



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CAMILLA PASSARELA SILVA**

**GENOTOXICIDADE ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO CRÔNICA A HERBICIDA A  
BASE DE GLIFOSATO EM RATOS**

Presidente Prudente - SP  
2022

**CAMILLA PASSARELA SILVA**

**GENOTOXICIDADE ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO CRÔNICA A HERBICIDA A  
BASE DE GLIFOSATO EM RATOS**

Exame geral de Qualificação apresentado a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre – Mestrado em Ciência Animal.

Orientadora:  
Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai

615.907  
S586g      Silva, Camilla Passarela.  
              Genotoxicidade associada à exposição crônica a  
              herbicida a base de glifosato em ratos / Camilla  
              Passarela Silva. – Presidente Prudente, 2022.  
              38f.: il.

              Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -  
              Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente  
              Prudente, SP, 2022.  
              Bibliografia.  
              Orientador: Gisele Alborghetti Nai

              1. Glifosato. 2. Toxicidade. 3. Testes para  
              micronúcleos. I. Título.

Catálogo na fonte: Michele Mologni – CRB 8-6204

**CAMILLA PASSARELA SILVA**

**GENOTOXICIDADE ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO CRÔNICA A HERBICIDA A  
BASE DE GLIFOSATO EM RATOS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 09 de junho de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Profa. Dra. Edislane Barreiros de Souza  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Assis --SP

---

Prof. Dr. José Luiz Santos Parizi  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

## **DEDICATÓRIA**

Com gratidão e alegria, dedico este trabalho a Deus por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia e por estar presente em todos os momentos.

Dedico a minha família, pelo incentivo e apoio em todo o processo.

Essa conquista não é só minha, mas de todos nós.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer imensamente a minha orientadora, a Professora Dra. Gisele A. Nai, por todo apoio e contribuição para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a todos os profissionais que estiveram envolvidos para elaboração do estudo, a todos os membros do programa de Mestrado em Ciência Animal por toda estrutura e atenção prestada aos alunos.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda  
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”  
(Arthur Schopenhauer)*

## RESUMO

### Genotoxicidade associada à exposição crônica a herbicida a base de glifosato em ratos

Apesar dos estudos realizados pela indústria sugerirem que o glifosato é pouco tóxico para as espécies não alvo, os estudos realizados com este herbicida colocam em dúvida sua segurança para a saúde de outras espécies. O objetivo deste estudo foi avaliar a genotoxicidade da exposição crônica por via oral e inalatória ao herbicida glifosato em ratos. Para a realização dos experimentos, foram utilizados 88 ratos Wistar albinos, machos, adultos, divididos em nove grupos: CI - Grupo Controle Inalatório: animais expostos à nebulização com água destilada (n=10); CO - Grupo Controle Oral: ração nebulizada com água destilada (n=10); BI - Grupo de Baixa Concentração Inalatório: animais expostos a nebulização ao herbicida com  $2,99 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) (n=10); BO - Grupo de Baixa Concentração Oral: ração nebulizada com o herbicida na concentração de  $2,99 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (n=10); MI - Grupo de Média Concentração Inalatório: animais expostos a nebulização ao herbicida com  $4,99 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (n=10); MO - Grupo de Média Concentração Oral: ração nebulizada com o herbicida na concentração de  $4,99 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (n=10); AI - Grupo de Alta Concentração Inalatório: animais expostos a nebulização ao herbicida com  $7,48 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (n=10); AO - Grupo de Alta Concentração: ração nebulizada com o herbicida na concentração de  $7,48 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (n=10); controle positivo (CP) (n=8), cujos animais receberam ciclofosfamida em dose única no primeiro dia do experimento e foram eutanasiados 24 horas após. Foram coletadas células da medula óssea para o teste do micronúcleo e para o ensaio do cometa. Os demais animais foram eutanasiados 6 meses após o início do experimento. A mediana de micronúcleos nos grupos controles inalatório e oral foi de 0, no grupo BI de 4,5, no BO de 1,5, no MI de 5, no MO de 1, no AI de 5, no AO de 3, e no grupo controle positivo de 9. Houve diferença entre os grupos estudados ( $p < 0,0001$ ). Em relação à via de exposição, os animais expostos por via inalatória apresentaram maior número de micronúcleos do que os expostos por via oral ( $p < 0,0001$ ). Ao ensaio do cometa, enquanto os grupos controle apresentaram maior número de células com classe de dano 0, os animais expostos ao GBH apresentaram maior número de células com classe de dano 4, principalmente aqueles expostos a altas concentrações ( $p < 0,05$ ). Concluímos que exposição inalatória ao GBH acarreta em maior formação de micronúcleos, e as exposições a maiores concentrações apresentam um maior dano em célula única, evidenciado pelo ensaio do cometa.

**Palavras-chave:** glifosato, toxicidade, testes para micronúcleos, modelo experimental.



## ABSTRACT

### **Genotoxicity associated with chronic exposure to glyphosate-based herbicide in rats**

Although studies carried out by the industry suggest that glyphosate is not very toxic to non-target species, studies carried out with this herbicide cast doubt on its safety for the health of other species. The aim of this study was to evaluate the genotoxicity of chronic oral and inhalation exposure to the herbicide glyphosate in rats. For the accomplishment of the experiments, 88 male, adult, albino Wistar rats were used, divided into nine groups: CI - Inhalation Control Group: animals exposed to nebulization with distilled water (n=10); CO - Oral Control Group: nebulized diet with distilled water (n=10); BI - Low Inhalation Concentration Group: animals exposed to nebulization to the herbicide with  $2.99 \times 10^{-3}$  grams of active ingredient per hectare (g.i.a/ha) (n=10); BO - Low Oral Concentration Group: nebulized feed with the herbicide at a concentration of  $2.99 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (n=10); MI - Medium Inhalation Concentration Group: animals exposed to nebulization to the herbicide with  $4.99 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (n=10); OM - Medium Oral Concentration Group: feed sprayed with the herbicide at a concentration of  $4.99 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (n=10); AI - High Inhalation Concentration Group: animals exposed to nebulization to the herbicide with  $7.48 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (n=10); AO - High Concentration Group: ration sprayed with the herbicide at a concentration of  $7.48 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (n=10); positive control (PC) (n=8), whose animals received cyclophosphamide in a single dose on the first day of the experiment and were euthanized 24 hours later. Bone marrow cells were collected for the micronucleus test and for the comet assay. The remaining animals were euthanized 6 months after the beginning of the experiment. The median of micronuclei in the inhaled and oral control groups was 0, in the BI group 4.5, in the BO of 1.5, in the MI of 5, in the MO of 1, in the AI of 5, in the AO of 3, and in the positive control group of 9. There was a difference between the studied groups ( $p < 0.0001$ ). Regarding the route of exposure, the animals exposed by inhalation had a higher number of micronuclei than those exposed orally ( $p < 0.0001$ ). In the comet assay, while the control groups had a higher number of cells with damage class 0, the animals exposed to GBH had a greater number of cells with damage class 4, especially those exposed to high concentrations ( $p < 0.05$ ). We conclude that inhalation exposure to GBH leads to greater micronucleus formation, and exposures to higher concentrations present greater DNA damage at the single-cell level, evidenced by the comet assay.

**Keywords:** glyphosate, toxicity, micronucleus tests, experimental model.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mediana e intervalo interquartílico do ganho de peso (em gramas) dos animais por grupo de estudo (n=80). a: p= 0,349 (teste de Dunn).....	19
Figura 2 -	Eritrócito policromático (círculo) com micronúcleo (seta). Animal do grupo baixa concentração inalatório. Giemsa, aumento de 400x.....	20
Figura 3 -	Mediana e intervalo interquartílico de micronúcleos por grupo de estudo (n=88).....	20
Figura 4 -	Contagem de células ao Ensaio do cometa (mediana e intervalo interquartílico): A - Células com escore 0 em cada grupo de estudo (a x c; b x d; e x f: valor de p <0,0001 - teste de Dunn). B - Células com escore 1 em cada grupo de estudo (a x c; b x d; b, e x f: valor de p <0,0001 - teste de Dunn). C - Células com escore 2 em cada grupo de estudo (a x c; b x d; e x f: valor de p <0,0001 - teste de Dunn). D - Células com escore 3 em cada grupo de estudo (a x c; b x d: valor de p <0,0001 - teste de Dunn). E - Células com escore 4 em cada grupo de estudo (a x c; b x d; e x f: valor de p <0,0001 - teste de Dunn).....	22

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ARTIGO .....</b>	<b>11</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>30</b>
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE) .....</b>	<b>30</b>
	<b>ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>31</b>

1 ARTIGO

**GENOTOXICIDADE ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO CRÔNICA A HERBICIDA A  
BASE DE GLIFOSATO EM RATOS**

Camilla Passarela Silva<sup>1</sup>, Fabíola de Azevedo Mello<sup>1</sup>, Isadora de Almeida Costa<sup>2</sup>, Karen Pompei Bruneri<sup>2</sup>, Mariana Olívia Ferreira do Amaral<sup>2</sup>, Maitê Perrone Marcondes<sup>2</sup>, Renata Calciolari Rossi<sup>3</sup>, Gisele Alborghetti Nai<sup>1,2,4\*</sup>.

<sup>1</sup>Animal Science - Master's Degree and Doctoral Program, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Medical College, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Environment and Regional Development - Master's Degree Program, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Pathology, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

\*Correspondência: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil. Phone: +55-18-3229-1059. Fax: +55-18-3229-1194. E-mail: patologia@unoeste.br

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: *Environmental & Molecular Mutagenesis*, Fator de impacto 3.216, Classificação Qualis A3.

## RESUMO

Herbicidas a base de glifosato (GBH) são os mais utilizados para pulverização de lavouras e espaços urbanos no mundo. Os GBH tem formulação muito variável entre países e fabricantes, o que torna sua avaliação constante, importante para se evitar efeitos adversos à saúde. O objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito genotóxico da exposição crônica por via oral e inalatória a GBH em ratos. Foram utilizados 80 ratos Wistar albinos, machos, adultos, divididos em oito grupos (n=10) e expostos por via oral e inalatória a água destilada (grupos controles) e a três diferentes concentrações do GBH conforme preconizado para pulverização de lavouras [ $2,99 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha);  $4,99 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha; e  $7,48 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha] durante 6 meses. As células da medula óssea foram coletadas para o teste do micronúcleo e ensaio do cometa. A mediana de micronúcleos nos grupos controles foi de 0, nos grupos expostos por via inalatória variou de 4,5 a 5 e nos grupos expostos por via oral variou de 1 a 3 ( $p < 0,05$ ). Enquanto os grupos controle apresentaram maior número de células com classe de dano 0, os animais expostos ao GBH apresentaram maior número de células com classe de dano 4, principalmente aqueles expostos a altas concentrações ( $p < 0,05$ ). A exposição crônica ao GBH apresenta genotoxicidade e o padrão de efeito depende da via de exposição e da concentração deste herbicida.

**Palavras-chave:** glifosato, toxicidade, meio ambiente, exposição a praguicidas, testes de mutagenicidade.

## INTRODUÇÃO

Desde a descrição dos primeiros agrotóxicos, o uso destes produtos na agricultura vem aumentando consideravelmente e tem se tornado um problema mundial. Apesar de serem aplicados em áreas terrestres, eles podem contaminar outras áreas e a água por deriva, enxurrada, drenagem e lixiviação [Guilherme et al. 2012].

Estes produtos podem provocar riscos à saúde não somente de agricultores e de trabalhadores da indústria produtora, mas também podem afetar a população em geral pelo consumo diário de alimentos e água contaminados [USEPA, 1993]. Assim, estudos com exposição por via oral de alimentos contaminados com agrotóxicos se tornam importantes por avaliar não somente a exposição ocupacional (mais comum por via inalatória), mas também a exposição não ocupacional dos indivíduos.

O herbicida glifosato (N- [fosfometil] -glicina) começou a ser usado na prática agrícola na década de 1970 para o controle de ervas daninhas em culturas agrícolas alimentares e não alimentares e em áreas sem cultivo. Seu principal produto de biodegradação é o ácido aminometilfosfônico (AMPA), que também apresenta toxicidade [USEPA, 1993]. Herbicidas a base de glifosato (GBH) são os produtos mais utilizados para pulverização de lavouras e espaços urbanos no mundo [Conrad et al. 2017]. O amplo uso de GBH vem aumentando os riscos de contaminação de organismos não-alvos, devido a extensa contaminação da água [Guilherme et al. 2012]. A população geralmente se expõe aos GBH por residir perto de áreas pulverizadas, pelo uso doméstico e pela alimentação, sendo o nível observado geralmente baixo [IARC, 2015]. A exposição de cidadãos europeus aos GBH parece ser menor do que a dos Americanos [Tarazona et al. 2017].

A genotoxicidade do glifosato, assim como sua carcinogenicidade, tem sido muito estudada ao longo dos anos, porém ainda é controversa [Nagy et al. 2019]. Em 1991, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* - USEPA) considerou o herbicida glifosato como apresentando evidências de não ser cancerígeno para seres humanos (Grupo E) [USEPA, 2017]. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (*International Agency for Research on Cancer* - IARC) classificou o glifosato como "provavelmente carcinogênico para humanos" (Grupo 2A) em 2015, e com forte evidência para

carcinogenicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo em animais experimentais [IARC, 2015]. Porém, no mesmo ano, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority* - EFSA) considerou o glifosato como improvável de ser genotóxico ou representar uma ameaça carcinogênica para humanos [EFSA, 2015].

O glifosato é frequentemente comercializado em solução aquosa como sais de isopropilamina, dimetilamina, trimésio e potássio para aumentar sua solubilidade, além de outros ingredientes rotulados como “inertes” adicionados às formulações para melhorar a solução, estabilidade, absorção e a ação dos GBH. Porém, a composição destes ingredientes “inertes” é um segredo industrial; assim a composição GBHs geralmente é desconhecida e varia entre os países e fabricantes do produto [Mesnage et al. 2019]. As diferentes metodologias aplicadas para avaliar a genotoxicidade e carcinogenicidade do glifosato e as diferentes formulações deste herbicida podem explicar a controvérsia na sua classificação [Nagy et al. 2019]. Além disso, os dados epidemiológicos não são exclusivos da exposição ao glifosato, pois em geral numa mesma lavoura são utilizados vários agrotóxicos, não sendo possível separar as causas do dano no caso de exposições humanas [USEPA, 2017]. Embora, haja vários trabalhos que avaliaram o potencial genotóxico dos GBH ao longo dos anos, é consenso que estes herbicidas comercializados atualmente têm composição altamente variável, o que torna importante a avaliação sistemática destes GBH para maior proteção a potenciais efeitos adversos crônicos causados aos seres humanos [Nagy et al. 2019].

O objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito genotóxico da exposição crônica a um GBH por via oral e inalatória em ratos, simulando a exposição ocupacional e não ocupacional de seres humanos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Protocolo animal*

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (Protocolo 6440) (Anexo A), seguiu estritamente os protocolos institucionais e internacionais de manejo animal e foi desenhado e monitorado de acordo com as diretrizes ARRIVE [Kilkenny et al. 2010].

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 88 ratos Wistar albinos, machos, adultos, com peso entre 200-250g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), alocados em gaiolas plásticas grandes, a temperatura média de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclos de 12 horas de claro e escuro.

A exposição ao GBH foi feita com Glifosato [N-(phosphonomethyl) glycine] (Roundup Original DI, Monsanto, São Paulo, Brasil), concentração: Sal de Di-amônio de Glifosato 445 g/L (370 g/L equivalente ácido). As concentrações utilizadas no estudo foram baseadas nas concentrações indicadas na bula do produto, sendo que cada tipo de lavoura necessita de uma concentração distinta para pulverização.

Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos experimentais (n=10): CI - Grupo Controle Inalatório: animais expostos à nebulização com água destilada; CO - Grupo Controle Oral: ração nebulizada com água destilada; BI - Grupo de Baixa Concentração Inalatório: animais expostos a nebulização ao herbicida com  $2,99 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) (correspondente a  $91,17\text{mg/m}^3$ ); BO - Grupo de Baixa Concentração Oral: ração nebulizada com o herbicida na concentração de  $2,99 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (correspondente a  $91,17\text{mg/m}^3$ ); MI - Grupo de Média Concentração Inalatório: animais expostos a nebulização ao herbicida com  $4,99 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (correspondente a  $152,12\text{mg/m}^3$ ); MO - Grupo de Média Concentração Oral: ração nebulizada com o herbicida na concentração de  $4,99 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (correspondente a  $152,12\text{mg/m}^3$ ); AI - Grupo de Alta Concentração Inalatório: animais expostos a nebulização ao herbicida com  $7,48 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (correspondente a  $228,06\text{mg/m}^3$ ); AO - Grupo de Alta Concentração: ração nebulizada com o herbicida na concentração de  $7,48 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha (correspondente a  $228,06\text{mg/m}^3$ ).

O protocolo de experimentação contou com duas caixas (32x 24x 32 cm) cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico da marca Pulmosonic Star<sup>®</sup> (Soniclear Ind. Com. Imp. e Exp. Ltda., São Paulo, Brasil). Uma das caixas foi utilizada para os grupos controles e a outra para os grupos expostos ao glifosato. O tempo de exposição foi de 15 minutos, tanto para os animais quanto para a ração, tempo este necessário para que toda a solução fosse nebulizada [Mello et al. 2018].



Os animais expostos por via inalatória foram nebulizados durante cinco dias consecutivos na semana (simulação da exposição ocupacional). A ração dos animais expostos por via oral foi trocada a cada dois dias, sendo que a nebulização foi realizada um dia antes da ração ser ofertada aos animais (simulação da exposição não ocupacional) [Parizi et al. 2020]. A ração dos animais de todos os grupos foi pesada a cada troca para a avaliação da quantidade de ingestão. Todos os animais foram pesados mensalmente durante os 6 meses de exposição.

Um nono grupo (n=8) constituiu o controle positivo (CP), cujos animais receberam ciclofosfamida (Genuxal, Baxter Oncology GmbH, Halle/Westfalen, Alemanha) em dose única subcutânea (50mg/kg) no primeiro dia do experimento e foram eutanasiados 24 horas após [MacGregor, 1987].

Todos os animais foram eutanasiados com Tiopental sódico (Syntec, EUA), na dose de 100mg/kg por via subcutânea [Paiva et al. 2005].

#### *Teste do micronúcleo*

Após a eutanásia, a medula óssea de um dos fêmures foi retirada e utilizada para o teste do micronúcleo. Após a secção das extremidades, foi realizada a injeção de soro fisiológico (1ml) com auxílio de uma agulha de 22G em uma das extremidades, para que o material fosse expelido através da outra. As células da medula óssea foram coletadas dos fêmures em 3ml de soro fisiológico. Após ressuspensão, o material foi centrifugado por 5 minutos, a 1000rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 0,5ml de soro fisiológico. Os esfregaços foram preparados pingando-se duas gotas da suspensão na extremidade de uma lâmina e realizados por extensão com auxílio de outra lâmina. Foram realizadas duas lâminas por animal, as quais foram coradas pelo corante de Giemsa (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) [MacGregor, 1987].

Para determinação do número de micronúcleos foram contados 2000 eritrócitos policromático por animal (1000 em cada lâmina) no aumento de 400x [MacGregor, 1987]. Foram considerados micronúcleos as estruturas que apresentaram um halo circundante sugestivo de membrana, menores que um terço do diâmetro do núcleo associado, intensidade de coloração semelhante ao núcleo e

mesmo plano focal a microscopia [Tolbert et al. 1992]. A análise das lâminas foi às cegas e realizada por um pesquisador.

### *Ensaio do cometa*

A medula óssea do outro fêmur foi utilizada para o Ensaio do Cometa. Após a secção das extremidades, foi realizada a injeção de soro fetal bovino (1ml) com auxílio de uma agulha de 22G em uma das extremidades, para que o material fosse expelido através da outra. As células da medula óssea foram ressuspensas em solução contendo 40% de soro fetal bovino, 50% de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co. LLC. - EUA) e 10% de DMSO (dimetil sulfóxido – Merck - EUA) (tampão de criopreservação) e estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Os tubos foram colocados em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  para descongelamento, quando restou um pequeno pellet congelado transferiu-se o tampão de criopreservação contendo as células da medula óssea para um tubo de centrifuga de 15 ml, que foi completado até 12 ml com PBS livre de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ . Posteriormente, os tubos de centrifuga de 15 mL foram centrifugados a 800rpm por 10 minutos, para lavagem e inativação de possível efeito citotóxico do DMSO. Após centrifugação, foram retirados e descartados cerca de 11,5 mL de sobrenadante e o conteúdo restante em cada tubo foi completado até 12 mL com PBS livre de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  e homogeneizado. Após nova centrifugação a 800rpm por 10 minutos, aproximadamente 11,5 mL de sobrenadante foram retirados, restando aproximadamente 0,5 mL, que foi utilizado para análise [Scherer and Strohschoen, 2013].

As lâminas foram preparadas com agarose 1,5%, secas e posteriormente uma mistura de 5 $\mu\text{l}$  das células da medula óssea com 75 $\mu\text{l}$  de agarose *low melting* foi adicionada sobre estas e imediatamente colocadas em uma câmara de eletroforese horizontal, recobertas com tampão de eletroforese, onde permaneceram em repouso por 20 minutos. A eletroforese foi realizada em seguida, em condições alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ) a 25V e uma corrente de 300 mA por uma hora. Ao final, as amostras foram neutralizadas com tampão Tris (Tris 0,4 M pH 7,5). As lâminas foram colocadas em solução fixadora [contendo ácido tricloroacético, sulfato de zinco

(hepta-hidratado) e de glicerol] e posteriormente lavadas. As amostras foram então coradas por solução de prata a 37°C até a solução começar a escurecer. Em seguida, as lâminas foram lavadas e colocadas por cinco minutos em solução *stop* e novamente lavadas. Após esse processo, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e recobertas com lamínula para análise [Scherer and Strohschoen, 2013].

Cem células de cada animal foram escolhidas aleatoriamente e analisadas ao microscópio óptico com aumento de 400x. Elas foram classificadas de acordo com a forma e tamanho da cauda em quatro classes de danos no DNA: 0 (sem dano), 1, 2, 3 e 4 (maior grau de dano). Células “hedgehog” foram excluídas da análise [Villela et al. 2006]. A análise das lâminas foi às cegas e realizada por um pesquisador.

#### *Análise estatística*

As variáveis não apresentaram distribuição normal, verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0,05$ ), logo, para comparação entre os grupos foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para as comparações múltiplas, quando necessário.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) com o pacote estatístico SPSS 23.

## **RESULTADOS**

### *Peso dos animais e ingesta da ração*

Não houve diferença entre os grupos para o consumo da ração ( $p = 0,156$ ), assim como não houve diferença de ganho de peso ( $p = 0,349$ ) (Figura 1).

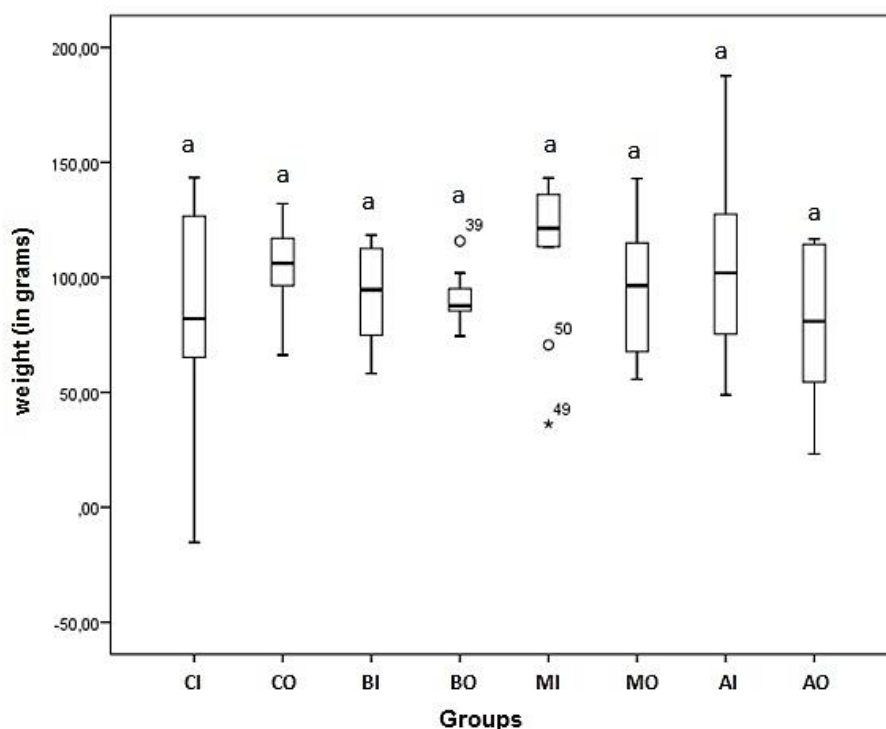


Figura 1 - Mediana e intervalo interquartilico do ganho de peso (em gramas) dos animais por grupo de estudo (n=80). a:  $p=0,349$  (teste de Dunn). Grupos: CI: controle inalatório; CO: controle oral; BI: baixa concentração inalatório; BO: baixa concentração oral; MI: média concentração inalatório; MO: média concentração oral; AI: alta concentração inalatório; AO: alta concentração oral. CP: controle positivo (ciclofosfamida). °, \*: *outlier* e número do animal.

### Teste do micronúcleo

A mediana de micronúcleos nos grupos controles inalatório e oral foi de 0, no grupo BI de 4,5, no BO de 1,5, no MI de 5, no MO de 1, no AI de 5, no AO de 3, e no grupo controle positivo de 9. Houve diferença entre os grupos estudados ( $p < 0,0001$ ) e a diferença foi entre o grupo CI x (BI, MI, AI, CP), entre CO x (BO, MO, AO, CP) e entre os grupos CP x (BO, MO, AO). Em relação à via de exposição, os animais expostos por via inalatória apresentaram maior número de micronúcleos do que os expostos por via oral ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 2 e 3).



Figura 2 – Eritrócito policromático (círculo) com micronúcleo (seta). Animal do grupo baixa concentração inalatório. Giemsa, aumento de 400x.

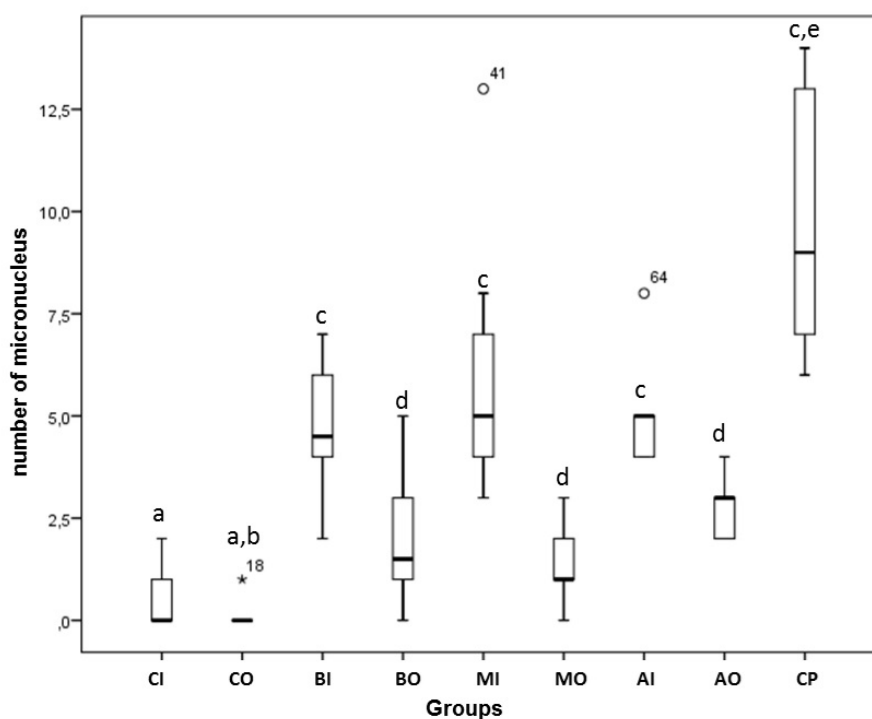


Figura 3 - Mediana e intervalo interquartilico de micronúcleos por grupo de estudo (n=88). Grupos: CI: controle inalatório; CO: controle oral; BI: baixa concentração inalatório; BO: baixa concentração oral; MI: média concentração inalatório; MO: média concentração oral; AI: alta concentração inalatório; AO: alta concentração oral. CP: controle positivo (ciclofosfamida). a x c; b x d; d x e:  $p < 0,0001$  (teste de Dunn).. °, \*: *outlier* e número do animal.

### *Ensaio do cometa*

A biodisponibilidade mínima de 91% foi verificada nas amostras.

Em relação às células apresentando escore 0, houve diferença entre os grupos CI x (BI, MI, AI), entre CO x (BO, MO, AO) e entre CP x (MO, AI, AO) ( $p < 0,0001$ ) (Figura 4A). Em relação às células apresentando escore 1, houve diferença entre os grupos CI x (MI, AI), entre BCO x (MO, AO) e entre CP x (MO, AI, AO) ( $p < 0,0001$ ) (Figura 4B). Em relação às células apresentando escore 2, houve diferença entre os grupos CI x (BI, MI, AI) entre CO x (BO, MO, AO, CP) e entre AO x (BO, CP) ( $p < 0,0001$ ) (Figura 4C). Para o escore 3, houve diferença entre os grupos CI x (BI, MI, AI) e entre CO x (BO, MO, AO) ( $p < 0,0001$ ) (Figura 4D). Para o escore 4, houve diferença entre os grupos CI x (BI, MI, AI), entre CO x (BO, MO, AO) e entre CP x (MO, AI, AO) ( $p < 0,0001$ ) (Figura 4E). Não houve diferença entre as vias de exposição (oral e inalatória) ( $p > 0,05$ ).

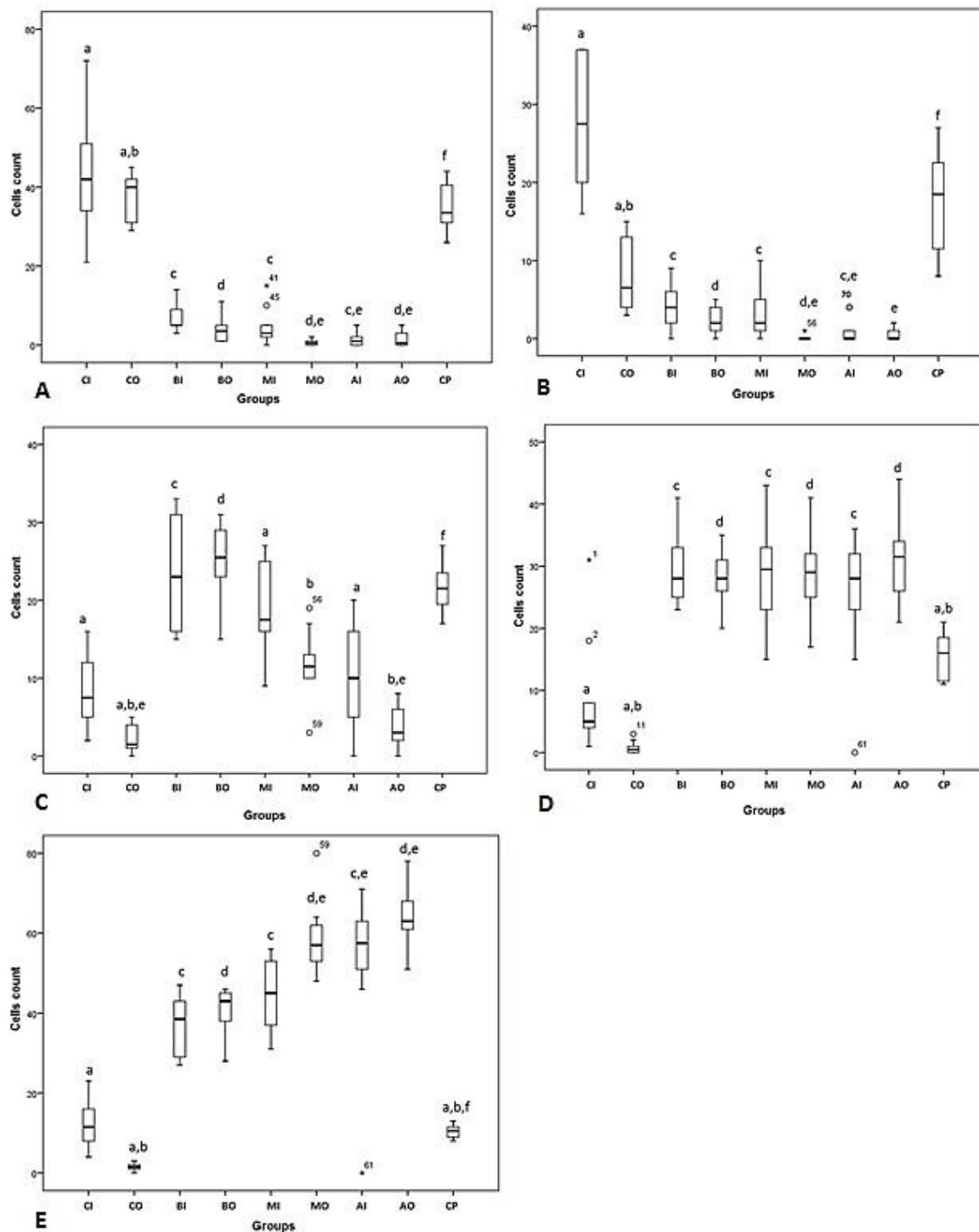


Figura 4 – Contagem de células ao Ensaio do cometa (mediana e intervalo interquartílico): A - Células com escore 0 em cada grupo de estudo (a x c; b x d; e x f: valor de  $p < 0,0001$  - teste de Dunn). B - Células com escore 1 em cada grupo de estudo (a x c; b x d; b, e x f: valor de  $p < 0,0001$  - teste de Dunn). C - Células com escore 2 em cada grupo de estudo (a x c; b x d; e x f: valor de  $p < 0,0001$  - teste de Dunn). D - Células com escore 3 em cada grupo de estudo (a x c; b x d: valor de  $p$

<0,0001 - teste de Dunn). E - Células com escore 4 em cada grupo de estudo (a x c; b x d; e x f: valor de p <0,0001 - teste de Dunn). Grupos: CI: controle inalatório; CO: controle oral; BI: baixa concentração inalatório; BO: baixa concentração oral; MI: média concentração inalatório; MO: média concentração oral; AI: alta concentração inalatório; AO: alta concentração oral. CP: controle positivo (ciclofosfamida). °,\*: *outlier* e número do animal.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, nós observamos aumento do número de micronúcleos, o qual foi maior nos animais expostos por via inalatória ao GBH, e dano de DNA em nível de célula única no ensaio do cometa associado a maiores concentrações do GBH, mas não a via de exposição.

Em 2014, a EFSA realizou um estudo na União Europeia para análise de resíduos de glifosato em 4.721 amostras de diferentes produtos (incluindo produtos processados), principalmente frutas, nozes, vegetais e cereais, uma vez que não há informações disponíveis sobre resíduos de glifosato em produtos de origem animal. A maior taxa de detecção de glifosato foi em sementes de girassol (mas dentro do limite legal), seguida por lentilhas secas, sementes de mostarda, ervilhas secas, linhaça e soja. Nos cereais, o glifosato foi encontrado principalmente na cevada, trigo, aveia e centeio, sendo que apenas uma amostra de feijões secos excedeu o limite legal de 2 mg / kg [EFSA, 2016]. Embora, os resíduos alimentares de glifosato possam ser pequenos, é importante avaliar os possíveis danos de uma ingestão oral de alimentos contaminados por este herbicida para constante avaliação dos níveis permissíveis de contaminação. Assim, neste estudo, nós escolhemos analisar também o potencial genotóxico do glifosato mediante a exposição a alimentos contaminados por este herbicida.

Enquanto um estudo realizado com peixes mostrou que tanto o glifosato quanto o herbicida formulado com ele são capazes induzir danos ao DNA em eritrócitos e células branquiais pelo ensaio do cometa [Moreno et al. 2014], outro estudo mostrou dano do DNA pelo ensaio do cometa em linfócitos humanos somente na exposição aos três GBHs comerciais avaliados mas não a exposição ao princípio ativo (exposição somente a glifosato) [Nagy et al. 2019]. Este dado mostra a importância da avaliação de diferentes GBHs comercializados e que o potencial



genotóxico em mamíferos pode estar mais associado a sua formulação e aos ingredientes inertes utilizados do que ao princípio ativo. Em nosso estudo, optamos por utilizar o GBH mais comumente utilizado em lavouras e jardins urbanos em nosso país.

A maioria dos estudos para avaliação de genotoxicidade foi realizada com exposição aguda ao glifosato ou GBH e por vias não comuns à exposição humana. Exposições subcrônicas ou crônicas são muito mais comuns em seres humanos, tanto na exposição ocupacional quanto na não ocupacional. Além disso, as vias comuns de exposição de seres humanos a agrotóxicos são a inalatória e a oral (por meio de água ou alimentos contaminados) [Mello et al. 2019]. Em um estudo anterior de nosso grupo, onde realizamos exposição subcrônica (75 dias) de ratos ao mesmo GBH em concentrações similares, observamos aumento de micronúcleos nos grupos expostos ao GBH independente da via de exposição (oral ou inalatória) [de Maria Serra et al. 2021]. Diferente de nosso estudo anterior, no presente estudo, onde realizamos exposição crônica dos animais, observamos que a exposição inalatória levou a uma maior formação de micronúcleos do que a exposição oral, independente da concentração do GBH. Com este dado, podemos inferir que a exposição crônica inalatória causa mais mutagenicidade do que a exposição oral, possivelmente por haver uma maior absorção do GBH no trato respiratório do que no trato digestório.

Os efeitos genotóxicos podem ser transitórios, já os efeitos mutagênicos são persistentes e geralmente não podem ser reparados [USEPA, 2012]. Neste estudo utilizamos dois testes para avaliar genotoxicidade mediante exposição ao GBH. O teste do micronúcleo que avalia mutações estruturais cromossômicas [Fenech et al. 1999] e o Ensaio do cometa que avalia a segregação do DNA [Villela et al. 2006]. Enquanto no teste do micronúcleo, pudemos observar uma maior formação de micronúcleos nos animais expostos por via inalatória independente da concentração do GBH, ao ensaio do cometa, não houve diferença de dano de DNA em nível de célula única em relação à via de exposição, mas houve sim em relação à concentração do GBH, onde maiores concentrações mostraram maior número de células com maior nível de dano (cometa score 4). Este dado mostra que o GBH avaliado pode provocar diferentes padrões de lesão no DNA, tanto aberrações cromossômicas quanto interações com o aparato celular alterando sua segregação. E o padrão de lesão é dependente da via de exposição ou da concentração do GBH. Além disso, estes dados corroboram outros dois estudos com exposição ao glifosato

que mostraram dano do DNA ao ensaio do cometa (estudo realizado em peixes com exposição na água contaminada [Guilherme et al. 2012] ) e um aumento significativo de aberração cromossômica e indução de formação de micronúcleos (estudo em camundongos com injeção intraperitoneal [Prasad et al. 2009]), alterações estas dependentes da concentração e do tempo de exposição.

Alguns estudos sugerem que os GBH podem induzir efeitos mediados pela toxicidade local, no caso de injeção intraperitoneal, mas não na administração oral [Heydens et al. 2008], ou que o danos ao DNA parecem ser, provavelmente, secundários a efeitos citotóxicos e que o GBH não cause genotoxicidade [Kier et al. 2013]. Em nosso estudo, observamos que a exposição oral a alimentos contaminados pelo GBH pode sim causar dano ao DNA (tanto aumento de micronúcleos quanto dano em nível de célula única) e como a análise foi realizada em células da medula óssea, este efeito não parece estar associado à toxicidade local, mas sim sistêmica. Outro estudo mostrou que a indução de danos ao DNA ao ensaio do cometa em concentrações mais altas está associada principalmente por processos dependentes de espécies reativas de oxigênio (ROS) [Guilherme et al. 2012], o que pode ter ocorrido também em nosso estudo. Estudos que avaliem, concomitantemente, genotoxicidade, citotoxicidade e estresse oxidativo mediante a exposição crônica e com parâmetros simulando a exposição humana poderão esclarecer melhor o potencial genotóxico dos GBH e seus possíveis mecanismos.

Com os dados deste estudo e nas condições de exposição realizadas, concluímos que exposição ao GBH avaliado tem potencial genotóxico, que a via inalatória acarreta em maior formação de micronúcleos, e as exposições a maiores concentrações apresentam um maior dano em nível de célula única, evidenciado pelo ensaio do cometa.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi financiado por fundos de pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) e realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. C. P. Silva foi taxista CAPES.

Os autores gostariam de agradecer a técnica do Laboratório de Genética da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Mayara de Oliveira Vidotto Figueiredo, pela ajuda na realização do Ensaio do cometa.

## **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

IAC, KPB, MOFA, MPN: conduziram a exposição dos animais e a coleta das amostras; CPS e FAM: conduziram os testes genotóxicos sob supervisão de GAN; CPS, FAM e GAN: fizeram a curadoria e a análise dos dados; CPS: escreveu o artigo original; RCR: fez importantes contribuições intelectuais para o desenho do estudo e revisou o manuscrito; GAN: administrou e supervisionou o estudo e realizou a revisão do manuscrito; e todos os autores leram e aprovaram esta versão do manuscrito.

## **CONFLITO DE INTERESSES**

Os autores declaram que não existe nenhum conflito de interesse.

## **REFERÊNCIAS**

- Conrad A, Schroter-Kermani C, Hoppe HW, Ruther M, Pieper S, Kolossa-Gehring M. 2017. Glyphosate in German adults – time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. *Int J Hyg Environ Health* 220(1):8-16. doi:10.1016/j.ijheh.2016.09.016
- de Maria Serra F, Parizi JLS, Odorizzi GASM, Sato GMRH, Patrão IB, Chagas PHN, de Azevedo Mello F, Nai GA. 2021. Subchronic exposure to a glyphosate-based herbicide causes dysplasia in the digestive tract of Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res Int*. doi: 10.1007/s11356-021-15051-6.
- EFSA. European Food Safety Authority. 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA J* 13(11):4302.

- EFSA. European Food Safety Authority. 2016. The 2014 European Union report on pesticide residues in food. EFSA J 14(10):4611. doi:10.2903/j.efsa.2016.4611
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. 1999. The HUman MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. Mutat Res 428:271–83.
- Guilherme S, Gaivão I, Santos MA, Pacheco M. 2012. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. Mutat Res 743(1-2):1-9. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.017.
- Heydens WF, Healy CE, Hotz KJ, Kier LD, Martens MA, Wilson AG, Farmer DR. 2008. Genotoxic potential of glyphosate formulations: mode-of-action investigations. J Agric Food Chem 56(4):1517-23. doi: 10.1021/jf072581i.
- IARC Working Group. 2015. Glyphosate. In: Some organophosphate insecticides and herbicides: diazinon, glyphosate, malathion, parathion, and tetrachlorvinphos. Vol 112. IARC Monogr Prog 1-92.
- Kier LD, Kirkland DJ. 2013. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. Crit Rev Toxicol 43(4):283-315. doi: 10.3109/10408444.2013.770820
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. 2010. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biology 8(6):1-5. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412
- MacGregor JT. 1987. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. Mutat Res 189(2):103-112.
- Mello FA, Fagiani M d AB, Silva RCR, Nai GA. 2019. Pesticides: impacts to the environment and human health. Colloquium Vitae 11:37-44. doi: 10.5747/cv.2019.v11.n2.v262.
- Mello FA, Quinallia G, Marion AL, Jorge FC, Marinelli LM, Salge AKM, Fagiani MAB, Mareco EA, Favareto APA, Rossi e Silva RC. 2018. Evaluation of the nasal cavity mice submitted to the inhalation exposure to the herbicide 2,4-

dichlorophenoxyacetic acid. *Medicina (Ribeirão Preto, Online.)* 51(4): 247-253. doi: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v51i4p00-00>

Mesnager R, Benbrook C, Antoniou MN. 2019. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food Chem Toxicol.* 128:137-145. doi: 10.1016/j.fct.2019.03.053.

Moreno NC, Sofia SH, Martinez CB. 2014. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environ Toxicol Pharmacol* 37(1):448-454. doi: 10.1016/j.etap.2013.12.012.

Nagy K, Tessema RA, Budnik LT, Ádám B. 2019. Comparative cyto- and genotoxicity assessment of glyphosate and glyphosate-based herbicides in human peripheral white blood cells. *Environ Res* 179(Pt B):108851. doi: 10.1016/j.envres.2019.108851.

Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. 2005. Disponível em: [http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha\\_manipulacao.pdf](http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf). Acesso em 22 ago 2015.

Parizi JLS, de Mello Odorizzi GAS, Sato GMRH, Patrão IB, Nai GA. 2020. Oral mucosa changes associated with chronic oral and inhalation exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in Wistar rats. *Toxicol Res* 9(6): 746-757. doi: 10.1093/toxres/tfaa085.

Prasad S, Srivastava S, Singh M, Shukla Y. 2009. Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of Swiss albino mice. *J Toxicol* 1-6. doi: 10.1155/2009/308985.

Scherer K, Strohschoen AAG. 2013. Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde. *Revista Destaques Acadêmicos.* 5(3): 49-60.

Tarazona JV, Court-Marques D, Tiramani M, Reich H, Pfeil R, Istace F, Crivellente F. 2017. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of

the European Union assessment and its differences with IARC. *Arch Toxicol* 91(8):2723-2743. doi: 10.1007/s00204-017-1962-5.

Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res* 271:69-77.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. 2012. "40 CFR Part 180, [EPA-HQ-OPP-2008-0877; FRL-9344-1]. 2,4-D; Order Denying NRDC's Peon To Revoke Tolerances," Order. *Federal Register* vol. 77, no. 75, pp. 23135-23158.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. 1993. Re-registration Eligibility Decision (RED) Glyphosate: EPA-738-R-93-014. Washington: US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs and Toxic Substances.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. 2017. Revised Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential. EPA's Office of Pesticide Programs.

Villela IV, Oliveira IM, Silva J, Henriques JA. 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat Res* 605:78-86.

## ANEXOS

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista				
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO				
PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica				
<b>Parecer Final</b>				
<p>Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE MEDIANTE A EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO HERBICIDA GLIFOSATO EM RATOS", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6440 e tendo como participante(s) CAMILLA PASSARELA SILVA (discente), ISADORA DE ALMEIDA COSTA (discente), KAREN POMPEI BRUNERI (discente), FABIOLA DE AZEVEDO MELLO (discente), MARIANA OLIVIA FERREIRA DO AMARAL (discente), MAITE PERRONE MARCONDES (discente), RENATA CALCIOLARI ROSSI (docente), GISELE ALBORGHETTI NAI (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.</p> <p>Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 07/10/2020.</p>				
MATERIAL ARMAZENADO/DOADO				
Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
5684	13/11/2019	UNOESTE	SIM	Biotério de Experimentação Animal - Campus II
Presidente Prudente, 8 de Outubro de 2020.				
 Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr. Coordenador Científico da CPDI				
 Prof. Ms. Adriana Falco de Brito Coordenadora da CEUA - UNOESTE				
<small>             Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPDI - 18 3229-2079 - cpdi@unoeste.br              Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18 3229-2079 - cep@unoeste.br              Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - 183229-2079 - ceua@unoeste.br           </small>				
<small>             valide este documento em <a href="http://www.unoeste.br/sgp/certificados/ver.asp?h=9a0b04837b829547a896be61f7d49c03">www.unoeste.br/sgp/certificados/ver.asp?h=9a0b04837b829547a896be61f7d49c03</a> informando o código de segurança 9a0b04837b829547a896be61f7d49c03           </small>				
<small> <a href="http://www.unoeste.br/SGP/certificados/ver.asp?h=9a0b04837b829547a896be61f7d49c03">www.unoeste.br/SGP/certificados/ver.asp?h=9a0b04837b829547a896be61f7d49c03</a> </small>				
<small>1/1</small>				

## ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO

Environmental and  
Molecular Mutagenesis



### **Author Guidelines**

Environmental mutagenesis is a multidisciplinary field and *Environmental & Molecular Mutagenesis* is intended for publications in a variety of fields including genetics, epigenetics, biochemistry, toxicology, radiation biology, microbiology, epidemiology, basic cancer research and public health. The content is of interest to investigators involved in primary research, as well as, governmental and industrial institutions interested in regulatory decision-making and public health policy.

**Aims and Scope.** *Environmental & Molecular Mutagenesis* publishes original research articles, reviews, brief communications, letters and commentaries. The content focuses on seven topic areas.

- Mechanisms of somatic and germ cell mutagenesis and chromosomal alterations including spontaneous and induced mutations and genomic instability.
- Mechanisms of genetic-based health conditions and diseases, including cancer, aging, sensitivity and susceptibility.
- DNA damage and damage processing including identification, detection, characterization, and quantification of DNA damage events, metabolism and activation of DNA-damaging agents, identification of DNA damaging agents in complex environmental media, cytogenetic abnormalities including translocations, rearrangements, and aneuploidy.
- DNA replication, recombination and repair including molecular mechanisms, genetic and enzymatic studies.
- Structural, comparative and functional genomics including genetic polymorphisms, gene expression alterations (transcriptomics), proteomics, epigenetic alterations, and microRNA analysis.
- Public health research and policy including molecular epidemiology, biomonitoring in humans and other species, cancer, genetic diseases and aging, regulatory requirements and decision-making and risk assessment.
- DNA technology including DNA microarrays, novel technologies for sequencing and mutation analyses, bioinformatics and functional genomics.

### **MANUSCRIPT SUBMISSION**

*Environmental & Molecular Mutagenesis* welcomes manuscript submissions online at <http://mc.manuscriptcentral.com/emm>.

**Editorial Office:** Dr. Bhaskar Gollapudi  
Exponent, Inc.  
Alexandria, VA  
E-mail: [bbhaskarg@hotmail.com](mailto:bbhaskarg@hotmail.com)

Please note that you will need a ScholarOne Manuscript Central account for each Wiley journal to which you want to submit a paper. Authors are encouraged to first check for an existing account. If none exists, then follow the directions for creating a new account. Once you have logged in, you will be presented with the Main Menu and a link to your Author



Center where you can submit your manuscript. Please submit the main body of the manuscript (i.e., all text and tables) as a single electronic file. To retain the appropriate resolution, it is recommended that figures be submitted as separate files. At the end of a successful submission, ManuscriptCentral will compile a pdf version of the complete manuscript and provide a manuscript number on the submission screen. Authors *must* verify that the compiled pdf has been correctly assembled and contains all the required manuscript sections. You also will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the Journal. If confirmation is not received, you should check your submission and/or contact the EMM administrator Neeraja Gollapudi at [neegollapudi71@gmail.com](mailto:neegollapudi71@gmail.com)

All manuscripts must be accompanied by a cover letter from the corresponding author that includes the following information:

- assurance that the work has not been published or submitted for publication elsewhere and that all authors agree to its submission, and publication in EMM;
- assurance of permission from scientists whose work is cited as unpublished (i.e., personal communications or works in preparation)
- assurance of permission to duplicate materials published elsewhere;
- disclosure of any potential conflicts of interest.

### **Conflict of Interest Declaration**

At the time of submission, EMM policy requires that each and every author reveal any financial interests or connections, direct or indirect, or other situations that might raise the question of bias in the work reported or the conclusions, implications, or opinions stated. These include pertinent commercial or other sources of funding for the individual author(s) or for the associated department(s) or organization(s), personal relationships, or direct academic competition. The corresponding author is required to confirm whether s/he or his/her co-authors have any conflicts of interest to declare, and to provide details of these. If the Corresponding author is unable to confirm this information on behalf of all co-authors, the authors in question will be required to submit a conflict of interest statement to the Editor-in-Chief. It is the Corresponding author's responsibility to ensure that all authors adhere to this policy. The authors may choose to follow the sample wording provided below.

[Name of individual] has received fees for serving as a speaker, a consultant and an advisory board member for [names of organizations], and has received research funding from [names of organization].

[Name of individual] is an employee of [Name of organization].

[Name of individual] owns stocks and shares in [name of organization].

[Name of individual] owns patent [patent identification and brief description].

### **Authorship Credit**

The Wiley Exclusive License form, the open access in hybrid titles form, and the Copyright Assignment form, one of which must be submitted before publication in any Wiley journal, requires the corresponding author to state that written authorization for publication of the article has been received from all co-authors. Authorship credit should be based on (1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (3) final approval of the version to be published. All authors must meet conditions 1, 2, and 3. Contributions from individuals who do not qualify for authorship should be described in the acknowledgements section.

### **FORMAT FOR ORIGINAL RESEARCH MANUSCRIPTS**

Regular full-length papers should be subdivided into the following sections: Title page, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Statement of Author

Contributions, Acknowledgements, Grant sponsors, References, Tables, Figure Legends, Figures, and Appendices.

### **General formatting information**

Manuscripts should be prepared using a word processing program. Acceptable file formats include doc, docx, xls, xlsx, ppt, pptx, wpd, eps, tif, rtf, and txt. The following file extensions are not permitted: zip, sea, tar, exe, com, pdf, bat, and pds. Use double spacing throughout the manuscript and leave margins of 25 mm (1 inch) at the top, bottom and sides of each page. Text should be left unjustified (without hyphenation) and pages numbered. Avoid footnotes; using parentheses instead. Where possible, use Times for the text font and Symbol for Greek and special characters. Use the word processing formatting features to indicate **Bold**, *Italic*, Greek, <sup>Superscript</sup> and <sub>Subscript</sub> characters. Differentiate between the letter O and the number zero, and the letters l and I and the number 1. All abbreviations that cannot be assumed to be common knowledge must be defined at first mention. All measurements must be in metric units, and SI units should be employed wherever possible.

EMM adheres to the Wiley House Style Guide. This guide, which is available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/housestyle.asp>, provides detailed information regarding spelling, grammar and style (e.g., abbreviations, use of italics, units and unit prefixes, etc.) In general, the journal follows the conventions of the CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, 6th edition, 1994 (Council of Biology Editors, Cambridge University Press). Chemical names follow *Chemical Abstracts Service* ([www.ccas.org](http://www.ccas.org)). For guidance on the use of biochemical terminology authors should follow the recommendations issued by the IUPAC-IUBMB Commission on Biochemical Nomenclature, as given in *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 2nd edition (Portland Press, 1992), available at <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bibliog/white.html#3>. Gene and gene names should follow the recommendations of the HUGO Gene Nomenclature Committee for human genes (<http://www.genenames.org/>), and the Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat (<http://www.informatics.jax.org/mqihome/nomen/gene.shtml>).

Gene names should be italicized; protein names should be in plain case. Human gene/protein names should be in all capital letters (e.g., *HPRT*); other mammalian (e.g., rat/mouse) gene/protein names should only have the first letter capitalized (e.g., *Hprt*). Taxonomic nomenclature should follow the appropriate recommendations for bacteria, viruses, plants and animals as specified in the International Code of Zoological Nomenclature, the International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Committee on Taxonomy of Viruses.

**Title Page.** This page must include an informative title, a short running title, keywords, the names and affiliations of all authors, and the name, address, telephone and fax numbers, and electronic mail address for the corresponding author. Three to six key words should be provided that adequately index the subject matter of the article. Avoid terms that appear in the title.

**Abstract.** This section should be a single paragraph containing a factual condensation of the entire work. It should include a statement of the problem, method of study, results, and conclusion. The abstract may not exceed 250 words.

**Introduction.** This section should provide a concise and insightful introduction to the topic, including a sound premise for the submitted work, and a brief description of the problem/issue investigated and/or hypothesis examined. The introduction should not be an extensive review of the topic, but rather a brief overview that highlights past progress, knowledge gaps, outstanding controversy, and the premise for the submitted work.

**Materials and Methods.** This section must be sufficiently detailed to permit other scientists to evaluate the work critically and to repeat the experiments. The source (including city,

state/country) of all chemicals, unusual supplies, organisms, and any unusual equipment should be given. Strain designations and relevant information on genotypes should be clearly specified. Any deviation from published methods should be given. Authors should provide details of plant growth conditions or animal husbandry, such as food, bedding and light cycles. Details of culture conditions and media should be provided. If in doubt about whether or not to include any technical details, include it. When animals are used, authors must indicate that approvals of the relevant regulatory authorities were obtained and that their guidelines were followed. Experiments involving humans must indicate that appropriate regulatory approvals were obtained and that informed consent was documented. Positive and negative controls, together with their concentrations, must be included where appropriate. *In vivo* studies should note strain, age, weight, sex and total number of animals used in each experiment. Manuscripts including gene expression results must conform to MIAME 2.0 standards

(see [http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame\\_2.0.html](http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_2.0.html)). MIAME-compliant results must be deposited in a publicly available database such as ArrayExpress, the NCBI Gene Expression Omnibus database, or the Chemical Effects in Biological Systems (CEBS) database before final publication. Manuscripts including proteomic results must conform to MIAPE standards (see <http://www.psivdev.info/index.php?q=node/91>).

**Results.** In some cases, the authors may wish to combine the Results and Discussion sections into a single section. The Results should objectively present and describe the key results. The results should be presented in an orderly and logical fashion, without interpretation. Results are generally described in the text, and illustrated or summarized in a series of Figures and Tables. Summaries of the statistical data analyses can be presented in the text or in the relevant Tables (sometimes as footnotes) and/or Figure legends. Tables should have self-explanatory titles and be numbered with Roman numerals in order of required appearance. Tables should be referred to in the text as required. Figures should be numbered with Arabic numerals and referred to in the text as required.

**Discussion.** This section of the manuscript should provide an interpretation of the results in the context of what is already known regarding the subject of investigation (i.e., published in the scientific literature), and moreover, outline how the work contributes to existing scientific knowledge. This is the section of the manuscript where any limitations of the results should be objectively presented, and remaining knowledge gaps be outlined. The Discussion should always connect to the Introduction by way of addressing the problem, issue and/or hypotheses initially described.

**Statement of Author Contributions.** The corresponding author must provide a statement of author contributions on behalf of all authors. The text below provides an example of a statement of author contributions.

*Drs A, B and C designed the study and applied for Research Ethics Board approval. Dr. A recruited the patients and collected the data. Drs A and B analyzed the data and prepared draft figures and tables. Dr A prepared the manuscript draft with important intellectual input from Drs B and C. All authors approved the final manuscript. Drs A, B and C had complete access to the study data.*

**Acknowledgments.** These should be included in a separate section after the Discussion, and not in footnotes. Personal acknowledgements should precede those of institutions or agencies. Details of all funding sources must be provided, and this should appear at the end of the Acknowledgements section. Funding by a commercial company, charity or government department must be stated and this applies to all types of submissions including research papers, reviews, letters, editorials, and commentaries. The full official funding agency name should be given, (i.e., the National Cancer Institute of the National Institutes of Health or simply National Institutes of Health) and Grant numbers should be given in brackets. Multiple grant numbers should be separated by a comma. Where individuals need to be specified for

certain sources of funding, indications should be provided using parentheses containing the author(s) initials. Wiley Journals will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central. Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above. For more information regarding the Wiley policy on the NIH Public Access Mandate see <http://www.wiley.com/WileyCDA/Section/id-321171.html>.

**References.** Authors should cite references using the name and date system as markers in the text, with citation markers enclosed in square brackets. When there are more than two authors, use the first name and et al. (with period). In the References section, citations should be arranged alphabetically, using chronological order if there is more than one reference with the same authorship. Begin each reference with the names of up to 10 authors, followed by et al., if necessary. Use a letter suffix (e.g., 2004a) in the text and Reference section if more than one reference has the same authorship and year. Note the punctuation in the examples provided below. Do not use all capitals. Do not underline. The accuracy of the references is the responsibility of the author.

#### **Journal Articles:**

Hoffman GR, Colyer SP, Littlefield LG. 1993. Induction of micronuclei by bleomycin in Go human lymphocytes: II. Potentiation by radioprotectors. *Environ Mol Mutagen* 21:136-143.

#### **Books:**

Mitelman F. 1991. *Catalog of chromosome aberrations in cancer*. 4th edition. New York: Wiley-Liss, Inc. 1223 p.

#### **Chapters in Books:**

Goldsworthy TL, Morgan KT, Popp JA, Butterworth BE. 1991. Guidelines for measuring chemically-induced cell proliferation in specific rodent target organs. In: Butterworth BE, Slaga TJ, editors. *Chemically-induced cell proliferation: Implications for risk assessment*. New York: Wiley-Liss, Inc. p 253-284.

**Tables.** Each table must have a self-explanatory title, be numbered with Roman numerals in order of appearance, and be keyed into the text.

**Figure Legends.** A clear and complete legend must accompany each Figure. The legend should be brief, yet must convey all essential information regarding the results that are being displayed. Legends should include a summary of statistical comparisons as they apply, the names of the organism(s) if applicable, culture or exposure conditions if applicable, sample sizes, etc.

**Figures.** Figures must be numbered in order with Arabic numerals and be referenced in the text. Legends should be placed together in a section immediately preceding figures. For digital artwork, resolution should be 300 DPI or higher, for optimal reproduction Wiley recommends:

900 DPI for black and white images, such as line drawings or graphs.

300 DPI for picture-only photographs and

600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements, i.e., text labels, thin lines, arrows.

These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly. For the editorial review process, GIF and JPEG files are welcome; upon acceptance, EPS or TIFF files will be required. Delivery of production-quality files early in the review process may facilitate smooth and rapid publication once a manuscript has been accepted. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the Journal at no cost to the authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print. If color is essential to convey the scientific information, authors are encouraged to submit color illustrations that highlight the text and maximize the contrast between the results and/or text and the

background. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; colored material should be placed against a white background wherever possible. Additional information regarding the preparation of electronic artwork can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

**Appendices/Supplementary Material.** Long tables of primary data and data not considered necessary for inclusion in the main body of the article may be submitted as Appendices that follow the main body of the paper in both the print and online Journal or as Supporting Information (formerly known as Supplementary Material) that appears only in the online Journal. Wiley is able to host approved supporting information that authors submit with their paper. Supporting information must be important, ancillary information that is relevant to the parent article, but which does not or cannot appear in the printed edition of the journal. Final decisions on the form of presentation will be made by the Editor-In-Chief. Supporting information will be published as submitted and will not be corrected or checked for scientific content, typographical errors or functionality. The responsibility for scientific accuracy and file functionality remains entirely with the authors. Accepted file formats include any Microsoft Office format (i.e., Word, Powerpoint, Access, Excel, etc.), PDF files, graphics as GIF, TIFF, EPS, PNG, JPEG, or BMP files, Quicktime, MPEG or AVI video files, and MP3, AAC or WMA audio files. Additional details regarding Supporting Information can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>.

## ALTERNATIVE FORMATS

**Review Articles.** Review articles should have an abstract and be organized into sections with headings appropriate to the content. There is no restriction on length, and short mini-reviews on a pertinent topic are encouraged.

**Brief Communications** These are short original scientific papers that are restricted to approximately 2,500 words (approximately seven to ten manuscript pages not including references, tables and figures). Brief communications include a brief abstract (~150 words) and may not include more than four display items (i.e. tables and figures) and more than 25 citations.

**Commentaries** Thought-provoking items dealing with topics of interest to the readers are welcomed. Length should be appropriate to the content. The maximum acceptable length is 7000 words (i.e. 6-8 journal pages); however, they are much shorter.

**Letters to the Editor.** Letters will be subject to review by the Editor-in-Chief for relevance and content. Letters referring to works published in EMM may be anonymously forwarded to the appropriate corresponding author for comment and/or reply.

## ARTICLE PREPARATION SUPPORT

**Wiley Editing Services** offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

## ENGLISH LANGUAGE EDITING

Before submitting a manuscript the authors may wish to have it edited for language. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of the manuscript is fully understood by journal editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. Information regarding language editing, including a listing of companies recommended by Wiley, can be found

at <https://wileyeditingservices.com/en/>. Authors are liable for all costs associated with such services.

### **AUTHOR SERVICES**

Detailed information regarding Wiley editorial policies, authors' rights and benefits, the preparation and submission of electronic manuscripts, and scientific publication ethics can be found in the *Journal Authors'* section of the Wiley Authors Services website (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/default.asp>). Please visit the Author Services web page for information, tools, and services related to publishing in *Environmental and Molecular Mutagenesis*.

### **PREPRINT POLICY:**

Please find the Wiley preprint policy [here](#).

*Environmental and Molecular Mutagenesis* will consider for review articles previously available as preprints. You may also post the submitted version of a manuscript to a preprint server at any time. You are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

### **ARTICLE PROMOTION SUPPORT**

**Wiley Editing Services** offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

### **PUBLICATION ETHICS**

*Environmental and Molecular Mutagenesis* endorses the COPE (Committee on Publication Ethics) guidelines and will pursue all cases of suspected research and publication misconduct (e.g., falsification, fabrication, plagiarism, inappropriate image manipulation, redundant publication). Please

visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/publicationethics.asp> for important information on major ethical principles of scholarly publishing and a guide to best practices.

All manuscripts submitted to *Environmental and Molecular Mutagenesis* may not have been published in any part or form, except as an abstract for a meeting. Upon acceptance of a manuscript for publication, the author(s) will be requested to sign an agreement transferring copyright to the publisher, Wiley-Liss, Inc., a division of John Wiley & Sons, Inc., 111 River Street, Hoboken, NJ 07030, who reserves copyright. No published material may be reproduced elsewhere without the written permission of the publisher and the author. The Journal will not be responsible for the loss of manuscripts at any time. All statements in, or omissions from, published manuscripts are the responsibility of the authors who will assist the editors by reviewing proofs before publication.

### **Open Access in Hybrid Journals**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

### **For authors signing the non-standard CTA**

If the open access in hybrid titles option is not selected the corresponding author will be presented with the *Environmental & Molecular Mutagenesis* non-standard CTA to sign. The terms and conditions of the non-standard CTA can be previewed below:

**Terms and Conditions.** Please do not complete this PDF until you are prompted to login into Author Services as described above.

### **Note to Contributors on Deposit of Accepted Version**

### **Funder arrangements**

Certain funders, including the NIH, members of the Research Councils UK (RCUK) and Wellcome Trust require deposit of the Accepted Version in a repository after an embargo period. Details of funding arrangements are set out at the following website: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>. Please contact the Journal production editor if you have additional funding requirements.

### **Institutions**

Wiley has arrangements with certain academic institutions to permit the deposit of the Accepted Version in the institutional repository after an embargo period. Details of such arrangements are set out at the following website: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>

### **For authors choosing open access in hybrid titles**

If the open access in hybrid titles option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the open access in hybrid titles option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

### **Wiley's Author Name Change Policy**

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

**TRACK YOUR ARTICLE.** Once your accepted article has been received in our production department **you will receive an e-mail** inviting you to link to the site and register your name and e-mail address. By using the unique link in the e-mail you receive, your article will automatically be added to your account when you complete the short registration form. You can use the registration form to request to receive an e-mail alert at all or any of the tracked stages of production and log in periodically to track the status of your article online. The website contains clear descriptions of the production stages featured.