ao herbicida Glifosato

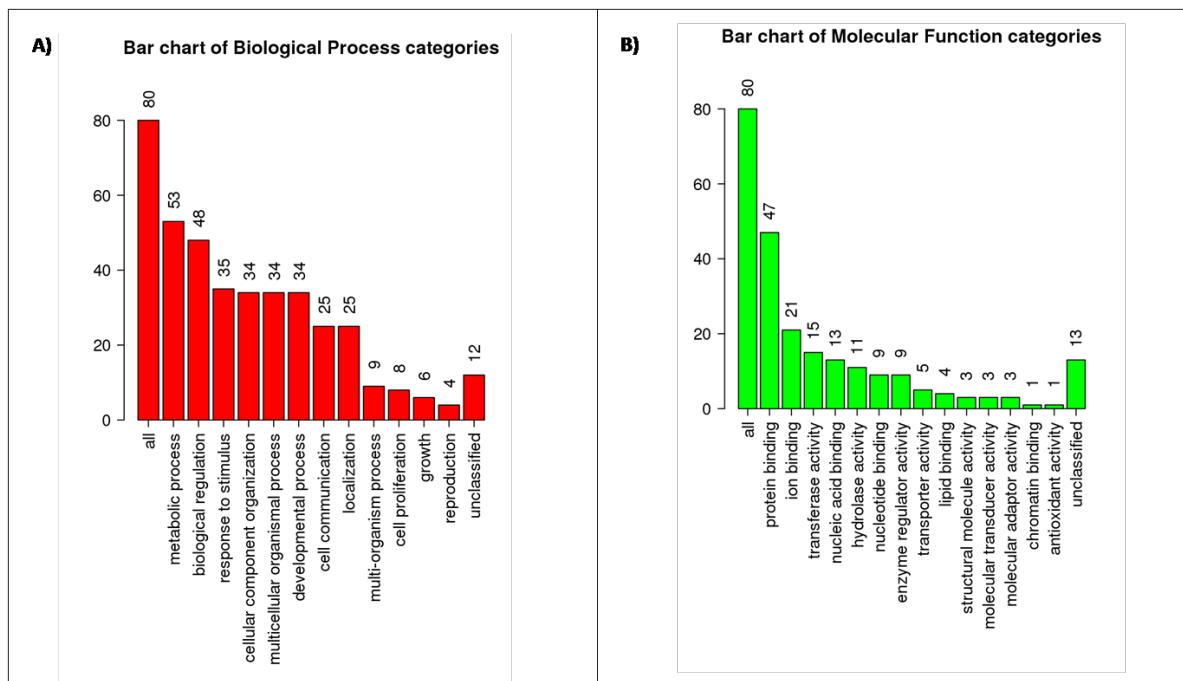
A linhagem celular normal de pulmão (HBE) foi exposta a duas concentrações (10  $\mu\text{m}$  e 1000  $\mu\text{m}$ ) do herbicida glifosato (gly) durante o período de 72 horas. Na comparação entre a dose 10  $\mu\text{m}$  e o controle foram encontrados 105 sítios diferencialmente metilados (SDM) ( $p < 0,05$  e delta de metilação  $> 10\%$ ). Dentre os SDM 18,1% estavam hipometilados e 81,9% hipermetilados conforme pode ser observado na Figura 35 pela predominância da cor vermelha no grupo tratado. Além disso, neste heatmap também podemos observar que as células tratadas com gly 1000  $\mu\text{m}$  apresenta um perfil intermediário entre o controle e a menor dose.



**Figura 35** - Heatmap de sítios CpG diferencialmente metilados após o tratamento glifosato 10  $\mu\text{m}$  em relação ao controle tratado com DMSO (valor de  $p < 0,05$ ; delta de metilação  $> 10\%$ ). Cada coluna representa uma amostra, cada linha representa uma sonda diferencialmente metilada, e as amostras foram agrupadas de acordo com sua semelhança de perfil de metilação. Cores do heatmap: verde = menores níveis de metilação, vermelho = maiores níveis de metilação. Cores da legenda: Azul = Linhagem HBE tratada com DMSO (grupo controle); vermelho =

Linhagem HBE tratada com gly 10  $\mu\text{m}$  por 72 horas e cinza = Linhagem HBE tratada com gly 1000  $\mu\text{m}$  por 72 horas.

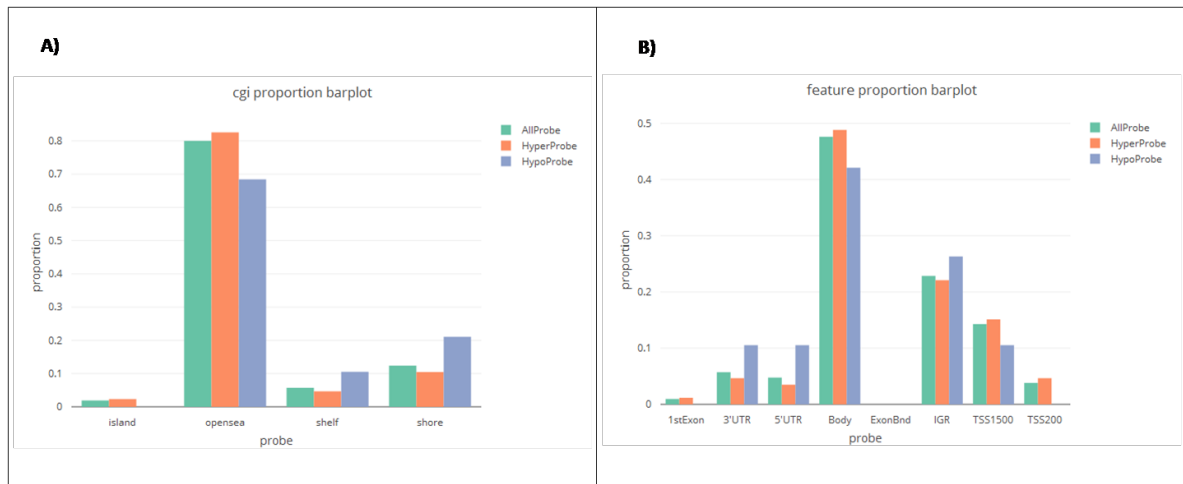
A partir da lista de genes diferencialmente metilados após o tratamento com gly 10  $\mu\text{m}$  (Anexo C) foi feita a análise de enriquecimento de processos biológicos e funções moleculares utilizando o banco de dados *Gene Ontology*. Na Figura 36a podemos observar que a maior parte dos genes encontrados está envolvida com a regulação biológica da célula e processos metabólicos. Já em relação à função molecular os genes alterados codificam proteínas que na maioria se ligam as outras proteínas (figura 36b).



**Figura 36.** Análise de enriquecimento de processos biológicos e funções moleculares utilizando o banco de dados Gene Ontology após o tratamento com gly 10  $\mu\text{m}$  em relação ao controle. **A)** Lista dos processos biológicos dos genes diferencialmente metilados, **B)** Lista de funções moleculares dos genes diferencialmente metilados.

Dentre as sondas hipometiladas não há uma proporção maior do que a esperada pela distribuição de sondas do microarranjo entre regiões de ilha e *opensea*, porém nas regiões *shelf* e *shore* existem uma proporção maior. Já entre as sondas hipermetiladas observamos uma menor proporção em regiões de ilha, *shelf* e *shore* e uma maior proporção em *opensea* (Figura 39a). Os SDM também foram avaliados de acordo com a sua região gênica (Figura 39b) e dentre as sondas hipometiladas foi encontrado uma maior proporção nas 3'UTR, 5'UTR e Regiões Intergênicas do Genoma (IGR, do inglês *Intergenic Genomic Region*). E em relação às

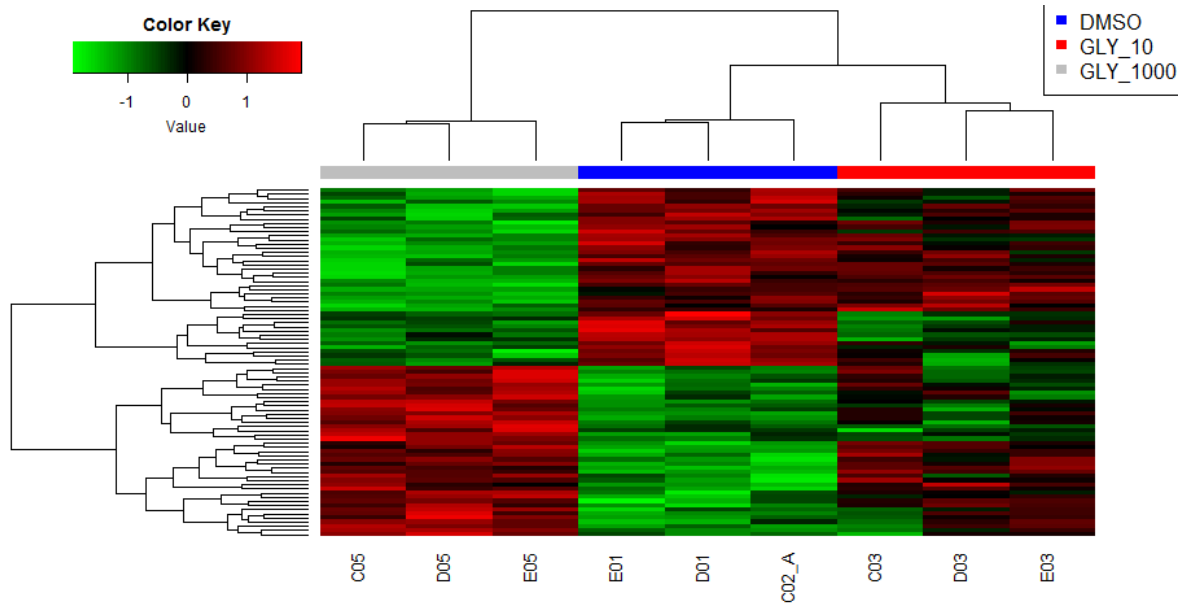
sondas hipermetiladas foi encontrada uma maior proporção na região *opensea* e regiões promotoras (TSS200 e TSS1500).



**Figura 37.** Distribuição das sondas hiper e hipometiladas após o tratamento com gly 10 µm em relação ao controle de acordo com a proximidade a ilhas CpG (A) e região gênica (B). Legenda de cores: proporção das sondas incluídas no microarranjo, laranja = proporção das sondas hipermetiladas e azul = proporção das sondas hipometiladas.

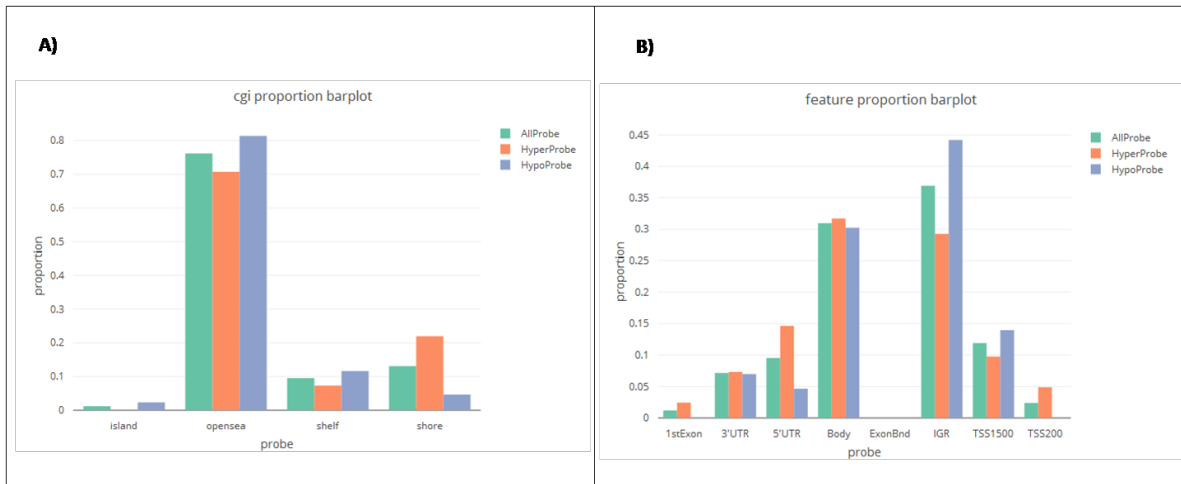
Na comparação entre a dose 1000 µm de gly e o controle foram encontrados 84 sítios diferencialmente metilados (SDM) ( $p < 0,05$  e delta de metilação  $> 10\%$ ). Dentre os SDM 51,2% estavam hipometilados e 48,8% hipermetilados conforme pode ser observado na figura 38, pela predominância da cor vermelha no grupo tratado. Além disso, neste *heatmap* também podemos observar que as células tratadas com gly 10 µm apresentam um perfil intermediário entre o controle e a maior dose.





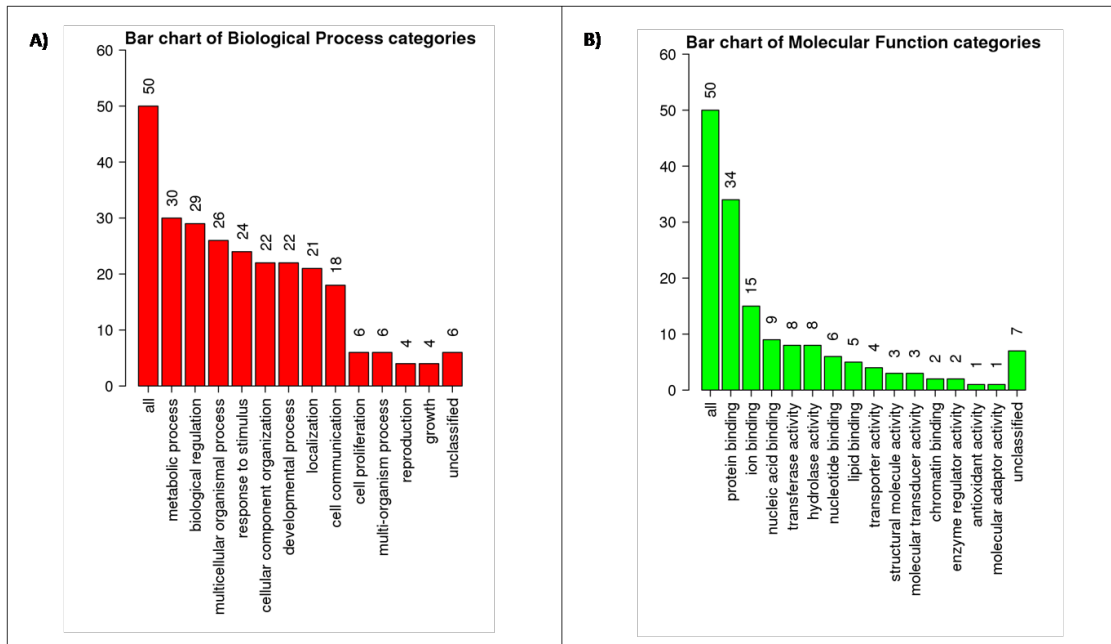
**Figura 38.** *Heatmap* de sítios CpG diferencialmente metilados após o tratamento glifosato 1000  $\mu\text{m}$  em relação ao controle tratado com DMSO (valor de  $p < 0,05$ ; delta de metilação  $> 10\%$ ). Cada coluna representa uma amostra, cada linha representa uma sonda diferencialmente metilada, e as amostras foram agrupadas de acordo com sua semelhança de perfil de metilação. Cores do heatmap: verde = menores níveis de metilação, vermelho = maiores níveis de metilação. Cores da legenda: Azul = Linhagem HBE tratada com DMSO (grupo controle); vermelho = Linhagem HBE tratada com gly 1000  $\mu\text{m}$  por 72 horas e cinza = Linhagem HBE tratada com gly 1000  $\mu\text{m}$  por 72 horas.

Dentre as sondas hipometiladas há uma proporção maior do que a esperada pela distribuição de sondas do microarranjo entre regiões de *opensea*. Já entre as sondas hipermetiladas observamos uma menor proporção em regiões de ilhas, *shelf* e *opensea* e uma maior proporção em *shore* (figura 39a). Os SDM também foram avaliados de acordo com a sua região gênica (Figura 39b) e dentre as sondas hipometiladas foi encontrado uma maior proporção nas Regiões Intergênicas do Genoma (IGR, do inglês *Intergenic Genomic Region*) e TSS1500. E em relação às sondas hipermetiladas foi encontrada uma maior proporção na região 5'UTR, corpo e TSS200.



**Figura 39.** Distribuição das sondas hiper e hipometiladas após o tratamento com gly 1000  $\mu\text{m}$  em relação ao controle de acordo com a proximidade a ilhas CpG (A) e região gênica (B). Legenda de cores: proporção das sondas incluídas no microarranjo, laranja = proporção das sondas hipermetiladas e azul = proporção das sondas hipometiladas.

A partir da lista de genes diferencialmente metilados após o tratamento com gly 1000  $\mu\text{m}$  (Anexo D) foi feita a análise de enriquecimento de processos biológicos e funções moleculares utilizando o banco de dados *Gene Ontology*. Na (Figura 40a) podemos observar que a maior parte dos genes encontrados está envolvida com a regulação biológica da célula e processos metabólicos. Já em relação à função molecular os genes alterados codificam proteínas que se ligam as outras proteínas (Figura 40b).



**Figura 40. Análise de enriquecimento de processos biológicos e funções moleculares utilizando o banco de dados *Gene Ontology* após o tratamento com gly 1000  $\mu\text{m}$  em relação ao controle. A) Lista dos processos biológicos dos genes diferencialmente metilados, B) Lista de funções moleculares dos genes diferencialmente metilados.**

Na comparação entre os sítios diferencialmente metilados encontrados nas doses 10  $\mu\text{m}$  e a dose 1000  $\mu\text{m}$  em relação ao controle foram observados 9 Sítios Diferencialmente Metilados (SDM) em comum (Tabela 8).

**Tabela 8. Lista Sítios Diferenciados Metilados (SDM) em comum com o tratamento gly 10  $\mu\text{m}$  e gly 1000  $\mu\text{m}$ .**

Probe ID	Gene	Feat.cgi	deltaBeta	P.Value
cg01328499	NNT	Body-opensea	0.129862520236308	0.000208216361198963
cg05831237		IGR-opensea	0.122958001198341	4.39162179562682e-05
cg09951759	GPHN	Body-opensea	0.196409344615929	0.00062376014154669
cg12056772	CANT1	3'UTR-shore	-0.108687701855403	0.000611772455403622
cg19318707		IGR-opensea	-0.102439951555394	8.68606218426515e-07
cg20202037	MECOM	5'UTR-opensea	0.103118252655432	0.00016987802595122
cg21095808	CTDP1	Body-shelf	-0.140564084531739	0.000403485679781873
cg22678398	RAP2B	3'UTR-shelf	0.119198769225273	1.83215875290152e-05
cg23210303	CD44	TSS1500-shore	0.135303204377556	7.45450884874339e-06

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados a citotoxicidade de quatro herbicidas mais utilizados em Barretos, SP e no Brasil, são estes: atrazina, hexazinona, 2,4-D e glifosato. Para essas análises utilizamos duas linhagens celulares de pulmão, a A549 e HBE.

O primeiro herbicida analisado foi a ATZ, que demonstrou ser citotóxica apenas na concentração 10  $\mu$ M, na linhagem celular A549 (Figura 19a). Estudo realizado por Manske, 2004<sup>150</sup> na linhagem celular normal de fibroblasto demonstrou uma diminuição na viabilidade celular em baixas concentrações da ATZ. O mesmo resultado também foram encontrados em células CHO<sup>151, 152</sup>. Na linhagem HBE a concentração de 10  $\mu$ M também demonstrou-se ser citotóxica, mas apenas com redução significativa em 24h. No entanto, nas concentrações mais baixas a ATZ ocasionou um aumento significativo da viabilidade celular, após 72 horas de exposição (figura 19b). Em células de próstata (RM1)<sup>153</sup>, células intestinais normais de rato (IEC-6)<sup>152</sup> expostas a ATZ também ocasionou um aumento da proliferação celular. Fazendo-se necessários mais ensaios para esclarecer em quais processos celulares a ATZ pode estar afetando na linhagem normal pulmonar (HBE). Estudos relataram que a atrazina afeta os sistemas endócrino, reprodutivo e neuronal<sup>154-156</sup>, porém ainda não está claro como esse herbicidas podem afetar as células pulmonares humanas.

Para as análises com o herbicida hexazinona, em nossos resultados não foi observado nenhuma citototoxicidade em nenhuma das linhagens celulares testadas (figura 20). Não existe nenhum dado na literatura avaliando a ação da HEX em linhagens celulares humanas. E estudos realizados com ratos, porquinho-da-índia<sup>157</sup>, insetos aquáticos<sup>158</sup> e salmão<sup>159</sup> também não encontraram efeitos citotóxicos após a exposição deste herbicida.

Por outro lado, nas análises com o herbicida 2,4-D, foi demonstrada uma significativa redução da viabilidade apenas na concentração 10  $\mu$ M (Figura 21a) nas linhagens celulares A549 e HBE, respectivamente. No tempo de 48h na linhagem HBE a concentração LEO, 0,1  $\mu$ M e 1  $\mu$ M foi verificado um aumento na viabilidade celular (Figura 21b). Foi realizado um outro teste de citotoxicidade para a linhagem HBE utilizando a metodologia da sulforrodamina B (SRB), e a exposição das células ao princípio ativo não acarretou nenhuma alteração (Figura 23b). O teste de SRB, diferente do ensaio de MTS, não distingue as células viáveis das não viáveis e sua coloração é independente da via metabólica<sup>145</sup>. O que sugere que este herbicida possa alterar os processos metabólicos. Estudos que avaliaram a citotoxicidade do herbicida 2,4-D em linhagens celulares (MCF7, HepG2, CHO) demonstraram que esta substância parece

ter um efeito citostático em baixas concentrações e em concentrações elevadas causam morte celular <sup>160-165</sup>.

O herbicida glifosato apresentou uma significativa redução da viabilidade apenas na concentração elevada de 1000  $\mu\text{M}$  (Figura 24a) na linhagem celular A549. Na linhagem HBE a concentração de 1000  $\mu\text{M}$  também demonstrou-se ser citotóxica em 24 horas e 48 horas, mas no tempo de 72 horas a concentração 0,01  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  verificou-se o aumento da viabilidade celular (Figura 24b). Estudos recentes na literatura verificaram o aumento da proliferação celular em outras linhagens celulares, como HepG2, HEK293 e JEG3, expostas em baixas concentrações de GLY e curto período de tempo <sup>166, 167</sup>. Estes trabalhos revelaram que concentrações realmente baixas estimulam a proliferação celular, especialmente em células cancerosas que são instáveis e que apresentam proliferação celular ativa <sup>166</sup>. Diferentemente do que ocorreu com os nossos resultados onde a proliferação sofreu alteração na linhagem pulmão normal HBE.

Além do GLY, a ATZ e 2,4 D apresentaram no tempo de 72 horas na mesma linhagem um aumento da viabilidade celular em baixas concentrações. A linhagem HBE vem sendo estudada em vários trabalhos recentes em relação e exposição a fatores ambientais classificados como carcinogênicos. Estes estudos relatam os efeitos destes fatores na transformação maligna desta linhagem celular <sup>168-172</sup>. Sendo assim, esta linhagem é possível de ser utilizada para mimetizar condições mais próximas a realidade.

A partir desses resultados e também em relação aos custos dos experimentos de metilação, seguimos com dois princípios ativos para as análises genotóxicas e análise do perfil de metilação, sendo eles o 2,4-D (10  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$ ) e o glifosato (0,04  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ ). Estas concentrações possibilitaram análise de uma condição de aumento da viabilidade celular (intermediária) e outra de inibição de crescimento (maior concentração) quando as células foram expostas aos agrotóxicos. Além disso, estas doses de exposição não afetaram mais de 80% a viabilidade celular em 72 horas.

Dessa forma, nas análises genotóxicas por Western Blot (WB) e também pela frequência de MN no tempo de 24 horas foi demonstrado que o herbicida GLY (10  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$ ) nessas concentrações não apresentam uma genotoxicidade na linhagem HBE. Porém, em 72 horas esse dano aparenta aumentar a fosforilação da H2AX, mas não induz a formação aumentada de MN, com significância estatística. Kwiatkowska et al. 2018 verificaram por meio de ensaio cometa em células mononucleares do sangue expostas a GLY nas

concentrações de 0,25 mM e 10 mM por 24 horas, que o herbicida induziu a lesões no DNA. Woźniak et al, 2018 <sup>173</sup> demonstraram em células de sangue total genotoxicidade no tempo de 24 horas, tanto do princípio ativo quanto da sua formulação comercial e seu metabólito (AMPA) em concentrações que estavam dentro do nosso *range*.

Porém no herbicida 2,4-D em 24 horas e na concentração mais alta (10 µM) observamos danos tanto pela fosforilação da H2AX quanto na frequência de MN e em 72 horas o mesmo acontece na análise da fosforilação da H2AX e PARP. O PARP é ativado em respostas às quebras de fitas no DNA e ao dano celular provocado por moléculas oxidantes <sup>174</sup>. O estudo de Sousa, 2012 <sup>175</sup> descreve a interligação de PARP-1 com proteínas envolvidas em vias de reparo como BER, NER, HR e NHEJ, bem como seu envolvimento com sensores de danos ao DNA (ATM, ATR, P53) e indutores de morte celular (caspase-3 e caspase-8). Holland, 2002 <sup>176</sup> em seu estudo apresentou resultados inconclusivos em relação à sua genotoxicidade, em culturas de sangue total ou linfócitos expostas a 2,4-D, assim como no glifosato em baixas concentrações <sup>177</sup>. Porém, foram encontrados em ambos os herbicidas aumento nas trocas de cromátides irmãs. Para ambos os agrotóxicos os danos ao DNA em sua maioria são associados também à sua formulação comercial ou metabólitos <sup>114-116</sup>.

Para as análises de metilação é importante destacarmos que este é o primeiro estudo sobre a alteração da metilação do DNA em células humanas tratadas com glifosato e 2,4-D usando a plataforma *Illumina HumanMethylation 850k* específica para cada local do genoma. A plataforma de metilação do DNA da Infinium é altamente adequada para a descoberta de novos marcadores de metilação do DNA e devido a um pré-processamento altamente padronizado garante alta reprodutibilidade <sup>127</sup>.

Padrões distintos de metilação do DNA no genoma foram observados após o tratamento com as duas concentrações e os dois herbicidas. Foram encontrados 411 sítios diferencialmente metilados na exposição ao herbicida 2,4-D (Figura 27 e 31) e 189 SDM na exposição ao GLY (Figura 35 e 38). Encontramos 23 Sítios Diferenciados Metilados comuns entre a concentração 0,04 µM e 10 µM do 2,4-D e 9 SDM entre as concentrações 10 µM e 1000 µM do GLY.

A maioria dos genes encontrados após a exposição de 72 horas dos herbicidas glifosato e 2,4-D estão envolvidos em processos biológicos e metabólicos. Essas alterações de metilação do DNA podem induzir uma ampla gama de potenciais mudanças nos padrões de expressão gênica que podem levar à desregulação dos processos relacionados à

transformação celular e tumorigênese <sup>178</sup>. Apesar de encontrarmos uma semelhança nos processos biológicos entre os herbicidas, o padrão de metilação dos sítios (SDM) observados são diferentes. No 2,4-D encontramos uma hipermetilação dos SDM e no GLY esse padrão se modifica, principalmente na concentração mais alta, ou seja, onde praticamente metade dos sítios são hipermetilados e outra porção hipometilada.

Dos totais de sítios 88 SDM e 44 SDM, 2,4-D e GLY respectivamente, estão localizados em regiões promotoras de genes e alguns deles são regiões de genes já conhecidas por estarem envolvidos nos processos de carcinogênese, reparo do DNA e fatores de transcrição, como o *CD44 molecule (CD44)* <sup>179</sup>, *Histona desacetilase 4 (HDAC4)* <sup>180</sup>, *forkhead box P1 (FOXP1)* <sup>181</sup>, *MDS1 and EVI1 complex locus (MECOM)* <sup>182</sup>, *E2F transcription factor 5 (E2F5)* <sup>183</sup>, *FA complementation group C (FANCC)* <sup>184</sup>, *spastic paraplegia 20 (SPG20)* <sup>185</sup>, *microRNA 518b (MIR518b)* <sup>186</sup> (Tabelas em anexo). Com destaque para o estudo de Zhou et al. 2018 <sup>185</sup> que encontraram uma proliferação de células gástricas induzida pelo silenciamento por metilação do gene *SPG20*, ativando a via de sinalização EGFR/MAPK. Ackermann et al. 2018 demonstrou que a regulação negativa da expressão de FOXP1 é um evento comum na patogênese do neuroblastoma de alto risco e pode contribuir para a progressão do tumor e desfecho desfavorável do paciente. Os estudos de Zhang et al. 2012 <sup>137-138</sup> também encontraram alterações no perfil de metilação das histonas desacetilases, quando as células K562 (leucêmica) foi exposta aos agrotóxicos organofosforadas. Além disso, foram encontrados vários SDM em regiões promotoras de genes envolvidos na carcinogênese. Vaz et al. 2017 <sup>178</sup> verificaram a exposição crônica da fumaça do cigarro na linhagem HBE, e demonstraram que a metilação do DNA tem um papel importante nas alterações celulares ao longo do tempo de exposição. Dessa forma, demonstrando que os fatores epigenéticos podem estar envolvidos na iniciação da carcinogênese.

## 7 CONCLUSÃO

Com base em nossos dados podemos concluir que:

1) Foi possível verificar pelos ensaios de citotoxicidade aumento da viabilidade celular nas condições intermediárias dos herbicidas ATZ, GLY e 2,4-D na linhagem celular HBE e redução da viabilidade somente na maior concentração nas duas linhagens estudadas, o que pode sugerir que estes princípios ativos em baixas concentrações possam estar envolvidos em processos de proliferação celular.

2) Foi possível observar pelos ensaios de genotoxicidade evidente dano de DNA somente em 2,4-D na concentração de 10 uM. Verificou-se que o GLY não apresentou genotoxicidade nas concentrações analisadas. O que sugere que o GLY pode não promover danos de DNA nas concentrações estudadas na linhagem de pulmão HBE.

3) As análises de metilação revelaram perfis distintos de sítios diferencialmente metilados entre as condições estudadas em ambos os agrotóxicos. Foi possível revelar sítios comuns de acordo com o perfil de metilação entre as concentrações de 0,04  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  do 2,4-D e também entre as concentrações 10  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$  do GLY. Foi observado que a maioria dos genes diferencialmente metilados em GLY e 2,4-D estão envolvidos em processos biológicos e metabólicos. Mas também foi possível revelar, sítios diferencialmente metilados em regiões promotoras de genes já conhecidas por estarem envolvidos nos processos de carcinogênese, reparo do DNA e fatores de transcrição.

4) Nossos resultados, foram os primeiros a mostrar a citotoxicidade, genotoxicidade e alterações no perfil de metilação de DNA em linhagem celular de pulmão quando expostas aos herbicidas GLY e 2,4-D. Estes resultados sugerem que independente dos danos ao DNA, os herbicidas podem regular processos epigenéticos importantes para o metabolismo celular, envolvendo processos biológicos diferentes podendo contribuir para o processo de iniciação da carcinogênese. Estudos futuros serão realizados para confirmação destas hipóteses.



## 8 REFERÊNCIA

1. Teixeira JC. *Modernização da agricultura no Brasil: impactos econômicos, sociais e ambientais*. **Revista Eletrônica AGB-TL**. 2005;1(2):21-42.
2. Martine G. *A trajetória da modernização agrícola: a quem beneficia?* **Lua Nova: Revista de Cultura e Política**. 1991(23):7-37.
3. Nunes SP. *O desenvolvimento da agricultura brasileira e mundial e a idéia de Desenvolvimento Rural*. **Departamento de Estudos Sócio-Econômicos Rurais, nº157**. 2007.
4. Pintor Ed, Silva GMd, Piacenti CA. *Crédito rural e crescimento econômico no Brasil*2015.
5. Borges A. *O grande desafio do agronegócio no Brasil*. 2007.
6. *PIB AGRO São Paulo*. [Internet]: CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - ESALQ/USP; 2013 [cited Mai 16 ];Available from: <http://cepea.esalq.usp.br/pibsp/>.
7. *Agronegócios*. [Internet]: Agência Paulista de Promoção de Investimentos e Competitividade; 2013 [cited 2016 Mai 16];Available from: <http://www.investe.sp.gov.br/setores-de-negocios/agronegocios/>.
8. Porto MF, Soares WL. *Development model, pesticides, and health: a panorama of the Brazilian agricultural reality and proposals for an innovative research agenda*. **Rev bras Saúde ocup**. 2012;37(125): 17-50.
9. *Programa de Aceleração do Crescimento (PAC)*. [Internet]: Brasil - Ministério do Planejamento; 2007 [cited 2016 Mai 16];Available from: <http://www.pac.gov.br>.
10. Leite SP, Junior VJW. *Estado, políticas públicas e agronegócio no brasil: revisitando o papel do crédito rural*. **Revista Pós Ciências Sociais**. 2015;11(22).
11. Rigotto RM, Vasconcelos DP, Rocha MM. *Pesticide use in Brazil and problems for public health*. **Cad Saúde Pública**. 2014;30(7):1-3.
12. Hirata F. *Brazilian Pesticide Market Overview*. [Internet]: Agro news; 2014 [cited 2016 Mai 16];Available from: <http://news.agropages.com/News/NewsDetail---11750.htm>.
13. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Câncer (INCA). *Vigilância do câncer relacionado ao trabalho e ao ambiente*. 2010;2.

14. Fosu-Mensah BY, Okoffo ED, Darko G, Gordon C. *Organophosphorus pesticide residues in soils and drinking water sources from cocoa producing areas in Ghana*. **Environmental Systems Research**. 2016;5(1):1.
15. Meffe R, De Bustamante I. *Review of the occurrence of emerging organic contaminants and pesticides in Italian surface water and groundwater*. 2016.
16. Pignati WA, Machado JM, Cabral JF. *Acidente rural ampliado: o caso das "chuvas" de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde-MT*. **Cien Saude Colet**. 2007;12(1):105-14.
17. Blair A, Ritz B, Wesseling C, Freeman LB. *Pesticides and human health*. **Occupational and environmental medicine**. 2014:oemed-2014-102454.
18. Blankson G, Osei-Fosu P, Adeendze E, Ashie D. *Contamination levels of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in vegetables marketed in Accra, Ghana*. **Food Control**. 2016;68:174-80.
19. Rose MT, Cavagnaro TR, Scanlan CA, Rose TJ, Vancov T, Kimber S, et al. *Impact of herbicides on soil biology and function*. **Advances in Agronomy**. 2016;136:133-220.
20. Weichenthal S, Moase C, Chan P. *A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort*. **Environmental health perspectives**. 2010:1117-25.
21. Landrigan PJ, Benbrook C. *GMOs, herbicides, and public health*. **New England Journal of Medicine**. 2015;373(8):693-5.
22. INCA. *POSICIONAMENTO DO INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA ACERCA DOS AGROTÓXICOS*. [Internet]: INCA; 2015 [cited JUL 2016]; Available from: [http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento\\_do\\_inca\\_sobre\\_os\\_agrototoxicos\\_06\\_abr\\_15.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrototoxicos_06_abr_15.pdf).
23. IBAMA. *Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil*. **Diretoria de Qualidade Ambiental**. 2009 - 2014.
24. Bolognesi C. *Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies*. **Mutat Res**. 2003;543(3):251-72.
25. Adad LM, de Andrade HH, Kvitko K, Lehmann M, Cavalcante AA, Dihl RR. *Occupational exposure of workers to pesticides: Toxicogenetics and susceptibility gene polymorphisms*. **Genet Mol Biol**. 2015;38(3):308-15.

26. Tominack RL, Tominack R. *Herbicide formulations*. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**. 2000;38(2):129-35.
27. Zimdahl RL. *Weed-crop competition: a review*: John Wiley & Sons; 2007.
28. Rebelo R, Vasconcelos R, Buys B, Rezende J, Moraes K, Oliveira R. *Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Brasília, Brazil. 2010.
29. Maroni M, Fanetti AC, Metruccio F. *Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture*. **La Medicina del lavoro**. 2005;97(2):430-7.
30. Holliday R. *Epigenetics: a historical overview*. **Epigenetics**. 2006;1(2):76-80.
31. Ministério do meio Ambiente. [Internet] 2017 [cited 20 JUL];Available from: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>.
32. Gonçalves EA, da Cruz VMC. *Segurança e medicina do trabalho*. São Paulo: LTr. 1996.
33. Monquero P, Christoffoleti P, Santos C. *Glyphosate em mistura com herbicidas alternativos para o manejo de plantas daninhas*. **Planta Daninha**. 2001;19(3):375-80.
34. Di Meo NL. *Understanding the Inheritance and Mechanism of Auxinic Herbicide Resistance in Wild Radish (*Raphanus raphanistrum* L.)*. 2012.
35. Queiroz ARSd, Vidal RA. *O desenvolvimento de culturas tolerantes ao herbicida diclorofenoxiacetato: revisão de literatura*. **Planta daninha Viçosa, MG Vol 32, n 3,(jul/set 2014), p 649-654**. 2014.
36. Pokorny R. *New Compounds. Some Chlorophenoxyacetic Acids*. **Journal of the American Chemical Society**. 1941;63(6):1768-.
37. Song Y. *Insight into the mode of action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) as an herbicide*. **Journal of integrative plant biology**. 2014;56(2):106-13.
38. Devine M, Duke SO, Fedtke C. *Physiology of herbicide action*: PTR Prentice Hall; 1992.
39. Tripathy NK, Routray PK, Sahu GP, Kumar AA. *Genotoxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid tested in somatic and germ-line cells of *Drosophila**. **Mutation Research/Genetic Toxicology**. 1993;319(3):237-42.

40. PUBCHEM. [Internet] [cited 2017 Jan]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1486#section=Agrochemical-Information>.
41. Atwood D, Paisley-Jones C. *Pesticides industry sales and usage 2008–2012 market estimates*. **US Environmental Protection Agency, Washington, DC Google Scholar**. 2017.
42. Goodman JE, Loftus CT, Zu K. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid and non-Hodgkin's lymphoma, gastric cancer, and prostate cancer: meta-analyses of the published literature. **Annals of epidemiology**. 2015;25(8):626-36. e4.
43. Nhanes I. *Fourth national report on human exposure to environmental chemicals*. **Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia**. 2009.
44. Osterloh J, Lotti M, Pond SM. *Toxicologic studies in a fatal overdose of 2, 4-D, MCPP, and chlorpyrifos*. **Journal of analytical toxicology**. 1983;7(3):125-9.
45. Neuberger JS. *Atrazine and/or triazine herbicides exposure and cancer: An epidemiologic review*. **Journal of Agromedicine**. 1996;3(2):9-30.
46. Inoue-Choi M, Weyer PJ, Jones RR, Booth BJ, Cantor KP, Robien K, et al. *Atrazine in public water supplies and risk of ovarian cancer among postmenopausal women in the Iowa Women's Health Study*. **Occupational and Environmental Medicine**. 2016:oemed-2016-103575.
47. Baxter L, Brain RA, Lissemore L, Solomon KR, Hanson ML, Prosser RS. *Influence of light, nutrients, and temperature on the toxicity of atrazine to the algal species *Raphidocelis subcapitata*: Implications for the risk assessment of herbicides*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2016;132:250-9.
48. Gammon DW, Aldous CN, Carr WC, Sanborn JR, Pfeifer KF. *A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects*. **Pest management science**. 2005;61(4):331-55.
49. Davidson I. *Metabolism and kinetics of atrazine in man*. **Winston-Salem, NC: Department of Physiology/Pharmacology, Bowman Gray School of Medicine Submitted to the World Health Organization by Syngenta Crop Protection AG**. 1988.
50. Mcelroy JA, Gangnon RE, Newcomb PA, Kanarek MS, Anderson HA, Brook JV, et al. *Risk of breast cancer for women living in rural areas from adult exposure to atrazine from well water in Wisconsin*. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**. 2007;17(2):207.
51. Hopenhayn-Rich C, Stump M, Browning S. *Regional assessment of atrazine exposure and incidence of breast and ovarian cancers in Kentucky*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 2002;42(1):127-36.

52. MacLennan PA, Delzell E, Sathiakumar N, Myers SL, Cheng H, Grizzle W, et al. *Cancer incidence among triazine herbicide manufacturing workers*. **Journal of occupational and environmental medicine**. 2002;44(11):1048-58.
53. De Roos A, Zahm S, Cantor K, Weisenburger D, Holmes F, Burmeister L, et al. *Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men*. **Occupational and Environmental Medicine**. 2003;60(9):e11-e.
54. Eldridge JC, Stevens JT, Breckenridge CB. *Atrazine interaction with estrogen expression systems*. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 196*: Springer; 2008. p. 147-60.
55. Huang P, Yang J, Ning J, Wang M, Song Q. *Atrazine triggers DNA damage response and induces DNA double-strand breaks in MCF-10A cells*. **International journal of molecular sciences**. 2015;16(7):14353-68.
56. Lioi MB, Scarfi MR, Santoro A, Barbieri R, Zeni O, Salvemini F, et al. *Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E 9636*. **Environmental and molecular mutagenesis**. 1998;32(1):39-46.
57. Roloff BD, Belluck DA, Meisner LF. *Cytogenetic studies of herbicide interactions in vitro and in vivo using atrazine and linuron*. **Archives of environmental contamination and toxicology**. 1992;22(3):267-71.
58. Kligerman AD, Doerr CL, Tennant AH, Peng B. *Cytogenetic studies of three triazine herbicides: II. In vivo micronucleus studies in mouse bone marrow*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 2000;471(1):107-12.
59. Bethsass J, Colangelo A. *European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use*. **International journal of occupational and environmental health**. 2013.
60. Cox C. *Glyphosate (roundup)*. **Herbicide fact sheet, Journal of Pesticide Reform**. 1998;18(3).
61. Lautre Y. *Pesticides Brèves (2006)*. 2005.
62. Takahashi K, Horie M, Aoba N. *[Analysis of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in agricultural products by HPLC]*. **Shokuhin eiseigaku zasshi Journal of the Food Hygienic Society of Japan**. 2001;42(5):304-8.
63. Acquavella JF, Alexander BH, Mandel JS, Gustin C, Baker B, Chapman P, et al. *Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study*. **Environmental Health Perspectives**. 2004;112(3):321.

64. Contardo-Jara V, Klingelmann E, Wiegand C. *Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in Lumbriculus variegatus and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes.* **Environmental Pollution.** 2009;157(1):57-63.
65. 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.** 2009;262(3):184-91.
66. James C. *Global status of commercialized Biotech/GM Crops 2008. The International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications (ISAAA Brief# 39), Ithaca, NY. Ithaca, NY: ISAAA.* 2008.
67. Defarge N, Takács E, Lozano VL, Mesnage R, Spiroux de Vendômois J, Séralini G-E, et al. *Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels.* **International journal of environmental research and public health.** 2016;13(3):264.
68. Mesnage R, Defarge N, de Vendomois JS, Seralini G. *Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits.* **Food and Chemical Toxicology.** 2015;84:133-53.
69. Peterson HG, Boutin C, Freemark KE, Martin PA. *Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed.* **Aquatic Toxicology.** 1997;39(2):111-34.
70. Yegnasubramanian S, Haffner MC, Zhang Y, Gurel B, Cornish TC, Wu Z, et al. *DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity.* **Cancer Res.** 2008;68(21):8954-67.
71. Blair A, Freeman LB. *Epidemiologic studies in agricultural populations: observations and future directions.* **J Agromedicine.** 2009;14(2):125-31.
72. Blair A, Dosemeci M, Heineman EF. *Cancer and other causes of death among male and female farmers from twenty-three states.* **American journal of industrial medicine.** 1993;23(5):729-42.
73. Vakonaki E, Androutsopoulos VP, Liesivuori J, Tsatsakis AM, Spandidos DA. *Pesticides and oncogenic modulation.* **Toxicology.** 2013;307:42-5.
74. Damalas CA, Georgiou EB, Theodorou MG. *Pesticide use and safety practices among Greek tobacco farmers: A survey.* **International journal of environmental health research.** 2006;16(5):339-48.
75. Blair A, Hines CJ, Thomas KW, Alavanja MC, Freeman LE, Hoppin JA, et al. *Investing in prospective cohorts for etiologic study of occupational exposures.* **Am J Ind Med.** 2015;58(2):113-22.

76. Tucker JD, Preston RJ. *Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment*. **Mutat Res**. 1996;365(1-3):147-59.
77. Bull S, Fletcher K, Boobis AR, Battershill JM. *Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review*. **Mutagenesis**. 2006;21(2):93-103.
78. Mamane A, Raheison C, Tessier JF, Baldi I, Bouvier G. *Environmental exposure to pesticides and respiratory health*. **Eur Respir Rev**. 2015;24(137):462-73.
79. Gomes J, Lloyd O, Revitt D. *The influence of personal protection, environmental hygiene and exposure to pesticides on the health of immigrant farm workers in a desert country*. **International archives of occupational and environmental health**. 1999;72(1):40-5.
80. Jindal T, Singh DK, Agarwal H. *Effect of UV radiation and temperature on mineralization and volatilization of coumaphos in water*. **Journal of Environmental Science and Health Part B**. 2007;42(4):367-72.
81. Jaga K, Dharmani C. *Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides*. **Revista panamericana de salud pública**. 2003;14(3):171-85.
82. Ye M, Beach J, Martin JW, Senthilselvan A. *Occupational pesticide exposures and respiratory health*. **International journal of environmental research and public health**. 2013;10(12):6442-71.
83. Thundiyl JG, Stober J, Besbelli N, Pronczuk J. *Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool*. **Bulletin of the World Health Organization**. 2008;86(3):205-9.
84. Carvalho TC, Peters JI, Williams RO. *Influence of particle size on regional lung deposition—what evidence is there?* **International Journal of Pharmaceutics**. 2011;406(1):1-10.
85. Damalas CA, Eleftherohorinos IG. *Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators*. **International journal of environmental research and public health**. 2011;8(5):1402-19.
86. Ziegler-Skylakakis K, Kielhorn J, Konnecker G, Koppenhofer J, Mangelsdorf I, Organization WH. *Thiourea*. 2003.
87. Buschinelli J. *Manual de orientação sobre controle médico ocupacional da exposição a substâncias químicas*. **São Paulo: Fundacentro**. 2014.
88. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. *Global cancer statistics, 2012*. **CA: a cancer journal for clinicians**. 2015;65(2):87-108.
89. INCA. *ESTIMATIVA I 2018 Incidência de Câncer no Brasil*. 2018.

90. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global cancer statistics*. **CA Cancer J Clin**. 2011;61(2):69-90.
91. Yang M. *A current global view of environmental and occupational cancers*. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**. 2011;29(3):223-49.
92. Guha N, Guyton KZ, Loomis D, Barupal DK. *Prioritizing Chemicals for Risk Assessment Using Chemoinformatics: Examples from the IARC Monographs on Pesticides*. **Environmental health perspectives**. 2016.
93. Fritschi L, McLaughlin J, Sergi C, Calaf G, Le Curieux F, Forastiere F, et al. *Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate*. **Red**. 2015;114.
94. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. *Environmental and chemical carcinogenesis*. In: **Seminars in cancer biology**; 2004. **Elsevier**. 14(6):473-86.
95. Knudson AG. *Two genetic hits (more or less) to cancer*. **Nature Reviews Cancer**. 2001;1(2):157.
96. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. *Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis*. **Toxicology and applied pharmacology**. 2011;254(2):86-99.
97. Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R. *Micronuclei and pesticide exposure*. **Mutagenesis**. 2011;26(1):19-26.
98. Shen Z. *Genomic instability and cancer: an introduction*. **Journal of molecular cell biology**. 2011;3(1):1-3.
99. Baumstark-Khan C, Hellweg CE, Reitz G. *Cytotoxicity and genotoxicity reporter systems based on the use of mammalian cells*. *Whole Cell Sensing System II*: **Springer**; 2010. p. 113-51.
100. Lan J, Gou N, Rahman SM, Gao C, He M, Gu AZ. *A quantitative toxicogenomics assay for high-throughput and mechanistic genotoxicity assessment and screening of environmental pollutants*. **Environmental science & technology**. 2016;50(6):3202-14.
101. Mostafalou S, Abdollahi M. *Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives*. **Toxicology and applied pharmacology**. 2013;268(2):157-77.
102. Turinetto V, Giachino C. *Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions*. **Nucleic acids research**. 2015;43(5):2489-98.



103. Sulli G, Di Micco R, di Fagagna FdA. *Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer*. **Nature Reviews Cancer**. 2012;12(10):709.
104. Georgoulis A, Vorgias CE, Chrousos GP, Rogakou EP. *Genome instability and  $\gamma$ H2AX*. **International journal of molecular sciences**. 2017;18(9):1979.
105. Graillet V, Tomasetig F, Cravedi J-P, Audebert M. *Evidence of the in vitro genotoxicity of methyl-pyrazole pesticides in human cells*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 2012;748(1):8-16.
106. Hershman JM, France B, Hon K, Damoiseaux R. *Direct quantification of gamma H2AX by cell-based high throughput screening for evaluation of genotoxicity of pesticides in a human thyroid cell lines*. **Environmental and molecular mutagenesis**. 2017;58(7):522-8.
107. Suárez-Larios K, Salazar-Martínez A-M, Montero-Montoya R. *Screening of Pesticides with the Potential of Inducing DSB and Successive Recombinational Repair*. **Journal of toxicology**. 2017;2017.
108. Fenech M. *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*. **Nature protocols**. 2007;2(5):1084.
109. Schmid W. *The micronucleus test*. **Mutat Res**. 1975;31:9-15.
110. Kisurina-Evgenieva O, Sutiagina O, Onishchenko G. *Biogenesis of micronuclei*. **Biochemistry (Moscow)**. 2016;81(5):453-64.
111. Tsamou M, Jennen DG, Claessen SM, Magkoufopoulou C, Kleinjans JC, van Delft JH. *Performance of in vitro  $\gamma$ H2AX assay in HepG2 cells to predict in vivo genotoxicity*. **Mutagenesis**. 2012;27(6):645-52.
112. Hershman JM, France B, Hon K, Damoiseaux R. *Direct quantification of gamma H2AX by cell-based high throughput screening for evaluation of genotoxicity of pesticides in a human thyroid cell lines*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 2017.
113. Watters GP, Smart DJ, Harvey JS, Austin CA. *H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 2009;679(1):50-8.
114. Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V. *Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation*. **Toxicology**. 2004;200(1):39-47.
115. Mustonen R, Kangas J, Vuojolahti P, Linnainmaa K. *Effects of phenoxyacetic acids on the induction of chromosome aberrations in vitro and in vivo*. **Mutagenesis**. 1986;1(4):241-5.

116. Korte C, Jalal S. 2, 4-D induced clastogenicity and elevated rates of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. **Journal of heredity**. 1982;73(3):224-6.
117. Williams GM, Aardema M, Acquavella J, Berry SC, Brusick D, Burns MM, et al. A review of the carcinogenic potential of glyphosate by four independent expert panels and comparison to the IARC assessment. **Critical reviews in toxicology**. 2016;46(sup1):3-20.
118. Baccarelli A, Bollati V. *Epigenetics and environmental chemicals*. **Current opinion in pediatrics**. 2009;21(2):243.
119. Szyf M. *The dynamic epigenome and its implications in toxicology*. **Toxicological Sciences**. 2007;100(1):7-23.
120. He C, Cole P. *Introduction: Epigenetics*. **Chemical reviews**. 2015;115(6):2223-4.
121. Bollati V, Baccarelli A. *Environmental epigenetics*. **Heredity**. 2010;105(1):105.
122. Miousse IR, Chalbot MC, Aykin-Burns N, Wang X, Basnakian A, Kavouras IG, et al. *Epigenetic alterations induced by ambient particulate matter in mouse macrophages*. **Environ Mol Mutagen**. 2014;55(5):428-35.
123. Umer M, Herceg Z. *Deciphering the epigenetic code: an overview of DNA methylation analysis methods*. **Antioxid Redox Signal**. 2013;18(15):1972-86.
124. Caiafa P, Zampieri M. *DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands*. **Journal of cellular biochemistry**. 2005;94(2):257-65.
125. Jones PA. *Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond*. **Nature Reviews Genetics**. 2012;13(7):484.
126. Takai D, Jones PA. *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22*. **Proceedings of the national academy of sciences**. 2002;99(6):3740-5.
127. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. *High density DNA methylation array with single CpG site resolution*. **Genomics**. 2011;98(4):288-95.
128. Deaton AM, Bird A. *CpG islands and the regulation of transcription*. **Genes & development**. 2011;25(10):1010-22.
129. Lerner L, Winn R, Hulbert A. *Lung cancer early detection and health disparities: the intersection of epigenetics and ethnicity*. **Journal of thoracic disease**. 2018;10(4):2498.

130. Nwanaji-Enwerem JC, Weisskopf MG, Baccarelli AA. *Multi-tissue DNA Methylation Age: Molecular Relationships and Perspectives for Advancing Biomarker Utility*. **Ageing research reviews**. 2018.
131. Koch A, Joosten SC, Feng Z, Ruijter TC, Draht MX, Melotte V, et al. *Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited*. **Nature Reviews Clinical Oncology**. 2018;1.
132. Hou L, Zhang X, Tarantini L, Nordio F, Bonzini M, Angelici L, et al. *Ambient PM exposure and DNA methylation in tumor suppressor genes: a cross-sectional study*. **Part Fibre Toxicol**. 2011;8:25.
133. Weisenberger DJ. *Characterizing DNA methylation alterations from the cancer genome atlas*. **The Journal of clinical investigation**. 2014;124(1):17-23.
134. Jones PA, Baylin SB. *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. **Nature reviews genetics**. 2002;3(6):415.
135. Cowley M, Oakey RJ. *Transposable elements re-wire and fine-tune the transcriptome*. **PLoS Genet**. 2013;9(1):e1003234.
136. Roman AC, Gonzalez-Rico FJ, Fernandez-Salguero PM. *B1-SINE retrotransposons: Establishing genomic insulatory networks*. **Mob Genet Elements**. 2011;1(1):66-70.
137. Zhang X, Wallace AD, Du P, Kibbe WA, Jafari N, Xie H, et al. *DNA methylation alterations in response to pesticide exposure in vitro*. **Environmental and molecular mutagenesis**. 2012;53(7):542-9.
138. Zhang X, Wallace AD, Du P, Lin S, Baccarelli AA, Jiang H, et al. *Genome-wide study of DNA methylation alterations in response to diazinon exposure in vitro*. **Environmental toxicology and pharmacology**. 2012;34(3):959-68.
139. Wirbisky-Hershberger SE, Sanchez OF, Horzmann KA, Thanki D, Yuan C, Freeman JL. *Atrazine exposure decreases the activity of DNMTs, global DNA methylation levels, and dnmt expression*. **Food and Chemical Toxicology**. 2017;109:727-34.
140. Kwiatkowska M, Reszka E, Woźniak K, Jabłońska E, Michałowicz J, Bukowska B. *DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study)*. **Food and Chemical Toxicology**. 2017;105:93-8.
141. Salvo LM, Malucelli MIC, da Silva JRM, Alberton GC, Silva De Assis HC. *Toxicity assessment of 2, 4-D and MCPA herbicides in primary culture of fish hepatic cells*. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**. 2015;50(7):449-55.

142. ACGIH. *Defining the Science of Occupational and Environmental Health*. [Internet] 2016 [cited Outubro]; Available from: <https://www.acgih.org/tlv-bei-guidelines/tlv-chemical-substances-introduction>.
143. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 17, de 13 de julho de 2006. Diário Oficial da União, Brasília, 14 de julho de 2006. Seção 1, p.23-37.*
144. U. S. Department Of Agriculture Forest Service. [Internet] 2016 [cited Outubro]; Available from: <http://www.fs.fed.us/>.
145. Vichai V, Kirtikara K. *Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening*. **Nature protocols**. 2006;1(3):1112.
146. Shahane SA, Nishihara K, Xia M. *High-Throughput and High-Content Micronucleus Assay in CHO-K1 Cells*. *High-Throughput Screening Assays in Toxicology*: Springer; 2016. p. 77-85.
147. Westerink WM, Schirris TJ, Horbach GJ, Schoonen WG. *Development and validation of a high-content screening in vitro micronucleus assay in CHO-k1 and HepG2 cells*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 2011;724(1):7-21.
148. Nordlund J, Bäcklin CL, Wahlberg P, Busche S, Berglund EC, Eloranta M-L, et al. *Genome-wide signatures of differential DNA methylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. **Genome biology**. 2013;14(9):r105.
149. Ghosh D. *Incorporating the empirical null hypothesis into the Benjamini-Hochberg procedure*. **Statistical applications in genetics and molecular biology**. 2012;11(4).
150. Manske MK, Beltz LA, Dhanwada KR. *Low-level atrazine exposure decreases cell proliferation in human fibroblasts*. **Archives of environmental contamination and toxicology**. 2004;46(4):438-44.
151. Freeman JL, Rayburn AL. *Aquatic herbicides and herbicide contaminants: In vitro cytotoxicity and cell-cycle analysis*. **Environmental Toxicology: An International Journal**. 2006;21(3):256-63.
152. Greenman SB, Rutten MJ, Fowler WM, Scheffler L, Shortridge LA, Brown B, et al. *Herbicide/pesticide effects on intestinal epithelial growth*. **Environmental research**. 1997;75(1):85-93.
153. Hu K, Tian Y, Du Y, Huang L, Chen J, Li N, et al. *Atrazine promotes RM1 prostate cancer cell proliferation by activating STAT3 signaling*. **International journal of oncology**. 2016;48(5):2166-74.
154. Goodman M, Mandel JS, DeSesso JM, Scialli AR. *Atrazine and pregnancy outcomes: a systematic review of epidemiologic evidence*. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**. 2014;101(3):215-36.

155. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs Jr DR, Lee D-H, et al. *Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses*. **Endocrine reviews**. 2012;33(3):378-455.
156. Ma K, Wu H-Y, Zhang B, He X, Li B-X. *Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells via microglial activation*. **Molecular BioSystems**. 2015;11(11):2915-24.
157. Kennedy Jr GL. *Acute and environmental toxicity studies with hexazinone*. **Toxicological Sciences**. 1984;4(4):603-11.
158. Kreutzweiser DP, Holmes SB, Behmer DJ. *Effects of the herbicides Hexazinone and Triclopyr Ester on aquatic insects*. **Ecotoxicology and environmental safety**. 1992;23(3):364-74.
159. Nieves-Puigdoller K, Björnsson BT, McCormick SD. *Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon*. **Aquatic Toxicology**. 2007;84(1):27-37.
160. Ester K, Ćurković-Perica M, Kralj M. *The phytohormone auxin induces G1 cell-cycle arrest of human tumor cells*. **Planta medica**. 2009;75(13):1423-6.
161. Soloneski S, González NV, Reigosa MA, Larramendy ML. *Herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro in presence of erythrocytes*. **Cell Biology International**. 2007;31(11):1316-22.
162. Gonzalez M, Soloneski S, Reigosa M, Larramendy M. *Genotoxicity of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and a commercial formulation, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese Hamster ovary (CHO) cells*. **Toxicology in Vitro**. 2005;19(2):289-97.
163. Bharadwaj L, Dhama K, Schneberger D, Stevens M, Renaud C, Ali A. *Altered gene expression in human hepatoma HepG2 cells exposed to low-level 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and potassium nitrate*. **Toxicology in vitro**. 2005;19(5):603-19.
164. Tuschl H, Schwab CE. *The use of flow cytometric methods in acute and long-term in vitro testing*. **Toxicology in vitro**. 2005;19(7):845-52.
165. Chen C, Jiang X, Gu S, Zhang Z. *MicroRNA-155 regulates arsenite-induced malignant transformation by targeting Nrf2-mediated oxidative damage in human bronchial epithelial cells*. **Toxicology letters**. 2017;278:38-47.
166. Mesnage R, Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini G-E. *Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles*. **BioMed research international**. 2014;2014.

167. Kašuba V, Milić M, Rozgaj R, Kopjar N, Mladinić M, Žunec S, et al. *Effects of low doses of glyphosate on DNA damage, cell proliferation and oxidative stress in the HepG2 cell line.* **Environmental Science and Pollution Research.** 2017;24(23):19267-81.
168. Zhai Q, Duan H, Wang Y, Huang C, Niu Y, Dai Y, et al. *Genetic damage induced by organic extract of coke oven emissions on human bronchial epithelial cells.* **Toxicology in Vitro.** 2012;26(5):752-8.
169. Liu X, Sun B, Wang X, Nie J, Chen Z, An Y, et al. *Synergistic effect of radon and sodium arsenite on DNA damage in HBE cells.* **Environmental toxicology and pharmacology.** 2016;41:127-31.
170. Dodmane PR, Arnold LL, Kakiuchi-Kiyota S, Qiu F, Liu X, Rennard SI, et al. *Cytotoxicity and gene expression changes induced by inorganic and organic trivalent arsenicals in human cells.* **Toxicology.** 2013;312:18-29.
171. Zhu X, Li D, Zhang Z, Zhu W, Li W, Zhao J, et al. *Persistent phosphorylation at specific H3 serine residues involved in chemical carcinogen-induced cell transformation.* **Molecular carcinogenesis.** 2017;56(5):1449-60.
172. Lu L, Xu H, Yang P, Xue J, Chen C, Sun Q, et al. *Involvement of HIF-1 $\alpha$ -regulated miR-21, acting via the Akt/NF- $\kappa$ B pathway, in malignant transformation of HBE cells induced by cigarette smoke extract.* **Toxicology letters.** 2018;289:14-21.
173. Woźniak E, Sicińska P, Michałowicz J, Woźniak K, Reszka E, Huras B, et al. *The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells-genotoxic risk assesement.* **Food and Chemical Toxicology.** 2018.
174. Virág L, Szabó C. *The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors.* **Pharmacological reviews.** 2002;54(3):375-429.
175. Sousa FG, Matuo R, Soares DG, Escargueil AE, Henriques JA, Larsen AK, et al. *PARPs and the DNA damage response.* **Carcinogenesis.** 2012;33(8):1433-40.
176. Holland NT, Duramad P, Rothman N, Figgs LW, Blair A, Hubbard A, et al. *Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo.* **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.** 2002;521(1):165-78.
177. Mladinic M, Perkovic P, Zeljezic D. *Characterization of chromatin instabilities induced by glyphosate, terbuthylazine and carbofuran using cytome FISH assay.* **Toxicology letters.** 2009;189(2):130-7.

178. Vaz M, Hwang SY, Kagiampakis I, Phallen J, Patil A, O'Hagan HM, et al. *Chronic cigarette smoke-induced epigenomic changes precede sensitization of bronchial epithelial cells to single-step transformation by KRAS mutations.* **Cancer cell.** 2017;32(3):360-76. e6.
179. Wang W, Zhang H, Liu S, Kim CK, Xu Y, Hurley LA, et al. *Internalized CD44s splice isoform attenuates EGFR degradation by targeting Rab7A.* **Proceedings of the National Academy of Sciences.** 2017;114(31):8366-71.
180. Kaletsch A, Pinkerneil M, Hoffmann MJ, Vasudevan AAJ, Wang C, Hansen FK, et al. *Effects of novel HDAC inhibitors on urothelial carcinoma cells.* **Clinical epigenetics.** 2018;10(1):100.
181. Qin W, Xie W, He Q, Sun T, Meng C, Yang K, et al. *MicroRNA-152 inhibits ovarian cancer cell proliferation and migration and may infer improved outcomes in ovarian cancer through targeting FOXP1.* **Experimental and therapeutic medicine.** 2018;15(2):1672-9.
182. Hou A, Zhao L, Zhao F, Wang W, Niu J, Li B, et al. *Expression of MECOM is associated with unfavorable prognosis in glioblastoma multiforme.* **OncoTargets and therapy.** 2016;9:315.
183. Fang D, Wang Y, Liu J, Hui X, Wang X, Chen X, et al. *MicroRNA-129-3p suppresses tumor growth by targeting E2F5 in glioblastoma.* **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** 2018;22(4):1044-50.
184. Nepal M, Ma C, Xie G, Jia W, Fei P. *Fanconi Anemia complementation group C protein in metabolic disorders.* **Aging (Albany NY).** 2018;10(6):1506.
185. Zhou Z, Wang W, Xie X, Song Y, Dang C, Zhang H. *Methylation-induced silencing of SPG20 facilitates gastric cancer cell proliferation by activating the EGFR/MAPK pathway.* **Biochemical and biophysical research communications.** 2018;500(2):411-7.
186. Xu X, Zhang F, Chen X, Ying Q. *MicroRNA-518b functions as a tumor suppressor in glioblastoma by targeting PDGFRB.* **Molecular medicine reports.** 2017;16(4):5326-32.

## ANEXOS

**ANEXO A** - Lista de sítios diferencialmente me após o tratamento com o herbicida 2,4-D 0,2 µm em relação ao controle tratado com DMSO

Row.names	P.Value	deltaBeta	gene	feat.cgi
cg00112163	0.000670991512320972	0.110207892237815	ZNF177	Body-opensea
cg00203620	0.000459470730429918	0.101168859428395	HDHD1	Body-opensea
cg00230326	0.000575527043747389	0.109637683761819	MGAT4C	5'UTR-opensea
cg00314003	5.34541425351632e-05	0.107408764004631		IGR-shore
cg00408720	0.000810706796770066	0.112291075855782	ZNF192	5'UTR-shelf
cg00630636	0.000615778026299548	0.105151958616447	SNX2	5'UTR-shore
cg00812737	0.000811065815914809	0.115677905944692	SHROOM3	Body-opensea
cg00859288	1.49872399554535e-06	0.12386781059926		IGR-opensea
cg00942554	0.000554195029999463	0.114489567518113	SMURF2	Body-opensea
cg01188509	0.000764849128688695	0.108516827573548	IGF2R	Body-shelf
cg01328499	0.00024142957925689	0.121171072166592	NNT	Body-opensea
cg01342217	8.64343054879576e-06	-0.147863977491647	ST5	Body-opensea
cg01412300	0.000916035773867873	0.102152163575722	TNFSF15	Body-opensea
cg01716807	0.000567284998566013	0.106940540827216	OMD	TSS1500-opensea
cg01904145	0.000611613200959313	0.102323775303115	PROK2	Body-shelf
cg01949353	0.000103597478907576	0.114309519220629		IGR-opensea
cg02578100	7.87180557231035e-05	0.102477125113714	C22orf42	Body-opensea
cg02663175	0.000963486933821764	0.106859128490978	MAP3K10	Body-shore
cg02743284	8.8648793657153e-06	0.128341404365133	EXOC6B	Body-opensea
cg03118633	1.67513144086815e-05	0.118959720882217	AFAP1L2	Body-opensea
cg03175870	0.000454706988507827	0.145861384228355	DCDC2	TSS200-opensea
cg03309025	1.79124698960176e-07	0.149434100762095		IGR-opensea
cg03578760	0.000163885671849566	0.106778028628532	ANKRD44-IT1	TSS1500-opensea
cg03689586	0.000191226612106836	0.108825986722889	MAPK8	5'UTR-opensea
cg03714740	0.000212236179702359	0.108585570313103		IGR-opensea
cg03806646	4.6084688837701e-06	0.133559625249339	C11orf30	Body-opensea
cg03944512	2.7755459428679e-05	0.107668853274584	CCSER1	Body-opensea
cg04065742	0.000544171578622111	-0.10066470763811	PARD3	Body-opensea
cg04074353	0.000218009695068211	0.110612031359736	GADL1	Body-shelf
cg04120639	0.000285908095382975	0.134856890215372	HIPK2	Body-opensea
cg04682933	0.000272575568516741	0.127641970133303		IGR-shelf
cg04739302	0.00017947507037519	0.101969083604875	OLFM1	Body-opensea
cg04835068	0.000164479213681175	0.100375023466094	SFI1	ExonBnd-opensea
cg04881183	3.14457304601162e-05	0.101901949182711	RBMS3	Body-opensea
cg04898765	8.45636783853834e-05	-0.102441284408543		IGR-shore
cg04908106	0.000219783738608073	0.105980252269302	LMF1	Body-island
cg04938549	0.000516809661349381	0.100596766267915	PAX6	Body-shore
cg04945586	4.22054019250863e-05	0.118108114334089	FAM189A2	TSS1500-shore
cg05092628	0.000611713398049851	0.123954206262779	FANCC	5'UTR-opensea
cg05731122	7.77115457532926e-05	0.109817229509305	RPAP3	TSS1500-shore



cg05831237	0.000108451828870416	0.103395473863664		IGR-opensea
cg05842524	0.000125331005671637	0.130585763927902	FUBP1	Body-opensea
cg05876174	0.000933925714104546	0.11424405523058	IRX2	Body-shore
cg06218095	2.79324167377233e-05	0.112344303717882		IGR-opensea
cg06339463	0.000271786032379988	0.16095594025112	TMX1	Body-opensea
cg06512476	2.97251908305465e-05	0.102370399369429		IGR-opensea
cg06544550	0.000510914242613371	0.103803983578982	AMBN	TSS1500-opensea
cg06825998	9.35105755586408e-06	0.110165391966569	SYN3	Body-opensea
cg06899597	2.28781817403615e-05	0.104435501358223	AURKC	Body-shelf
cg06977381	0.000523446094009492	0.110541417559179		IGR-opensea
cg07017677	0.000680690879660243	0.100391265119634	ADAMTS9	Body-opensea
cg07450839	0.000428943713434088	0.100830740349708	SNORD114-6	TSS1500-opensea
cg07478478	0.000525898400401764	0.107699959996345	ZFPM2-AS1	Body-opensea
cg07482356	0.000151874650025631	0.114908348212084		IGR-opensea
cg07756014	0.000214544021285159	0.12972354652496	STRBP	Body-opensea
cg07764189	0.000120399651954645	0.127828315905926	SLC16A10	Body-opensea
cg07794699	0.000162173930711112	0.101889098776065	ARAP2	Body-opensea
cg07825983	0.000312372532766884	0.113484103143745		IGR-opensea
cg07908903	9.34718967219437e-05	0.10319391820767	LINC01260	Body-opensea
cg08042477	0.000606098924206737	0.101169661611739	SLC6A16	5'UTR-shelf
cg08073874	0.000962726126584844	0.110321186402932		IGR-opensea
cg08141965	0.000279311954202496	0.13572152053808	ZNF407	Body-opensea
cg08179564	0.000479260548795777	0.117024449036903	TM7SF4	Body-opensea
cg08268814	0.000411766267878892	0.106204860395439	EP400	Body-opensea
cg08620138	9.60405910436941e-06	0.13018040333083	TPP2	TSS1500-shore
cg08628561	0.000921849239442333	0.104613569245908	SPG20	3'UTR-shelf
cg08680998	0.000457048559989749	0.124490345128151	CAND1.11	Body-opensea
cg08815968	0.000840760418769482	0.106001286826032	SLC9A9	Body-opensea
cg09506020	5.94840380237466e-05	0.12055292812975	GLIS3	Body-opensea
cg09541801	0.000602820184526462	0.136749414690524	SAR1B	5'UTR-opensea
cg09544144	0.000962646638876227	0.109349861195968		IGR-opensea
cg09612493	0.00075627782437378	0.104774807114234		IGR-opensea
cg09640528	0.000390760016403612	0.10415261159239	IL12RB1	Body-opensea
cg09734965	0.000727977697464485	0.106594009397118	C10orf67	Body-opensea
cg09923234	0.000192974415708788	0.110847615206	MMRN1	TSS1500-opensea
cg09951759	0.000305257630617246	0.157631779630007	GPHN	Body-opensea
cg09985075	0.000711125937401122	0.101149235482351	CHMP3	Body-opensea
cg10095534	5.55540934027972e-05	0.112891723303454	FBN1	Body-opensea
cg10142837	0.000599726054031214	0.11448364145302		IGR-opensea
cg10298817	0.000701940356367503	0.120800951950562		IGR-opensea
cg10578996	5.53793798900962e-05	0.112345550409801	LOC148145	TSS200-opensea
cg10763425	0.000367352080998572	-0.107644897277315	FLYWCH1	5'UTR-shelf
cg10921743	5.31889730754637e-05	0.138851569291634	PDE4D	3'UTR-opensea
cg11019319	4.84077151930704e-05	0.113059369551926	DCUN1D4	5'UTR-opensea
cg11248977	0.000623867274493592	0.101238380709226	PRKCH	Body-opensea
cg11382687	0.000556090380753833	0.107145337178875		IGR-opensea
cg11384205	5.36396393703368e-05	0.144195619130295		IGR-opensea

cg11481047	0.000996420317536676	0.104461487300546	AZIN1-AS1	Body-opensea
cg11604536	0.000709320897247161	0.10393285155366		IGR-opensea
cg11663482	0.000690829933367316	-0.122504658331884	KYNU	Body-opensea
cg11685489	0.000484174896553693	0.105530769890669	AASS	Body-opensea
cg11970703	0.000181054544859491	0.119164558859898	ABCA12	Body-opensea
cg12020240	0.000540194804289293	0.123648861567718	PYDC2	TSS1500-opensea
cg12037238	0.000792275732966905	0.131942430753635		IGR-opensea
cg12122597	2.35586927305798e-05	0.130232079453974	KCNA4	TSS1500-island
cg12382697	0.000823610125591798	0.115854837685455	HMCN1	Body-opensea
cg12546646	0.000224245085455012	0.101086509751593	PRICKLE2-AS1	Body-opensea
cg12644949	0.000995798919554648	0.144432830786533		IGR-opensea
cg12687125	1.92103798854413e-05	0.123840280342915	APBA2	Body-shore
cg12839080	0.00013924525407679	0.101795571047653		IGR-opensea
cg13038007	0.000923020608176164	0.110896808072154	EXOC6B	Body-opensea
cg13241517	0.000868185718755995	0.102949864622557	GSAP	Body-opensea
cg13462829	0.000199255378784874	0.120072604433196	LOC145814	Body-shelf
cg13467096	0.000131186029787776	0.118952713081708	SPTBN4	Body-shelf
cg13607993	5.50811061508986e-05	0.105285724243507		IGR-shore
cg13943259	0.000293446643291422	0.110284391098025		IGR-opensea
cg13991154	0.000921533077139699	0.113278727932391	TRANK1	Body-opensea
cg14083620	5.04257046717825e-05	0.102393020429364		IGR-opensea
cg14251512	0.000658655728702856	0.102539552202739	ZSCAN21	TSS1500-opensea
cg14443606	0.000751408117422786	0.110175445252807		IGR-opensea
cg14451115	0.000954949785422095	-0.102609894809882	GABBR2	3'UTR-opensea
cg14465630	0.000264238130604638	0.107520930310649	SLC6A17	Body-opensea
cg14530623	0.000132004608782479	0.107219131537057	ITSN2	5'UTR-opensea
cg14551084	6.22653100360622e-06	0.112489931647615	TNIP3	Body-opensea
cg14585288	0.00099380931935017	0.132301727835644	FANK1	Body-shore
cg14885394	2.01967023632166e-05	0.126689620702938	CHAMP1	TSS1500-shore
cg14998516	0.000161337533090753	0.14831207787841	C16orf52	Body-opensea
cg15114013	0.000593678643298262	0.117948441042967	NFYC	5'UTR-shore
cg15188810	3.04711009582034e-05	0.111815100730675		IGR-opensea
cg15337080	7.80350210173948e-05	0.111078203083344	FRMD3	Body-opensea
cg15815515	0.000248003345417537	0.122385237119404	RAPGEF1	TSS1500-opensea
cg15826765	0.000229340577124822	0.104164893466779		IGR-opensea
cg15890527	0.000302771088012951	0.137472161555057		IGR-shelf
cg16016288	0.000414849620945445	0.132438812632993	LRIT3	TSS1500-opensea
cg16275270	0.000191774759269518	0.104558408891304		IGR-opensea
cg16354694	7.32342315398126e-05	0.119160997606133		IGR-opensea
cg16509638	0.000162986923666979	0.122843133717465	CCNH	5'UTR-shore
cg16534913	0.000408987736843854	0.101762944854682	ATP9B	Body-opensea
cg16730825	0.000411220913133525	0.107918297643655	AP2A2	Body-shelf
cg16931554	0.000171916931387458	0.100296425918955	ZC3H4	Body-opensea
cg17203617	0.000421741873133121	0.101909461104429	TM9SF3	Body-opensea
cg17523024	0.000743761895606233	0.162486683756587		IGR-shore

cg17525653	0.000237505930149208	0.11578573956351	LOC101927421	Body-opensea
cg17537151	0.00018218792593598	0.111176742471498		IGR-opensea
cg17554494	0.000174309039762052	0.123769742815905		IGR-opensea
cg17892830	0.000798544661236123	0.149052523466229	PRKACG	TSS1500-shore
cg17933893	0.000459288931298944	0.111190460014021	TTN-AS1	Body-opensea
cg18131456	0.000353857142144253	0.132432888583537	DIRC3	Body-opensea
cg18434902	0.000481385743602121	0.134499838676949	E2F5	TSS1500-opensea
cg18516609	0.000260371331582912	0.150198620745159	ZEB1	Body-opensea
cg18556031	0.000405402751575938	0.109606118115019	ADAM32	Body-opensea
cg18905856	0.000422972640735424	0.108477940445596	EGF	TSS1500-opensea
cg19123846	0.000859551247348598	0.119166925860842	CAMKMT	Body-opensea
cg19164131	0.000821230243333372	0.113521143990604	CAMTA1	Body-opensea
cg19318364	2.79811294230155e-05	0.104292701427547		IGR-opensea
cg19435443	3.50383190756406e-05	0.124897792290371		IGR-opensea
cg19781117	0.000757519764825865	0.112759522929618		IGR-opensea
cg19828499	0.000122127797399085	0.109618374247029		IGR-shelf
cg19903294	0.00063921581453765	0.100195059597615		IGR-opensea
cg20115117	6.28239627351296e-06	0.145117624511733	FOXP1	5'UTR-opensea
cg20202037	7.56106271950598e-05	0.102265277280866	MECOM	5'UTR-opensea
cg20379719	0.000535480623622872	0.111648547978066	ACTL6A	Body-opensea
cg20568140	0.000199852926372059	0.116038105531649		IGR-shelf
cg20711983	0.000717748106785121	0.103796350489799	C6	TSS1500-opensea
cg20780945	0.000195893483610179	0.103980551584757		IGR-opensea
cg20899681	0.000858279314247805	0.104538837942257		IGR-opensea
cg20928596	0.000949929776844489	0.175352661190315	ANKRD13C	Body-opensea
cg20964601	0.000178135664259015	0.103681817428098	CMYA5	Body-opensea
cg20983046	9.41998227068023e-06	0.108885969112663		IGR-opensea
cg21011617	0.000241723406445817	0.121096164435657	TNIP3	TSS1500-opensea
cg21022303	0.000222099567062125	0.127176982599523		IGR-opensea
cg21065304	0.00089087324503198	0.117572334766121	LRRC27	Body-opensea
cg21069700	0.000152511696150676	0.141682158036307		IGR-opensea
cg21154426	0.000268572668264026	0.105104162085355	RFT1	Body-shelf
cg21162304	0.000498902282246014	0.101070322497047	NAA11	TSS200-opensea
cg21474351	0.00082417990570779	0.101459234159261	CCBP2	TSS200-opensea
cg21575235	0.000628569649480194	0.106480711562332	PPP2R5A	Body-opensea
cg21610839	2.28278993631101e-05	0.117640623390416	UBE2E1	Body-opensea
cg21769057	0.00043966546101212	0.123638855774239	CDK14	Body-opensea
cg22410262	0.000408203352065047	0.123563609168081		IGR-opensea
cg22505295	0.000393265100268396	0.102846274145297	TAS2R31	TSS1500-opensea
cg22546302	0.000390658441963324	0.102893507007337	TRIM2	Body-opensea
cg22678398	0.000998830533033435	0.102623958267651	RAP2B	3'UTR-shelf
cg22686038	4.85845895019675e-05	0.121086133762122	MIS18BP1	Body-opensea
cg22708984	0.000608876619639644	0.100123254331497		IGR-opensea

cg22844894	5.28585767070512e-05	0.105347869934246	SERPINA6	TSS1500-opensea
cg23013864	4.32585501722028e-05	0.105264940576881	CAP2	TSS1500-opensea
cg23039425	0.000384234456733022	0.100899610499485	EIF4E	Body-opensea
cg23091585	5.53274457085843e-07	0.126439783834205	OCIAD1	Body-opensea
cg23563130	4.52022289193282e-05	-0.103425707173656		IGR-opensea
cg23821159	0.00072937692971565	0.100045609184675		IGR-opensea
cg24087145	0.000512978301267177	-0.102113657835852		IGR-opensea
cg24091982	0.000614388104096495	0.139981068672608	SCOC	5'UTR-opensea
cg24114458	0.000370829630010695	0.114915486552083	CDK6	Body-opensea
cg24193367	0.000276323270453485	0.109424766501317	LRRC2	TSS1500-shore
cg24214585	7.19970660278062e-05	0.133196467699169	PAFAH1B1	Body-opensea
cg24273103	0.000390585141218031	0.105648871975617	RAD54L	Body-opensea
cg24312042	9.52906262542732e-06	0.106529422730527		IGR-shelf
cg24598929	9.70630813963896e-05	0.103179495130123	SEC16B	Body-opensea
cg24884856	5.03358827072789e-06	0.115039177443453	RAPGEF2	Body-opensea
cg25172788	0.000574998779452366	0.1164609129706	RMI1	5'UTR-opensea
cg25218521	4.69543066732057e-05	0.103129221383696	TSC22D1	Body-opensea
cg25347526	1.17889310833822e-05	0.120571225376615	LOC285419	Body-opensea
cg25721832	0.000610614937050069	0.121819414204131		IGR-opensea
cg26241877	0.000311827117294159	-0.134528512355516		IGR-shelf
cg26429042	1.72659324072177e-05	0.114958395435491	TRAPPC9	Body-opensea
cg26486460	0.000294045944282113	0.100465103329274		IGR-opensea
cg26576836	9.56706988041192e-05	0.132840883225072		IGR-opensea
cg26684050	0.000534583617255556	0.100237433853094	STAU2	Body-opensea
cg26746055	0.000153757145090594	0.135840497853757	SPICE1	Body-opensea
cg26858454	5.77305863172275e-05	0.116558375565185		IGR-opensea
cg26869829	0.00072084550719007	0.112157495639385	RB1	Body-opensea
cg26870386	0.000720042140290506	0.116849603024252	LOC100130691	Body-opensea
cg26990517	7.24848254250124e-05	0.100258697164818	CDK12	Body-opensea
cg27101633	0.000517443805283107	0.128222017651547	KIAA0146	Body-opensea
cg27117020	0.000924961662339665	0.111366094069027	RBMS3	Body-opensea
cg27652345	0.000128631811573608	0.111451034434799	CNTN5	TSS1500-opensea

**ANEXO B** - Lista de sítios diferencialmente meapós o tratamento com o herbicida 2,4-D 10 µm em relação ao controle tratado com DMSO.

**Anexo B.** Lista de sítios diferencialmente meapós o tratamento com o herbicida 2,4-D 10 µm em relação ao controle tratado com DMSO.

Row.names	P.Value	deltaBeta	gene	feat.cgi
cg00023948	0.000156047354143098	0.128066920720379	RBM47	3'UTR-opensea
cg00061553	6.92210472419354e-05	0.110366447894442		IGR-opensea
cg00407017	0.000553812495861422	0.104600517759837	MIR99AHG	Body-opensea
cg00532778	0.000220858625715361	0.110908383934986		IGR-opensea
cg00773582	0.000953452746523324	0.111600297989183	LNPEP	TSS1500-opensea
cg00815519	2.39176334130566e-05	0.118372005942581	GJC2	5'UTR-shelf

cg01188509	3.01469786271777e-05	0.108269338889939	IGF2R	Body-shelf
cg01368550	0.000802427922902429	0.100770929912363	HECW2	Body-opensea
cg01575752	0.000711987189843487	0.108133814879085		IGR-opensea
cg01666817	0.000632433409125334	0.102726059669875	USP34	Body-opensea
cg01691303	0.000313843581689176	0.188146373551123	TTL11	Body-opensea
cg01762264	2.7852646949064e-05	0.109292285597414	ZNF213	3'UTR-island
cg02035061	0.000115237670425658	0.108156062039077		IGR-shelf
cg02074501	0.00025899824889849	0.181683346615903	SPTBN1	5'UTR-opensea
cg02395751	2.46446855550157e-05	0.104573269968536	NYAP2	TSS200-opensea
cg02411312	0.00024227214046623	0.12095166853102	WEE1	Body-shelf
cg02451536	0.000125558992448058	0.133425143357215	OSCP1	Body-opensea
cg02655646	0.000123361575665239	0.176525571713351		IGR-opensea
cg02661831	6.76770823349937e-05	0.148014649185615	PHF3	Body-opensea
cg02672232	7.71522425768762e-05	0.123612360299061	XPR1	3'UTR-opensea
cg02969833	0.000167144271495433	0.106080334631241	MPP7	5'UTR-opensea
cg03024055	0.000345051210612861	0.15982393866093		IGR-opensea
cg03033632	0.000546472581718367	0.108650799613679	OSBPL1A	TSS1500-opensea
cg03048525	0.000482365042805572	0.119167986346287		IGR-opensea
cg03117351	0.000218908332860698	0.110923196751534	PARD3	Body-opensea
cg03128499	7.10739745843018e-06	0.116657573357162	MAP2K6	Body-opensea
cg03236449	0.000267319875170443	0.120671663421058	CERS6	Body-opensea
cg03287192	0.000576702413547766	0.102044826467115		IGR-opensea
cg03505103	0.000318493282385414	0.101969523857165	ERG	Body-opensea
cg03538902	0.000632692320372038	0.112551125510719		IGR-opensea
cg03588007	3.24397284092733e-05	0.124415807155463	TRIM14	3'UTR-shore
cg03881867	4.51113755496055e-05	0.107993045929257	ZCCHC7	Body-opensea
cg04072728	0.00030613388068776	0.10679199287308	MED27	Body-opensea
cg04120639	4.67236878382563e-05	0.158504865393636	HIPK2	Body-opensea
cg04658353	4.64239029406833e-05	0.10030375629811	TEAD1	Body-opensea
cg04919378	0.000171071858760719	0.125786735806629	LITAF	Body-opensea
cg04945586	0.000466893451819028	0.146879650986778	FAM189A2	TSS1500-shore
cg04958082	0.000966719722710656	0.106698197173211	RALGPS2	Body-opensea
cg04974804	0.000718739894321569	0.113070076250197	HTR1D	TSS1500-opensea
cg05260703	0.000135192613457219	0.158253259267067	CEP192	Body-opensea
cg05586466	0.000838641316851004	0.129182798748133		IGR-opensea
cg05654938	1.28641217925627e-05	0.104153007394436		IGR-opensea
cg05668006	0.000395998583140815	0.102128850463454		IGR-opensea
cg06047629	0.000454434638485168	0.160207206192572	LINC00977	Body-opensea
cg06109237	0.000334678439350698	0.121405778004847		IGR-opensea
cg06296151	2.79036044378132e-05	0.117299909351635	CMTM6	3'UTR-opensea
cg06304883	0.000983864337331776	0.105113124423639	LAMC1	TSS1500-shore
cg06339463	0.000668925022436248	0.138175566785028	TMX1	Body-opensea
cg06533253	0.00051173057088422	0.137710140254911	COQ3	Body-opensea
cg06810986	1.0915920366868e-05	0.132313794856652		IGR-island
cg06837272	0.000183181201522394	0.101584836875253	LINC00616	Body-opensea
cg06871149	0.000380910790363946	0.102336123177179		IGR-opensea
cg06871184	7.13588358439966e-05	0.112259944881758	ATG4D	Body-opensea
cg07005924	0.000167440724213681	0.105720030313628		IGR-shelf
cg07086770	1.73051057652148e-05	0.148393389506035	LOC101926942	Body-opensea
cg07410339	3.76836120926377e-06	0.107953494384634	MYST4	Body-opensea
cg07482226	0.000393157382992778	0.121857583523946		IGR-opensea

cg07651271	0.000128781895369612	0.107970575741272		IGR-opensea
cg07701837	0.00097641949658218	0.121370450814787	MAP2	5'UTR-opensea
cg07764189	0.000486008261436206	0.121869170094458	SLC16A10	Body-opensea
cg07825983	0.000100464093828944	0.112869049281378		IGR-opensea
cg08223928	0.000205846241862798	0.110875456424853	CCDC146	Body-opensea
cg08483173	0.000117262781214538	0.119722619209985	ZNF284	Body-opensea
cg08497835	0.000896375377384855	0.10690781923558	EPB41	5'UTR-opensea
cg08541856	1.15886726051914e-05	0.146077292789583	PTPDC1	TSS1500-opensea
cg08566499	0.000890661675658498	0.13505888203615	EIF4G3	Body-opensea
cg08707849	0.00066134821387002	0.100520148141121	CCDC3	5'UTR-opensea
cg09065396	0.000180929493133408	0.164354487519987		IGR-opensea
cg09086987	5.24111525411198e-05	0.147184160806178	SATB1	5'UTR-shelf
cg09106769	0.000124983600171051	0.108579939589904	ANKRD19P	Body-opensea
cg09207246	9.73050398044246e-05	0.114830166586338		IGR-opensea
cg09240793	0.000324328175830318	0.119246352719562		IGR-shore
cg09951759	9.75395444695092e-06	0.148023589507484	GPHN	Body-opensea
cg10179240	1.37455604450823e-06	0.102169823391162	KMT2E	ExonBnd-opensea
cg10430917	0.000397907505422934	0.12174971152264	OR52N2	TSS1500-opensea
cg10443091	0.000959752696112594	0.110112515134509		IGR-opensea
cg10513118	0.000173717648922789	0.104823398979219	SCN2B	1stExon-opensea
cg10629128	8.90772804349332e-05	0.105506252275974	HDAC4	5'UTR-opensea
cg10748439	0.000557970680742918	0.13240242531916		IGR-opensea
cg10763425	0.00036095872577672	-0.12703635774753	FLYWCH1	5'UTR-shelf
cg10921743	0.000105079574317812	0.148420061212291	PDE4D	3'UTR-opensea
cg11088671	0.000340030729443583	0.153240139961739	PRR27	TSS200-opensea
cg11248977	0.000174107046036972	0.103581785568225	PRKCH	Body-opensea
cg11357862	0.000907230812587741	0.116857914550937	BZW1	Body-opensea
cg11423701	0.000394677765661522	0.103983782521596	GJA5	TSS1500-opensea
cg11502568	0.000725681848113237	0.120773437815841	CEP170	Body-opensea
cg11543010	0.000907083168824704	0.174991469204892	CAMK1D	Body-opensea
cg11555708	0.00089373372576537	-0.143983582961486	C11orf65	Body-opensea
cg11619648	0.000360126957357177	0.113509831074299	ZNF445	5'UTR-shelf
cg11669975	0.000167768807933355	0.148448126301376		IGR-shore
cg11842199	0.000115711180998241	-0.135127101545665		IGR-opensea
cg12071968	0.00039332132302191	0.121177627720338		IGR-opensea
cg12116363	0.000687322494423892	0.100939360924235	LOC255411	TSS1500-opensea
cg12186796	0.000259774993781407	0.115670875939273	RTN4IP1	Body-opensea
cg12638508	0.000193547273605444	0.185747419913957	RAPGEF2	TSS1500-opensea
cg12654856	8.34656838331223e-05	0.111743581492924		IGR-opensea
cg12808565	1.74714061281293e-05	0.103374684971559	DIP2C	Body-opensea
cg12906702	0.000688935530832366	0.103523543749074	SIK3	Body-opensea
cg12967820	5.44832501538963e-05	0.103896451770247		IGR-opensea
cg13184495	0.000145947773069651	0.107466001853739		IGR-opensea
cg13568311	0.000209599949230502	0.112593559488405	LRCH1	3'UTR-opensea
cg13628057	0.000944568800449753	-0.152455726945265	EHMT1	Body-opensea
cg14051693	0.000589066692971749	0.104564797994055	KIF24	Body-opensea
cg14083620	3.20468512930567e-05	0.101805028142378		IGR-opensea
cg14146491	0.00013514356776228	0.169852969108019		IGR-opensea

cg14195458	0.000265936750521109	0.103039788864124	HERC5	Body-shelf
cg14819352	0.000969658413451397	0.116560777732563	EXOC6B	Body-opensea
cg14842658	0.000448771709959034	0.13680532283824	RRAS2	Body-opensea
cg14885394	2.79569571565074e-05	0.136279376734644	CHAMP1	TSS1500-shore
cg14887576	0.000831416795518636	0.207229885729222		IGR-opensea
cg14929116	0.000191838537500193	0.125643637999994	RPSA	Body-shelf
cg14976342	0.000966268076121873	0.116142703506252	KIAA1026	Body-shelf
cg14998516	0.000229968089556251	0.103814313756596	C16orf52	Body-opensea
cg15226514	8.1425865525161e-06	0.170345055803281	ATXN7	5'UTR-opensea
cg15607017	0.000448043587705117	0.100871878697876		IGR-opensea
cg15667844	0.000727706113522763	0.13992300427658	DUSP5	TSS1500-shore
cg15793476	1.2336630252131e-05	0.116042494949464	GAK	Body-shore
cg16023600	0.00036752171691705	0.115251179101372	C5orf46	3'UTR-opensea
cg16201661	0.000912760094352479	0.123739606229477	LEKR1	3'UTR-opensea
cg16354694	0.00050747026506971	0.125598937232181		IGR-opensea
cg16391727	0.000261357248762456	0.108088174178411	PRKAG2	Body-shore
cg16415999	4.8678021583489e-05	0.130817000849687	YTHDF3	Body-opensea
cg16434098	0.00029031441623367	0.12946691514803	ODZ2	Body-opensea
cg16446041	0.000367818655381935	0.1213859011479	ARID4B	Body-opensea
cg16550359	3.40589748050862e-05	0.132165497306033		IGR-opensea
cg16627180	8.54900836011286e-05	0.111924592471413	MYH15	Body-opensea
cg16814575	3.76013492504703e-06	0.10622776651003	TAAR2	TSS1500-opensea
cg16976968	4.13035436620527e-05	0.146086159164584		IGR-opensea
cg17085774	0.000414954574721419	-0.133717221947527	ARL14	TSS1500-opensea
cg17537151	0.000230699321154847	0.106788172877927		IGR-opensea
cg17596316	0.000175647051929725	0.137832574514539	NHSL1	TSS200-opensea
cg18359129	8.60231929398943e-05	0.113978506387721	IGF1R	Body-shore
cg18693889	2.36931807225672e-05	0.150054471220005	RNPC3	3'UTR-opensea
cg19081359	0.000442156893222562	0.114524434727979	NBAS	Body-opensea
cg19123846	0.000273871564393414	0.152224626220851	CAMKMT	Body-opensea
cg19216829	0.000167199774393242	0.108085264552326	R3HDM1	ExonBnd-opensea
cg19273378	0.00033766755007993	0.10620473728355	KCNMA1	Body-opensea
cg19283824	4.75110424954547e-05	0.101238258833557	LOC101928940	TSS200-opensea
cg19379244	0.000303403586896119	0.104690160751043	HHLA1	Body-opensea
cg19435443	3.22714349554181e-05	0.116436227274872		IGR-opensea
cg19611300	0.000305721692051535	-0.100318659986001	MOK	Body-opensea
cg19693801	0.000464367109639448	0.11432321436424	TNFAIP8	TSS1500-opensea
cg19956402	0.000487444951709423	0.110556036289992		IGR-opensea
cg20011278	0.00070129200933441	0.125824193696812	ALPK1	Body-shelf
cg20115117	2.65767119802787e-05	0.146155904618763	FOXP1	5'UTR-opensea
cg20323491	0.000479168441848872	0.114648806155448	SLC4A11	TSS200-shore
cg20660297	6.62341040626144e-05	0.139031371979362	KRR1	TSS1500-shore
cg20714046	0.000249844945214937	0.117693636459443		IGR-opensea
cg20900466	0.000675508820446959	0.188868212381522	FAM26D	5'UTR-opensea
cg20928257	6.21663101769259e-05	0.194797350475659	TTC29	Body-opensea
cg21053502	0.000848506499213489	0.111277810076408	TIAM1	Body-opensea
cg21272827	0.00063307661064708	0.107477184099988	ANXA10	Body-opensea
cg21318318	0.000295477981757317	0.104110324294275	NAA16	3'UTR-opensea
cg21328202	0.000158187445199336	0.14519431467009		IGR-opensea

cg21422584	1.17598722063338e-05	0.13999895708986	USP33	5'UTR-opensea
cg21523574	0.000633121230465439	0.106057081341561	SLC7A8	3'UTR-opensea
cg21548340	0.000489800798867123	0.1069805786097		IGR-opensea
cg21629653	0.000240683721282983	0.100300915502958		IGR-opensea
cg22151420	0.00052214624526308	0.102983864176477		IGR-opensea
cg22210682	0.00027510822481271	0.130861431110975	ATG10	Body-opensea
cg22332321	0.000290108816574623	0.106148790550815	TPD52L2	Body-shore
cg22355811	2.31910007422486e-05	0.106144907565875	PRTG	Body-opensea
cg22406941	0.000763499336854174	0.142714121406778	PPP2R2D	5'UTR-shore
cg22424122	0.000657132199289952	0.102383317878571	PPP1R12A	Body-opensea
cg22456809	0.000343395666669999	0.102486522682492	FGB	TSS1500-opensea
cg23210303	7.90327308335555e-07	0.12390069641857	CD44	TSS1500-shore
cg23858869	3.88217465206063e-05	0.114477219541615	STAU2	Body-opensea
cg23951395	0.000712070807161996	0.164673837051898	SEPT2	5'UTR-opensea
cg24091982	4.80413336451028e-06	0.190397268176637	SCOC	5'UTR-opensea
cg24170212	0.000427375935713842	0.134777184743015		IGR-opensea
cg24214585	8.20473176169572e-05	0.142692430685802	PAFAH1B1	Body-opensea
cg24272309	4.77781492228086e-05	0.142428765696398	DNAJB12	TSS200-shore
cg24273103	0.000335905846178842	0.113189191180292	RAD54L	Body-opensea
cg24363159	1.30627346003003e-05	0.161170632134625	NDC1	Body-opensea
cg24392496	0.000882983097962293	0.152726245176365		IGR-opensea
cg24585729	0.000397146807716322	0.108007451361098	RTKN2	Body-opensea
cg24586582	2.2040138605097e-05	0.115256647525829	DDX4	Body-opensea
cg24597466	0.000504790412856344	0.101964737676198	SIPA1L2	TSS1500-opensea
cg24884856	7.32175521481601e-06	0.123160889323663	RAPGEF2	Body-opensea
cg24993869	8.27544658769047e-05	0.116143318068418	LINC00571	Body-opensea
cg25003701	2.85871272720509e-05	0.103441794232311	M1AP	Body-opensea
cg25208142	0.000585176864009656	0.111312739457837		IGR-island
cg25212847	0.000498786660110476	0.107197041277101	OTOGL	ExonBnd-opensea
cg25238978	3.20560595242161e-05	0.113127927769292	SLC25A26	Body-opensea
cg25437443	0.000305631053143118	0.111088358493171	ARID4B	Body-opensea
cg25541908	0.00012602851143237	0.117766035431184	GOLGA4	Body-opensea
cg25578781	8.91788304591522e-05	0.106527093226635	ETS1	5'UTR-opensea
cg25600763	0.000736138555165022	0.103519839876236		IGR-opensea
cg26713777	0.000478832333689141	0.101484807118008	PRR5L	5'UTR-opensea
cg26858454	0.000444530917822429	0.106332247154529		IGR-opensea
cg26983360	0.000154796392686848	0.136072894609256	ASH1L	Body-opensea
cg27032082	0.000129878735081669	0.189832119514294	ZBTB16	Body-opensea
cg27292485	0.000269095659123775	0.13601343270178	DOCK10	Body-opensea
cg27491228	0.000396634641116929	0.100467262891099	KCND2	Body-opensea



**ANEXO C** - Lista de sítios diferencialmente meapós o tratamento com o herbicida gly10 µm em relação ao controle tratado com DMSO.

**Anexo C.**Lista de sítios diferencialmente meapós o tratamento com o herbicida gly10 µm em relação ao controle tratado com DMSO.

Row.names	P.Value	deltaBeta	gene	feat.cgi
cg00123963	0.000641263415816065	0.131249899799847	FN3K	Body-opensea
cg00453817	0.000623967817199675	0.105965356154743	NR2E1	TSS200-island
cg00570285	0.000564055122965383	0.127305335734254	ARHGAP12	Body-opensea
cg01328499	0.000208216361198963	0.129862520236308	NNT	Body-opensea
cg01342217	0.000155592245063022	-0.13940793439464	ST5	Body-opensea
cg01368132	0.00074026487269219	0.145762196097211	HERPUD2	Body-opensea
cg01426921	0.000211397358165394	0.102862523559913	RMRP	TSS1500-island
cg01665970	3.92487368164465e-05	0.100996735240068	C6orf10	Body-opensea
cg02336817	0.000321454237393604	-0.106383706050324	FTO	Body-opensea
cg02451536	0.000329079980291204	0.134721615189918	OSCP1	Body-opensea
cg02757223	0.000746838638500008	0.110359325803858		IGR-opensea
cg02808430	0.000968996352238444	0.152408350033247	SLC4A7	TSS1500-opensea
cg03118633	0.000141360280526979	0.129010342664854	AFAP1L2	Body-opensea
cg03405560	0.000773757577037311	-0.139654415619115	ZNF267	TSS1500-shore
cg03565584	0.000468638191776861	0.108734674258566	ABHD8	Body-shelf
cg04074955	0.000387390103824468	0.104588542732087	ZDHHC14	Body-opensea
cg05303293	4.36005742788548e-06	0.125387493554803	PARP4	Body-opensea
cg05384467	0.000516937848296617	-0.119987006680231	MBTD1	5'UTR-shore
cg05617467	0.000905810750277729	0.106731829401698	AGTPBP1	Body-opensea
cg05831237	4.39162179562682e-05	0.122958001198341		IGR-opensea
cg05842524	1.27670529408627e-05	0.158458927192146	FUBP1	Body-opensea
cg06879253	0.000216440730527726	0.109570688504005		IGR-opensea
cg07442260	0.000186115475088167	-0.139383548689299	PREPL	Body-opensea
cg07914866	2.19258868226013e-05	0.108167022654189	IRAK3	Body-shore
cg08358427	0.00051541687772583	0.108072072077216	NRP1	Body-opensea
cg08628561	0.000689035069760742	0.104333484956659	SPG20	3'UTR-shelf
cg09053011	0.00081151393208354	-0.117978222910774	MGST1	Body-opensea
cg09251959	0.000893083021977073	-0.113610589820425	COL16A1	TSS1500-shore
cg09310194	0.000848343690306523	0.103560413734492	ANK3	Body-opensea
cg09393309	4.91271197040352e-05	0.10184300191218	TYW5	Body-opensea

cg09544144	5.87819960332853e-05	0.109586412933404		IGR-opensea
cg09681586	0.000347896177506918	0.117045137962273		IGR-opensea
cg09951759	0.00062376014154669	0.196409344615929	GPHN	Body-opensea
cg10954931	0.000671960406319502	0.115466150325772	WAC	Body-opensea
cg11088671	0.000603162835901413	0.128619247604312	PRR27	TSS200-opensea
cg11176519	9.26099375628891e-05	0.110206421939901		IGR-opensea
cg11226009	0.000780645646200708	0.175166848313928	ARHGAP32	5'UTR-opensea
cg11467289	0.000651187712276386	0.102913736997057		IGR-opensea
cg11842199	0.000373631844170003	-0.139651934884731		IGR-opensea
cg12000468	0.000975536794020454	0.110966385212459	IQGAP1	Body-opensea
cg12056772	0.000611772455403622	-0.108687701855403	CANT1	3'UTR-shore
cg12367714	5.51417313950479e-06	0.103632439613522	THOC7	Body-opensea
cg12679070	0.000742142787009669	-0.10197184419102	CAPZB	Body-opensea
cg12693632	0.000458105216018898	0.113635644411445	PTPN5	TSS1500-shore
cg12734449	0.000314114257497	0.133784480343001	PPP1R11	3'UTR-shore
cg12811804	0.000874919904985971	0.104488686533899	PRKD3	TSS200-opensea
cg13140804	0.000441412780371502	0.125081227475676	YTHDC1	3'UTR-opensea
cg13754259	6.99590259083018e-06	0.114897868655511	NKX2-3	Body-shore
cg13883966	0.00074817227996117	0.10160808083568	COBLL1	Body-opensea
cg14259208	0.000644982581720434	-0.100236797607911	COL15A1	Body-opensea
cg14595495	0.000905732398562809	0.112059563691232	OSMR-AS1	Body-opensea
cg14839358	0.000267517380190389	0.109885935708054	HHIP	Body-opensea
cg14885394	8.85371051518941e-05	0.125274355226329	CHAMP1	TSS1500-shore
cg14991469	0.000319238885671594	-0.113821558577966		IGR-opensea
cg15006215	0.000115655273707602	-0.105790196396892	CCDC117	3'UTR-opensea
cg15071359	0.000937138013999482	0.103119753836632	CPN1	1stExon-opensea
cg15390010	0.000851666797751081	0.125220993836308	PARD3	Body-opensea
cg15392326	0.00069579200046281	0.105583508261007	ARFGEF1	Body-opensea
cg15671767	0.000152202044743882	0.10171843187028		IGR-opensea
cg15793476	1.86148371087841e-05	0.104720765042884	GAK	Body-shore
cg16199877	9.50822398477161e-05	0.112837509251451	ALDH1A1	Body-opensea
cg16453927	0.000641871578553896	0.113875875819187	CFAP43	Body-opensea
cg16976968	0.000314388097126899	0.111457830877441		IGR-opensea
cg17057647	8.19998197226929e-05	0.164997379794526	ATP5A1	Body-opensea
cg17256835	0.000425830978442267	0.136272934820842	DNAH12	TSS1500-opensea

cg17546454	0.00020705395348600 9	0.107488084673383	ZFX	Body-opensea
cg17624393	0.00041290588047625 1	0.111794452413768		IGR-opensea
cg19123846	0.00069188258997951 1	0.12343735901269	CAMKMT	Body-opensea
cg19318707	8.68606218426515e-07	-0.102439951555394		IGR-opensea
cg19693801	0.00077298332830284 8	0.119010651372468	TNFAIP8	TSS1500-opensea
cg19702383	0.00057094900654198 2	0.104296727934296	RMST	Body-opensea
cg19740984	0.00012040802903879 5	0.1253086299105		IGR-opensea
cg20202037	0.00016987802595122	0.103118252655432	MECOM	5'UTR-opensea
cg20899266	0.00055583726703942 6	-0.124544900555786	SETD5	Body-opensea
cg21095808	0.00040348567978187 3	-0.140564084531739	CTDP1	Body-shelf
cg21575235	0.00011058000276385 6	0.109620721437288	PPP2R5A	Body-opensea
cg21757338	9.01881815441417e-05	0.123895308612212	PLK2	Body-opensea
cg21813567	0.00051036802100573 3	0.136408669334095		IGR-opensea
cg21908829	4.12148500150799e-05	0.103236519790387		IGR-opensea
cg22047338	0.00023542947728862 3	0.133850428039594	C19orf35	TSS200-shelf
cg22317255	0.00019301832259901 2	0.134784036751579		IGR-opensea
cg22456809	4.83613115811478e-07	0.111574446822721	FGB	TSS1500-opensea
cg22678398	1.83215875290152e-05	0.119198769225273	RAP2B	3'UTR-shelf
cg22831264	0.00055942534288438 6	0.116100868733996		IGR-shore
cg22859440	0.00033958824661735	0.12578983340455		IGR-opensea
cg23210303	7.45450884874339e-06	0.135303204377556	CD44	TSS1500-shore
cg23399347	0.00081579916732830 6	0.132732828881018	SH3D19	Body-opensea
cg23469512	0.00063283861231323 8	0.105175953700421	C16orf45	TSS1500-opensea
cg24091982	0.00015192553274200 8	0.148000661036475	SCOC	5'UTR-opensea
cg24214585	0.00018433851911658 5	0.146066259267825	PAFAH1B1	Body-opensea
cg24993869	0.00017178943210107	0.110241807626027	LINC00571	Body-opensea
cg25363347	0.00011279404440750 7	0.121584897289554	PDZRN3	TSS1500-opensea
cg25462845	0.00065176405902118 3	0.102946042929131	FABP5	Body-shore
cg25473065	0.00017298023610829 8	0.100106185262723		IGR-opensea
cg25486941	0.00012513325068183 1	-0.120489320632823		IGR-opensea
cg25488228	0.00071541283066249 4	0.112747591978136	CEP152	Body-opensea
cg25633983	8.09104951907994e-05	0.124207385062526	DPYD-AS2	TSS1500-opensea
cg25810980	0.00054008204888284 1	-0.110192685114775	OTUD4	5'UTR-shelf
cg25816127	0.00082745296275736 7	0.116824789391165		IGR-opensea

cg25865570	0.00067207945867849 7	0.11430627854173	CUGBP2	TSS1500-opensea
cg26486460	0.00026395771768014 8	0.113514747202596		IGR-opensea
cg26651188	0.00098113501732843	0.189930626862547	LPCAT3	Body-opensea
cg26736446	0.00080148034224275 7	-0.101167698070966		IGR-opensea
cg27491228	2.09539331572974e-05	0.111492425582453	KCND2	Body-opensea
cg27652345	0.00058443527840772 5	0.104309665329372	CNTN5	TSS1500-opensea

**ANEXO D** - Lista de sítios diferencialmente metilados após o tratamento com o herbicida gly 1000 µm em relação ao controle tratado com DMSO.

**AnexoD.** Lista de sítios diferencialmente metilados após o tratamento com o herbicida gly 1000 µm em relação ao controle tratado com DMSO.

Row.names	P.Value	deltaBeta	gene	feat.cgi
cg00590602	4.08773884189459e-06	-0.13856157909535	SPTLC1	TSS1500-shore
cg00869927	4.83160568536855e-05	-0.104681764067959	SGIP1	Body-opensea
cg01328499	0.000115554739154622	0.133624947684882	NNT	Body-opensea
cg01692020	0.00021755909584639	0.106291834980817	MEIS1	Body-opensea
cg02389281	4.1336891459966e-05	-0.125676854593917	OR1L3	TSS1500-opensea
cg02498477	1.7315699105802e-05	-0.155880237580899	PIAS2	Body-opensea
cg04187123	0.000248032355512633	-0.124003857546825	RYR3	Body-opensea
cg04363734	4.21538621491162e-05	0.102877037634816	NXNL2	TSS200-shore
cg06672736	0.000591444967733737	-0.122568230985571	ABCB4	Body-opensea
cg07756014	0.000142250303669243	0.111530639591175	STRBP	Body-opensea
cg08497835	6.2351615441279e-05	0.118507106761828	EPB41	5'UTR-opensea
cg08620138	0.00051527692431134	0.137501366103064	TPP2	TSS1500-shore
cg09951759	0.000902719513205919	0.16795959845658	GPHN	Body-opensea
cg10041017	0.000738061989776971	0.197652173799147	MCF2L	Body-shore
cg10921743	8.44080843099601e-06	0.155024450450206	PDE4D	3'UTR-opensea
cg11545307	0.000363868261152168	-0.102549264259758	RNF182	5'UTR-shelf
cg11637017	6.93258198776062e-06	0.102525634558947	NT5DC1	3'UTR-opensea
cg12056772	0.000149504934384474	-0.104994542990697	CANT1	3'UTR-shore
cg14095044	0.000685256079817227	0.15717229185521	EXD3	5'UTR-shore
cg14498246	0.0002989063366597	0.193817510969861	KMT2A	Body-opensea
cg14617167	0.000418047641483063	-0.10943410615961	PODXL2	Body-opensea
cg14780551	0.000877687815515165	0.100944044549228	ZNF728	TSS1500-shore
cg15989168	0.00041317575355253	0.139061419913009	ANK2	Body-opensea

cg15993786	0.000262534609637978	-0.106871397380929	MIR518B	TSS1500-opensea
cg16082695	0.000876227655198577	-0.143874287253798	LOC100128239	TSS1500-opensea
cg17085774	0.00021940583328598	-0.1589691835296	ARL14	TSS1500-opensea
cg17132307	0.000405297257548065	-0.105278853226326	THBS1	Body-opensea
cg17179886	0.000341219382285263	-0.115507397430867	LINC00907	Body-opensea
cg17213919	0.000742897418759256	-0.147687943255208	LOC101928280	TSS1500-opensea
cg17448954	0.000401712103441606	0.145481451260625	NCAM2	Body-opensea
cg18306374	5.70576028709044e-05	-0.108273541441735	APP	5'UTR-opensea
cg19505458	0.000128985228421575	-0.115598623068251	KIAA1217	Body-opensea
cg19568997	0.000325213512324168	-0.110370817883162	PARD3	Body-opensea
cg19840252	0.000844153789403903	-0.167918183421505	WNT7A	Body-opensea
cg19890321	0.000701861032945139	0.104991173312863	RGCC	Body-opensea
cg20107184	0.00030766311852677	-0.126000364455122	GPR110	3'UTR-opensea
cg20202037	0.00014036189544844	0.110749745423253	MECOM	5'UTR-opensea
cg20900466	0.000750141738597108	0.172049039658872	FAM26D	5'UTR-opensea
cg21095808	0.000148327532282395	-0.106481092861572	CTDP1	Body-shelf
cg21236970	0.0005130924377157	-0.124022418998054	REEP1	Body-opensea
cg21422584	0.0001960016366286	0.106011727387212	USP33	5'UTR-opensea
cg22328863	3.27296150091803e-05	-0.157017829050823	FAM101B	3'UTR-island
cg22678398	2.42937842819306e-06	0.107431771470687	RAP2B	3'UTR-shelf
cg23085759	0.000890488496460567	0.118415597416755	SCG2	5'UTR-opensea
cg23210303	1.28569784427725e-05	0.116460257261312	CD44	TSS1500-shore
cg23443066	0.000381649335404544	0.101743014615534	C1QTNF9	TSS200-shore
cg23455212	0.000843862901653453	0.124465914870366	LUM	1stExon-opensea
cg24171915	0.000721278392318093	0.119611866750317	C13orf16	Body-shore
cg24301250	0.000534624428519461	0.120320855020807	KIRREL3	Body-opensea
cg25003701	0.000243966402607021	0.12309250661939	M1AP	Body-opensea
cg25794707	0.000181828625480834	0.11179085089635	KLHL2	TSS1500-shore
cg26870386	0.00012464056696952	0.140943940841389	LOC100130691	Body-opensea
cg27015201	0.000575931477219477	-0.102127090230486	THUMP3	Body-opensea