

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE – MESTRADO

ELLEN CAROLINA ZAWOSKI GOMES

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO GLIFOSATO SOBRE A
HOMEOSTASE GLICÊMICA DA PROLE ADULTA DE CAMUNDONGOS
ALIMENTADOS OU NÃO COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

CASCADEL-PR

Setembro/2018

ELLEN CAROLINA ZAWOSKI GOMES

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO GLIFOSATO SOBRE A
HOMEOSTASE GLICÊMICA DA PROLE ADULTA DE CAMUNDONGOS
ALIMENTADOS OU NÃO COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Saúde – Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas públicas.

Orientadora: Dra. Sandra Lucinei Balbo
Coorientadora: Dra. Ana Claudia Paiva Alegre Maller

CASCADEL-PR
Setembro/2018

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Zawoski Gomes, Ellen Carolina

Avaliação da exposição materna ao glifosato sobre a homeostase glicêmica da prole adulta de camundongos alimentados ou não com dieta hiperlipídica / Ellen Carolina Zawoski Gomes; orientador(a), Sandra Lucinei Balbo; coorientador(a), Ana Claudia Paiva Alegre Maller, 2018.

92 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, 2018.

1. Glifosato. 2. Programação metabólica. 3. Homeostase glicêmica. 4. Desregulador endócrino químico. I. Balbo, Sandra Lucinei. II. Paiva Alegre Maller, Ana Claudia. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO



Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-65
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

ELLEN CAROLINA ZAWOSKI GOMES

Avaliação da exposição materna ao glifosato sobre a homeostase glicêmica da prole adulta de camundongos alimentados ou não com dieta hiperlipídica.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biociências e Saúde, área de concentração Biologia, Processo Saúde-doença e Políticas de Saúde, linha de pesquisa Fatores Que Influenciam A Morfofisiologia Orgânica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Sandra Lucinei Balbo

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Maria Lucia Frizon Rizzotto

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Dionizia Xavier Scamporrin

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Cascavel, 3 de setembro de 2018

Para o meu Pai, exemplo de vida e de superação. Para a minha Mãe, simplesmente por tudo. Para os meus Irmãos, por todo o apoio. Faltam palavras que descrevam a complexidade dos sentimentos que me unem a vocês. Agradeço a Deus, Ele sabe por quê...

AGRADECIMENTOS

Início os meus agradecimentos àquele que meu deu a vida, a sabedoria e a capacidade física e mental para realizar este trabalho, Deus.

Agradeço aos meus pais, aos meus irmãos e ao meu namorado. Vocês são o meu exemplo. Obrigada pelo suporte, por estarem sempre ao meu lado, por não me deixarem desistir e por apoiarem as minhas escolhas pessoais e profissionais. Sem vocês essa trajetória teria sido muito mais difícil, quiçá impossível.

Às minhas orientadoras Sandra Balbo e Ana Cláudia Maller. Tenho profunda admiração por vocês. Esta dissertação é resultado do árduo trabalho e soma dos nossos esforços. Obrigada por me acolher, aconselhar, ensinar, corrigir e orientar. Serei eternamente grata pela oportunidade de trabalharmos juntas. Agradeço por tudo o que fizeram por mim.

A todos os professores que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial, a Sabrina Grassioli. Obrigada pelo carinho, por todos os ensinamentos e pelos conselhos valiosos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro, tornando possível a realização desta pesquisa.

À minha companheira de pesquisa e amiga Jakeline Teleken. Você foi fundamental nessa trajetória. Agradeço pela amizade, apoio, conselhos, aprendizados, simplesmente por tudo. Me faltam palavras para demonstrar o quanto você foi e continuará sendo importante em minha vida.

À Bruna Siqueira, pela amizade que construímos. Você é singular, é exemplo de vida, de coragem, de dedicação. Obrigada por me fazer enxergar o mundo com outros olhos. Agradeço pelo carinho, por todos os ensinamentos e pelos os momentos únicos e felizes que compartilhamos (e que continuaremos a compartilhar).

À Zoé Ma. Guareschi e Ana Cláudia Valcanaia. Que sorte a minha ter cruzado o caminho de vocês. Vocês são especiais. Aprendi muito com vocês durante essa trajetória. Obrigado por me permitirem participar de momentos tão importantes e preciosos da vida de vocês.

À Sandra Schmidt, pela amizade e por toda contribuição nesta pesquisa. Você é iluminada. Agradeço pelo companheirismo, pelos conselhos e pelo carinho. Obrigada por fazer os dias no laboratório serem mais alegres.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo da UNIOESTE: Rodrigo Vargas, Carine Marmentini, Gabriela Bronczek, Luana Sinhori, Milara Moi, Marcia Rudy, Ariadne Barbosa, Vanessa Ceglarek, Carla Pietrobon, Iala Bertasso, e aos demais, por de alguma forma contribuir com a realização desta pesquisa ou por estarem presentes nos momentos de descontração.

Aos pesquisadores do Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo da UNICAMP, pela disposição e auxílio em algumas análises. Agradeço por terem nos recepcionado tão bem.

Aos meus verdadeiros amigos, por entenderem (nem sempre) a minha ausência. Obrigada por me tornarem uma pessoa melhor a cada dia. Vocês são pontos de paz no universo. Já dizia Platão que, “a amizade é uma predisposição recíproca que torna dois seres igualmente ciosos da felicidade um do outro”. Sou feliz por vocês, tenho certeza que são por mim.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa e para o meu crescimento pessoal e profissional.

Em respeito a vida, agradeço aos animais utilizados nesta pesquisa.

Obrigada!

"C'est le temps que tu as perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante."

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

GOMES, E. C. Z. **Avaliação da exposição materna ao glifosato sobre a homeostase glicêmica da prole adulta de camundongos alimentados ou não com dieta hiperlipídica.** 92 Páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2018.

O uso de agrotóxicos, tais como o glifosato, constitui relevante fator de risco para a saúde humana e para o meio ambiente. O glifosato é classificado como de baixo risco, pois a via de biossíntese em que ele atua nas plantas não faz parte do reino animal. Porém, diversos estudos têm mostrado os efeitos nocivos da exposição ao glifosato, mesmo em doses muito baixas. O glifosato tem sido identificado como um desregulador endócrino químico, uma substância exógena capaz de interferir diretamente no sistema endócrino, mimetizando a ação de hormônios naturais, resultando em efeitos adversos aos organismos e/ou à sua progênie. Exposições aos desreguladores endócrinos químicos em períodos críticos, como a gestação e a lactação, podem alterar a trajetória de desenvolvimento do feto e causar alterações permanentes nos tecidos e/ou órgãos. Os efeitos biológicos observados incluem, dentre outros, a obesidade e o diabetes. Além disso, vários estudos têm mostrado os efeitos da exposição direta ao glifosato sobre o metabolismo glicêmico, porém, os resultados são controversos, mesmo em espécies semelhantes. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos da exposição materna ao glifosato Roundup Original DI®, durante a prenhez e a lactação, sobre os parâmetros corporais e a homeostase glicêmica, da prole adulta de camundongos alimentados ou não com dieta hiperlipídica. Durante a prenhez e a lactação, camundongos C56BL/6 fêmeas receberam 0,5% de glifosato (grupo GF) na água de beber, enquanto o grupo controle (CTL) recebeu apenas água potável. A prole foi nomeada de acordo com o tratamento realizado nas mães e conforme o alimento recebido, formando os grupos: CTL-F1 e GF-F1, alimentados com ração padrão e CTL-DH-F1 e GF-DH-F1, alimentados com dieta hiperlipídica. Aos 60 e 150 dias de vida, a prole foi submetida ao teste de tolerância à glicose e ao teste de tolerância à insulina. Após jejum de oito horas, os animais foram eutanasiados e os parâmetros corporais, a glicemia e a insulinemia de jejum foram analisados. A exposição ao Roundup Original DI® durante a prenhez e a lactação reduziu o ganho de peso corporal e os consumos alimentar e hídrico nas fêmeas do grupo GF, sem alterar o tamanho da ninhada. Na prole, a exposição materna ao glifosato reduziu o ganho de peso corporal, aumentou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, sem alterar as concentrações plasmáticas de glicose e insulina no grupo GF-F1 em relação ao grupo CTL-F1. A exposição ao glifosato, quando associada à alimentação com dieta hiperlipídica, reduziu o ganho de peso corporal e dos tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal, além de aumentar a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina no grupo GF-DH-F1 comparado ao grupo CTL-DH-F1.

Palavras-chave: Roundup®. Desregulador endócrino químico. Programação metabólica. Homeostase glicêmica. Insulina.

ABSTRACT

GOMES, E. C. Z. **Evaluation of maternal exposure to glyphosate on the glucose homeostasis of adult offspring mice fed or not with a high fat diet.** 92 Pages. Dissertation (Masters). Postgraduate Program in Bioscience and Health, Center for Biological Sciences and Health, Cascavel Campus, Unioeste, 2018.

The use of agrochemicals, such as glyphosate, constituting risk factor for human health and to the environment. The glyphosate is classified as low risk, because the biosynthesis pathway in which it acts in plants, is not present in any member of the animal kingdom. However, several studies have shown the adverse effects of exposure to glyphosate, even at very low doses. The glyphosate has been identified as an endocrine disruptor chemical, which is an exogenous substance that interfering directly with the endocrine system, mimicking the action of natural hormones, and resulting in adverse effects on organisms and/or their progeny. Exposures to the endocrine disruptor chemical at critical times, such as gestation and lactation, may alter the developing trajectory of the fetus, and result in permanent changes in tissues and/or organs. The biological effects observed include, among others, obesity and diabetes. In addition, several studies have shown the effects of direct exposure to glyphosate on glycemic metabolism, however, the results are controversial, even in similar species. Therefore, the present study aims to investigate the effects of maternal exposure to Roundup Original DI®, during pregnancy and lactation, on body parameters, and especially, glucose homeostasis, of adult offspring male mice fed or not with high fat diet. During pregnancy and lactation, female C56BL/6 mice received 0.5% of glyphosate (GL group) in drinking water, while the control group (CTL) received only water. The offspring was named according to the treatment of mothers, and according kind of food, forming the groups: CTL-F1 and GL-F1, fed with standard diet and CTL-HFD-F1 and GL-HFD-F1, fed with high fat diet. At 60 and 90 days of life, male offspring mice were submitted to the glucose tolerance test and the insulin tolerance test. After eight hours fasted, dams and offspring mice were euthanized and body features and fasting glucose and insulin levels were analyzed. The body weight gain during pregnancy and lactation was lower in dams of GF group, without affect the litter size. The dams of GF group also showed lower food and water intake compared to dams of CTL group. Maternal exposure to glyphosate reduced the body weight gain of GF-F1 adult male mice. Also, GL-F1 group showed higher glucose tolerance and insulin sensitivity, without affect fasting blood glucose and insulin, when compared to CTL-F1 group. Pre- and postnatal exposure to glyphosate when associated with high fat diet reduced the body weight gains and the retroperitoneal and perigonadal fat in GF-DH-F1 adult male mice. In addition, GL-HFD-F1 group showed high glucose tolerance and insulin sensitivity, when compared to CTL-HFD-F1 group.

Keywords: Roundup®. Endocrine disruptor chemical. Metabolic programming. Glycemic homeostasis. Insulin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Classificação toxicológica dos agrotóxicos com base na DL ₅₀ .	19
Figura 2 Fórmula estrutural do glifosato.	21
Figura 3 Anatomia fisiológica de uma Ilhota de <i>Langherans</i> no pâncreas.	31
Figura 4 Mecanismo de secreção da insulina estimulada pela glicose.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica

ADP – Adenosina Difosfato

AMPA – Aminometilfosfônico

AMPc – Adenosina Monofostato cíclico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Adenosina Trifosfato

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DAG – Diacilglicerol

DL₅₀ – Dose Média Letal

DM – Diabetes *Mellitus*

DM1 – Diabetes *Mellitus* tipo 1

DM2 – Diabetes *Mellitus* tipo 2

DMG – Diabetes *Mellitus* Gestacional

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

G6P – Glicose-6-fosfato

GLUT 2 – Transportador de Glicose do tipo 2

GLUT 4 – Transportador de Glicose do tipo 4

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas

IMC – Índice de Massa Corporal

IP3 – Inositol 1-4-5-trifosfato

IR – Receptor de Insulina

NIH – *National Institutes of Health*

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 Agrotóxicos	18
3.2 Glifosato.....	21
3.3 Desreguladores endócrinos químicos	24
3.4 Programação metabólica.....	25
3.5 Obesidade e Diabetes	27
3.6 Modelo de obesidade	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ARTIGO CIENTÍFICO 1	50
ARTIGO CIENTÍFICO 2	66
ANEXO A – Parecer de Protocolo do CEUA	80
ANEXO B – Diretrizes de submissão	81

1 INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos constitui relevante fator de risco para a saúde humana e para o meio ambiente, visto que as intoxicações decorrentes do uso dessas substâncias representam um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo (BOCHNER, 2015). As consequências à saúde pública devido ao uso de agrotóxicos são muito abrangentes devido à contaminação do meio ambiente e a casos de intoxicações, doenças e óbitos. Isso acontece, pois sua exposição atinge populações de trabalhadores e moradores no entorno das fábricas, nas proximidades das áreas agrícolas e, também, na população urbana (ANVISA, 2012; MESQUITA; RODRIGUES; JÚNIOR, 2011; RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014).

O aumento exponencial da produção e liberação dessas substâncias sintéticas resultam em efeitos indesejados, em especial pela introdução de substâncias tóxicas e persistentes no ambiente. Atualmente, os seres vivos são expostos a milhares de resíduos químicos, tanto pelo contato direto quanto pelo ar, água e alimentos. Além disso, a contaminação pode ocorrer também pela inalação e absorção dérmica. Porém, as informações científicas acerca dos efeitos em baixas doses e em longo prazo desses produtos são limitadas (CARNEIRO et al., 2012; LONDRES, 2011; SWEDENBORG et al., 2009; WHO, 2010).

Os herbicidas representam cerca de 45% do total de agrotóxicos comercializados no Brasil (CARNEIRO et al., 2012). Destes, destaca-se o glifosato, que, devido à crescente utilização, posicionou o país, em 2008, como o maior consumidor do mundo (ROSSI, 2015). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o glifosato (N-(fosfonometil)glicina) é classificado como pouco tóxico, ocupando a posição IV na escala de classificação toxicológica (ANVISA, 2018).

O glifosato inibe a atividade da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase, responsável por catalisar a condensação do ácido chiquímico e do fosfato piruvato, atuante em reações de síntese de aminoácidos aromáticos essenciais, como fenilalanina, tirosina e triptofano (FREITAS et al., 2013; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; YAMADA; CASTRO, 2007). Devido à alta especificidade deste mecanismo, o glifosato é classificado como de baixo risco. Além disso, esta via de biossíntese é exclusiva às plantas, portanto, não é expressa por nenhum membro do reino animal (BAI; OGBOURNE, 2016; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000). Por esse motivo,

autores afirmam que o glifosato não representa potenciais riscos à saúde do homem (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Contudo, pesquisas com diferentes formulações de glifosato mostram alterações em diversas células, tecidos e órgãos do organismo. Além disso, exposições maternas a diversos fatores, incluindo produtos tóxicos durante o período gestacional, causam mudanças no fenótipo da prole, as quais podem apresentar alterações morfológicas e fisiológicas permanentes (PHILLIPS; MATTHEWS, 2011). E, com isso, caracterizar o glifosato como um desregulador endócrino químico (DALLEGRAVE et al., 2007).

Desreguladores endócrinos químicos são substâncias químicas capazes de interferir no sistema endócrino de humanos e animais, produzindo efeitos adversos aos organismos (EPA, 2016). As moléculas identificadas como desreguladores endócrinos químicos são amplamente heterogêneas e incluem, dentre outros produtos, os herbicidas, tais como o glifosato (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009; KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015).

Exposições aos desreguladores endócrinos químicos podem ocorrer por meio da ingestão de alimentos e água, pela inalação de gases e partículas presentes no ar e pela absorção através da pele. Além disso, os desreguladores endócrinos químicos podem ser transportados através da placenta e durante o aleitamento. Dessa forma, devido ao contato com os desreguladores ocorrer durante as fases de desenvolvimento, efeitos tardios podem ser observados na prole (WHO, 2018).

O período perinatal, momento em que ocorre a organogênese e diferenciação dos tecidos, é uma janela de susceptibilidade às influências do ambiente adverso. Insultos que ocorrem durante esse período (gravidez e lactação) alteram a trajetória de desenvolvimento do feto, resultando em alterações permanentes na função de tecidos ou de órgãos. Estas implicações conduzem à “programação”, termo utilizado para definir os insultos ou estímulos em um período crítico do desenvolvimento fetal, acarretando alterações no decorrer da vida, com consequências irreversíveis (EBERLE; AMENT, 2012; LUCAS, 1991).

Hales e Barker (2001) propuseram a “hipótese fenótipo poupador”, que tenta explicar a relação entre o ambiente fetal e o desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta. Baseado nesta hipótese, a escassez de nutrientes durante o

desenvolvimento embrionário programa o feto para economizar nutrientes, todavia, se a disponibilidade de nutrientes na vida pós-natal for abundante, pode levar a doenças metabólicas. Assim, o ambiente fetal, por meio da exposição da mãe às situações nutricionais inadequadas, pode desencadear o processo conhecido como programação metabólica.

Nessa perspectiva, a transmissão das sequelas metabólicas nos períodos críticos do desenvolvimento, em que ocorre a programação, abrangem vários estágios da vida, incluindo desde a concepção até o fim da lactação e também na adolescência (CERF, 2015). Esse evento é explicado pela hipótese do segundo *hit*. Padmanabhan, Cardoso e Puttabyatappa (2016) descrevem que a susceptibilidade genética juntamente com insultos que ocorrem no período perinatal (primeiro hit) pode não ser suficiente para alterar o fenótipo do adulto. Dessa forma, o desequilíbrio endócrino decorrente dos insultos perinatais combinados com fatores estressores e/ou exposições pós-natais ativam ou amplificam defeitos subjacentes, culminando em doenças.

Os sistemas envolvidos na manutenção da homeostase glicêmica são suscetíveis à reprogramação durante os estágios de diferenciação tecidual e desenvolvimento de órgãos, com início durante a vida fetal, continuando até a infância. Dessa forma, insultos durante os estágios que abrangem tais períodos podem não só programar, como também amplificar os efeitos de exposições *in utero* sobre os riscos de doenças metabólicas ao longo da vida (ELLSWORTH et al., 2018).

Diversos autores demonstram que exposições a agrotóxicos/desreguladores endócrinos químicos, durante os períodos críticos para o desenvolvimento, estão associados com o aumento do peso corporal e/ou índice de massa corporal, além de outras disfunções, durante a puberdade e a vida adulta (BAILLIE-HAMILTON, 2002; KARMAUS et al., 2009; NEWBOLD et al., 2008; TINGGAARD et al., 2016). De fato, essas substâncias são identificadas como novos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas. E, dessa forma, correlacionadas com o aumento na prevalência de sobrepeso, obesidade e diabetes (REGNIER et al., 2018).

Atualmente, diversos estudos têm demonstrado os efeitos da exposição direta a diferentes formulações de glifosato sobre o controle de peso corporal e o metabolismo glicêmico. Porém, os resultados ainda são controversos. Além disso, acredita-se que a adição de um segundo fator estressor, nesta pesquisa, a dieta

hiperlipídica, irá amplificar o efeito de programação resultante da exposição pré e pós-natal ao glifosato. Por esse motivo, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos da exposição materna ao glifosato Roundup Original DI®, durante a prenhez e a lactação, sobre os parâmetros corporais e, em especial, a homeostase glicêmica, da prole macho adulta de camundongos alimentados ou não com dieta hiperlipídica na vida adulta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da exposição materna ao glifosato Roundup Original DI®, durante a prenhez e a lactação, sobre os parâmetros corporais e a homeostase glicêmica da prole adulta (F1) de camundongos, alimentados ou não com dieta hiperlipídica.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os parâmetros corporais e plasmáticos de camundongos fêmeas expostas a 0,5% de glifosato Roundup Original DI®, durante a prenhez e a lactação.

Verificar os efeitos da exposição pré e pós-natal ao glifosato Roundup Original DI® na prole (F1) adulta, alimentada ou não com dieta hiperlipídica, sobre:

- Parâmetros corporais;
- Parâmetros plasmáticos;
- Tolerância à glicose;
- Tolerância à insulina.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Agrotóxicos

O uso de agrotóxicos constitui um relevante fator de risco para a saúde humana e para o meio ambiente, visto que as intoxicações decorrentes do uso dessas substâncias representam um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo (BOCHNER, 2015). Os primeiros problemas de saúde decorrentes do uso de agrotóxicos, no Brasil, ocorreram por volta de 1950, na região de Presidente Prudente, São Paulo. Nesta data, o Instituto Biológico da Secretaria Estadual de Agricultura constatou casos de doenças em agricultores de algodão. Posteriormente, nas décadas de 70 e 80, foram identificados problemas de saúde e ambientais, nas regiões de maior produção agrícola do país, decorrentes da exposição aos agrotóxicos (TRAPÉ, 2007).

As consequências à saúde pública devido ao uso de agrotóxicos são muito abrangentes, devido à contaminação do meio ambiente e casos de intoxicações, doenças e óbitos. Isso acontece pelo fato de que a sua exposição atinge populações de trabalhadores e moradores no entorno das fábricas, nas proximidades das áreas agrícolas e, também, nos consumidores de alimentos contaminados (ANVISA, 2012; MESQUITA; RODRIGUES; JÚNIOR, 2011; RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014).

Dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX revelam que, entre os anos de 2012 e 2016, foram registrados 17.715 casos de intoxicações e 535 óbitos pelo contato com agrotóxicos de uso agrícolas no Brasil. No mesmo período, foram registrados 9.845 casos de intoxicações e 25 óbitos pela exposição aos agrotóxicos de uso domésticos. Vale ressaltar que as unidades federativas com maior número de registros de intoxicações estão concentradas nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (SINITOX, 2018).

A capacidade de substâncias químicas, como os agrotóxicos, causarem intoxicação, morte ou efeitos sobre os animais e humanos depende de sua concentração no corpo do indivíduo e varia de acordo com a forma de administração. A toxicidade da maior parte dos agrotóxicos é expressa em valores referentes à Dose Média Letal (DL_{50}). Esta é expressa por miligrama do ingrediente ativo do produto por

quilograma de massa corporal, necessária para provocar a morte de pelo menos 50% da população em estudo. A DL_{50} é utilizada para estabelecer medidas de segurança, para, assim, reduzir os riscos à saúde humana. Ainda, os agrotóxicos são classificados de acordo com o grau de toxicidade e os rótulos dos produtos são identificados por meio de faixas coloridas (figura 1) (AGEITEC, 2017).

Classe toxicológica	Toxicidade	DL_{50} (mg/Kg)	Cor da faixa
I	Extremamente tóxico	< 50	Vermelha
II	Altamente tóxico	50 – 500	Amarela
III	Medianamente tóxico	500 – 5.000	Azul
IV	Pouco tóxico	> 5.000	Verde

Figura 1 Classificação toxicológica dos agrotóxicos com base na DL_{50} .

Fonte: AGEITEC, 2017.

O artigo 2º, inciso I, alínea “a”, da lei nº 7.802/1989, da Constituição Federal, e o decreto nº 4.074/2002 (artigo 1º, inciso IV) determinam que seja considerado agrotóxico:

Os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989; BRASIL 2002).

A legislação brasileira (nº 7.802/89, artigo 3º, parágrafo 6º) proíbe o registro de agrotóxicos quando não há métodos para que seus componentes sejam desativados, de modo que seus resíduos provoquem riscos à saúde pública, e, ainda, quando revelam características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, que promovam distúrbios hormonais, danos ao aparelho reprodutor, ao meio ambiente, ou quando não há tratamento eficaz para detecção de contaminação (BRASIL, 2016). O Sistema Único de Saúde – SUS – dispõe de poucos recursos para constatação de contaminações por agrotóxicos, pois os custos e a viabilidade dos exames em grande escala são somente aplicados aos agrotóxicos organofosforados e carbamatos, e somente quando a contaminação for detectada em até sete dias, ou seja, é eficaz somente para intoxicações agudas (LONDRES, 2011).

As doenças decorrentes do uso de agrotóxicos constituem grave problema de saúde pública, visto que, no Brasil, há carência de políticas públicas de saúde que delineiem ações de vigilância e monitoramento das populações expostas a esses compostos. Além disso, deficiências estruturais limitam os diagnósticos dos efeitos de exposições em longo prazo, em consequência da falta de laboratórios de toxicologia, com métodos e equipamentos atualizados, principalmente no setor público de saúde. Diante dos fatores mencionados, é possível determinar o caráter epidemiológico das doenças ocasionadas por produtos tóxicos, os quais constituem endemia nacional, acometendo diversos segmentos, tanto da população rural como da população urbana (TRAPÉ, 2007).

Os efeitos agudos da exposição aos agrotóxicos aparecem durante ou logo após o contato com o pesticida. Tais efeitos são divididos em três categorias: a) muscarínicos, ocasionando estimulação das glândulas salivares e lacrimais, espasmos intestinais e brônquicos, bradicardia e miose; b) nicotínicos, em que são observadas fibrilações musculares e convulsões; c) centrais, as quais são caracterizadas por problemas cardiovasculares, confusão mental, sonolência, fadiga, cefaleia, perda da consciência e letargia (CASSAL et al., 2014; SOARES, 2010).

Todavia, os efeitos crônicos não têm sido caracterizados de forma adequada, pois os efeitos tardios dos agrotóxicos podem tornar-se aparentes somente após anos de contaminação. Entretanto, a literatura médica provê de um conjunto de indicadores que associam os efeitos na saúde em decorrência da exposição em longo prazo aos agrotóxicos, como problemas nos sistemas respiratório, cardiovascular e neurológico, problemas oculares e gastrointestinais e efeitos cutâneos (SOARES, 2010).

O aumento exponencial da produção e liberação dessas substâncias sintéticas resultam em efeitos indesejados, em especial, pela introdução de substâncias tóxicas e persistentes no ambiente. Atualmente, os seres vivos são expostos a milhares de resíduos químicos, tanto pelo contato direto quanto pelo ar, água e alimentos. Além disso, a contaminação pode ocorrer também pela inalação e absorção dérmica. Porém, as informações científicas acerca dos efeitos em baixas doses e em longo prazo desses produtos são limitadas (CARNEIRO et al., 2012; LONDRES, 2011; SWEDENBORG et al., 2009; WHO, 2010).

3.2 Glifosato

Os herbicidas representam cerca de 45% do total de agrotóxicos comercializados no Brasil (CARNEIRO et al., 2012). Destes, destaca-se o glifosato, que, devido à crescente utilização, posicionou o país, em 2008, como o maior consumidor do mundo (ROSSI, 2015).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o glifosato (N-(fosfonometil)glicina), cuja fórmula estrutural está representada na figura 2, é classificado como pouco tóxico, ocupando a posição IV na escala de classificação toxicológica (figura 1) (ANVISA, 2018). É caracterizado por ser um herbicida de amplo espectro, não seletivo, pós-emergente, sistêmico e pertencente ao grupo das glicinas substituídas (CARNEIRO et al., 2012; GALLI; MONTEZUMA, 2005; JUNIOR et al., 2002; MENEZES et al., 2004).

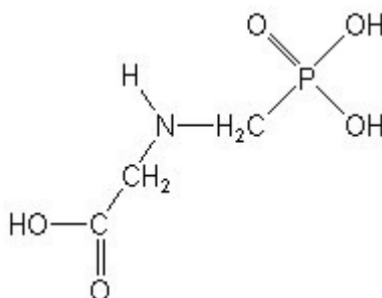


Figura 2 Fórmula estrutural do glifosato.
Fonte: ANVISA, 2018.

Suas características possibilitam combate a ervas daninhas anuais e perenes, agindo em folhas largas e estreitas, além de monocotiledôneas ou dicotiledôneas, em diversas culturas como, cana-de-açúcar, arroz irrigado, café, maçã, pastagens, algodão, soja, dentre muitas outras. Quando utilizado de maneira inadequada, pode causar fitotoxicidade ou até mesmo a morte das plantas, entretanto, quando aplicado conforme recomendações da bula, não causam quaisquer efeitos negativos à cultura (GALLI; MONTEZUMA, 2005; JUNIOR et al., 2002).

A fitotoxicidade se dá pelo mecanismo de ação do glifosato, que inibe a atividade da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase, responsável por catalisar a condensação do ácido chiquímico e do fosfato piruvato, atuante em reações de síntese de aminoácidos aromáticos essenciais, como fenilalanina, tirosina

e triptofano (FREITAS et al., 2013; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; YAMADA; CASTRO, 2007). Devido à alta especificidade deste mecanismo, o glifosato é classificado pela *Environmental Protection Agency* (EPA) como de baixo risco. Além disso, esta via de biossíntese é exclusiva às plantas, portanto, não é expressa por nenhum membro do reino animal (BAI; OGBOURNE, 2016; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Esta classificação também está relacionada ao fato do glifosato ser rapidamente mineralizado do meio ambiente, dando origem ao seu principal metabólito, o aminometilfosfônico (AMPA). O glifosato e o AMPA podem ser relativamente persistentes no ambiente, desta forma, podem causar uma série de riscos ecológicos. Mas, devido à falta de dados sobre toxicologia, saúde e segurança em relação às exposições em longo prazo, torna-se difícil prever a importância e a extensão de tais riscos (BAI; OGBOURNE, 2016).

Com a modificação na agricultura e o uso de tecnologias, intensificou-se o uso dos produtos químicos, especialmente o glifosato, que, por sua vez, tem contribuído com danos ambientais, como a poluição das águas superficiais e lençóis freáticos devido à lixiviação no solo, danos às mais diversas espécies animais e, também, tem causado grandes impactos na saúde do homem. Diante disso, é de suma importância que estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo* identifiquem tais impactos em doses de exposições ambientais, para que seja possível prever os danos que esses compostos químicos podem causar tanto em animais como em humanos (OLIVEIRA; FAVARETO; ANTUNES, 2013).

As formulações comerciais de glifosato, tais como o Roundup® da Monsanto, incluem uma série de outros compostos químicos, que atuam como adjuvantes, preservativos, solventes ou surfactantes, podendo torná-las mais tóxicas do que o ingrediente ativo isolado (GUERRERO SCHIMPF et al., 2016). De acordo com a Monsanto (2008), a DL₅₀ do Roundup® pela via oral em ratos equivale a 5400 mg/Kg de peso corporal, caracterizando toxicidade aguda. Ainda, a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – FISPQ, disponibilizada pelo fabricante, alerta quanto aos perigos e efeitos do glifosato adversos à saúde humana e aos efeitos ambientais, e relaciona os sintomas:

Se ingerido, podem ocorrer lesões corrosivas (ulcerativas) das mucosas oral, esofágica, gástrica e menos frequentemente, duodenal; disfagia, epigastria, náusea/vômitos, cólicas, diarreia. Também são observadas hematêmese e melena, assim como hepatite anictérica e pancreatite aguda; hipotensão arterial, choque cardiogênico. Hipoxemia leve assintomática detectável por gasometria; infiltrado alveolar ou intersticial ao raio X, taquipnéia, dispnéia, tosse, broncoespasmo, edema pulmonar não cardiogênico e falência respiratória. Pode ocorrer pneumonite por broncoaspiração. Pode ocorrer oligúria, anúria e hematúria; acidose metabólica e insuficiência renal nos mais seriamente intoxicados. As alterações neurológicas, que podem se complicar com convulsões, coma e morte, são atribuídas a hipóxia e/ou hipotensão. Se em contato com a pele pode ocorrer dermatite de contato (eritema, queimação, prurido, vesículas, eczema). O produto em contato com os olhos pode resultar em irritação, dor e queimação ocular, turvação da visão, conjuntivite e edema palpebral. Se inalado pode ocorrer irritação das vias respiratórias altas. Nos casos de aspiração pode ocorrer pneumonite química (MONSANTO, 2008, p. 1).

O fato da via do shiquimato não estar presente no reino animal, como relatado anteriormente, suporta a ideia da ausência de toxicidade aguda em animais expostos ao glifosato, mesmo após uma única exposição a doses relativamente altas. Todavia, a DL_{50} varia consideravelmente de acordo com a formulação, principalmente em relação aos surfactantes (VAN BRUGGEN et al., 2018). Ainda assim, autores afirmam que o herbicida Roundup® não representa potenciais riscos à saúde do homem (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Em contrapartida, pesquisas com formulações de glifosato mostram alterações em diversas células, tecidos e órgãos em diferentes organismos. Em cultura de células, a exposição crônica ao glifosato resultou em aumento em espécies reativas de oxigênio; diminuição na atividade da enzima acetilcolinesterase; danos no Ácido Desoxirribonucleico (DNA) em leucócitos e diminuição na metilação do DNA; além de funções ovarianas deterioradas (KWIATKOWSKA; HURAS; BUKOWSKA, 2014; KWIATKOWSKA; NOWACKA-KRUKOWSKA; BUKOWSKA, 2014; KWIATKOWSKA et al., 2017; PEREGO et al., 2017). Em humanos, a exposição causou insuficiência circulatória grave, tais como vasorelaxamento de aorta e inibição das contrações normais do coração. Além de alterar o metabolismo normal das plaquetas do sangue, por meio da diminuição da agregação plaquetária, inibição da hemostase primária e diminuição na produção de Adenosina Trifosfato (ATP) (CHAN et al., 2007; NEIVA et al., 2010).

Em animais, a exposição crônica ao glifosato prejudicou o desenvolvimento de células neurais e crescimento dos axônios; comprometeu a atividade da enzima

acetilcolinesterase; provocou estresse oxidativo e excitotoxicidade do glutamato no hipocampo; levou a comportamento do tipo depressivo na descendência; causou danos bioquímicos e anatômicos no fígado; desenvolveu tumores no fígado e rins; além de prejudicar a fertilidade, devido a alterações na progressão da puberdade e redução na produção de testosterona (ABARIKWU; AKIRI; DUROJAIYE, 2015; ÇAĞLAR; KOLANKAYA, 2008; CATTANI et al., 2017; COULLERY; FERRARI; ROSSO, 2016; KWIATKOWSKA; NOWACKA-KRUKOWSKA; BUKOWSKA, 2014; MENÉNDEZ-HELMAN et al., 2012; MESNAGE et al., 2015; NARDI et al., 2017; ROMANO et al., 2010; SÉRALINI et al., 2014).

Efeitos adversos do glifosato também são observados quando a exposição ocorre durante a prenhez e/ou lactação. A exposição ao glifosato causou diminuição na atividade das enzimas isocitrato desidrogenase, glicose-6-fostato desidrogenase e malato desidrogenase no fígado, coração e cérebro das mães e sua prole. Na prole, provocou redução do número e produção diária de espermatozoides, diminuição na concentração sérica de testosterona e atraso na abertura do canal vaginal (DALLEGRAVE et al., 2007; DARUICH; ZIRULNIK; GIMENEZ, 2001).

Exposições maternas a diversos fatores, incluindo produtos tóxicos, durante o período gestacional, causam mudanças no fenótipo da prole, as quais podem apresentar alterações morfológicas e fisiológicas permanentes (PHILLIPS; MATTHEWS, 2011). Tais alterações confirmam o potencial efeito endócrino desregulador das formulações comerciais de glifosato (ROMANO et al., 2010).

3.3 Desreguladores endócrinos químicos

Desreguladores endócrinos químicos são substâncias químicas capazes de interferir no sistema endócrino de humanos e animais, produzindo efeitos adversos aos organismos. De acordo com a EPA, a ruptura do sistema endócrino ocorre devido à ação dessas substâncias que mimetizam a ação dos hormônios, interferindo na “síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais presentes no organismo, os quais são responsáveis pela homeostase, reprodução e desenvolvimento” (EPA, 2016, p.1).

As moléculas identificadas como desreguladores endócrinos químicos são amplamente heterogêneas. Estas incluem produtos químicos sintéticos, utilizados

como solventes/lubrificantes industriais (e seus subprodutos), plásticos, plastificantes, pesticidas (dentre eles o glifosato), fungicidas e agentes farmacêuticos. Além disso, substâncias químicas naturais, como as encontradas nos alimentos de humanos e animais, podem também atuar como desreguladores endócrinos químicos (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009; KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015).

Exposições aos desreguladores endócrinos químicos podem ocorrer por meio da ingestão de alimentos e água, pela inalação de gases e partículas presentes no ar e pela absorção através da pele (WHO, 2018). Os efeitos biológicos observados devido à exposição a essas substâncias incluem: obesidade, diabetes *mellitus*, doença hepática gordurosa não alcoólica, distúrbios no sistema reprodutor masculino e feminino, distúrbios do neurodesenvolvimento, dentre outros (BRAUN, 2017; FOULDS et al., 2017; JOHANSSON et al., 2017; NADAL et al., 2017).

Além das exposições citadas, os desreguladores endócrinos químicos podem ser transportados através da placenta e durante o aleitamento, tornando grávidas e crianças populações vulneráveis a ação dessas substâncias químicas. Dessa forma, devido o contato com os desreguladores ocorrer durante as fases de desenvolvimento, efeitos tardios podem ser observados na descendência (WHO, 2018).

3.4 Programação metabólica

O período perinatal, momento em que ocorre a organogênese e diferenciação dos tecidos, é uma janela de susceptibilidade as influências do ambiente adverso. Evidências indicam que os insultos que ocorrem durante esse período (gravidez e lactação) alteram a trajetória de desenvolvimento do feto, resultando em alterações permanentes na função de tecidos ou de órgãos, com ou sem alteração do crescimento. Além disso, pode constituir fator de risco em longo prazo, ocasionando implicações negativas e patologias na vida adulta (PADMANABHAN; CARDOSO; PUTTABYATAPPA, 2016; SECO; MATIAS, 2009). Essas implicações conduzem à “programação”, termo utilizado para definir os insultos ou estímulos em um período crítico do desenvolvimento fetal, acarretando alterações no decorrer da vida, com consequências irreversíveis (EBERLE; AMENT, 2012; LUCAS, 1991).

O termo “doença de programação fetal” surgiu em 1995, quando Barker propôs que as doenças na vida adulta teriam origem fetal. Posterior a isso, pesquisadores propuseram a “hipótese fenótipo poupador”, em que, quando a mãe apresenta condições de subnutrição durante a maternidade, o feto sofre adaptações metabólicas e estruturais, garantindo, por meio de redistribuição de energia e nutrientes, o desenvolvimento de órgãos vitais, às custas de órgãos menos críticos para o desenvolvimento inicial, comprometendo, dessa forma, tais sistemas na vida adulta (BARKER, 1995; HALES; BARKER, 2001).

A transmissão das sequelas metabólicas nos períodos críticos do desenvolvimento, em que ocorre a programação, abrangem vários estágios da vida, incluindo desde a concepção até o fim da lactação e também na adolescência (CERF, 2015). Esse evento é explicado pela hipótese do segundo *hit*. Padmanabhan, Cardoso e Puttabyatappa (2016) descrevem que a susceptibilidade genética juntamente com insultos que ocorrem no período perinatal (primeiro hit) pode não ser suficiente para alterar o fenótipo do adulto. Mas, o desequilíbrio endócrino decorrente dos insultos perinatais combinados com fatores estressores e/ou exposições pós-natais (segundo hit), ativam ou amplificam defeitos subjacentes, culminando em doenças.

Diversos fatores gestacionais podem alterar o desenvolvimento fetal, como o estado materno e do feto, a ocorrência de doenças, deficiências ou excessos nutricionais, estresse, estilo de vida, exposição a desreguladores endócrinos e a substâncias químicas presentes no ambiente (PADMANABHAN; CARDOSO; PUTTABYATAPPA, 2016; PHILLIPS; MATTHEWS, 2011; SECO; MATIAS, 2009). Esses fatores precoces desempenham potenciais influências na susceptibilidade para doenças crônicas como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e cognitivas, hipertensão, síndrome metabólica, obesidade e Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2) (GLUCKMAN et al., 2008; VAISERMAN, 2014; WARNER; OZANNE, 2010).

As alterações no desenvolvimento que resultam nessas doenças ocorrem por meio de respostas adaptativas fetais, as quais incluem alterações no metabolismo, na produção hormonal e na sensibilidade dos tecidos aos hormônios, podendo, assim, comprometer o desenvolvimento de diversos órgãos e, conseqüentemente, desencadeando alterações persistentes nos mecanismos homeostáticos fisiológicos e metabólicos. Tais alterações requerem a modulação estável da expressão de genes,

mediada por processos epigenéticos, como a metilação do DNA e a modificação das histonas, com isso, tanto o genoma como o epigenoma influenciam o fenótipo maduro, podendo, desse modo, determinar a sensibilidade aos fatores ambientais e, subsequentemente, o risco de doenças (GLUCKMAN et al., 2008).

Os sistemas envolvidos na manutenção da homeostase glicêmica são suscetíveis à reprogramação durante os estágios de diferenciação tecidual e desenvolvimento de órgãos, com início durante a vida fetal, continuando até a infância. A capacidade de manter a homeostase glicêmica em mamíferos depende das funções combinadas do cérebro, pâncreas (ilhotas pancreáticas), fígado, músculo e tecido adiposo. O desenvolvimento das ilhotas pancreáticas, em humanos, tem início a partir da 3ª semana de gestação, estendendo-se até o fim da lactação. Em camundongos, a organogênese ocorre a partir do 8º dia de prenhez, até o início da lactação. Dessa forma, insultos durante a lactação podem não só programar, como também amplificar os efeitos de exposições *in utero* sobre os riscos de doenças metabólicas ao longo da vida (ELLSWORTH et al., 2018).

Exposições pré-natais a agrotóxicos estão associadas com o aumento no Índice de Massa Corporal (IMC) e no peso corporal durante a puberdade e na vida adulta. Os autores sugerem que há susceptibilidade sexo-específicas a distúrbios metabólicos e que tal exposição desencadeia mudanças metabólicas estáveis e com efeitos duradouros (KARMAUS et al., 2009; TINGGAARD et al., 2016). Tais alterações também são observadas quando a exposição a desreguladores endócrinos ocorre no início da vida, resultando no aumento do peso corporal conforme a idade e as disfunções no sistema reprodutor (NEWBOLD et al., 2008). De fato, exposições aos desreguladores endócrinos químicos são identificados como novos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas. E, dessa forma, correlacionadas com o aumento na prevalência de sobrepeso, obesidade e diabetes (REGNIER et al., 2018).

3.5 Obesidade e Diabetes

A obesidade atingiu proporções epidêmicas mundiais, caracterizando sério problema e um dos principais desafios da saúde pública. Por ser uma doença generalizada e de alta prevalência, a obesidade acarreta implicações clínicas com

potenciais efeitos negativos sobre praticamente todos os sistemas fisiológicos, além disso, apresenta efeitos psicossociais e sobrecargas econômicas para a sociedade (FRÜHBECK, 2015; SANTOS, 2007; WELLMAN; FRIEDBERG, 2002).

Estimativas globais acerca da obesidade revelam que, em 2014, mais de 1,9 bilhões (39%) de pessoas com idade igual ou superior a 18 anos apresentavam sobrepeso, e que destas, 600 milhões (13%) eram obesas (WHO, 2016b). Um levantamento realizado em 2015 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE) revelou que, no Brasil, a prevalência de sobrepeso e obesidade atinge cerca de 60% da população adulta, com número aproximado de 82 milhões de pessoas com sobrepeso e/ou obesidade (ABESO, 2015).

Define-se obesidade como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura, decorrente do desequilíbrio orgânico, no qual a ingestão energética excede o gasto calórico, podendo ocasionar prejuízos à saúde (WHO, 2016b). Para determinação do estado de obesidade e de sobrepeso em adultos é realizado o cálculo do IMC, para isso, utiliza-se o peso do indivíduo em quilogramas dividido pelo quadrado de sua altura em metros (Kg/m^2). Os indivíduos que obtiverem resultados entre 25,0 a 29,9 Kg/m^2 são classificados com sobrepeso, já aqueles que atingirem valores iguais ou superiores a 30,0 Kg/m^2 são considerados obesos (NIH, 1998; WHO, 2016b). A obesidade pode ser diferenciada em dois tipos: 1) obesidade exógena, na qual o excesso de gordura corporal é resultado do aumento da ingestão alimentar em detrimento do gasto calórico, representando cerca de 95% dos casos; 2) obesidade endógena, em que a doença é ocasionada por fatores hormonais ou genéticos, responsável por cerca de 5% dos pacientes (SANTOS, 2007).

Decorrente de causas multifatoriais, a obesidade resulta de fatores genéticos, metabólicos e neuroendócrinos (KRZYSZTOSZEK; WIERZEJSKA; ZIELIŃSKA, 2015; TAVARES; NUNES; SANTOS, 2010), porém, é narrado que a obesidade é claramente agravada por outros fatores, como o estilo de vida cada vez mais inativo e pelo aumento na ingestão de produtos altamente calóricos durante longos períodos da vida (PATTI, 2013). Essa doença vem sendo associada também a exposições pré-natais às substâncias tóxicas (KARMAUS et al., 2009). A ação dos produtos químicos ambientais no desenvolvimento da obesidade é uma área emergente nos campos de pesquisa que tem buscado a identificação de obesogênicos, seus possíveis alvos

moleculares e os mecanismos celulares potenciais pelos quais eles podem agir (NEWBOLD et al., 2008).

A obesidade é um dos principais fatores para o desenvolvimento da resistência à insulina, a qual, associada com o comprometimento do metabolismo energético, resulta em aumento de gordura no meio intracelular de tecidos como: músculo esquelético, fígado, tecido adiposo e também nas ilhotas pancreáticas (FU; GILBERT; LIU, 2013). O desenvolvimento da obesidade é acompanhado por diversas alterações metabólicas, além da resistência à insulina, o paciente pode apresentar hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão, que caracterizam a síndrome metabólica (NORIEGA-LÓPEZ et al., 2007). Juntos, a obesidade e a síndrome metabólica elevam o risco para o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como: doenças cardiovasculares, respiratórias e renais, hipertensão arterial sistêmica, esteato-hepatite não alcoólica, acidentes vasculares cerebrais, alguns tipos de câncer, pré-diabetes e DM2 (OPAS, 2003; ROSIEK et al., 2015; SIDDIQUEE et al., 2015; WELLMAN; FRIEDBERG, 2002). Dentre estas condições, o DM2 pode ser a comorbidade mais estreitamente relacionada à obesidade, pelo fato de ambas terem sua prevalência aumentada em todo o mundo (FLEGAL et al., 2002).

O diabetes *mellitus* (DM) pode ser classificado em quatro categorias: 1) Diabete *mellitus* tipo 1 (DM1), caracterizado pela destruição autoimune das células- β pancreáticas, que resulta na deficiência absoluta de insulina. Os indivíduos acometidos por essa forma necessitam de administração diária desse hormônio; 2) DM2, resulta da diminuição progressiva da secreção de insulina e da ineficácia de sua ação. Está associado, na maioria das vezes, com o sedentarismo e excesso de peso; 3) Diabete *mellitus* gestacional (DMG) marcado pela hiperglicemia, a qual é diagnosticada durante o segundo ou terceiro trimestre da gravidez; 4) Tipos específicos de diabetes, os quais ocorrem devido a diversas causas, como síndrome do diabetes monogênico, doenças do pâncreas exócrino e drogas ou produtos químicos que induzem ao diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016; WHO, 2016a).

O DM2 é o mais prevalente entre pacientes acometidos por esta doença, totalizando cerca de 90% dos casos (GROSS et al., 2002; STUMVOLL; GOLDSTEIN; VAN HAEFTEN, 2005). A doença é considerada epidemia mundial do século XXI, atingindo não só países em desenvolvimento como também países já desenvolvidos.

A crescente prevalência e as incidências do DM2 são atribuídas ao envelhecimento populacional e o estilo de vida atual, caracterizado pelo sedentarismo e hábitos alimentares que propiciam o acúmulo de gordura corporal (FERREIRA; PITITTO, 2015).

O DM2 é uma doença crônica e de etiologia múltipla, caracterizada pela insuficiente produção de insulina ou quando este hormônio não pode ser utilizado de forma efetiva pelo corpo, resultando em distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas e na hiperglicemia crônica (WHO, 2016a). Dados da *International Diabetes Federation* (IDF) afirmam que, em todo o mundo, 415 milhões de pessoas são afetadas pelo DM2 e prevê que em 2040 esse número aumentará para 642 milhões de pessoas. A organização relata que em 2015 a doença causou cerca de 5 milhões de mortes (IDF, 2015). No Brasil, o número de pessoas afetadas pelo DM2 chega aos 14,3 milhões, com estimativa de 23,2 milhões de pessoas em 2040, e aproximadamente 131 mil casos de mortalidade (SBD, 2015).

Os fatores que contribuem para o risco de desenvolvimento do DM2 são classificados em dois grupos: 1) Fatores não modificáveis incluem a predisposição genética, etnia, idade, gênero, histórico de DMG e síndrome do ovário policístico; e 2) Fatores modificáveis, como o sedentarismo, fatores nutricionais, excesso de peso e obesidade, síndrome metabólica e outros. Dentre os fatores citados, a obesidade é o mais importante problema para o desenvolvimento do DM2 (ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2007). Porém, ainda que a epidemia da obesidade seja considerada o principal fator para o desenvolvimento do DM2, não é suficiente para explicar o aumento da prevalência dessa doença. Evidências sugerem que exposições a contaminantes ambientais têm possível contribuição no desenvolvimento do DM2 (NGWA et al., 2015; RYLANDER et al., 2015), resistência à insulina e síndrome metabólica (HOWELL et al., 2015), ainda que haja pouco conhecimento dos mecanismos biológicos envolvidos nesses processos (LEE et al., 2010).

Anterior ao desenvolvimento de DM2, os pacientes apresentam uma condição denominada pré-diabetes, diabetes limítrofe ou hiperglicemia intermédia. Esse estado é resultado da produção insuficiente de insulina pelas células- β pancreáticas, ou pela ineficiência da ação deste hormônio no organismo (OKWECHIME; ROBERSON; ODOI, 2015). Para manter a normoglicemia plasmática, as ilhotas pancreáticas são submetidas a processos de compensação, dentre eles, a expansão da massa de

células- β . Quando o organismo não consegue manter essa resposta compensatória, ocorrem falhas nas células- β pancreáticas, propiciando o desenvolvimento do DM2 (PRENTKI; NOLAN, 2006).

O pâncreas é formado por dois tipos principais de tecidos (figura 3), os ácinos, responsáveis pela secreção do suco digestivo no duodeno, e que compõem a porção exócrina da glândula, e as ilhotas de *Langherans*, ou ilhotas pancreáticas, que estão envolvidas na secreção de insulina e glucagon diretamente no sangue, compondo a porção endócrina da glândula. O pâncreas humano contém entre um e dois milhões de ilhotas pancreáticas, organizadas em torno de capilares sanguíneos, para os quais secretam seus hormônios. As ilhotas são formadas principalmente por: 1) células beta (β), que constituem cerca de 60% do total e são responsáveis por secretar os hormônios insulina e amilina; 2) células alfa (α) representam aproximadamente 25% do volume total e secretam glucagon; e 3) células delta (δ), correspondem a 10% do total e secretam somatostatina (GUYTON; HALL, 2011; RÖDER et al., 2016).

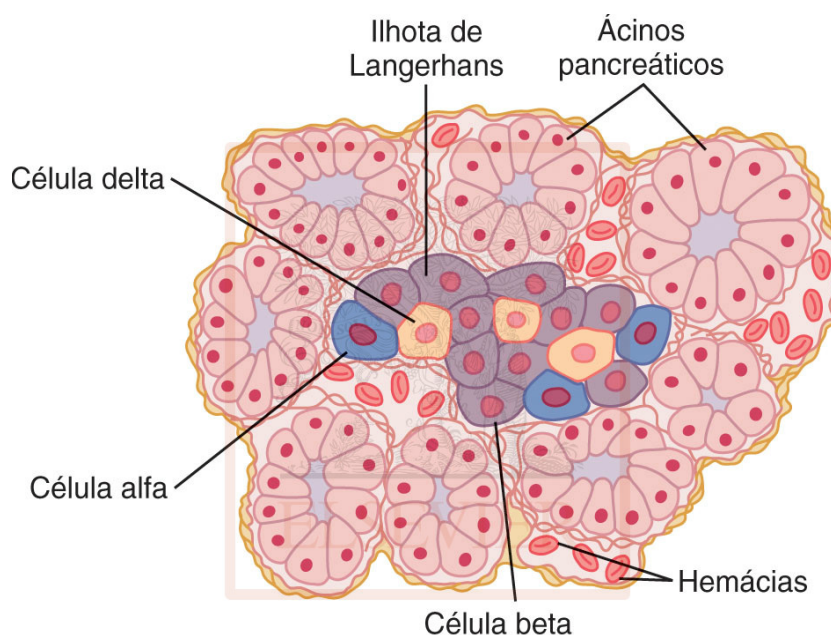


Figura 3 Anatomia fisiológica de uma Ilhota de *Langherans* no pâncreas.

Fonte: Guyton; Hall, 2011.

Baixas concentrações de glicose no sangue, tais como ocorrem durante o sono ou entre as refeições, resultam na liberação de glucagon pelas células- α , promovendo a glicogenólise hepática. Esse hormônio impulsiona a gliconeogênese hepática e renal, a fim de aumentar as concentrações de glicose no sangue durante um período

de jejum prolongado. Em contrapartida, concentrações elevadas de glicose na corrente sanguínea, tais como ocorrem após uma refeição, estimulam a secreção de insulina a partir das células- β (RÖDER et al., 2016).

Os mecanismos de secreção de insulina são continuamente ajustados em conformidade com as flutuações de determinados nutrientes, especialmente a glicose. A secreção pode ser modulada de modo direto ou indireto por hormônios neurotransmissores e agentes farmacológicos, permitindo, assim, que as células- β secretem insulina em quantidade e tempos adequados, possibilitando a regulação da concentração de nutrientes no sangue em diversas situações fisiológicas, como exercício físico, refeição, gravidez, lactação, entre outras (BOSCHERO, 1996).

A insulina é hormônio essencial para o metabolismo. Sua liberação, em indivíduos saudáveis, é primorosamente exata para atender a demanda metabólica (FU; GILBERT; LIU, 2013). Nas células- β pancreáticas, a secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis, dos quais a glicose é o mais importante secretagogo fisiológico (HABER et al., 2001; RÖDER et al., 2016; RUTTER et al., 2015).

O mecanismo de secreção de insulina (figura 4) tem início no momento em que a glicose é transportada para o interior das células- β pancreáticas, através de uma proteína integral de membrana chamada Transportador de Glicose do tipo 2 (GLUT 2). No interior da célula, a glicose é fosforilada à glicose-6-fostato (G6P) pela ação da enzima glicocinase, então, a G6P é submetida à glicólise, gerando o piruvato, ainda no citoplasma. Este é, então, metabolizado pelas enzimas piruvato desidrogenase e piruvato carboxilase e é transportado para a mitocôndria, permitindo a formação de ATP. O aumento na relação de ATP/ADP intracelular resulta no fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP e, conseqüentemente, despolarização da membrana, permitindo, assim, a abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem e o influxo deste íon para o interior da célula. Em decorrência do influxo de Ca^{2+} , a despolarização suplementar na membrana plasmática desencadeia o processo de fusão dos grânulos de insulina com a membrana plasmática e, subseqüentemente, a exocitose do seu conteúdo (ACHONG; MCINTYRE; CALLAWAY, 2014; FU; GILBERT; LIU, 2013; HABER et al., 2001; KOMATSU et al., 2013; RÖDER et al., 2016).

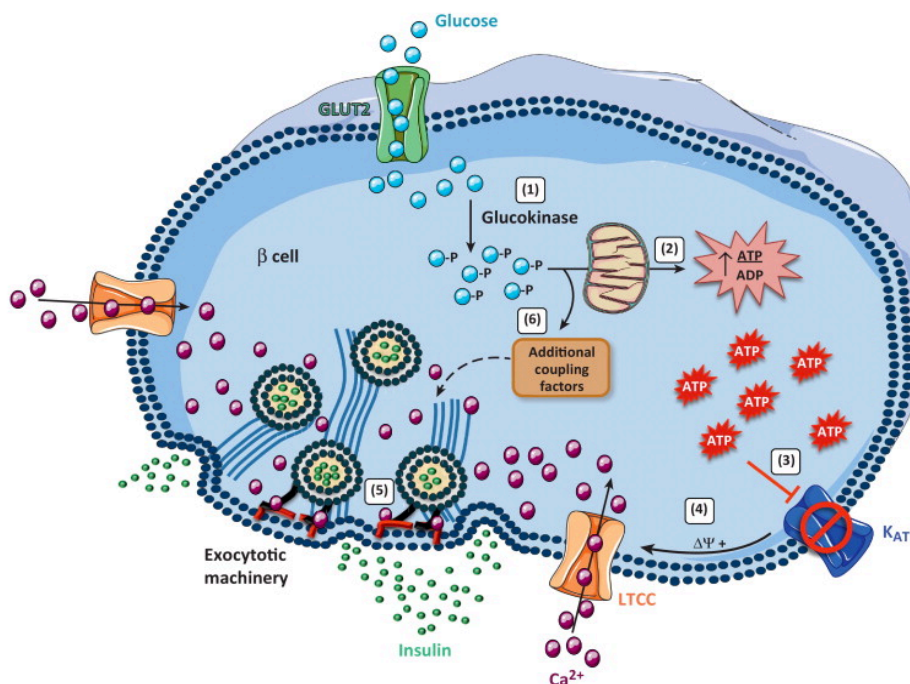


Figura 4 Mecanismo de secreção da insulina estimulada pela glicose. **1)** Fosforilação da glicose à G6P pela enzima glicocinase; **2)** Formação de ATP na mitocôndria e aumento na relação ATP/ADP intracelular; **3)** Fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP; **4)** Abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem; **5)** Exocitose de insulina através da membrana plasmática; **6)** Fatores de acoplamento adicionais.

Fonte: Mancini; Poitout, 2013.

A glicose pode ainda ativar vias de mensageiros intracelulares que amplificam a secreção de insulina por intermédio do metabolismo de Adenosina Monofosfato cíclico (AMPc). Isso ocorre após a ação da enzima adenilato-ciclase, que cliva o ATP gerando o AMPc, que, então, ativa a proteína quinase A, a qual pode estimular a secreção de insulina. A estimulação das células- β pela glicose resulta na ativação da enzima fosfolipase C, que promove a hidrólise de fosfolípidios de membrana, originando o Inositol 1-4-5-Trifosfato (IP3) e Diacilglicerol (DAG). O IP3, por sua vez, ativa os canais de Ca^{2+} presentes na membrana do retículo endoplasmático, resultando na saída desse íon da organela e, conseqüentemente, aumentando a concentração de Ca^{2+} no citossol. O DAG produz efeito semelhante em relação à concentração de Ca^{2+} no meio intracelular, devido à abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem presentes na membrana plasmática, resultando na passagem desse íon para o interior da célula. Além disso, o DAG ativa a proteína quinase C, responsável pela ativação de proteínas dos grânulos secretórios, que, em conjunto com íons Ca^{2+} , promovem a ativação do sistema de microtúbulos e microfilamentos,

culminando na exocitose de insulina (HABER et al. 2001; RÖDER et al., 2016; STRAUB; SHARP, 2002).

A insulina é o principal agente anabólico e anticatabólico, essencial para a manutenção da homeostase glicêmica, nos mamíferos. Este hormônio é responsável por promover o armazenamento e a síntese de lipídios, proteínas e carboidratos, impedindo sua degradação e liberação na corrente sanguínea (CHANG; CHIANG; SALTIEL, 2004; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ; SERRANO-RÍOS, 2007). A regulação normal de secreção de insulina é fundamental para o controle da glicemia. Isso ocorre por meio de sua ação no tecido hepático, a fim de reduzir a produção de glicose pela diminuição da gliconeogênese e glicogenólise. Além disso, a insulina é capaz de aumentar a captação periférica de glicose nos tecidos alvo, tais como tecidos adiposo e muscular. Ainda, esse hormônio induz a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, além de aumentar a síntese e inibir a degradação proteica (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; MAECHLER; WOLLHEIM, 2000).

Os efeitos da insulina em relação à absorção de glicose nos tecidos insulino dependentes são desencadeados pela rápida translocação dos Transportadores de Glicose do tipo 4 (GLUT 4). A ação da insulina é iniciada no momento em que ocorre a ligação do hormônio com os receptores de superfície, chamados receptores de insulina (IR), formados por duas subunidades α e duas subunidades β , responsáveis pela fosforilação das proteínas do Substrato do Receptor de Insulina (IRS). Os IRs são proteínas com atividade tirosina-quisases. O processo de fosforilação tem início no momento em que a insulina se liga à subunidade α , ativando na subunidade β , a atividade quinase. Em seguida, ocorre alteração conformacional e autofosforilação da subunidade β , transformando substratos proteicos em tirosina (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ; SERRANO-RÍOS, 2007). O IR pode ainda ser fosforilado em serina, desencadeando a diminuição da capacidade de fosforilação da subunidade β em tirosina, após o estímulo da insulina, e, com isso, provocar resistência à insulina (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

A resistência à insulina é um dos principais fatores para o desenvolvimento de DM2, além disso, está associada a outras complicações como dislipidemia, hipertensão, disfunções endoteliais, dentre outras (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ; SERRANO-RÍOS, 2007). Quando as células- β são incapazes de secretar quantidades

adequadas de insulina, para compensar a diminuição da sensibilidade a esse hormônio, é instalado estado de resistência à insulina crônica, que pode progredir e desenvolver DM2. Isso ocorre devido a disfunções da secreção de insulina, ou ainda pela perda significativa de células- β pancreáticas funcionais (FU; GILBERT; LIU, 2013).

A resistência à insulina ocorre quando os efeitos biológicos da insulina são insuficientes, não só na degradação de glicose no músculo esquelético, como também na supressão da produção de glicose endógena, especialmente no fígado. Pacientes com DM2 têm a produção de glicose endógena aumentada. Nas fases iniciais e intermediárias da doença, esse aumento ocorre na presença de hiperinsulinemia, dessa forma, a resistência à insulina hepática é considerada a força motriz da hiperglicemia dos pacientes acometidos por DM2 (STUMVOLL; GOLDSTEIN, VAN HAEFTEN, 2005).

Estudos *in vitro* e *in vivo* com roedores comprovam que a exposição aguda à desreguladores endócrinos altera nas células betapancreáticas reguladores de secreção e ação de insulina. Além de diferenciação nos adipócitos, os quais são capazes de causar resistência à insulina, sendo este um componente determinante na patofisiologia da síndrome metabólica, obesidade e DM2 (CHEVALIER; FENICHEL, 2016).

Ademais, exposições perinatais a baixas doses de pesticidas com posterior oferta de dieta hiperlipídica na vida adulta, desenvolveu, em camundongos da linhagem C57BL/6, diminuição na tolerância à glicose, aumento da insulina em jejum e HOMA-IR, indícios de resistência à insulina, além de risco aumentado de DM2 (LA MERRILL et al., 2014).

3.6 Modelo de obesidade

A obesidade induzida por dieta rica em gordura ou dieta hiperlipídica (DH) representa grave ameaça para a saúde. Isso ocorre devido à crescente ingestão de alimentos ricos em gordura em todo o mundo e sua associação com diversas doenças crônicas e fatais, como: doenças cardiovasculares, esteatose hepática, DM2 e outras desordens metabólicas (DARKHAK et al., 2015). Os alimentos classificados como DH são calóricos e extremamente palatáveis, tornando o seu consumo elevado em

relação aos demais nutrientes. A ingestão de alimentos gordurosos não estimula a oxidação e o gasto energético, por outro lado, promove seu armazenamento no tecido adiposo. Dessa forma, os efeitos da DH podem resultar em hiperfagia, aumento da adiposidade e aumento do peso. A DH não só reduz a captação, como também suprime a produção de glicose hepática estimulada pela insulina, de tal forma a resultar no desenvolvimento de hiperinsulinemia, resistência à insulina e hiperglicemia (GHIBAUDI et al., 2002).

Animais alimentados durante 15 semanas com DH apresentaram aumento significativo do peso corporal, consumo alimentar e gordura visceral em relação àqueles alimentados com dieta padrão, caracterizando, assim, o desenvolvimento da obesidade. Os resultados indicam resistência à insulina e disfunção metabólica, evidenciado pelo aumento da concentração de glicose, insulina, colesterol e triglicerídeos no plasma dos animais alimentados com DH. Além disso, foram observadas concentrações elevadas de fator de necrose tumoral alfa, interleucina 6 e proteína quimiotática de monócitos 1, e aumento significativo na expressão de lipoproteína lipase, responsável por hidrolisar moléculas de triglicerídeos a partir das lipoproteínas e receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama, o qual implica diversas desordens metabólicas, como: obesidade, resistência à insulina e dislipidemia (CARVALHO et al., 2016).

Resultados semelhantes foram observados em um estudo com ratos alimentados com dieta altamente gordurosa. Além do aumento significativo na concentração de triglicerídeos, glicose e resistência à insulina, diferenças foram observadas em relação à pressão sanguínea e ao peso do coração (LIN et al., 2016), além de aumento no peso do fígado, nas enzimas desse órgão e na concentração de leptina plasmática, a qual está associada com maior resistência à insulina, podendo ocasionar hiperlipidemia (LEE et al., 2015).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARIKWU, S.O.; AKIRI, O.F.; DUROJAIYE, M. A. Combined effects of repeated administration of Bretmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on testosterone, oxidative stress and sperm quality of Wistar rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 25, n. 1, p. 70-80, 2015.

ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Quase 60% dos Brasileiros estão acima do peso, revela IBGE**, 2015. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/noticia/quase-60-dos-brasileiros-estao-acima-do-peso-revela-pesquisa-do-ibge>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

ACHONG, N.; MCINTYRE, H. D.; CALLAWAY, L. Factors determining insulin requirements in women with type 1 diabetes mellitus during pregnancy: a review. **Obstetric Medicine**, v. 7, n. 2, p. 52-59, 2014.

AGEITEC. Agência Embrapa de Informação e Tecnologia. **Uso de agrotóxicos**, 2017. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fohgb6co02wyiv8065610dc2ls9ti.html#>>. Acesso em: 08 mai. 2017.

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P.; SHAW, J. International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention. **Diabetic Medicine**, v. 24, n. 5, p. 451-463, 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, v. 39, suppl. 1, p. S13-S22, 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **G01 Glifosato**, 2018. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/G01%2B%2BGlifosato.pdf/6a549ab8-990c-4c6b-b421-699e8f4b9ab4> > Acesso em: 18 jun. 2018.

_____. **Segundo Seminário Mercado de Agrotóxicos e Regulação**, 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/men u++noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrototoxic os+em+20+12>>. Acesso em: 23 mar. 2016.

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M.; Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 19, p. 18988–19001. 2016.

BAILLIE-HAMILTON, P. F. Chemical Toxins: A Hypothesis to Explain the Global Obesity Epidemic. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 8, n. 2, p.185-192, 2002.

BARKER, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. **British Medical Journal**, v. 15, n. 311, p. 171-174, 1995.

BOCHNER, R. Óbito ocupacional por exposição a agrotóxicos utilizado como evento sentinela: quando pouco significa muito. **Vigilância Sanitária em debate**, v. 3, n. 4, p. 39-49, 2015.

BOSCHERO, A. C. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 40, n. 3, p. 149-155, 1996.

BRASIL. **Agrotóxicos**, 2016. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

_____. **DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002**, 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 23 jun. 2016.

_____. **LEI Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989**, 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm>. Acesso em: 23 jun. 2016.

BRAUN, J. M. Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, p. 161-173, 2017.

ÇAĞLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 57-62, 2008.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R, M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZZOLO, A.; FARIA, N. M. X.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. ABRASCO, Rio de Janeiro, 1ª parte, 2012, 88 p.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CARVALHO, K. M. M. B.; MELO, T. S.; MELO, K. M.; QUINDERÉ, A. L.G.; OLIVEIRA, F. T. B.; VIANA, A. F. S. C.; NUNES, P. I.G.; QUETZ, J. S.; VIANA, D. A.; SILVA, A. A. C. A.; HAVT, A.; FONSECA, S. G. C.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Amyrins from *Protium heptaphyllum* Reduce High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice via Modulation of Enzymatic, Hormonal and Inflammatory Responses. **Planta Medica**, 2016.

CASSAL, V. B.; AZEVEDO, L. F.; FERREIRA, R. P.; SILVA, D. G.; SIMÃO, R. S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology**, v. 18, n. 1, p. 437-445, 2014.

CATTANI, D.; ACORDI CESCINETTO, P.; KRUGER TAVARES, M.; PARISOTTO, E. B.; DE OLIVEIRA, P. A.; HEINZ RIEG, C. E.; CONCLI LEITE, M.; SCHRÖDER PREDIGER, R. D.; WENDT, N. C.; RAZZERA, G.; WILHELM FILHO, D.; ZAMONER, A. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, p. 67-80, 2017.

CERF, M. E. High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction. **Pediatric Diabetes**, v. 16, p. 71-78, 2015.

CHAN, Y. C.; CHANG, S. C.; HSUAN, S. L.; CHIEN, M. S.; LEE W. C.; KANG, J. J.; WANGD, S. C. LIAOB, J. W. Cardiovascular effects of herbicides and formulated adjuvants on isolated rat aorta and heart. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 595-603, 2007.

CHANG, L.; CHIANG, S-H.; SALTIEL, A. R. Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. **Molecular Medicine**, v. 10, n. 7-12, p. 65-71, 2004.

CHEVALIER, N.; FENICHEL, P. Obésité, diabète de type 2 et perturbateurs endocriniens. **Médecine et environnement**, v. 45, n. 1, p. 88-97, 2016.

COULLERY, R. P.; FERRARI, M. E.; ROSSO, S. B. Neuronal development and axon growth are altered by glyphosate through a WNT non-canonical signaling pathway. **Neurotoxicology**, v. 52, p. 150-161, 2016.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; OLIVEIRA, R. T.; ANDRADE, A. J. M.; DALSENER, P. R.; LANGELOH, A. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, v. 81, p. 665-673, 2007.

DARKHAL, P.; GAO, M.; MA, Y.; LIU, D. Blocking High Fat Diet-induced Obesity, Insulin Resistance and Fatty Liver by Overexpression of IL-13 Gene in Mice. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 8, p. 1292-1299, 2015.

DARUICH, J.; ZIRULNIK, F.; GIMENEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. **Environmental Research**, v. 85, n. 3, p. 226-231, 2001.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J. P.; GIUDICE, L. C.; HAUSER, R.; PRINS, G. S.; SOTO, A. M.; ZOELLER, R. T.; GORE, A. C. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 4, p. 293-342, 2009.

EBERLE, C.; AMENT, C. Diabetic and Metabolic Programming: Mechanisms Altering the Intrauterine Milieu. **International Scholarly Research Notices Pediatrics**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

ELLSWORTH, L.; HARMAN, E.; PADMANABHAN, V.; GREGG B. Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. **Reproduction**, v. 156, n. 2, p. R23-R4, 2018.

EPA. *US Environmental Protection Agency. What is Endocrine Disruption?*, 2016. Disponível em: <<https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>>. Acesso em: 30 nov. 2016.

FERREIRA, S. R. G.; PITITTO, B. A. **Aspectos epidemiológicos do Diabetes Mellitus e seu impacto no indivíduo e na sociedade**, 2015. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/ebook/component/k2/item/73-capitulo-1-aspectos-epidemiologicos-do-diabetes-mellitus-e-seu-impacto-no-individuo-e-na-sociedade>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

FLEGAL, K. M.; CARROLL, M. D.; OGDEN, C. L.; JOHNSON, C. L. Prevalence and Trends in Obesity among US Adults, 1999-2000. **The Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 14, p. 1723-1727, 2002.

FOULDS, C. E.; TREVIÑO, L. S.; YORK, B.; WALKER, C. L. Endocrine-disrupting chemicals and fatty liver disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, p. 536-546, 2017.

FREITAS, R. F.; ALBARELLO, J. B.; DAL MAGRO, R.; ZALAMENA, J.; OLIVEIRA, P. D.; RODIGHERO, K.; MELO, G. W. B. Fitotoxicidade indireta do herbicida glifosato na videira. In: Encontro de Iniciação Científica, XI, 2013, Bento Gonçalves. **Anais do 7º Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho**, 2013, p. 29.
Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/97290/1/freitas-Resumos-IC-2013.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

FRÜHBECK, G. Bariatric and metabolic surgery: a shift in eligibility and success criteria. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, p. 465-477, 2015.

FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. **Current diabetes reviews**, v. 9, n. 1, p/ 25-53, 2013.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Glifosato**: alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. São Paulo: ACADCOM, 2005, 66 p.

GHIBAUDI, L.; COOK, J.; FARLEY, C.; HEEK, M. V.; HWA J. J. Fat Intake Affects Adiposity, Comorbidity Factors, and Energy Metabolism of Sprague-Dawley Rats. **Obesity**, v. 10, n. 9, p. 956-963, 2002.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; COOPER, C.; THORNBURG, K. L. Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 1, p. 61-73, 2008.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, J. L.; SERRANO-RÍOS, M. Molecular basis of insulin action. **Drug News & Perspectives**, v. 20, n. 8, p. 527-531, 2007.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICHEL, A. J.; AZEVEDO, M. J. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

GUERRERO SCHIMPF, M.; MILESI, M. M.; INGARAMO, P. I.; LUQUE, E. H.; VARAYOUD, J. Neonatal exposure to a glyphosate based herbicide alters the development of the rat uterus. **Toxicology**, v. 1, n. 376, p. 2-14, 2016.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, 1216 p.

HABER, E. P.; CURI, R.; CARVALHO, C. R. O.; CARPINELLI, A. R. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219-227, 2001.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. **British Medical Bulletin**, v. 60, p. 5-20, 2001.

HOWELL, G. E.; MULLIGAN, C.; MEEK, E.; CHAMBERS, J. E. Effect of chronic p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure on high fat diet-induced alterations in glucose and lipid metabolism in male C57BL/6H mice. **Toxicology**, v. 328, p. 112-122, 2015.

IDF. *International Diabetes Federation*. **IDF Diabetes Atlas - Seventh Edition**, 2015. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/>>. Acesso em: 16 ago. 2016.

JOHANSSON, H. K. L.; SVINGEN, T.; FOWLER, P. A.; VINGGAARD, A. M.; BOBERG, J. Environmental influences on ovarian dysgenesis — developmental windows sensitive to chemical exposures. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, p. 400-414, 2017.

JUNIOR, O. P. DE A.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 589-593, 2002.

KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 241-258, 2015.

KARMAUS, W.; OSUCH, J. R.; ENELI, I.; MUDD, L. M.; ZHANG, J.; MIKUCKI, D.; HAAN, P.; DAVIS, S. Maternal levels of dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE) may increase weight and body mass index in adult female offspring. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 66, n. 3, p. 143-149, 2009.

KOMATSU, M.; TAKEI, M. ISHII, H.; SATO, Y. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 4, n. 6, p. 511-516, 2013.

KRZYSZTOSZEK, J., WIERZEJSKA, E., ZIELIŃSKA, A. Obesity. An analysis of epidemiological and prognostic research. **Archives of Medical Science**, v. 16, n. 11, p. 24-33, 2015.

KWIATKOWSKA, M.; HURAS, B.; BUKOWSKA, B. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (*in vitro*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 109, p. 34-43 2014.

KWIATKOWSKA, M.; NOWACKA-KRUKOWSKA, H.; BUKOWSKA, B.; The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 1101-1108, 2014.

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**, v. 105, p. 93-98, 2017.

LA MERRILL, M.; KAREY, E.; MOSHIER, E.; LINDTNER, C.; LA FRANO, M. R.; NEWMAN, J. W.; BUETTNER, C. Perinatal Exposure of Mice to the Pesticide DDT Impairs Energy Expenditure and Metabolism in Adult Female Offspring. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. 1-11, 2014.

LEE, H. S.; LEE, Y. J.; CHUNG, Y. H.; NAM, Y.; KIM, S. T.; PARK, E. S.; HONG, S. M.; YANG, Y. K.; KIM, H. C.; JEONG, J. H. Beneficial Effects of Red Yeast Rice on High-Fat Diet-Induced Obesity, Hyperlipidemia, and Fatty Liver in Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 10, p. 1095-1102, 2015.

LEE, D-H.; STEFFES, M. W.; SJÖDIN, A.; JONES, R. S.; NEEDHAM, L. L.; JACOBS, D. R. Low Dose of Some Persistent Organic Pollutants Predicts Type 2 Diabetes: A Nested Case–Control Study. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 9, p. 1235-1242, 2010.

LIN, Y. Y.; HSIEH, P. S.; CHENG, Y. J.; CHENG, S. M.; CHEN, C. J.; HUANG, C. Y.; KUO, C. H.; KAO, C. L.; SHYU, W. C.; LEE, S. D. Anti-apoptotic and Pro-survival Effects of Food Restriction on High-Fat Diet-Induced Obese Hearts. **Cardiovascular Toxicology**, 2016.

LONDRES F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1. ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011, 190 p.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Foundation Symposium**, v. 156, p. 38-50, 1991.

MAECHLER, P.; WOLLHEIM, C. B. Mitochondrial signals in glucose-stimulated insulin secretion in the beta cell. **The Journal of Physiology**, v. 529, n. 1, p. 49-56, 2000.

MANCINI, A. D.; POITOUT, V. The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know? **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 8, p. 398-407, 2013.

MENÉNDEZ-HELMAN, R. J.; FERREYROA, G. V.; DOS SANTOS ALFONSO, M.; SALIBRÁN, A. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, n. 1, p. 6-9, 2012.

MENEZES, S.M.; TILLMANN, M. A. A.; DODE, L. B.; VILLELA, F. A. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p. 150-155, 2004.

MESNAGE, R.; ARNO, M.; COSTANZO, M.; MALATESTA, M.; SÉRALINI, G. E.; ANTONIOU, M. N. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. **Environmental Health**, v. 14, p. 70-84, 2015.

MESQUITA, H. C.; RODRIGUES, A. P. M. S.; JÚNIOR, A. F. M. Riscos toxicológicos do herbicida glyphosate. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 7, n. 2, p. 01-05, 2011.

MONSANTO. **FISPQ - Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. ROUNDUP NA**, 2008. Disponível em: <<http://www.monsanto.com/global/br/produtos/documents/roundup-na-fispq.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

NADAL, A.; QUESADA, I.; TUDURÍ, E.; NOGUEIRAS, R.; ALONSO-MAGDALENA, P. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, p. 536-546, 2017.

NARDI, J.; BONAMIGO MORAS, P.; KOEPPE, C.; DALLEGRAVE, E.; BAINY LEAL, M.; GRAZZIOTIN ROSSATOGRANDO, L. Prepubertal subchronic exposure to soy

milk and glyphosate leads to endocrine disruption. **Food and Chemical Toxicology**, v. 100, p. 247-252, 2017.

NEIVA, T. DE J. C.; MORAES, A. C. R.; SCHWYZER, R.; VITURI, C. DE L.; ROCHA, T. R. F.; FRIES, D. M.; et al. In vitro effect of the herbicide glyphosate on human blood platelet aggregation and coagulation. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 4. p. 291-294, 2010.

NEWBOLD, R. R.; PADILLA-BANCOS, E.; JEFFERSON, W. N.; HEINDEL, J. J. Effects of endocrine disruptors on obesity. **International Journal of Andrology**, v. 31, n. 2, p. 201-208, 2008.

NGWA, E. N.; KENGNE, A-P.; TIEDEU-ATOGHO, B.; MOFO-MATO, E-P.; SOBNGWI, E. Persistent organic pollutants as risk factors for type 2 diabetes. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, n. 41, p. 1-15, 2015.

NIH. *NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH*. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: the evidence report. **Obesity Research**, v. 6, suppl. 2, p. 51S-209S, 1998.

NORIEGA-LÓPEZ, L.; TOVAR, A. R.; GONZALEZ-GRANILLO, M.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; ESCALANTE, B.; SANTILLÁN-DOHERTY, P.; TORRES, T. Pancreatic Insulin Secretion in Rats Fed a Soy Protein High Fat Diet Depends on the Interaction between the Amino Acid Pattern and Isoflavones. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, v. 28, p. 20657–20666, 2007.

OKWECHIME, I. O.; ROBERSON, S.; ODOI, A. Prevalence and Predictors of Pre-Diabetes and Diabetes among Adults 18 Years or Older in Florida: A Multinomial Logistic Modeling Approach. **Plos One**, v. 10, n. 12, p 1-17, 2015.

OLIVEIRA, T. G.; FAVARETO, A. P.; ANTUNES, P. A. Agrotóxicos: levantamento dos mais utilizados no oeste paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos. **IX Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 11, p. 375-390, 2013.

OPAS. Organização Pan-Americana De Saúde. **Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde**. Brasília, 2003, 60 p. Disponível em: <http://www.opas.org.br/wp-content/uploads/2015/09/d_cronic.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2016.

PADMANABHAN, V.; CARDOSO, R. C.; PUTTABYATAPPA, M. Developmental Programming, a Pathway to Disease. **Endocrinology**, v. 157, n. 4, p. 1326-1340, 2016.

PARIONA, A. **Top Pesticide Using Countries**. Disponível em: <<https://www.worldatlas.com/articles/top-pesticide-consuming-countries-of-the-world.html>>. Acesso em: 01 ago. 2018.

PATTI, M. E. Reducing maternal weight improves offspring metabolism and alters (or modulates) methylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 32, p. 12.859-12.860, 2013.

PEREGO, C. M.; SCHUTZ, L. F.; CALONI, F.; CORTINOVIS, C.; ALBONICO, M.; SPICER, L. J. Evidence for direct effects of glyphosate on ovarian function: glyphosate influences steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa but not theca cells *in vitro*. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 6, p. 692-698, 2017.

PHILLIPS, D. I. W.; MATTHEWS, S. G. Is perinatal neuroendocrine programming involved in the developmental origins of metabolic disorders? **World Journal of Diabetes**, v. 2, n. 12, p. 211-216, 2011.

PRENTKI, M.; NOLAN, C. J. Islet β cell failure in type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.7, p.1802-1812, 2006.

REGNIER, S. M.; KIRKLEY, A. G.; RUIZ, D.; KAMAU, W.; WU, Q.; KANNAN, K.; SARGIS, R. M. Diet-dependence of metabolic perturbations mediated by the endocrine disruptor tolylfluanid. **Endocrine Connections**, v. 7, n. 1, p.159–168, 2018.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1-3, 2014.

RÖDER, P. V.; WU, B.; LIU, Y.; HAN, W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 48, n. 3, p. E219, 2016.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; BERNARDI, M. M.; OLIVEIRA, C. A.; FURTADO, P. V. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 309-317, 2010.

ROSIEK, A., MACIEJEWSKA, F., LEKSOWSKI, K., ROSIEK-KRYSZEWSKA, A., LEKSOWSKI, L. Effect of Television on Obesity and Excess of Weight and Consequences of Health. **International Journal of Environmental**, v. 12, n. 8, p. 9408-9426, 2015.

ROSSI, M. O “**alarmante**” uso de agrotóxicos no Brasil atinge 70% dos alimentos, 2015. Disponível em: <http://brasil.elpais.com/brasil/2015/04/29/politica/1430321822_851653.html>. Acesso em: 23 set. 2016.

RUTTER, G. A.; PULLEN, T. J.; HODSON, D. J.; MARTINEZ-SANCHEZ, A. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. **Biochemical Journal**, v. 466, n. 1, p. 203-218, 2015.

RYLANDER, C.; SANDANGER, T. M.; NOST, T. H.; BREIVIK, K.; LUND, E. Combining plasma measurements and mechanistic modeling to explore the effect of POPs on type 2 diabetes mellitus in Norwegian women. **Environmental Research**, v. 142, p. 365-373, 2015.

SANTOS, A. M. **Sociedade do consumo: Criança e propaganda, uma relação que dá peso**. 2007. Tese (Doutorado em Serviço Social) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Serviço Social. Porto Alegre.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Atlas do Diabetes 2015 – Atualização 7ª edição – IDF**. 2015. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/images/2015/atlas-idf-2015.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2016.

SECO, S.; MATIAS, A. Origem fetal das doenças do adulto: revisitando a teoria de Barker. **Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa**, v. 3, n. 3, p. 158-168, 2009.

SÉRALINI, G. E.; CLAIR, E.; MESNAGE, R.; GRESS, S.; DEFARGE, N.; MALATESTA, M.; HENNEQUIN, D.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J. Republished study: long-term toxicity of a roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Environmental Sciences Europe**, v. 26, n. 1, p. 14-31, 2014.

SIDDIQUEE, T.; BHOWMIK, B.; MOREIRA, N. C. V.; MUJUMDER, A.; MAHTAB H.; KHAN, A. K. A.; HUSSAIN, A. Prevalence of obesity in a rural Asian Indian (Bangladeshi) population and its determinants. **BioMed Central Public Health**, v. 15, p. 1-9, 2015.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. **Dados de intoxicação/Dados agentes tóxicos**. Disponível em: <<https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-de-agentes-toxicos>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

SOARES, W. L. **Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura**. 2010. Tese (Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca ENSP, Rio de Janeiro.

STRAUB, S. G.; SHARP, G. W. G. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v. 18, p. 451-463, 2002.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. G.; VAN HAEFTEN, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **The Lancet**, v. 365, p. 1333–1346, 2005.

SWEDENBORG, E.; RÜEGG, J.; MÄKELÄ, S.; PONGRATZ, I. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 43, p. 1-10, 2009.

TAVARES, T. B.; NUNES, S. M.; SANTOS, M. O. Obesidade e qualidade de vida: revisão de literatura. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 20, n. 3, p. 359-366, 2010.

TINGGAARD, J.; WOHLFAHRT-VEJE, C.; HUSBY, S. CHRISTIANSEN, L.; SKAKKEBÆK, N. E.; JENSEN, T. K.; GRANDJEAN, P.; MAIN, K. M.; ANDERSEN, H. R. Prenatal pesticide exposure and PON1 genotype associated with adolescent body fat distribution evaluated by dual X-ray absorptiometry (DXA). **Andrology**, v. 4, n. 4, p. 735-744, 2016.

TRAPÉ, A.Z. Agrotóxicos e saúde pública. **Visão Agrícola**, n. 7, p. 61-63, 2007.

VAISERMAN, A. M. Epigenetic programming by early-life stress: Evidence from human populations. **Developmental Dynamics**, v. 244, n. 3, p. 254-265, 2014.

VAN BRUGGEN, A. H. C.; HE, M. M.; SHIN, K.; MAI, V.; JEONG, K. C.; FINCKH, M. R.; MORRIS J. G. JR. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of the Total Environment**, v. 616, n. 617, p. 255–268, 2018.

WARNER, M. J.; OZANNE, S. E. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. **Biochemical Journal**, v. 427, n. 3, p. 333-347, 2010.

WELLMAN, N. S.; FRIEDBERG, B. Causes and consequences of adult obesity: health, social and economic impacts in the United States. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 11, p. S705-S709, 2002.

WHO. *World Health Organization*. **Diabetes**, 2016a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>>. Acesso em: 16 ago. 2016.

_____. **Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs)**, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/ceh/risks/cehemerging2/en/>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

_____. **Obesity and overweight**, 2016b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

_____. **Persistent Organic Pollutants: Impact on Child Health**, 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44525/1/9789241501101_eng.pdf>. Acesso em: 03 ago. 2016.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. Regulatory. **Toxicology and Pharmacology**, v. 3. p. 117-165, 2000.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agrônomicas. **International Plant Nutrition Institute**, Piracicaba: Informações Agrônomicas, 2007. 24.p (Boletim Técnico nº 119).

ARTIGO CIENTÍFICO 1

EFFECTS OF MATERNAL EXPOSURE TO GLYPHOSATE ON BODY WEIGHT
AND GLUCOSE HOMEOSTASIS IN ADULT OFFSPRING OF C57BL/6 MICE

EFFECTS OF MATERNAL EXPOSURE TO GLYPHOSATE ON BODY WEIGHT AND GLUCOSE HOMEOSTASIS IN ADULT OFFSPRING OF C57BL/6 MICE

Ellen Carolina Zawoski Gomes¹, Jakeline Liara Teleken¹, Rodrigo Vargas¹, Ana Claudia Paiva Alegre-Maller², Maria Lúcia Bonfleur¹, Sandra Lucinei Balbo¹.

¹Endocrine Physiology and Metabolism Laboratory, Center of Biological Sciences and Health, State University of Western Paraná, Cascavel, Paraná, Brazil.

²Nucleus of Biological Sciences, University Center Assis Gurgacz Foundation, Cascavel, Paraná, Brazil.

Abstract

Aim: Investigate the effects of maternal exposure to glyphosate Roundup Original DI® during pregnancy and lactation on body parameters and glucose homeostasis of C56BL/6 mice in adulthood.

Methods: C57BL/6 female mice received 0.5% of glyphosate Roundup Original DI® in drinking water (GL group), during pregnancy and lactation, while the CTL group received only water. The offspring (CTL-F1 and GL-F1) were submitted to glucose tolerance test and insulin tolerance test. At 150 days of life, the offspring were euthanized and body and plasmatic parameters were analyzed.

Results: Glyphosate exposure resulted in a reduction in body weight gain during pregnancy and lactation in the GL group. Pre- and postnatal exposure to glyphosate leads to a decrease in body weight gain in adulthood, increased the glucose tolerance at 60 days of life, normalized at 143 days of life, however with higher insulin sensitivity in relation to CTL-F1 group.

Conclusion: Maternal exposure to glyphosate reduces body weight gain and increases insulin sensitivity in adult F1 offspring.

Keywords: Glyphosate, metabolic programming, body weight and glucose homeostasis.

Correspondent author:

Sandra Lucinei Balbo, State University of Western Paraná, Center of Biological Sciences and Health, Cascavel, Paraná, Brazil.

E-mail address: sbalbo@hotmail.com

Introduction

The use of agrochemicals is a relevant risk factor for human health, once intoxications due to the use of these substances represents one of the most important public health problems in the world¹.

Among the active ingredients registered in Brazil for agricultural use, herbicides, such as glyphosate, are highlighted, since they account at about 45% of the total pesticides used^{1,2}. The glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine) is a broad-spectrum, non-selective, post-emergent, systemic organophosphate herbicide and belongs to the substituted glycine group^{2,4-6}. The use of this herbicide has caused damages to the environmental, to the animals, and also, great impacts on human health⁷. This is due to increased exposure through soil, water and contaminated food^{3,8}.

The glyphosate has been identified as an endocrine disruptor chemical, an exogenous substance capable of interfering directly with the endocrine system, mimicking the action of natural hormones, resulting in adverse effects on organisms and/or their progeny⁸⁻¹¹. Exposures to endocrine disruptors chemicals at critical periods of development, such as gestation and lactation, may alter the developmental trajectory of the fetus, resulting in permanent morphofunctional changes in tissues and/or organs, with or without growth disturbance. These implications lead to "programming", a term used to define insults or stimuli in a critical period of fetal development, causing changes in the course of life, with irreversible consequences^{12,13}. The transmission of metabolic sequelae at critical periods of development, in which programming occurs, span several stages of life, including from preconception to the end of lactation and also in adolescence¹⁴.

The systems involved in the maintenance of glucose homeostasis are susceptible to reprogramming during the stages of tissue differentiation and organ development, beginning during fetal life, continuing through childhood. The ability to maintain glucose homeostasis in mammals depends on the combined functions of the brain, pancreas (pancreatic islets), liver, muscle and adipose tissue. The development of pancreatic islets in humans starts from the 3th week of gestation, extending to the end of lactation. In mice, the organogenesis occurs from the 8th day of pregnancy until the beginning of lactation. Thus, insults during lactation can not only be programmed, but also amplify the effects of in utero exposures on the risks of metabolic diseases throughout life¹⁵.

In vitro and in vivo studies with rodents have shown that acute exposures to endocrine disruptors chemicals cause changes in β -pancreatic cells, influencing the regulation of insulin secretion and the action of this hormone. In addition, a differentiation was observed in the

adipocytes, which are capable of causing insulin resistance, a determinant component in the pathophysiology of the metabolic syndrome, obesity and type 2 Diabetes Mellitus¹⁶.

Currently, several studies with different animal species have shown the effects of direct exposure to glyphosate on glycemic metabolism¹⁷⁻²⁶. However, the results are controversial even in similar species. Thus, the present study aims to investigate the effects of maternal exposure to glyphosate (Roundup Original DI®) during pregnancy and lactation on body parameters and glycemic homeostasis of male C57BL/6 mice in adult life.

Material and Methods

Chemical

The pesticide used in this study is a commercial formulation marketed in Brazil as Roundup Original DI® by Monsanto, which contains 445 g/L of N-phosphonomethylglycine diammonium salt (44.5% m/v) (equivalent to 370 g/L (37.0% m/v) of glyphosate acid).

Animals

Male and female mice (60-90 days of life, 20-25g of body weight) of the lineage C57BL/6 were housed in polypropylene box (30x20x13 cm; 2-3 animals/box) under conditions of temperature (28 ± 2 °C) and luminosity (12 hours dark/light) monitored. The animals were feed with rodent standard chow (Supralab, Brazil) and pure water *ad libitum*. All experimental procedures were approved by the University's Ethics Committee on Animal Use (CEUA - State University of Western Paraná) (Annex A).

Mating

Receptive female mice and sexually active adult male mice were housed in a cage (two female and one male mice) during the dark period (7 p.m. – 7 a.m.) for mating. On the next morning, vaginal smears were obtained from all the female mice. The pregnancy was confirmed by the presence of spermatozoa on the vaginal smears or when the female remained four days at the diestrus phase on estral cycle.

Glyphosate administration

Pregnant female mice were randomly separated into two experimental groups. During the pregnancy (21 days) and lactation (30 days), the glyphosate group (GL, n = 9) received 0.5% of glyphosate (Roundup Original DI®, Monsanto, Brazil) in drinking water, while the control group (CLT, n = 11) received pure water. All the female mice were feed with rodent standard chow (Supralab, Brazil) *ad libitum*. The body weight and food and water intake were

measured weekly. Ten days after weaning, the female mice were euthanized and body features and fasting glucose and insulin were verified.

Offspring

The birth of the pups was considered the 0 postnatal day and at the 30th postnatal day the offspring were weaned. Only male mice were used in this study. The offspring were named according to the treatment received by the mothers, forming two experimental groups: CTL-F1 (n = 16) and GL-F1 (n= 10). All the animals received pure water and rodent standard chow (Supralab, Brazil) *ad libitum* until 150 days of life, when they were euthanized. The body weight and food and water intake were measured weekly in the adulthood (60 to 150 days of life).

Glucose Tolerance Test

At 60 and 143 days of life, the male mice F1 were submitted to the oral glucose tolerance test. After an 8-hour fast, blood was collected from the tail to obtain fasting glucose (time 0), using a glucometer and test strips (G-Tech Free®, SD Biosensor, Coreia). The animals received glucose solution orally (1.5 g/kg) and glucose was verified at the times 15, 30, 60, 90 and 120 minutes.

Insulin Tolerance Test

At 145 days of life, the male mice F1 were submitted to the insulin tolerance test. After a 2-hour fast, tail blood was collected and basal glucose was obtained, using a glucometer and test strips (G-Tech Free®, SD Biosensor, Coreia). After administration of regular insulin intraperitoneally (0.75 IU / kg) glucose was again evaluated at the times 3, 6, 9, 12, 15 and 18 minutes.

Euthanasia

Before the euthanasia, mothers and offspring remained fasted for 8 hours and glycemia was checked (G-Tech Free®, SD Biosensor, Coreia). The mice were weighed and anesthetized with xylazine (9 mg / kg) (Anasedan®, Vetbrands, Brazil) and ketamine (90 mg / kg) (Dopalen®, Vetbrands, Brazil). Once the skin reflex was absent, the naso-anal length was measured and the whole blood was collected by cardiac puncture, using a heparinized syringe. The blood was transferred into an eppendorf tube, centrifuged (12,600 g, 10 minutes, 4 °C) and the plasma was stored at -80 °C for subsequent insulin dosing, by radioimmunoassay. Then, a

laparotomy was performed for extraction and weighing of the pancreas, white adipose tissue retroperitoneal and perigonadal, and soleus and extensor digitorum muscles.

Data analyses and statistics

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean. The Shapiro-Wilk test was used for normality analysis. Parametric data were analyzed using the unpaired Student t-test. Non-parametric data were analyzed using the Mann-Whitney test. The level of significance was set at $P < 0.05$. The analyzes were performed in the statistical program GraphPad Prism version 6.0 for MAC (GraphPad Software ©) and statistical program R (R Coreteam, 2015).

Results

Maternal results

Glyphosate exposure impairs body weight gain and maternal water and food intake during the pregnancy and lactation

To verify the effects of glyphosate administration during pregnancy and lactation, body weight and food and water intake were weekly measured. Glyphosate administration resulted in a reduction in body weight gain in the GL group during pregnancy ($P = 0.0051$) as well as lactation ($P < 0.0001$) when compared to the CTL group (Fig 1A and B). Although the number of offspring born was similar between the two experimental groups ($P = 0.1088$) (Fig. 1C). Furthermore, glyphosate exposure reduced food intake ($P = 0.0026$) and water ($P = 0.0002$) in females of the GL group compared to the CTL group (Fig. 1D and E, respectively).

Glyphosate exposure during pregnancy and lactation does not alter maternal body parameters and glucose homeostasis

To analyze the effects of exposure to glyphosate on body and plasma parameters of the dams, female mice were anesthetized and whole blood and tissues were collected. Ten days after weaning, body weight was similar in both CTL and GL groups (Table 1). Glyphosate exposure did not change the weight of the perigonadal adipose tissue, the pancreas, and the soleus and extensor digitorum muscles (Table 1). Regarding plasma parameters, no effects of glyphosate administration were observed, once glycemia and insulinemia were similar in both groups (Table 1).

Adult offspring results

Maternal exposure to glyphosate reduces body weight gain of adult F1 offspring without altering dietary intake and glucose homeostasis

To evaluate the effects glyphosate exposure at pre- and postnatal periods, body weight and dietary intake of F1 offspring were weekly evaluated. Maternal exposure to glyphosate reduced body weight gain from 60 to 150 days of GL-F1 group ($P = 0.0486$) compared to CTL-F1 group (Fig. 2A). However, food intake was similar in both groups ($P = 0.8459$) (Fig. 2B). To evaluate plasma and body parameters, F1 mice were anesthetized and whole blood and tissues were collected. Maternal exposure to glyphosate did not alter naso-anal length, Lee's index, retroperitoneal and perigonadal adipose tissue weight, as well as soleus and longus extensor muscle weight in adult F1 offspring (Table 2). Plasma glucose and insulin concentration were also similar in both offspring groups (Table 2).

Pre- and postnatal exposure to glyphosate increases glucose tolerance in adult F1 offspring mice

To verify the glycemic profile of the adult offspring of females mice exposed to glyphosate, the glucose tolerance test and the insulin tolerance test were performed. At 60 days of life, and after glucose overload (1.5 g/kg), both groups reached maximum blood glucose levels at 15 minutes. GL-F1 mice showed a 35% decrease in glycemia, indicating a higher sensitivity to glucose in relation to CTL-F1 animals ($P = 0.0028$) (Fig. 3A and B). Interestingly, at 143 days of life, although glucose tolerance was similar in both groups ($P = 0.8345$) (Fig. 3C and D), glucose decay following regular insulin administration (0.75 IU/kg) was significantly higher in the GL-F1 group than in the CTL-F1 group ($P = 0.0234$) (Fig. 4A and B), indicating a higher sensitivity to this hormone.

Discussion

Exposure to glyphosate Roundup Original DI® (5%; ~30 mg/kg) in C57BL/6 female mice resulted in a reduction in body weight gain during pregnancy (21 days) and lactation (30 days), with no change in the litter size. The reduction of body weight is an important indicative of toxicity²⁹, which according to Jasper et al. and Ait Bali et al. may be associated with the ability of the glyphosate herbicide to produce reactive oxygen species^{30,31}. It is important to emphasize that the females exposed to glyphosate had lower water and food intake, which may contribute to the reduction on body weight gain during the experimental period. Daruich et al. and Beuret et al. reported a reduction in body weight and/or water and food intake in pregnant rats exposed to glyphosate^{27,32}. The authors suggest that this reduction is due to the palatability

of glyphosate in water, or due to the effects of glyphosate (and/or metabolites) on the nervous center of the thirst, on the hypothalamus. Furthermore, Pandey et al. described that besides the possible toxic effects caused by Roundup, the reduction in body weight and in food consumption may be related to the endocrine disrupting effect of this herbicide³³.

Glyphosate Roundup Original DI® exposure at 1% (~60 mg/kg) and 0.75% (~45 mg/kg) impaired the initiation and/or complete development of gestation (40% and 75% of the cases, respectively) and induced changes in parental care (20% and 25% of the cases, respectively). When given 0.5% glyphosate (~30 mg/kg), 19% had the onset and/or complete development of gestation impaired, and 38% showed changes in parental care, accounting for 57% of the total glyphosate exposed animals used in this research (data not shown). Milesi et al. showed a lower number of implantation sites, associated with an increase in the rate of pre-implantation embryo loss in females exposed in the perinatal period at different doses of glyphosate (2 and 200 mg/kg)³⁴. Camargo et al. explain that “exposures to toxic agents, early in development (gametogenesis, pre-implantation and implantation), may cause mainly embryolethality, but may also cause malformations in the fetus”³⁵. Moreover, early exposures to endocrine disruptors chemicals can have effects on maternal care³⁶. These effects may be responsible for differences in the maturation rate of offspring, such as growth, and subsequent neuroendocrine and behavioral responses resulting from epigenetic alterations³⁷.

Endocrine disruptors chemicals exposure during fetal development, such as occur in gestation and lactation, may alter the fetal development and cause permanent changes in organ and tissue function, increasing the risk of disease in adult life. In addition, it is noted that some endocrine disruptors chemicals have a biphasic effect and are age-dependent³⁸⁻⁴⁰. Pre- and postnatal exposure to glyphosate resulted in a reduction in body weight gain in F1 offspring mice during adult life. Similar results were observed by Milesi et al., however, the reduction of body weight was observed only in the second generation (F2). The reduced fetal growth may be due to inherent fetal abnormalities, such as chromosomal or congenital abnormalities, maternal diseases, or placental insufficiency. In addition, low birth weight may be associated with environmental exposures to pesticides³⁴.

Due to their deregulatory properties, endocrine disruptors chemicals may have potential influences on glycoregulatory hormones⁴¹. Pre- and postnatal exposure to glyphosate Roundup Original DI® increased glucose sensitivity on GL-F1 group at 60 days of life, and although normalizing this parameter at 143 days of life, glucose decay after administration of insulin was significantly higher in the GL-F1 group compared to CTL-F1, indicating a higher sensitivity to this hormone. It is noteworthy that fasting glycemia and insulinemia were similar in both GL-F1 and CTL-F1 groups. So it is suggested that the observed changes in glucose tolerance and

insulin sensitivity may be due to the reduction on body weight gain observed in GL- F1. Reinforcing this hypothesis Tizhe et al., showed a subtle (not significant) increase in plasma glucose and insulin concentration in male rats exposed to different concentrations of Bushfire® (commercial formulation of glyphosate)²⁶. Veissi et al., observed increased glycemia and decreased insulinemia in male mice exposed to Bisphenol A (BPA) (diphenol used in the production of plastics, with an endocrine disrupting effect)⁴¹. Bonvalloti et al., demonstrated that exposure to eight pesticides mixture, commonly found in the environment, can alter glycemic metabolism by increasing of hepatic glucose in rats and their offspring. This alteration may be related to a decrease in alanine (plasma in the mothers and liver and brain in the offspring), a nonessential amino acid that plays an important role in the regulation of glucose metabolism¹⁸. Several studies have shown the effects glyphosate exposure on glucose metabolism in fish, but the results are still controversial. Langiano and Martinez reported an increase in fish glycemia 24 and 96 hours after exposure to Roundup®. This change is a very common response in fish under stress conditions²². On the other hand, Moura et al. and Sinhorin et al., observed plasma glucose reduction in fish exposed to Roundup Original®^{23,25}.

Conclusion

In summary, we demonstrated that maternal exposure of mice to glyphosate Roundup Original DI®, during pregnancy and lactation, reduced the body weight gain of F1 offspring during adulthood without affect the plasma concentration of glucose and insulin. However, exposure to this herbicide increased the glucose tolerance in the animals at 60 days of life, normalized at 143, but with higher sensitivity to insulin in relation to the control animals.

Declaration of conflicting interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Financial support

This study was financed by the Coordination for the Improvement of Higher Level -or Education- Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

1. Bochner R. Óbito ocupacional por exposição a agrotóxicos utilizado como evento sentinela: quando pouco significa muito. *Visa em debate*, 2015; 3(4): 39-49.

2. Carneiro FF, Pignati W, Rigotto RM, et al. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO, Rio de Janeiro, 1ª parte, 2012, 88 p.
3. Londres F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. 1st ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011, p.190.
4. Galli AJB and Montezuma MC. Glifosato: alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. São Paulo: ACADCOM, 2005, p.66.
5. Junior OPDeA, Santos TCR, Brito NM, et al. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. Quím. Nova, 2002; 24: 589-593.
6. Menezes SM, Tillmann MAA, Dode LB, et al. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. Rev. bras. sementes, 2004; 26: 150-155.
7. Oliveira TG, Favareto AP and Antunes PA. Agrotóxicos: levantamento dos mais utilizados no oeste paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos. IX Fórum Ambiental da Alta Paulista, 2013; 9: 375-390.
8. Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, et al. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. Int J Environ Res Public Health, 2011; 8: 2265-2303.
9. Darbre PD. Overview of air pollution and endocrine disorders. Int J Gen Med, 2018; 11: 191-207.
10. EPA. *US Environmental Protection Agency*. What is Endocrine Disruption? <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>. (2016, accessed 30 November 2016).
11. Romano RM, Romano MA and Oliveira CA. Glifosato como desregulador endócrino químico. *Ambiência*, 2009; 5: 359-372.
12. Eberle C and Ament C. Diabetic and Metabolic Programming: Mechanisms Altering the Intrauterine Milieu. *ISRN Pediatr*, 2012; 2012: 1-11.
13. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp*, 1991; 156: 38-50.
14. Cerf ME. High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction. *Pediatr Diabetes*, 2015; 16: 71-78.
15. Ellsworth L, Harman E, Padmanabhan V, et al. Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. *Reproduction*, 2018; 156: R23-R42.

16. Chevalier N, Fenichel P. Obésité, diabète de type 2 et perturbateurs endocriniens. *Médecine et environnement*, 2016; 45: 88-97.
17. Bakry FA, Ismail SM and El-Atti MSA. glyphosate herbicide induces genotoxic effect and physiological disturbances in *Bulinus truncatus* snails. *Pestic Biochem Physiol*, 2015; 123: 24-30.
18. Bonvallot N, Canlet C, Blas-Y-Estrada F, et al. Metabolome disruption of pregnant rats and their offspring resulting from repeated exposure to a pesticide mixture representative of environmental contamination in Brittany. *Plos One*, 2018; 13: 1-21.
19. Gluszczak L, Loro VL, Pretto A, et al. Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch Environ Contam Toxicol*, 2011; 61: 624-630.
20. Khan A, Shah N, Gul A, et al. Comparative study of toxicological impinge of glyphosate and atrazine (Herbicide) on stress biomarkers: blood biochemical and hematological parameters of the freshwater Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Pol J Environ Stud*, 2016; 25: 1995–2001.
21. Kondera E, Teodorczuk B, Ługowska K, et al. Effect of glyphosate-based herbicide on hematological and hemopoietic parameters in common carp (*Cyprinus carpio L*). *Fish Physiol Biochem*, 2018; 44: 1011-1018.
22. Langiano VC and Martinez CBR. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2008; 147: 222-231.
23. Moura FR, Da Silva Lima RR, Da Costa Marisco P, et al. Effects of glyphosate- based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017; 56: 241-248.
24. Schnabel K, Schmitz R, Von Soosten D, et al. Effects of glyphosate residues and different concentrate feed proportions on performance, energy metabolism and health characteristics in lactating dairy cows. *Arch Anim Nutr*, 2017; 71: 413-427.
25. Sinhoin VD, Sinhoin AP, Teixeira JM, et al. Metabolic and behavior changes in surubim acutely exposed to a glyphosate-based herbicide. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2014; 67: 659-667.
26. Tizhe E, Ibrahim N, Fatihu M, et al. Pancreatic function and histoarchitecture in Wistar rats following chronic exposure to Bushfire® the mitigating role of zinc. *J Int Med Res*, 2018; 0: 1-10.
27. Daruich J, Zirulnik F and Gimenez MS. Effect of the Herbicide glyphosate on Enzymatic Activity in Pregnant Rats and Their Fetuses. *Environ Res*, 2001; 85: 226-231.

28. Cassault-Meyer E, Gress S, Séralini GÉ, et al. An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014; 38: 131-140.
29. Chahoud I, Ligensa A, Dietzel L, et al. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reprod Toxicol*, 1999; 13: 375-381.
30. Jasper R, Locatelli GO, Pilati C, et al. Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. *Interdiscip Toxicol*, 2012; 5: 133-140.
31. Ait Bali Y, Ba-Mhamed S and Bennis M. Behavioral and Immunohistochemical Study of the Effects of Subchronic and Chronic Exposure to glyphosate in Mice. *Front Behav Neurosci*, 2017; 11: 1-13.
32. Beuret CJ, Zirulnik F and Giménez MS. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reprod Toxicol*, 2005; 19: 501-504.
33. Pandey A and Rudraiah M. Analysis of endocrine disruption effect of Roundup® in adrenal gland of male rats. *Toxicol Rep*, 2015; 3: 1075-1085.
34. Milesi MM, Lorenz V, Pacini G, et al. Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide impairs female reproductive outcomes and induces second-generation adverse effects in Wistar rats. *Arch Toxicol*, 2018; 92: 2629-264.
35. Camargo ELRA, Zaccarelli-Magalhães J, Fukushima AR, et al. Comportamento materno: uma revisão da inter-relação com a toxicologia do desenvolvimento em roedores. *Cad Pós-Grad Distúrb Desenvol*, 2017; 17: 8-25.
36. Rosenfeld CS. Bisphenol A and phthalate endocrine disruption of parental and social behaviors. *Front Neurosci*, 2017; 9: 1-15.
37. Palanza P, Nagel SC, Parmigiani S, et al. Perinatal exposure to endocrine disruptors: sex, timing and behavioral endpoints. *Curr Opin Behav Sci*, 2016; 7: 69-75.
38. Howell GE, Mulligan C, Meek E, et al. Effect of chronic p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure on high fat diet-induced alterations in glucose and lipid metabolism in male C57BL/6H mice. *Toxicology*, 2015; 328: 112-122.
39. Padmanabhan V, Cardoso RC and Puttabyatappa M. Developmental Programming, a Pathway to Disease. *Endocrinology*, 2016; 157: 1326-1340.
40. Seco S and Matias A. Origem fetal das doenças do adulto: revisitando a teoria de Barker. *Acta Obstet Ginecol Port*, 2009; 3: 158-168.

41. Veissi M, Jafarirad S, Ahangarpour A, et al. Co-exposure to endocrine disruptors: effect of bisphenol A and soy extract on glucose homeostasis and related metabolic disorders in male mice. *Endocr Regul*, 2018; 52: 76-84.

Table 1 Maternal features and fasting plasma of dams which received 0.5% of glyphosate during pregnancy and lactation.

	CTL	GL	P-value
Body weight (g)	23.20 ± 0.46	22.10 ± 0.42	0.11
Perigonadal fat (mg/mg bw)	0.68 ± 0.07	0.85 ± 0.68	0.12
Pancreas (mg/mg bw)	0.58 ± 0.06	0.91 ± 0.15	0.08
Extensor digitorum longus muscle (mg/mg bw)	0.03 ± 0.002	0.04 ± 0.007	0.06
Soleus muscle (mg/mg bw)	0.02 ± 0.001	0.03 ± 0.003	0.06
Glucose (mg/dl)	105.00 ± 5.83	95.40 ± 4.99	0.24
Insulin (ng/ml)	0.48 ± 0.08	0.49 ± 0.10	0.97

CTL (n = 11) e GL (n = 9). Data are mean ± SEM. Mann-Whitney test and Student's t test. P-value < 0.05.

Table 2 Effect of pre- and postnatal exposure to glyphosate on offspring features and fasting plasma parameters in male mice at 150 days-old.

	CTL-F1	GL-F1	P-value
Body weight (g)	25.00 ± 0,6	23.30 ± 0.76*	0.03
Naso-anal length (cm)	9.28 ± 0.08	9.00 ± 0.13	0.10
Lee Index	315.00 ± 3.02	317.00 ± 3.73	0.73
Retroperitoneal fat (mg/mg bw)	0.19 ± 0.02	0.24 ± 0.04	0.34
Perigonadal fat (mg/mg bw)	1.02 ± 0.07	1.05 ± 0.09	0.77
Extensor digitorum longus muscle (mg/mg bw)	0.04 ± 0.005	0.04 ± 0.003	0.36
Soleus muscle (mg/mg bw)	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.004	0.21
Glucose (mg/dl)	105.00 ± 5.12	107.00 ± 7.14	0.77
Insulin (ng/ml)	0.25 ± 0.03	0.31 ± 0.05	0.28

The symbols * represent significant differences between the groups. CTL (n = 16) e GL-F1 (n = 10). Data are mean ± SEM. Mann-Whitney test and Student's t test. P-value < 0.05.

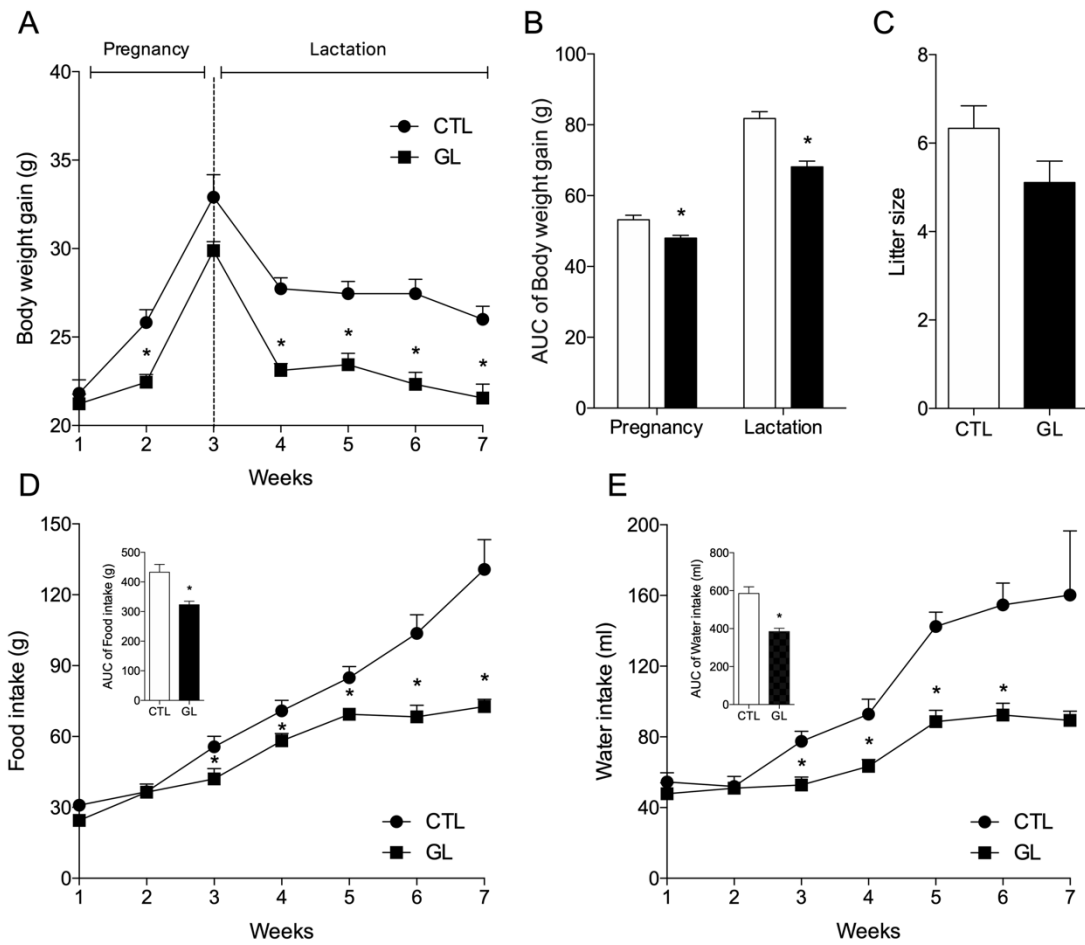


Figure 1 Effect of glyphosate exposure during pregnancy and lactation. (A) Body weight gain during pregnancy and lactation and (B) area under curve of body weight gain. (C) Litter size. (D) Food intake and (E) water intake during pregnancy and lactation. The symbols * represent statistical differences between the groups. CTL (n = 11) and GL (n = 9). Data are mean \pm SEM. Mann-Whitney test and Student's t test. P-value < 0.05.

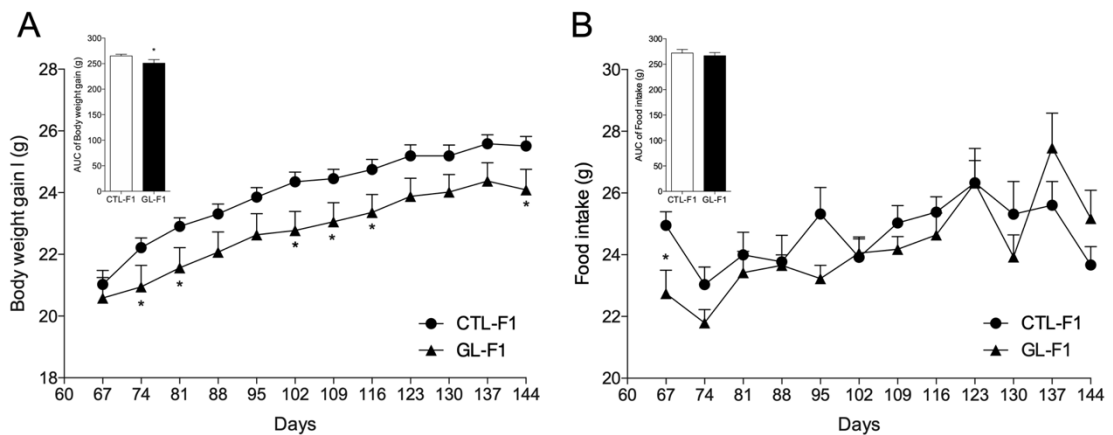


Figure 2 Effect of maternal exposure to glyphosate on F1 offspring. (A) Body weight gain in adult life. (B) Food intake in adult life. The symbols * represent statistical differences between the groups. CTL-F1 (n = 16) and GL-F1 (n = 10). Data are mean \pm SEM. Mann-Whitney test and Student's t test. P-value < 0.05.

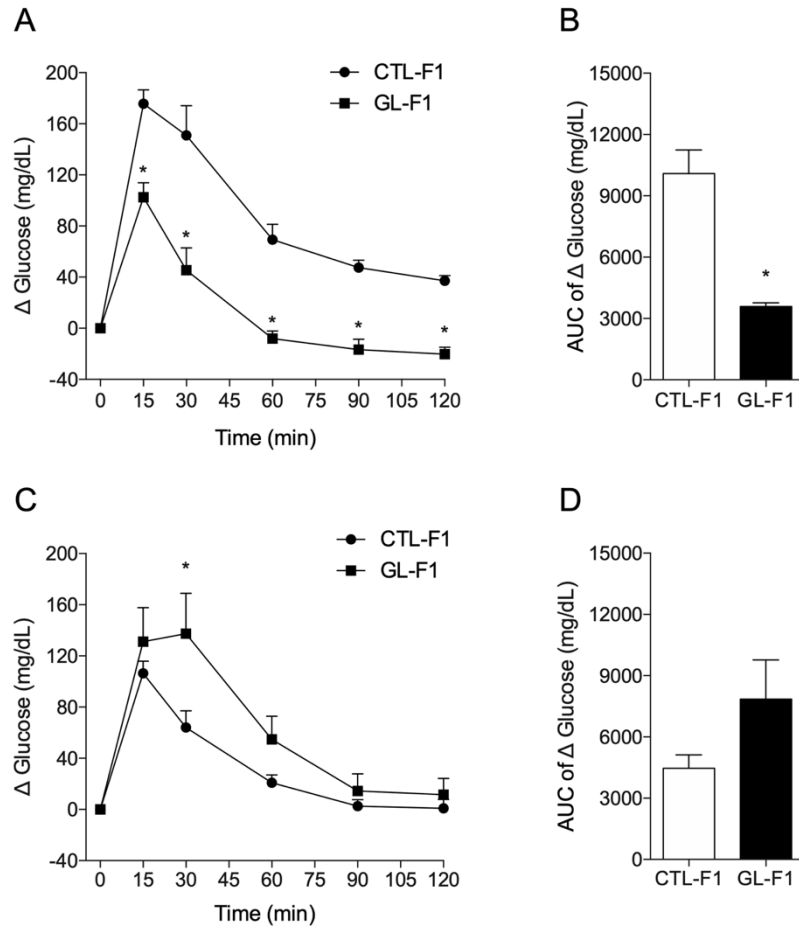


Figure 3 Effect of maternal exposure to glyphosate on glucose homeostasis of F1 offspring. (A) Glucose tolerance test and (B) area under curve at 60 days of life. (C) Glucose tolerance test and (D) area under curve at 143 days of life. The symbols represent statistical difference between the groups. CTL-F1 (n = 12-17) and GL-F1 (n = 5-9). Data are mean ± SEM. Mann-Whitney test and Student's t test. P-value < 0.05.

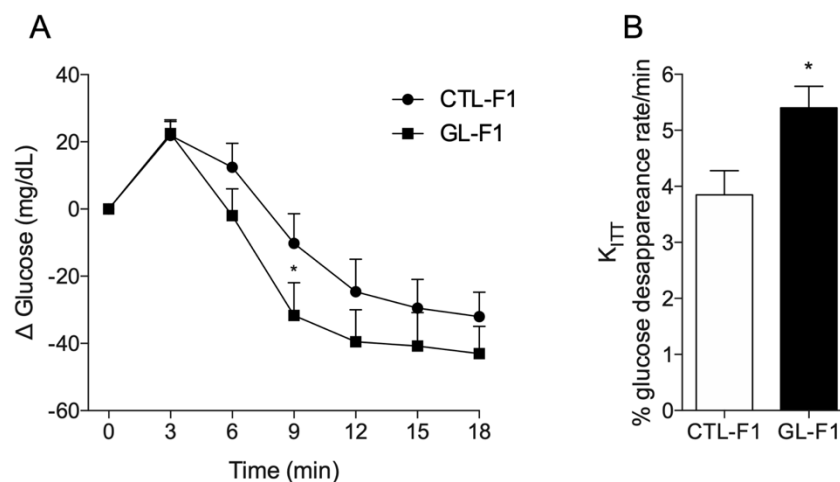


Figure 4 Effect of pre- and postnatal exposure to glyphosate on glucose homeostasis of F1 offspring. (A) Insulin tolerance test at 145 days of life and (B) glucose disappearance rate per minute. The symbols represent statistical difference between the groups. CTL-F1 (n = 15) and GL-F1 (n = 10). Data are mean ± SEM. Mann-Whitney test and Student's t test. P-value < 0.05.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

PRE- AND POSTNATAL EXPOSURE TO GLYPHOSATE ALTERS BODY
PARAMETERS AND GLUCOSE HOMEOSTASIS IN ADULT OFFSPRING MICE
FED WITH A HIGH FAT DIET

PRE- AND POSTNATAL EXPOSURE TO GLYPHOSATE ALTERS BODY PARAMETERS AND GLUCOSE HOMEOSTASIS IN ADULT OFFSPRING MICE FED WITH A HIGH FAT DIET

Ellen Carolina Zawoski Gomes¹, Jakeline Liara Teleken¹, Rodrigo Vargas¹, Ana Claudia Paiva Alegre-Maller², Maria Lúcia Bonfleur¹, Sandra Lucinei Balbo¹.

¹Endocrine Physiology and Metabolism Laboratory, Center of Biological Sciences and Health, State University of Western Paraná, Cascavel, Paraná, Brazil.

²Nucleus of Biological Sciences, University Center Assis Gurgacz Foundation, Cascavel, Paraná, Brazil.

Abstract

Aim: Verify the effect of pre- and postnatal exposure to glyphosate under body parameters and glucose homeostasis in adult offspring male mice, fed with a high fat diet.

Methods: Female mice C56BL/6 received 0.5% of glyphosate Roundup Original DI® in drinking water (GL group) or pure water (CTL group), during pregnancy and lactation. From 60 to 150 days of life the offspring (F1) were fed with a high-fat diet (HFD), giving rise to two groups: CTL-HFD-F1 and GL-HFD-F1. The glucose tolerance test and insulin tolerance test were performed and, a week later, the animals were euthanized. Body features and fasting glucose and insulin were analyzed.

Results: The body weight and retroperitoneal and perigonadal fats weight were lower in the GL-HFD-F1 group than in the CTL-HFD-F1 group. Although both groups had similar values of glycemia and insulinemia, the GL-HFD-F1 group showed higher glucose tolerance and higher insulin sensitivity when compared to the CTL-HFD-F1 group.

Conclusion: Mice exposed to glyphosate during gestation and lactation and fed with high-fat diet in adult life had a lower the body weight and fat deposits, as well as a higher glucose tolerance compared to the control group fed with a high-fat diet.

Keywords: Glyphosate, obesity, metabolic programming, glucose homeostasis.

Correspondent author:

Sandra Lucinei Balbo, State University of Western Paraná, Center of Biological Sciences and Health, Cascavel, Paraná, Brazil.

E-mail address: sbalbo@hotmail.com

Introduction

The glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine) is the active ingredient in numerous herbicide formulations used worldwide for weed control. The commercial formulations of glyphosate, such as Roundup®, include a large number of other chemical compounds, which act as adjuvants, preservatives, solvents or surfactants, making them more toxic than the active ingredient isolated¹. Its mechanism of action occurs by the inhibition of the shikimate pathway, which is essential for the synthesis of essential aromatic amino acids, such as phenylalanine, tyrosine and tryptophan present in plants, fungi and bacteria²⁻⁴. The fact that this metabolic process is not present in animals is the main reason for the use of the active ingredient of glyphosate in the production of herbicides effective and theoretically safe for human health^{2,5}. However, numerous studies indicate that glyphosate may cause toxicity in various tissues and/or organs and in different species⁶⁻¹⁰.

Glyphosate has been classified as an endocrine disruptor chemical^{8,11,12}. These substances are able to interfere directly in the endocrine system, mimicking the action of natural hormones, and thus impair the "synthesis, secretion, transport, metabolism, binding, action or elimination of hormones present in the body, which are responsible for homeostasis, reproduction and development"¹³.

Exposures to endocrine disruptors chemicals have become new risk factors for the development of metabolic diseases, correlated with an increase in the prevalence of overweight, obesity and diabetes¹⁴. These substances may be involved with dysfunctions in glycemic homeostasis, however, the literature is scarce and controversial. Langiano et al., reported an increase in the glycemia of fish exposed to glyphosate¹⁵, whereas, Sinhori et al. and Moura et al., observed the reduction of this parameter in fish exposed to the same compound^{16,17}. Tizhe et al., verified that the direct exposure to glyphosate increased, non-significantly, the glycemia and insulinemia in rats¹⁸. On the other hand, Bonvalloti et al., demonstrated that a mixture with eight pesticides, among them the glyphosate, did not alter the plasma concentration of glucose¹⁹. In addition, low-dose perinatal exposures of DDT associated with high-fat diet in adulthood, lead to decreased glucose tolerance, increased fasting insulin and HOMA-IR, which is an indicative of insulin resistance and increased risk of development of type 2 Diabetes Mellitus²⁰.

The contact with the endocrine disruptors chemicals at critical times for development, such as gestation and lactation, may alter the developmental trajectory of the fetus and cause permanent changes in tissue and/or organ function^{21,22}. The genetic susceptibility along with insults occurring in the perinatal period (first hit) leads to reorganization of various organ systems. However, authors describe that only this factor is not enough to alter the adult

phenotype. It is necessary the second hit, that is, adverse exposures during the postnatal life, in order to amplify the factors that culminate in diseases²¹.

Studies have shown that maternal insult, caused by different formulations of glyphosate, causes changes in the phenotype of the offspring, leading to permanent morphological and/or physiological changes^{8,23-25}. However, there are no reports in the literature on the effects of maternal exposure to glyphosate associated with a second insult on the offspring. Thus, the aim of the present study is to evaluate the body parameters and glucose homeostasis of pre- and postnatal mice exposed to glyphosate fed with a high-fat diet in adulthood.

Material and Methods

Chemicals

The pesticide used in this study is a commercial formulation marketed in Brazil as Roundup Original DI® by Monsanto, which contains 445 g/L of N- phosphonomethylglycine diammonium salt (44.5% m/v) (equivalent to 370 g/L (37.0% m/v) of glyphosate acid).

Animals

All experimental procedures were approved by the University's Ethics Committee on Animal Use (CEUA - State University of Western Paraná) (Annex A). Male and female C57BL/6 mice (60-90 days of life, 20-25g of body weight) were housed in polypropylene box (30x20x13 cm; 2-3 animals/box) under conditions of temperature (28 ± 2 °C) and luminosity (12 hours dark/light) monitored. The animals were feed with rodent standard chow (Supralab, Brazil) and pure water *ad libitum*. After acclimatization period (7 days), two receptive female mice and one sexually active adult male mice were housed in a cage during the dark period (7 p.m. – 7 a.m.) for mating. On the next morning, vaginal smears were obtained from all the female mice. The pregnancy was confirmed by the presence of spermatozoa on the vaginal smears or when the female remained four days at the diestrus phase on estral cycle.

Glyphosate administration

Once the pregnancy was confirmed, female mice were randomly separated into two experimental groups: the control group (CTL, n = 11) received pure water during the pregnancy (21 days) and lactation (20 days), while the glyphosate group (GL, n = 9) received 0.5% of glyphosate (Roundup Original DI®, Monsanto, Brazil) in drinking water during the same period.

Offspring

The birth of the pups (F1) was considered as postnatal day 0. Weaning occurred on the 30th postnatal day and up to 60 days of life, F1 male mice were fed with standard rodent chow (Supralab, Brazil) and pure water *ad libitum*. From 60 to 150 days of life, the offspring were fed a high-fat diet (HFD) for mice, forming two experimental groups: CTL-HFD-F1 and GL-HFD-F1. A part of the offspring of CTL mothers were fed with standard chow (CTL-F1) to evaluate the effectiveness of HFD for induction of obesity. All the animals received drinking water *ad libitum*. The body weight and food intake were evaluated weekly.

Diet composition

The standard chow for laboratory rodents was obtained from Supralab, Brazil. Its composition has 70% of carbohydrates, 20% of proteins and 10% of fats and contain 3.8 Kcal/g. The HFD for mice has in its composition starch (29.95%), casein (14%), sucrose (12%), soybean oil (4%), microcrystalline cellulose (5%), mineral mix AIN 93 M (3.5%), vitamins mix AIN 93 M (1%), L-cystine (0.3%), choline bitartrate (0.25%) and lard (30%), and contain 5.35 Kcal/g.

Glucose Tolerance Test

At 143 days of life, male mice F1 remain fasted for 8 hours and the oral glucose tolerance test was performed. The blood was collected from the tail to check fasting glucose (time 0), using a glucometer and test strips (G-Tech Free®, SD Biosensor, Coreia). After glucose loading (1.5 g/kg) by gavage, the blood glucose was again verified at times 15, 30, 60, 90 and 120 minutes.

Insulin Tolerance Test

Two days after the oral glucose tolerance test, at 145 days of life, the insulin tolerance test was performed. After a 2-hour fast the blood was collected from the tail to verify the fasting glucose (time 0). The regular insulin was applied (0.75 IU/kg), intraperitoneally, and the glycemia was again verified at times 3, 6, 9, 12, 15 and 18 minutes.

Euthanasia

At 150 days of life and after an 8-hour fast the glycemia was checked (G-Tech Free®, SD Biosensor, Coreia). The mice were weighed and anesthetized with xylazine (9 mg / kg) (Anasedan®, Vetbrands, Brazil) and ketamine (90 mg / kg) (Dopalen®, Vetbrands, Brazil). Once the skin reflex was absent, the naso-anal length was measured and the blood was collected

by cardiac puncture, using a heparinized syringe. The blood was transferred into an eppendorf tube, centrifuged (12,600 g, 10 minutes, 4 °C) and the plasma was stored at -80 °C for insulin dosing, by radioimmunoassay. Subsequently, laparotomy was performed for extraction and weighing of white retroperitoneal and perigonadal adipose tissue.

Data analyses and statistics

Data were mean \pm standard error of the mean. The Shapiro-Wilk test was used for normality analysis. Parametric data were analyzed using the unpaired Student t-test. Non-parametric data were analyzed using the Mann-Whitney test. The level of significance was set at $P < 0.05$. The analyzes were performed in the statistical program GraphPad Prism version 6.0 for MAC (GraphPad Software ©) and statistical program R (R Coreteam, 2015).

Results

Mice fed with a high-fat diet increase body and plasma parameters in adulthood

The high-fat diet during the adult life increased the body weight ($P < 0.0001$), the naso-anal length ($P = 0.0198$), the Lee Index ($P < 0.0001$) and the retroperitoneal and perigonadal adipose tissues weight ($P < 0.0001$) in CTL-HFD-F1 group when compared with the CTL-F1 group (Tab. 1). Fasting glycemia was higher in CTL-HFD-F1 group ($P = 0.0028$), however, fasting insulinemia was similar in both CTL-F1 and CTL-HFD-F1 groups ($P = 0.0617$). These changes in body and plasmatic parameters demonstrate that HFD was effective in inducing obesity.

Pre- and postnatal exposure to glyphosate associated with high-fat diet fed reduces body weight gain and visceral fat in adult male mice

Mice exposed to glyphosate in pre- and postnatal periods and fed with a high-fat diet in adulthood (GL-HFD-F1) had a reduction on the body weight gain ($P = 0.0029$), Lee Index ($P = 0.0228$) and in the deposits of retroperitoneal and perigonadal adipose tissue ($P = 0.0143$; $P = 0.0047$, respectively), when compared to the CTL-HFD-F1 group. The naso-anal length was similar in both experimental groups ($P = 0.1296$). Fasting glycemia and insulinemia were similar in both CTL-HFD-F1 and GL-HFD-F1 groups ($P = 0.2952$; $P = 0.1026$, respectively) (Tab. 2).

Glyphosate exposure during intrauterine life and lactation change the glucose sensibility in adult mice fed with a high-fat diet

At 143 days of life and after glucose loading (1.5 g/kg) glycemia in male offspring mice reached maximal levels at 15 min in all groups in the glucose tolerance test. Mice of mothers exposed to glyphosate and fed with a high-fat diet had lower value of glycemia in T30 ($P = 0.0282$) and in the area under curve ($P = 0.0446$) when compared to the CTL-HFD-F1 group (Fig. 1). At 145 days of life and after administration of regular insulin (0.75 IU/kg) both groups had a reduction in plasma glucose concentration. Interestingly, glucose decay was significantly higher in the GL-HFD-F1 group compared to the CTL-HFD-F1 group ($P = 0.0152$) (Fig 2), indicating higher insulin sensitivity.

Discussion

Exposure to environmental chemicals such as glyphosate occurs through ingestion of food and water, by inhaling gases and particulates present in the air and by absorption through the skin. These products can be transported through the placenta and during breastfeeding, making pregnant women and children vulnerable to this exposure. In addition, contact with endocrine disruptors chemicals during the developmental stages can cause late effects on offspring²⁷. In non-shown data, female C57BL/6 mice exposed to glyphosate Roundup Original DI®, during pregnancy and lactation, had a reduction on body weight gain and food and water intake in relation to the non-exposed group. It is important to note that the litter size was the same in both groups. Similar results were observed by Daruich et al. and Beuret et al.^{24,28}.

Several hypotheses have emerged in the fields of research to try to explain the onset of disease in adult life. Hales and Barker proposed the “thrifty phenotype hypothesis”, in which the fetus undergoes metabolic adaptations, through redistribution of energy and nutrients from vital organs, to the detriment of organs less critical for initial development²⁹. Another hypothesis called “predictive adaptive response”, explains that the fetus estimates and predicts the postnatal environment, promoting adaptations in the uterine life, in order to guarantee its survival until the reproductive age³⁰. However, recent findings support the “second hit” hypothesis to explain the development of diseases in adults. This hypothesis suggests that genetic susceptibility along with insults occurring in the perinatal period (first hit) may not be sufficient to alter the adult phenotype. Thus, endocrine imbalance due to perinatal insults combined with stressors and/or postnatal exposures activate or amplify underlying defects, culminating in diseases²¹.

In the present study, we evaluated the effects of perinatal insult, by the maternal exposure to glyphosate (first hit) and the second insult, by the HFD feeding (second hit). Firstly, we evaluated the effectiveness of HFD for obesity induction in the offspring of mothers not exposed to glyphosate. The HFD fed increased body weight and white adipose tissue

retroperitoneal and perigonadal, as well as fasting glycemia in the CTL-HFD-F1 group in relation to the CTL-F1 group, confirming the efficacy of HFD to induce obesity. Interestingly, the GL-HFD-F1 group (exposed to glyphosate during intrauterine life and lactation and fed with HFD in adulthood) had a reduction in body weight gain, Lee index and fat accumulation in relation to the CLT-HFD-F1 group. Several studies have reported changes in the digestive system from contact with glyphosate. Chłopecka et al. showed in vitro jejunal motility disorders during and after contact with the herbicide glyphosate in doses not toxic to humans². Lozano et al. reported that incubation with Roundup® causes toxicity in the mammalian intestinal microbiota. The results indicate dysbiosis, characterized by the decrease of the intestinal cells, with consequent reduction of the nutrient absorption³¹. Ait Bali et al. agree, showing that the reduction in body weight gain of mice exposed to glyphosate is associated with malabsorption of nutrients, induced by damage to the gastrointestinal tract, or by inhibition of protein synthesis³². Thus, it is suggested that maternal exposure to glyphosate Roundup Original DI® during critical periods to development may alter the functioning and/or morphology of the digestive system organs, implying in a reduction of nutrient absorption, with consequent body weight loss and deposition of adipose tissue.

Due to the potential endocrine disrupting effect, glyphosate is described as an endocrine disruptor chemical. These products may have potential influences on glucoregulatory hormones^{8,11,12,33}. In the present study, it was observed that fasting glycemia and insulinemia were similar between the CLT-HFD-F1 and GL-HFD-F1 groups. However, glucose tolerance and insulin sensitivity were higher in GL-HFD-F1 group, indicating that perinatal exposure to glyphosate influences on glycemic homeostasis. Tizhe et al. observed a non-significant increase in glycemia and insulinemia of rats exposed to a commercial formulation of glyphosate¹⁸. Bonvalloti et al. observed that maternal exposure to the mixture of eight pesticides, among them glyphosate, increased the hepatic glucose concentration of mothers and their progeny¹⁹. Ding et al. found that paternal exposure to Bisphenol A (BPA) (another endocrine disruptor chemical used in plastic production) increased glucose concentration after glucose loading (2 g/kg) in adult rats fed with a standard diet and more pronounced when fed with a HFD. However, no changes were observed in the glycemic and lipid metabolism of adult offspring³⁴. Several authors suggest that exposure to different endocrine disruptors chemicals, including glyphosate, may cause oxidative stress, with mitochondrial dysfunctions, causing damage to glycemic and lipid metabolism^{18,19,33,34}. It is noteworthy that mice exposed to glyphosate during intrauterine life and lactation and fed a high-fat diet in adulthood (GL-HFD-F1) had a reduction in body weight gain and fat accumulation in relation to the CLT-HFD-F1. It is suggested that these

changes in body parameters may contribute to higher glucose tolerance and increase in insulin sensitivity in the GL-HFD-F1 group.

Conclusion

Exposure to glyphosate Roundup Original DI® during the pre- and postnatal period decreased body weight gain and the accumulation of visceral fat in mice fed with a high-fat diet during adulthood, as well as increased glucose tolerance and insulin sensitivity.

Declaration of conflicting interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Financial support

This study was financed by the Coordination for the Improvement of Higher Level -or Education- Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

1. Guerrero Schimpf M, Milesi MM, Ingaramo P, et al. Neonatal exposure to a glyphosate based herbicide alters the development of the rat uterus. *Toxicology*, 2016; 1:2-14.
2. Chłopecka M, Mendel M, Dziekan N, et al. Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses – In vitro study. *Pestic Biochem Physiol*, 2014; 113: 25-30.
3. Freitas RF, Albarello JB, Dal Magro R, et al. Fitotoxicidade indireta do herbicida glifosato na videira. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/97290/1/freitas-Resumos-IC-2013.pdf> (2013, accessed 18 August 2016).
4. Yamada T and Castro PRC. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. <https://www.stopogm.net/sites/stopogm.net/files/webfm/plataforma/EfeitosGlifosatoPlantasImplica%C3%A7%C3%B5es.pdf> (2007, accessed 18 August 2016).
5. Williams GM, Kroes R and Munro IC. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2000; 3: 117-165.
6. Chan YC, Chang SC, Hsuan SL, et al. Cardiovascular effects of herbicides and formulated adjuvants on isolated rat aorta and heart. *Toxicol In Vitro*, 2007; 21: 595-603.

7. Neiva TJC, Moraes ACR, Schwyzer R, et al. In vitro effect of the herbicide glyphosate on human blood platelet aggregation and coagulation. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2010; 32: 291-294.
8. Romano RM, Romano MA, Bernardi MM, et al. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Arch Toxicol*, 2010; 84: 309-317.
9. Séralini GE, Clair E, Mesnage R. et al. Republished study: long-term toxicity of a roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environ Sci Eur*, 2014; 26: 14-31.
10. Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ*, 2018; 616: 255-268.
11. Darbre PD. Overview of air pollution and endocrine disorders. *Int J Gen Med*, 2018; 11: 191-207.
12. Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, et al. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int J Environ Res Public Health*, 2011; 8: 2265-2303.
13. EPA. US Environmental Protection Agency. What is Endocrine Disruption? <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>. (2016, accessed 30 November 2016).
14. Regnier SM, Kirkley AG, Ruiz D, et al. Diet-dependence of metabolic perturbations mediated by the endocrine disruptor tolylfluanid. *Endocr Connect*, 2018; 7: 159-168.
15. Langiano VC and Martinez CBR. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2008; 147: 222-231.
16. Sinhorin VD, Sinhorin AP, Teixeira JM, et al. Metabolic and behavior changes in surubim acutely exposed to a glyphosate-based herbicide. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2014; 67: 659-667.
17. Moura FR, Da Silva Lima RR, Da Costa Marisco P, et al. Effects of glyphosate- based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017; 56: 241-248.
18. Tizhe E, Ibrahim N, Fatihu M, et al. Pancreatic function and histoarchitecture in Wistar rats following chronic exposure to Bushfire – the mitigating role of zinc. *J Int Med Res*, 2018; 0: 1-10.

19. Bonvallet N, Canlet C, Blas-Y-Estrada F, et al. Metabolome disruption of pregnant rats and their offspring resulting from repeated exposure to a pesticide mixture representative of environmental contamination in Brittany. *Plos One*, 2018; 13: 1-21.
20. La Merrill M, Karey E, Moshier E, et al. Perinatal Exposure of Mice to the Pesticide DDT Impairs Energy Expenditure and Metabolism in Adult Female Offspring. *Plos One*, 2014; 9: 1-11.
21. Padmanabhan V, Cardoso RC and Puttabyatappa M. Developmental Programming, a Pathway to Disease. *Endocrinology*, 2016; 157: 1326-1340.
22. Seco S and Matias A. Origem fetal das doenças do adulto: revisitando a teoria de Barker. *Acta Obstet Ginecol Port*, 2009; 3: 158-168.
23. Dallegrave E, Mantese FD, Oliveira RT, et al. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol*, 2007; 81: 665-673.
24. Daruich J, Zirulnik F and Gimenez MS. Effect of the Herbicide glyphosate on Enzymatic Activity in Pregnant Rats and Their Fetuses. *Environ Res*, 2001; 85: 226-231.
25. Romano MA, Romano RM, Santos LD, et al. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch Toxicol*, 2012; 86: 663-673.
26. Cassault-Meyer E, Gress S, S eralini G E, et al. An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014; 38: 131-140.
27. WHO. World Health Organization. Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs). <http://www.who.int/ceh/risks/cehemerging2/en/> (2018, accessed 01 August 2018).
28. Beuret CJ, Zirulnik F and Gim enez MS. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reprod Toxicol*, 2005; 19: 501-504.
29. Hales CN and Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull*, 2001; 60: 5-20.
30. Gluckman PD and Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab*, 2004; 15: 183-187.
31. Lozano VL, Defarge N, Rocque LM, et al. Sex-dependent impact of Roundup on the rat gut microbiome. *Toxicology Reports*, 2018; 5: 96-107.
32. Ait Bali Y, Ba-Mhamed S and Bennis M. Behavioral and Immunohistochemical Study of the Effects of Subchronic and Chronic Exposure to glyphosate in Mice. *Front Behav Neurosci*, 2017; 11: 1-13.

33. Veissi M, Jafarirad S, Ahangarpour A, et al. Co-exposure to endocrine disruptors: effect of bisphenol A and soy extract on glucose homeostasis and related metabolic disorders in male mice. *Endocr Regul*, 2018; 52: 76-84.
34. Ding S, Fan Y, Zhao N, et al. High-fat diet aggravates glucose homeostasis disorder caused by chronic exposure to bisphenol A. *Int J Endocrinol*, 2004; 221: 167-179.

Table 1 Body and plasmatic parameters of F1 offspring mice fed with a high-fat diet in adulthood.

	CTL-F1	CTL-HFD-F1	P-value
Body weight (g)	25.00 ± 0.36	35.70 ± 1.30*	< 0.0001
Naso-anal length (cm)	9.28 ± 0.08	9.57 ± 0.08*	0.02
Lee index	315.00 ± 3.02	343.00 ± 3.80*	< 0.0001
Retroperitoneal fat (mg/mg bw)	0.19 ± 0.02	1.72 ± 0.18*	< 0.0001
Perigonadal fat (mg/mg bw)	1.02 ± 0.07	4.80 ± 0.33*	< 0.0001
Glucose (mg/dl)	105.00 ± 5.12	131.00 ± 6.43*	0.003
Insulin (ng/ml)	0.26 ± 0.03	0.43 ± 0.08	0.06

The symbols * represent significant differences between the groups. CTL-F1 (n = 16) e CTL-HFD-F1 (n = 15). Data are mean ± SEM. Mann-Whitney test and Student's t test. P-value < 0.05.

Table 2 Effect of pre-and postnatal exposure to glyphosate on offspring features and plasmatic parameters in male mice fed with a high-fat diet in adult life.

	CTL-HFD-F1	GL-HFD-F1	P-value
Body weight (g)	35.70 ± 1.30	28.30 ± 0.81*	0.003
Naso-anal length (cm)	9.57 ± 0.08	9.33 ± 0.11	0.13
Lee index	343.00 ± 3.80	327.00 ± 4.59*	0.02
Retroperitoneal fat (mg/mg bw)	1.72 ± 0.18	0.90 ± 0.17*	0.01
Perigonadal fat (mg/mg bw)	4.80 ± 0.33	2.84 ± 0.50*	0.005
Glucose (mg/dl)	131.00 ± 6.43	144.00 ± 2.65	0.30
Insulin (ng/ml)	0.43 ± 0.08	0.20 ± 0.04	0.10

The symbols * represent significant differences between the groups. CTL-HFD-F1 (n = 15) e GL-HFD-F1 (n = 6). Data are mean ± SEM. Mann-Whitney test and Student's t test. P-value < 0.05.

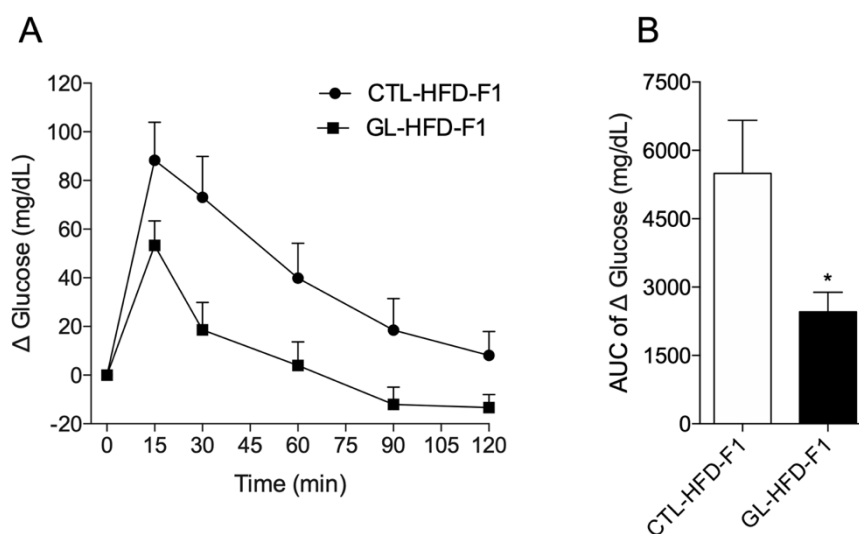


Figure 5 Effect of pre- and postnatal exposure to glyphosate on glucose homeostasis of F1 offspring mice fed with a high-fat diet in adulthood. (A) Glucose tolerance test and (B) area under curve at 143 days of life. The Symbols * represent statistical difference between the groups. CTL-HFD-F1 (n = 8) and GL-HFD-F1 (n = 6). Data are mean \pm SEM. Mann-Whitney test and Student's t test. P-value < 0.05.

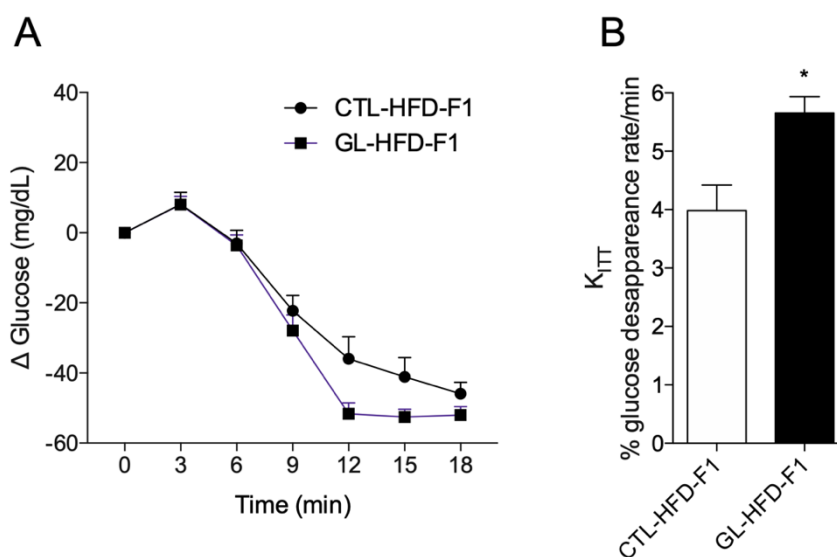


Figure 6 Effect of maternal exposure to glyphosate on glucose homeostasis of F1 offspring mice fed with a high-fat diet in adulthood. (A) Insulin tolerance test at 145 days of life and (B) glucose disappearance rate per minute. The Symbols * represent statistical difference between the groups. CTL-HFD-F1 (n = 8) and GL-HFD-F1 (n = 6). Data are mean \pm SEM. Mann-Whitney test and Student's t test. P-value < 0.05.

ANEXO A – Parecer de Protocolo do CEUA**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado “Efeito da exposição perinatal ao glifosato em camundongos fêmeas sobre a homeostase glicêmica e hepática da prole adulta”, sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 16/09/2016

Prof. Dr. Dirceu Baumgartner
Coordenador Suplente do CEUA
Portaria nº 3730/2016 - GRE

ANEXO B – Diretrizes de submissão

1. Open Access

Journal of International Medical Research is an open access, peer-reviewed journal. Each article accepted by peer review is made freely available online immediately upon publication, is published under a Creative Commons license and will be hosted online in perpetuity. Publication costs of the journal are covered by the collection of a page charge which is paid by the funder, institution or author of each manuscript upon acceptance. There is no charge for submitting a paper to the journal.

For general information on open access at SAGE please visit the Open Access page or view our Open Access FAQs.

2. Open Access publication charge

Publication in the journal is on a page charge basis, the current rate being 325 GBP (+VAT where applicable) per printed journal page. This page charge is payable when a manuscript is accepted after peer review, before it is published. The page charge is subject to taxes where applicable. Tax-exempt status can be indicated by providing appropriate registration numbers when payment is requested. Please see further details here.

All figures submitted in colour will be printed online and in print issue free of charge.

3. Article types

Journal of International Medical Research welcomes original articles which demonstrate strong evidence of clinical applicability, are scientifically robust and highly appropriate for an international general medical readership.

The following article types are permitted: Review, Meta-Analysis, Case Report, Pre-Clinical Research Report and Clinical Research Report.

Research Reports should be divided into Introduction, Patients & Methods/Materials & Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Declaration of Conflicting Interests and References.

Review articles and other types of papers may take their own relevant main headings.

Case reports should be of general interest rather than specialist interest. They must be likely to change routine clinical practice in some meaningful way. Rarity alone is not an appropriate criterion for acceptance. Retrospective case record analyses are discouraged and unlikely to be accepted. Case reports should be divided into Introduction, Case Report, Discussion, Acknowledgements, Declaration of Conflicting Interests and References.

Traditional Chinese Medicine studies are considered if it is clear what the active ingredient is. It must have been isolated and shown to have an acceptable standard of efficacy and safety through randomized controlled trials.

Symposium proceedings, summaries of presentations or collections of medical, pre-clinical or clinical data on a specific topic are welcome for consideration as Supplements and are subject to peer review. Please contact JIMR.admin@sagepub.com for more information on supplements.

Studies involving cell cultures and animal models are considered if they are supported by a clinical study.

Please note that small-scale, localized and pilot studies are discouraged and unlikely to be accepted. Replication in a local sample is not a reason for acceptance – the rationale for the study must be demonstrated.

4. Editorial policies

5. Peer review policy

Please explain within your cover letter why you think the paper suitable for publication. Following a preliminary triage to select submissions suitable for Journal of International Medical Research, papers are sent out for external peer review by the Managing Editor to at least two relevant specialists. This process will be executed in a robust fashion but in as short a time as possible. After peer review, the paper may be accepted, revisions requested, or rejected; this decision is taken by the Managing Editor only.

Journal of International Medical Research utilizes a single-blind peer-review process in which the reviewer's name and information are withheld from the author. Please note that the Editors are not obliged to invite any recommended/opposed reviewers to assess your manuscript.

If the paper is accepted, the page charge fee is due. After payment is received, the manuscript is assigned to a qualified scientific editor who will perform a combination of standard copy-editing, scientific content editing and English language editing.

The editorial and scientific queries will be raised directly to authors and must be answered to the satisfaction of the journal, before a final typeset proof is produced.

The final manuscript will be published online here:
<http://imr.sagepub.com/content/early/recent>.

6. Authorship

Papers should only be submitted for consideration once consent is given by all contributing authors. Those submitting papers should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors.

The list of authors should include all those who can legitimately claim authorship. This is all those who:

Made a substantial contribution to the concept or design of the work; or acquisition, analysis or interpretation of data,

Drafted the article or revised it critically for important intellectual content,

Approved the version to be published,

Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Authors should meet the conditions of all of the points above. When a large, multicentre group has conducted the work, the group should identify the individuals who accept direct responsibility for the manuscript. These individuals should fully meet the criteria for authorship. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group alone does not constitute authorship, although all contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the Acknowledgments section. Please refer to the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) authorship guidelines for more information on authorship.

Authors should meet the conditions of all of the points above. When a large, multicentre group has conducted the work, the group should identify the individuals who accept direct

responsibility for the manuscript. These individuals should fully meet the criteria for authorship.

Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group alone does not constitute authorship, although all contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the Acknowledgments section. Please refer to the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) authorship guidelines for more information on authorship.

7. Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an Acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, or a department chair who provided only general support.

7.1 Writing assistance

Individuals who provided writing assistance, e.g. from a specialist communications company, do not qualify as authors and so should be included in the Acknowledgements section. Authors must disclose any writing assistance – including the individual's name, company and level of input – and identify the entity that paid for this assistance.

It is not necessary to disclose use of language polishing services.

Any acknowledgements should appear first at the end of your article prior to your Declaration of Conflicting Interests (if applicable), any notes and your References.

8. Funding

Journal of International Medical Research requires all authors to acknowledge their funding in a consistent fashion under a separate heading. Please visit the Funding Acknowledgements page on the SAGE Journal Author Gateway to confirm the format of the acknowledgment text in the event of funding, or state that: This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

9. Declaration of conflicting interests

It is the policy of Journal of International Medical Research to require a declaration of conflicting interests from all authors enabling a statement to be carried within the paginated pages of all published articles.

Please ensure that a 'Declaration of Conflicting Interests' statement is included at the end of your manuscript, after any acknowledgements and prior to the references. If no conflict exists, please state that 'The Author(s) declare(s) that there is no conflict of interest'.

For guidance on conflict of interest statements, please see the ICMJE recommendations.

10. Research ethics and patient consent

Medical research involving human subjects must be conducted according to the World Medical Association Declaration of Helsinki.

Submitted manuscripts should conform to the ICMJE Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals, and all papers reporting animal and/or human studies must state in the methods section that the relevant Ethics Committee or Institutional Review Board provided (or waived) approval. Please ensure that you have provided the full name and institution of the review committee, in addition to the approval number.

For research articles, authors are also required to state in the methods section whether participants provided informed consent and whether the consent was written or verbal.

Information on informed consent to report individual cases or case series should be included in the manuscript text. A statement is required regarding whether written informed consent for patient information and images to be published was provided by the patient(s) or a legally authorized representative.

Please also refer to the ICMJE Recommendations for the Protection of Research Participants

All research involving animals submitted for publication must be approved by an ethics committee with oversight of the facility in which the studies were conducted. The journal has adopted the Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare for Veterinary Journals published by the International Association of Veterinary Editors.

11. Clinical trials

Journal of International Medical Research endorses the ICMJE requirement that clinical trials are registered in a WHO-approved public trials registry at or before the time of first patient enrolment. However, consistent with the AllTrials campaign, retrospectively registered trials will be considered if the justification for late registration is acceptable. The trial registry name and URL, and registration number must be included at the end of the abstract.

12. Reporting guidelines

The relevant EQUATOR Network reporting guidelines should be followed depending on the type of study. For example, all randomized controlled trials submitted for publication should include a completed CONSORT flow chart as a cited figure and the completed CONSORT checklist should be uploaded with your submission as a supplementary file. Systematic reviews and meta-analyses should include the completed PRISMA flow chart as a cited figure and the completed PRISMA checklist should be uploaded with your submission as a supplementary file. The EQUATOR wizard can help you identify the appropriate guideline.

Other resources can be found at NLM's Research Reporting Guidelines and Initiatives.

13. Data

SAGE acknowledges the importance of research data availability as an integral part of the research and verification process for academic journal articles.

Journal of International Medical Research requests all authors submitting any primary data used in their research articles if the articles are accepted to be published in the online version of the journal, or provide detailed information in their articles on how the data can be obtained. This information should include links to third-party data repositories or detailed contact information for third-party data sources. Data available only on an author-maintained website will need to be loaded onto either the journal's platform or a third-party platform to ensure continuing accessibility. Examples of data types include but are not limited to statistical data files, replication code, text files, audio files, images, videos, appendices, and additional charts and graphs necessary to understand the original research. [The editor may consider limited embargoes on proprietary data.] The editor can also grant exceptions for data that cannot legally or ethically be released. All data submitted should comply with Institutional or Ethical Review

Board requirements and applicable government regulations. For further information, please contact the editorial office at JIMR.editor@sagepub.co.uk.

14. Publishing policies

15. Publication ethics

SAGE is committed to upholding the integrity of the academic record. We encourage authors to refer to the Committee on Publication Ethics' International Standards for Authors and view the Publication Ethics page on the SAGE Author Gateway.

15.1 Plagiarism

Journal of International Medical Research and SAGE take issues of copyright infringement, plagiarism or other breaches of best practice in publication very seriously. We seek to protect the rights of our authors and we always investigate claims of plagiarism or misuse of published articles. Equally, we seek to protect the reputation of the journal against malpractice. Submitted articles may be checked with duplication-checking software. Where an article, for example, is found to have plagiarized other work or included third-party copyright material without permission or with insufficient acknowledgement, or where the authorship of the article is contested, we reserve the right to take action including, but not limited to: publishing an erratum or corrigendum (correction); retracting the article; taking up the matter with the head of department or dean of the author's institution and/or relevant academic bodies or societies; or taking appropriate legal action.

15.2 Prior publication

If material has been previously published, it is not generally acceptable for publication in a SAGE journal. However, there are certain circumstances where previously published material can be considered for publication. Please refer to the guidance on the SAGE Author Gateway or if in doubt, contact the editorial team at JIMR.admin@sagepub.com

16. Contributor's publishing agreement

Before publication SAGE requires the author as the rights holder to sign a Journal Contributor's Publishing Agreement. Journal of International Medical Research publishes manuscripts under Creative Commons licenses. The standard license for the journal is Creative Commons by Attribution Non-Commercial (CC BY-NC), which allows others to re-use the work without permission as long as the work is properly referenced and the use is non-commercial. For more information, you are advised to visit SAGE's OA licenses page.

Alternative license arrangements are available, for example, to meet particular funder mandates, made at the author's request.

17. Preparing your manuscript

18. Word processing formats

The preferred format for your manuscript is Word. LaTeX files are also accepted. Word and (La)Tex templates are available on the Manuscript Submission Guidelines page of our Author Gateway.

19. Title, keywords and abstracts

Please supply a title, short title, an abstract and keywords to accompany your article. The title, keywords and abstract are key to ensuring readers find your article online through online search engines such as Google.

The abstract should be a summary of no more than 200 words, and should state its purpose, the basic procedure, main findings and principal conclusions. New and important observations or aspects of the study should be emphasized. Summaries for all papers except narrative review articles and case reports should be structured with the following headings: OBJECTIVE, METHODS (include type of study/experimental design and type of participant), RESULTS, CONCLUSIONS. Summaries of narrative review articles and case reports should be a brief overview of the main points.

20. Artwork, figures and other graphics

For guidance on the preparation of illustrations, pictures and graphs in electronic format, please visit SAGE's Manuscript Submission Guidelines.

Figures supplied in colour will appear in colour online and in the print issue without charge.

Graphs and images that are unsuitable may be returned to the author for amendment, causing delay in publication.

Tables must be prepared in Word using proper table formatting with columns and rows. Tables created using tabs or any other type of formatting may be returned to the author for amendment as they cannot be worked on by the journal, causing delay in publication.

As many tables as necessary may be included as long as there is no repetition of data. For example do not include the same data as both a table and a figure. They should be numbered consecutively using Arabic numbers, e.g. TABLE 2, and they must have a brief caption and be referred to in the main body of the text.

21. Reference style

Journal of International Medical Research adheres to the SAGE Vancouver reference style. Please review the guidelines on SAGE Vancouver to ensure your manuscript conforms to this reference style.

If you use EndNote to manage references, you can download the SAGE Vancouver output file [here](#).

22. English language editing services

Authors seeking assistance with English language editing, translation, or figure and manuscript formatting to fit the journal's specifications should consider using SAGE Language Services. Visit SAGE Language Services on our Journal Author Gateway for further information.

23. Submitting your manuscript

Journal of International Medical Research is hosted on SAGE Track, a web based online submission and peer review system powered by ScholarOne™ Manuscripts. Visit <https://mc.manuscriptcentral.com/jimr> to login and submit your article online.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created. For further guidance on submitting your manuscript online please visit ScholarOne Online Help.

24. ORCID

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process SAGE is a supporting member of ORCID, the Open Researcher and Contributor ID. ORCID provides a persistent digital identifier that distinguishes researchers from every other researcher and, through integration in key research workflows such as manuscript and grant submission,

supports automated linkages between researchers and their professional activities ensuring that their work is recognized.

We encourage all authors to add their ORCID to their SAGE Track accounts and include their ORCID as part of the submission process. If you don't already have one you can create one [here](#).

25. Information required for completing your submission

You will be asked to provide contact details and academic affiliations for all co-authors via the submission system and identify who is to be the corresponding author. These details must match what appears on your manuscript and submissions that do not provide full contact details and academic affiliations for co-authors will be returned. At this stage please ensure you have included all the required statements and declarations and uploaded any additional supplementary files (including reporting guidelines where relevant).

26. Corresponding author contact details

Provide full contact details for the corresponding author including email, mailing address and telephone numbers. Academic affiliations are required for all co-authors. These details should be presented separately to the main text of the article to facilitate anonymous peer review.

27. Permissions

Please also ensure that you have obtained any necessary permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published elsewhere. For further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please see the Copyright and Permissions page on the SAGE Author Gateway.

28. Technical Edit

Once the paper has been accepted, the page charge fee is payable. Publication in the journal is on a page charge basis, the current rate being 325 GBP (+VAT where applicable) per printed journal page. This charge is based on the page count estimate made upon submission.

29. Proofs

Once payment is received, the manuscript is assigned to a qualified scientific editor who will perform a combination of standard copy-editing, scientific content editing and English language editing. The editorial and scientific queries will be raised directly to authors. On average, there

are 50-80 queries raised during the technical edit stage. These should be answered clearly and quickly, with the agreement of all co-authors and to the satisfaction of the journal. Following that, a final typeset proof will be produced for final checks before publication. No further charges or refunds will be granted to reconcile any difference between the page charge fee paid for upon acceptance and the final printed page count.

30. SAGE Production

Your SAGE Production Editor will keep you informed as to your article's progress throughout the production process. Proofs will be sent by PDF to the corresponding author and should be returned promptly. Authors are reminded to check their proofs carefully to confirm that all author information, including names, affiliations, sequence and contact details are correct, and that Funding and Conflict of Interest statements, if any, are accurate. Please note that if there are any changes to the author list at this stage all authors will be required to complete and sign a form authorising the change.

We value your feedback to ensure we continue to improve our author service levels. On publication all corresponding authors will receive a brief survey questionnaire on your experiences of publishing in Journal of International Medical Research with SAGE.

31. Online publication

One of the many benefits of publishing your research in an open access journal is the speed to publication. With no page count constraints, your article will be published online in a fully citable form with a DOI number as soon as it has completed the production process. At this time it will be completely free to view and download for all. It will then be assigned to an issue and receive issue publication.

32. Promoting your article

Publication is not the end of the process! You can help disseminate your paper and ensure it is as widely read and cited as possible. The SAGE Author Gateway has numerous resources to help you promote your work. Visit the Promote Your Article page on the Gateway for tips and advice. In addition, SAGE is partnered with Kudos, a free service that allows authors to explain, enrich, share, and measure the impact of their article. Find out how to maximise your article's impact with Kudos.

33. Further information

Any correspondence, queries or additional requests for information on the manuscript submission process should be sent to the Journal of International Medical Research editorial office as follows:

JIMR.admin@sagepub.com