

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

RENAN FERNANDO BRUSCHI

**EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO DURANTE O PERÍODO
PERIPUBERAL POTENCIALIZA ALTERAÇÕES NO SISTEMA ANTIOXIDANTE E
NA ATIVIDADE DA ENZIMA COLINESTERASE EM CAMUNDONGOS ADULTOS
SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA**

CASCADEL - PR
AGO 2020

RENAN FERNANDO BRUSCHI

EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO DURANTE O PERÍODO PERIPUBERAL POTENCIALIZA ALTERAÇÕES NO SISTEMA ANTIOXIDANTE E NA ATIVIDADE DA ENZIMA COLINESTERASE EM CAMUNDONGOS ADULTOS SUBMETIDOS À 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: Fatores que Influenciam a Morfofisiologia Orgânica

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Ana Tereza Bittencourt Guimarães

CASCADEL - PR

AGO 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração

Bruschi, Renan Fernando

Exposição ao herbicida a base de glifosato durante o período peripuberal potencializa alterações no sistema antioxidante e na atividade da enzima colinesterase em camundongos adultos submetidos à dieta hiperlipídica. / Renan Fernando Bruschi; orientador(a), Ana Tereza Bittencourt Guimarães , 2020.

90 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, 2020.

1. Agrotóxicos. 2. Janelas críticas. 3. Obesidade. 4. Estresse oxidativo. I. Guimarães , Ana Tereza Bittencourt. II. Título.



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

RENAN FERNANDO BRUSCHI

Exposição ao herbicida com base em Glifosato durante o período peripuberal potencializa alterações no sistema antioxidante e na atividade da enzima colinesterase em camundongos C57BI adultos submetidos à dieta hiperlipídica.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre 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) - Ana Tereza Bittercourt Guimarães

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

Maria Lucia Bonfleur

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

Silvia Romão

Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus de Laranjeiras do Sul (UFFS)

Cascavel, 27 de fevereiro de 2020

AGRADECIMENTOS

Aos animais utilizados nesta pesquisa todo o meu respeito e gratidão. A minha Orientadora, Ana Tereza Bittencourt Guimarães, pela disponibilidade, atenção e paciência para esclarecer as minhas dúvidas. Meu reconhecimento pela responsável do projeto professora Maria Lucia Bonfleur, para a colega de Mestrado Ana Paula Farina Rosolen, às colaboradoras; Camila Maria Toigo, Suellen Camila Padilha, Milara Moi e Luana Sinhori.

Agradeço a todos os meus familiares, especialmente aos meus Pais, Ivomar Bruschi e Marcia Bruschi, por toda a força que prestaram. A minha companheira que me apoiou nessa trajetória, Ana Claudia Kossmann, minha gratidão.

RESUMO

BRUSCHI, R.F. **Exposição ao herbicida a base de glifosato durante o período peripuberal potencializa alterações no sistema antioxidante e na atividade da enzima colinesterase em camundongos adultos submetidos à dieta hiperlipídica.** 91 Páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2020.

Tem sido apontado que intervenções ambientais como a exposição a pesticidas em períodos críticos do desenvolvimento (janelas da programação) leva a uma série de disfunções metabólicas, existindo uma possível correlação com a epidemia mundial de obesidade. Os herbicidas a base de glifosato (GBH), são os mais utilizados no mundo. Apesar de ser aparentemente seguro, é considerado provável desregulador endócrino, carcinógeno, indutor do estresse oxidativo, anticolinesterásico, além de outros diversos problemas. Avaliamos se a exposição peripuberal ao GBH potencializa as alterações no sistema antioxidante e na enzima colinesterase nos tecidos hepático, hipotalâmico e muscular em camundongos machos e fêmeas induzidos à obesidade na idade adulta por meio de dieta hiperlipídica (DH). Além disso, verificamos se a exposição ao GBH durante período peripuberal exacerba os efeitos deletérios da obesidade em animais que receberam DH. O grupo amostral foi composto por 47 camundongos machos e fêmeas, quando completaram 30 dias de vida os animais foram divididos em relação ao sexo e o tipo de exposição, controle (CTL) e herbicida a base de glifosato (GBH). O grupo CTL recebeu água por gavagem e o grupo GBH recebeu por gavagem o herbicida na concentração de $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, uma dose considerada baixa, na qual a população é exposta cronicamente. Aos 60 dias de vida (idade adulta), os animais foram separados em relação a dieta, sendo elas; padrão (DP) e hiperlipídica (DH), por conseguinte, foram criados os grupos; CTL-DP; CTL-DH; GBH-DP; GBH-DH. Aos 150 dias de vida, foram obtidas as medidas biométricas dos animais, em seguida foram anestesiados e realizada dissecação dos tecidos adiposos, fígado, hipotálamo e músculo sóleo. Nos três últimos tecidos, foi averiguado a atividade do sistema antioxidante enzimático, quantificamos malondialdeído para determinar nos níveis de lipoperoxidação (LPO) e avaliamos as colinesterases. Nas análises estatísticas, foi utilizado o programa R, sendo aplicado uma Análise da Variância Fator Triplo, posteriormente aplicada a análise dos componentes principais, com nível de significância de ($p < 0,05$). Os animais GBH-DH tendem a ser mais pesados em ambos os sexos em relação outros grupos, de maneira similar é visto nas fêmeas, com índice Lee e tecidos adiposos mais elevados. Evidenciamos maiores atividades enzimáticas e reação de LPO no fígado das fêmeas GBH-DH, quando comparadas ao GBH-DP e CTL-DP. No tecido muscular, foi verificado reduções nas atividades enzimáticas e aumento da LPO em fêmeas GBH-DH, quando comparadas ao GBH-DP e CTL-DP. Nos machos não constatamos diferenças estatísticas. Com essa pesquisa, verificamos que a exposição ao GBH durante o período peripuberal potencializou alterações no sistema antioxidante e ChE nas fêmeas que receberam dieta hiperlipídica, sendo que tais alterações ocorreram no fígado e músculo sóleo. Além disso, demonstramos indícios de efeitos obesógenos quando organismo é submetido ao herbicida e ao segundo hit (DH), podendo amplificar os efeitos da programação.

Palavras chaves: agrotóxicos, janelas críticas, obesidade, estresse oxidativo.

ABSTRACT

BRUSCHI, R.F. **Exposure to Glyphosate-based herbicide during the peripubertal period potentiates changes in the antioxidant system and cholinesterase enzyme activity in adult mice submitted to high-fat diet.** 91 pages. Dissertation (masters). Post-Graduation Program in Biosciences and Health, Center for Health and Biological Health Sciences, Cascabel Campus, Unioeste, 2020.

It has been pointed out that environmental interventions such as exposure to pesticides in the development critical times (programming windows) lead to a series of metabolic disorders, there are possible correlation with a global obesity epidemic. Glyphosate-based herbicide (GBH) are the most used in the world. Although it is apparently safe, it is considered a probable endocrine disruptor, carcinogen, oxidative stress inducer, anticholinesterase, in addition to several other problems. We evaluated whether peripubertal exposure to GBH potentiates changes in the antioxidant system and in the cholinesterase enzyme in the liver, hypothalamic and muscle tissues in male and female mice induced to obesity in adulthood by means of a hyperlipidic Diet (DH). Also, we verified whether exposure to GBH during the peripubertal period exacerbates the deleterious effects of obesity in animals that received DH. The sample group consisted of 47 male and female mice, when they completed 30 days of life the animals were divided according to sex and type of exposure, control (CTL) and glyphosate-based herbicide (GBH). The CTL group received water by gavage and GBH group received by gavage the herbicide at a concentration of $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, considered a low dose, in which the population is chronically exposed. At 60 days of life (adulthood) the animals were separated in relation to diet, that are; standard (DP) and hyperlipidic (DH). Therefore, groups were created; CTL-DP; CTL-DH; GBH-DP; GBH-DH. At 150 days of life were obtained the biometric measurements of the animals, then they were anesthetized and performed the dissection of the soleus muscle, hypothalamus, liver and adipose tissues. In the last three tissues, it was checked the enzymatic antioxidant system activity. We quantified malondialdehyde to determine the levels of lipoperoxidation (LPO) and evaluated the cholinesterases. In the statistical analyses, it was used the R program and applied an analysis of the triple factor variance, subsequently applied to the analysis of the main components, with a significance level of ($p < 0,05$). GBH-DH animals tend to be heavier in both sexes compared to other groups, similarly seen in females, with a higher Lee index and adipose tissues. We showed greater enzymatic activities and LPO reaction in the liver of GBH-DH females, when compared to GBH-DP and CTL-DP. In the muscle tissue was verified reductions in the enzyme activities and an increase of LPO in GBH-DH females, when compared to GBH-DP and CTL-DP. In males no statistical differences founded. With this research, we checked that exposure to GBH during peripubertal period potentiated changes in the antioxidant system and ChE in females which received hyperlipidic diet and such changes occurred in the liver and soleus muscle. In addition, we show evidence of obesogenic effects when the organism is subjected to the herbicide and the second hit (DH), which can amplify the effects of programming.

Key Words: Pesticides, Critical Windows, Obesity, Oxidative Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmula estrutural do herbicida Glifosato e seu metabólito AMPA	20
Figura 2- Sexto estágio da etapa que envolve a transferência do enolpiruvil do PEP para o S3P.	21
Figura 3 - Macanismo de atuação das colinesterases	27
Figura 4- Esquema da ação conjunta do sistema antioxidante	37
Figura 5- Etapas do processo de peroxidação lipídica.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido aminometilfosfônico
CAT	Catalase
ChE	Colinesterase
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
EROS	Espécies reativas do metabolismo do oxigênio
EPSPS	Enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3 fosfato-sintase
EFSA	Agência Europeia de Segurança Alimentar
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
GR	Glutaciona-redutase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
LO	Radical alcoxila
LOO	Radical peroxila
LMA	Leucemia mielóide aguda
MDA	Malonaldeído
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida
OMS	Organização Mundial da Saúde
•O ₂	Radical superóxido
(-OH)	Radical hidroxila
StAR	proteína reguladora aguda esteroideogênica
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVOS GERAIS	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3.0 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 AGROTÓXICOS.....	18
3.2 HERBICIDAS A BASE DE GLIFOSATO E SEUS POSSÍVEIS DANOS AOS ORGANISMOS.....	22
3.3.2 Herbicidas a base de glifosato: alterações na enzima colinesterase.....	26
3.3 SOBREPESO E OBESIDADE.....	28
3.3.1 Estresse oxidativo associado à obesidade	29
3.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E RADICAIS LIVRES	31
3.4.1 Radical superóxido	32
3.4.2 Radical hidroxila	33
3.4.3 Peróxido de hidrogênio.....	33
3.5 SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO	33
3.5.1 Superóxido dismutase (SOD)	34
3.5.2 Catalase	34
3.5.3 Glutaciona peroxidase e Glutaciona redutase.....	35
3.5.4 Glutaciona transferase	35
3.3.3 Lipoperoxidação	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ARTIGO CIENTÍFICO	51

1. INTRODUÇÃO

Estudos das origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD) analisam o efeito das exposições ambientais em vários períodos importantes do desenvolvimento (SILVEIRA *et al.*, 2007). Sabe-se, que eventos adversos ocorridos no início da vida podem causar alterações na expressão da carga genética do indivíduo, podendo causar doenças por toda a vida (DESAI; JELLYMAN; ROSS, 2015).

Determinadas fases na qual o indivíduo tem uma maior vulnerabilidade são denominadas de períodos ou janelas críticas do desenvolvimento. São caracterizadas pela intensa proliferação celular, diferenciação e rápida expansão tecidual (XAVIER *et al.*, 2015). Estágios da vida como pré-natal, pós-natal, infância, puberdade e adolescência, são fases caracterizadas por um alto grau de plasticidade, sendo considerados períodos críticos durante os quais podem ocorrer a programação metabólica (SILVEIRA *et al.*, 2007).

Atualmente tem sido muito questionado sobre efeitos deletérios que os agrotóxicos podem ocasionar na saúde populacional, são produtos usados em larga escala para controle de pragas e ervas daninhas e estão relacionadas a diversas disfunções metabólicas (OMS, 2010). Os consumidores são frequentemente expostos a níveis residuais dessas substâncias em alimentos (OMOIKE *et al.*, 2015). Muitos destes produtos são persistentes no meio ambiente, contaminando o solo e os rios, podendo ainda ser transportados para outras localidades (WAISSMANN, 2002). Vale enfatizar que a exposição a diferentes xenobióticos (compostos químicos estranhos ao organismo) podem aumentar os efeitos deletérios sobre a saúde a longo prazo (DU *et al.*, 2014), salientando que a exposição a essas substâncias em determinadas fases do desenvolvimento pode estar relacionada ao desenvolvimento da obesidade (NEWBOLD *et al.*, 2008).

Um dos agrotóxicos mais utilizados atualmente são os herbicidas a base de glifosato (GBH), substância considerada de baixo risco para humanos e outros animais (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000). Entretanto, estudos demonstram que o composto é um provável disruptor endócrino (ROMANO *et al.*, 2009; DEFARGE, *et*

al., 2016), carcinógeno, genotóxico e indutor do estresse oxidativo (BRUSICK *et al.*, 2016). É possível que o GBH também interfira na atividade das colinesterases, que são grupos de enzimas presente no sistema colinérgico responsáveis pela hidrólise da acetilcolina (MENÉNDEZ-HELMAN, *et al.*, 2012; MILIĆ, *et al.*, 2018).

Um dos meios indiretos de avaliar o balanço redox é por meio da atuação do sistema antioxidante, ou produtos finais dos danos oxidativos, como por exemplo a quantificação de malondialdeído (MDA) (SAVINI *et al.*, 2013). As colinesterases também são conhecidas para diagnóstico de efeitos neurotóxicos em organismos não alvo (NIMET; GUIMARÃES; DELARIVA, 2017). Todavia, a maioria dos estudos realizado sobre toxicidade do GBH foi realizada em peixes, que são considerados organismos sensíveis, sendo que normalmente a exposição é aguda e em concentrações elevadas (LUSHCHAK *et al.*, 2009; MODESTO; MARTINEZ, 2010; ORTIZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2011). São necessárias pesquisas em outros modelos experimentais, sendo de grande relevância nos mamíferos. Além do mais, essas pesquisas normalmente são realizadas em animais adultos, e caso não resultem em danos deletérios, tais substâncias são consideradas seguras (GORE *et al.*, 2019).

Diante do que foi abordado inicialmente sobre os períodos críticos de exposição, nessa pesquisa nós demonstramos os efeitos da exposição ao GBH durante o período peripuberal e as potenciais alterações nas enzimas do sistema antioxidante e colinesterase em camundongos que foram induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica na fase adulta. Ressalta-se, que a exposição a um agente estressante em uma fase de alta plasticidade pode resultar em uma resposta exagerada aos estressores subsequentes “segundo hit” (MESSER *et al.*, 2015), justamente por isso, em nosso estudo, os camundongos quando adultos receberam dieta hiperlipídica.

As análises enzimáticas foram realizadas no fígado pelo fato deste participar de diversas funções metabólicas, no hipotálamo por ele estar envolvido na síntese de hormônios e no controle do balanço energético, também no músculo sóleo pelo fato de ser oxidativo e com abundância de mitocôndrias (GUYTON, 2011). Além disso, essa pesquisa verificou a possibilidade do GBH ser uma substância obesogênica, avaliando-se os tecidos adiposos retroperitoneal, perigonadal e marrom, bem como medidas corporais. Sendo assim, nossa hipótese foi que ao expor os camundongos ao GBH no período peripuberal e posteriormente a administração do segundo agente estressante (dieta hiperlipídica) as alterações nos biomarcadores por conta do

estresse oxidativo, e os efeitos deletérios da obesidade serão exacerbados, uma vez que o segundo “hit” pode amplificar ou ativar os efeitos da programação metabólica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar se a exposição no período peripuberal ao herbicida à base de glifosato (GBH) potencializa as alterações no sistema antioxidante e na enzima colinesterase nos tecidos hepático, hipotalâmico e muscular em camundongos machos e fêmeas induzidos à obesidade na idade adulta por meio de dieta hiperlipídica (DH).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade do sistema antioxidante nos tecidos hepático, hipotalâmico e no músculo sóleo de camundongos machos e fêmeas na idade adulta, que foram expostos a baixas concentrações de GBH durante o período peripuberal.
- Analisar a atividade da enzima colinesterase em camundongos machos e fêmeas na idade adulta que foram expostos a baixas concentrações de GBH durante o período peripuberal.
- Verificar se a exposição no período peripuberal ao GBH intensifica as alterações no sistema antioxidante e colinesterase nos tecidos hepático, hipotalâmico e no músculo sóleo em camundongos induzidos à obesidade por meio de dieta DH quando adultos.
- Averiguar se a exposição peripuberal ao GBH exacerba os efeitos deletérios da obesidade em animais que receberam DH.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Um novo ramo da ciência tem estudado mais a fundo as origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). Por meio de pesquisas laboratoriais, epidemiológicas, clínicas e pré-clínicas têm sido associado a exposição de diferentes fatores ambientais que podem promover alterações em vários períodos importantes do desenvolvimento; sabe-se que intervenções precoces em fases de intensas modificações predispõem o indivíduo ao aparecimento de doenças na idade adulta (SILVEIRA *et al.*, 2007).

Por volta de 1930, pesquisadores constataram que as condições ambientais durante a vida fetal e a infância pareciam estar determinando a sobrevivência de cada geração (KERMACK; MCKENDRICK; MCKINLAY, 2001). Na década de 70, uma pesquisa revelou que os filhos de mulheres grávidas desnutridas, apresentaram na vida adulta, alterações no padrão da composição corporal, sendo variável de acordo com a idade em que os filhos sofreram desnutrição durante a vida intra-uterina, observando-se que nos casos de desnutrição no primeiro semestre da gestação, a incidência de obesidade aumentava significativamente na prole (RAVELLI *et al.*, 1976).

Barker *et al.*, (1989) correlacionou o peso ao nascer e as condições ambientais durante a infância com a saúde cardiovascular, pois indivíduos com baixo peso eram biologicamente distintos daqueles considerados eutróficos. Estudos subsequentes permitiram a levantar a hipótese do fenótipo poupador, na qual o feto se adaptava ao ambiente uterino otimizando o uso de suprimentos energéticos reduzidos com o intuito de garantir sua sobrevivência. Essa adaptação beneficiaria órgãos nobres em detrimento de outros, ocasionando alterações persistentes no crescimento e na função dos tecidos. Apesar da hipótese ter sido muito importante na época, o fenótipo poupador não explica uma série de achados descritos posteriormente (HALES; BARKER, 1992).

Esse conjunto de ideias permitiu a Alan Lucas propor o termo “Programming” (em português: programação), cujo o autor aborda como sendo um resultado de modificações não estruturais do material genético decorrentes de insulto ou estímulo

aplicado em um período crítico ou sensível, com capacidade de causar efeitos duráveis ou persistentes na estrutura, ou função de um organismo, podendo ocasionar patologias na vida adulta (LUCAS, 1991).

Exposições a diferentes insultos podem alterar a mudança na expressão gênica que altera o crescimento e o desenvolvimento da prole. Estes mecanismos da epigenética se referem a alterações reversíveis e herdáveis no genoma funcional que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA (DESAI; JELLYMAN; ROSS, 2015). Vale enfatizar que existe a possibilidade, durante um período crítico, de reverter as alterações. Porém, caso permaneçam, as mudanças no organismo influenciarão o mesmo por toda sua vida, podendo ser transmitidas a gerações subsequentes (KIM; SAMARANAYAKE; PRADHAN, 2009).

A modificação na epigenética ocorre por meio da metilação, na qual radicais metil são inseridos em locais específicos do DNA, alterando a expressão de genes. Além disso, podem ocorrer modificações nas histonas, que são estruturas em volta das quais o DNA se organiza. Essas alterações podem ocorrer em sua conformação, como por exemplo a acetilação, a metilação, a isomerização da prolina, a ubiquitinação, a fosforilação, a ribosilação da ADP e a desaminação, que podem alterar a transcrição. Estudos também evidenciaram alterações na expressão dos RNAs não-codificante, sendo pequenas fitas de nucleotídeos que podem modular a expressão dos genes por meio do silenciamento transcricional, ou pós-transcricional (WILLIAMS; DRAKE, 2014; RATTAN; FLAWS, 2019).

Períodos, ou janelas críticas, são fases da vida em que o organismo está vulnerável, tais como: gestação, lactação, infância, puberdade e adolescência. Estas etapas são conhecidas como janelas da programação, uma vez que são fases de elevada plasticidade, no qual ocorre uma intensa proliferação celular, diferenciação e rápida expansão tecidual (SILVEIRA *et al.*, 2007; XAVIER *et al.*, 2015). A puberdade é a fase do desenvolvimento em que ocorrem profundas alterações hormonais, físicas, comportamentais e psicológicas, tornando os indivíduos aptos à reprodução. O início da puberdade decorre em sequências de alterações maturacionais no cérebro, especificadamente no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, responsável na síntese e liberação de gonadotrofinas hipofisárias, hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante FSH (ROMANO *et al.*, 2009). Portanto, intervenções ambientais precoces durante fases de intensas modificações, como na puberdade, podem influenciar na susceptibilidade a patologias na vida adulta (GIEDD; KESHAVAN; PAUS, 2008).

Neste sentido, estudos vêm demonstrando que o aporte inadequado de nutrientes em períodos críticos do desenvolvimento, predispõe o indivíduo adulto a doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, hipertensão, intolerância à glicose e hiperlipidemia (BOULLU-CIOCCA *et al.*, 2005). Entretanto, a programação metabólica não se limita apenas em insultos nutricionais. O consumo de certos fármacos, álcool e o fumo também se enquadram como agentes estressantes (LEANDRO *et al.*, 2009). Outros fatores como a exposição a agrotóxicos, que são usados em larga escala no controle de pragas e ervas daninha, também estão relacionados a diversas disfunções metabólicas. Os consumidores são considerados organismos não-alvo, frequentemente expostos aos níveis residuais de agrotóxicos em alimentos (OMOIKE *et al.*, 2015). Muitos destes produtos são persistentes no meio ambiente, contaminando o solo e os rios (WAISSMANN, 2002), salientando que a exposição a diferentes produtos contaminados pode aumentar efeitos deletérios sobre a saúde a longo prazo (DU *et al.*, 2014).

Muitas dessas substâncias são consideradas disruptores endócrinos (DE) que comprometem a síntese, a secreção, o transporte, a ligação e a ação dos hormônios, promovendo efeitos adversos ao indivíduo, podendo acometer também seus descendentes (GORE *et al.*, 2019). Esses desreguladores mimetizam a ação dos hormônios do organismo e se acumulam nos tecidos gordurosos, passando a agir como se fossem os hormônios segregados pelas glândulas, alterando o metabolismo do corpo humano (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 2002).

Os danos causados por esses compostos dependem das concentrações no ambiente, da lipofilicidade, da persistência, da bioacumulação, do tempo de exposição, e dos mecanismos de biotransformação e de excreção. Salienta-se que alguns subprodutos podem ser até mais danosos que os compostos originais. Sendo assim, a exposição a baixos níveis dos DEs, que bioacumulam no decorrer do tempo, pode levar, ao longo da cadeia trófica, a uma acumulação em níveis mais elevados nos animais, enfatizando-se que os seres humanos, por ocuparem o topo da cadeia alimentar, podem apresentar concentrações mais altas dessas substâncias no corpo (BILA; DEZOTTI, 2007).

Nos últimos anos, pesquisadores têm elaborado explicações de como os DEs causam mudanças biológicas e provocam doenças. Entretanto, é necessário buscar novas alternativas para prever os efeitos causados em organismos expostos. Normalmente as pesquisas se baseiam na ideia de que há relações lineares

crecentes entre as doses e a toxicidade, estabelecendo-se um limiar considerado seguro. Esses testes tradicionais são geralmente utilizados em animais adultos, e caso não resultem em câncer, ou morte, são considerados seguros (GORE *et al.*, 2019). Contudo, é de suma importância novas abordagens levarem em consideração que essas substâncias químicas podem ser transferidas para a prole pela placenta, ou leite materno, podendo acometer o desenvolvimento (BILA; DEZOTTI, 2007). No quadro 1 observamos as principais substâncias consideradas como desreguladores endócrinos.

Quadro 1 - Principais desreguladores endócrinos (DEs) conhecidos

Categoria/Uso	Exemplos de DEs
Pesticidas	DDT, clorpirifós, atrazina, 2,4-D e glifosato
Produtos Infantis	Chumbo, ftalatos, cádmio
Recipientes de Alimentos	BPA, ftalatos, fenol
Material Eletrônico e de Construção	Retardadores de chama bromados, PCB
Produtos de Higiene Pessoal, Tubos Médicos	Ftalatos
Antibacterianos	Triclosan
Vestuário Têxtil	Perfluoroquímicos

Fonte: (GORE *et al.*, 2019)

3.1 AGROTÓXICOS

Por séculos a agricultura tem sido a base da sobrevivência da população humana, sendo que a mesma é praticada pela humanidade há mais de 10 mil anos (PIETROBON; SENEM, 2015). Desde o início das civilizações, os humanos buscaram alternativas para melhorar os cultivos de suas plantações, a utilização de cinzas, folhas de cipreste esmagadas e urinas diluídas, eram algumas das estratégias que forneciam proteção para lavouras. Nos dias atuais, muitas coisas mudaram por conta das pesquisas científicas e tecnologias implantadas, o que resultou na elevação da produção de alimentos (QUEIROZ *et al.*, 2017).

Atualmente, o modelo de produção agrícola é por meio da aplicação de agrotóxicos, cujo objetivo, é combater pragas e ervas daninhas. A introdução destes produtos se deu durante as guerras mundiais, usados como armas químicas, sendo

posteriormente implantados na agricultura. (BURIGO; VENÂNCIO, 2016). Os agrotóxicos são substâncias definidas como agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamentos de produtos agrícolas, proteção de florestas nativas ou plantadas, pastagens e em ambientes urbanos, hídricos e indústrias. Sua finalidade é alterar a composição da fauna ou flora, com o intuito de preservá-las dos danos causados por pragas agrícolas (BRASIL, 2017).

Pesquisas apontam que o Brasil já ocupou o lugar de maior consumidor mundial de agrotóxicos, com valores acima de um milhão de toneladas por ano (LONDRES, 2011). Apesar do seu uso promover uma grande comodidade aos trabalhadores rurais, em razão que não se necessita do trabalho manual (capinas e roçadas) tem sido apontado que a exposição a diversas substâncias utilizadas nas lavouras podem estar relacionadas diversos distúrbios metabólicos (INCA, 2019). Os efeitos mais comuns associados à exposição aos agrotóxicos são alergias, distúrbios gastrointestinais, respiratórios, endócrinos, reprodutivos e neurológicos, além de neoplasias, mortes acidentais e suicídio (OMS, 2010). Em relação aos óbitos, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) são registradas 20 mil mortes por ano devidas ao consumo de agrotóxicos (INCA, 2019). Os grupos mais afetados são os agricultores e trabalhadores das indústrias de agrotóxicos, mas toda a população está sujeita aos danos, sendo expostas pelo consumo de alimentos e água contaminada. Gestantes, crianças e adolescentes são considerados grupos de alto risco devido às alterações metabólicas, imunológicas, ou hormonais que ocorrem nestes períodos da vida (INCA, 2019).

Entre os dez agrotóxicos químicos mais comercializados em 2014, destacou-se o herbicida glifosato, correspondendo a 488.388.696,10 kg, equivalente a 31,45% do total de agrotóxicos comercializados no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018) (Quadro 2).

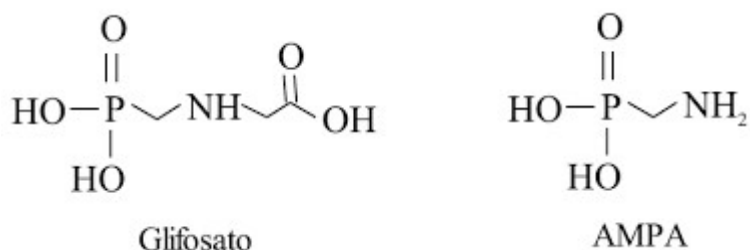
Quadro 2 - Ranking dos agrotóxicos mais comercializados no Brasil em 2014.

Classificação	Agrotóxicos	Total (kg) 2014
1	Glifosato ^b	488.388.696,10
2	2,4-D ^c	52.889.356,02
3	Óleo mineral (hidrocarbonetos alifáticos)	52.239.957,28
4	Acefato (organofosforado)	48.891.645,90
5	Metomil (metilcarbamato de oxima)	48.502.231,65
6	Clorpirifós (organofosforado)	46.760.108,99
7	Atrazina (triazina)	35.397.501,74
8	Dicloreto de paraquate (bipiridílio)	32.920.024,56
9	Carbendazim (benzimidazol)	15.307.157,79
10	Mancozebe (alquilenobis (ditiocarbamato))	14.770.319,00

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2018).

Os herbicidas a base de glifosato (GBH) são os mais comercializados mundialmente. O elemento ativo destes herbicidas pertence à classe dos organofosforados, incluído no grupo químico das glicinas modificadas, sendo que seu nome químico é N(fosfonometil) glicina. O mesmo apresenta fórmula molecular C₃H₈NO₅P (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000) e o seu principal metabólito é o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (Figura 1). O Glifosato é o princípio ativo de mais de 750 herbicidas diferentes, podendo ser utilizado na agricultura, na silvicultura, em usos urbanos e domésticos (GUYTON et al., 2015). O aumento de sua comercialização ocorreu após a introdução no mercado de culturas geneticamente modificadas resistentes a sua ação (DIAS, 2017).

Figura 1 - Fórmula estrutural do herbicida Glifosato e seu metabólito AMPA

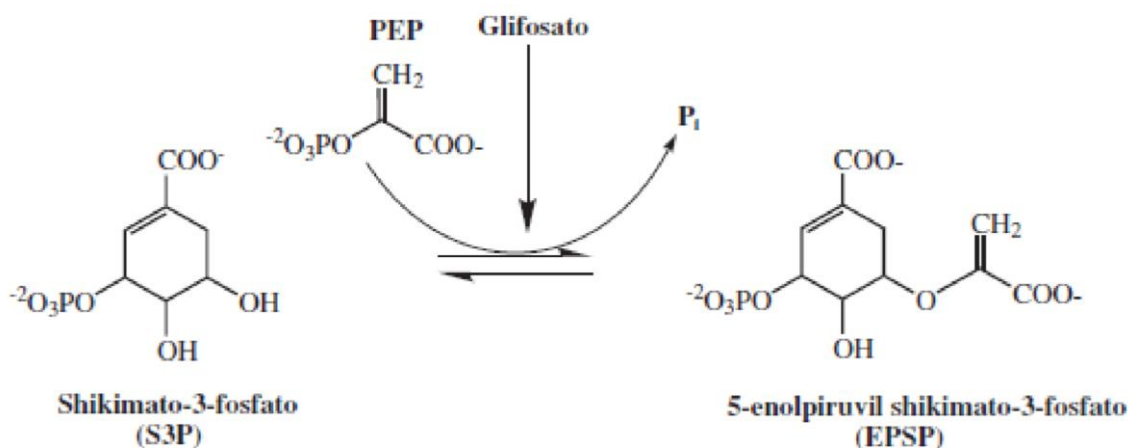


Fonte: ANVISA (2018).

O GBH é classificado como não-seletivo e de ação sistêmica, pós-emergente, com um amplo espectro de atuação (ANDRIGHETT *et al.*, 2014), eficaz no controle de ervas daninhas anuais ou perenes, muito utilizado nas culturas de soja, milho, trigo,

café, cana de açúcar, arroz, feijão, fumo, banana, citros, ameixa, cacau, nectarina, maçã, uva, coco, mamão, pera, pêssigo, algodão, eucalipto e pinus (OLIVEIRA *et al.*, 2008; MONEKE *et al.*, 2010). O GBH impede o desenvolvimento da planta por agir na via chiquimato, inibindo a atividade da enzima chamada 5-enolpiruvil-chiquimato-3 fosfato-sintase (EPSPS), encarregada da biossíntese de corismato, um precursor comum de aminoácidos essenciais como triptofano, fenilalanina e tirosina (Figura 2). Desta maneira, há uma redução drástica destes aminoácidos nas plantas, o que impede a formação de proteínas como auxinas, compostos de defesas contra organismos patogênicos, precursores das ligninas, flavonóides, plastoquinona, fitoalexinas, ácido fólico e vários outros compostos alcolóides e fenólicos (TONI; SANTANA; ZAIA, 2006). Vale salientar que a biossíntese de aminoácidos aromáticos não é expressa no reino animal, ou seja, esse mecanismo de ação é exclusivo em plantas e em algumas bactérias (BOHM; ROMBALDI, 2010; BOHM *et al.*, 2011).

Figura 2- Sexto estágio da etapa que envolve a transferência do enolpiruvil do PEP para o S3P.



Fonte: Coutinho e Mazo, 2005.

Devido ao fato de não existir a enzima EPSPS no reino animal, os pesquisadores concluíram que o herbicida não ofereceria riscos à saúde humana (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000). Além disso, o mesmo foi considerado seguro para o uso no ambiente devido a sua rápida degradação do solo (BOHM *et al.*, 2011), variando em uma meia vida de 1 a 197 dias, dependendo da temperatura, umidade, tipo de solo, degradação microbiana e níveis de fosfato (BENTO *et al.*, 2017). Após ser degradado por microrganismos presentes solo, forma-se o seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), classificado como persistente nos

solos e, dependendo das condições, pode apresentar meia vida entre 23 e 958 dias (BENTO *et al.*, 2017). Apesar do glifosato ser o elemento ativo mais comercializado no mundo, há muitas incertezas e dúvidas a respeito do produto e seus possíveis danos ao meio ambiente e à saúde humana, sendo questionado por pesquisadores do mundo todo.

3.2 HERBICIDAS A BASE DE GLIFOSATO E SEUS POSSÍVEIS DANOS AOS ORGANISMOS

Vários debates estão ocorrendo em instituições científicas sobre o limiar de toxicidade dos agrotóxicos, em especial do princípio ativo glifosato, e os níveis permitidos destes compostos pelas agências reguladoras (Agência Europeia de Segurança Alimentar - EFSA, Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer - IARC e Organização Mundial da Saúde - OMS citados por DEFARGE *et al.*, 2018).

A IARC, em 2015, realizou uma investigação epidemiológica sobre os efeitos do uso de Glifosato e o classificou como provável carcinogênico, genotóxico e indutor de estresse oxidativo. Anterior a este estudo, houve uma série de publicações que abordavam que o uso do glifosato não apresentava riscos (US EPA, 1993; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; KIER; KIRKLAND, 2013), o que culminou em sua autorização para uso em mais de 160 países (BRUSICK *et al.*, 2016). Diante da afirmação da IARC, a empresa multinacional Monsanto contratou a Intertek Scientific & Regulatory Consultancy para conduzir uma revisão completa focada em genotoxicidade e estresse oxidativo. Este grupo de pesquisadores concordou que há evidências plausíveis de que o glifosato induz a quebra da fita do DNA promovendo efeitos mutagênicos e genotóxicos em sistemas *in vitro* de células de mamíferos e não mamíferos. Apesar destas evidências, os efeitos deste produto ainda não puderam ser caracterizados com precisão, especialmente em sistemas *in vivo* de mamíferos. Diante disso, conclui-se que as evidências não eram muito convincentes, e que os dados são insuficientes para a caracterização do glifosato como um carcinógeno genotóxico (BRUSICK *et al.*, 2016).

A União Europeia, em ação conjunta com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), e a Organização Mundial da Saúde (OMS) realizaram a primeira avaliação regulatória abrangente do glifosato após a avaliação

da IARC. Suas conclusões contradisseram a IARC, colocando o GBH como não carcinogênico em ratos, porém, em doses elevadas não se deve excluir a possibilidade de haver riscos. Concluiu-se que é improvável que o glifosato represente um risco carcinogênico para os seres humanos quando há exposição pela dieta (TARAZONA *et al.*, 2017).

Em estudo de coorte realizado na Carolina do Norte e Iowa, os resultados também discordaram das conclusões da IARC, evidenciando que o herbicida não está associado aos casos de câncer em ambos os locais. Entretanto, foi observado que entre os indivíduos que se enquadraram com maior exposição ao produto, houve um aumento de leucemia mielóide aguda (LMA) em comparação com os usuários que nunca foram expostos. De acordo com autores, este estudo foi o primeiro a relatar uma possível associação entre GBH e LMA (ANDREOTTI *et al.*, 2018).

Outras pesquisas atualmente apontam fortes evidências que o herbicida pode comprometer a síntese, a secreção, o transporte, a ligação e a ação dos hormônios, sendo considerado um disruptor endócrino em várias espécies de animais. No caracol terrestre *Cantareus aspersus*, aplicação no solo de 3mg.Kg⁻¹ de GBH ocasionou uma diminuição no número de ovos por adultos quando expostos durante o desenvolvimento embrionário. Pelo fato de não ter sido visualizado alterações histológicas nas gônadas, os autores sugeriram que tais alterações ocorreram por mecanismo neuroendócrinos (DRUART *et al.*, 2017). Em estudos com peixes, foi verificado que a exposição de 10 mg.L⁻¹ de GBH sobre o peixe *Danio rerio*, por 24 a 96 h, resultaram em perda de motilidade espermática, perda da funcionalidade mitocondrial e redução da integridade do DNA (LOPES *et al.*, 2014). Estudos realizados com casais da espécie de peixe *Amatitlania nigrofasciata* (Acará do Congo) demonstraram a redução do número de embriões quando expostos por 96 h em concentrações de 3,62 mg.L⁻¹ de glifosato (ZEBRAL *et al.*, 2018).

Já a exposição a baixas doses do herbicida em ratos (36 ppm ou 0,036 g.L⁻¹), por um período de 30 minutos, aumentou os níveis de cálcio intracelular, promovendo a abertura de canais de Ca⁺⁺ dependentes de voltagem do tipo L e receptores rianodina. Tal evento ocasiona a sobrecarga de Ca⁺⁺ desencadeando o aumento de estresse oxidativo e a morte celular das células de Sertoli em testículos de ratos prépuberes (CAVALLI *et al.*, 2013).

Em cultivo celular das células de Leydig (MA-10 linhagem tumoral), foi quantificada a expressão da enzima aromatase (enzima do citocromo p450 que age

como mediador da aromatização de andrógenos em estrógenos) e StAR (proteínas de regulação rápida de estereoidogênese) quando expostas a diferentes concentrações do herbicida, evidenciando uma diminuição de 90% dos níveis da proteína StAR, redução em 71% da conversão de colesterol em pregnenolona e decréscimo de 94% na esteroidogênese absoluta (ROMANO; AURÉLIO; DE OLIVEIRA, 2009). Defarge e colaboradores (2016) testaram a desregulação endócrina usando co-formulantes de seis herbicidas à base de glifosato e também do princípio ativo isolado; em concentrações 800 vezes inferiores às diluições agrícolas, foi observado que a atividade de aromatase diminuiu significativamente pelos coformulantes, enquanto o glifosato isolado exerceu efeito em apenas em 1/3 da diluição agrícola. Desta forma, percebeu-se que a desregulação endócrina não ocorre apenas pelo princípio ativo, mas também pelos co-formulantes, indicando que o produto comercializado apresenta efeitos deletérios mais severos sobre os organismos não alvo.

Além de ações sobre o sistema endócrino e reprodutivo, distúrbios neurodegenerativos podem estar associados ao uso de agrotóxicos. A introdução de GBH em ratos por via intraperitoneal nas concentrações 50, 100 e 150mg.kg⁻¹ durante duas semanas promoveu o decréscimo na atividade locomotora e nos marcadores dopaminérgicos cerebrais (HERNANDEZ-PLATA *et al.*, 2015). Baier e colaboradores (2017) evidenciaram que a exposição ao GBH por via intranasal nas concentrações 50mg.kg⁻¹ durante quatro semanas, ocasionou diminuição da atividade locomotora, acréscimo dos níveis de ansiedade, e acometimento na memória e reconhecimento em camundongos. Martínez e colaboradores (2018) demonstraram que exposição ao GBH nas doses de 75, 150 e 800mg.kg⁻¹ durante seis dias induziu o aumento dos níveis de norepinefrina, serotonina, dopamina e seus metabólitos em ratos Wistar. Alguns informes clínicos em indivíduos submetidos a formulações comerciais de glifosato descreveram efeitos negativos no sistema nervoso relacionados à síndrome de Parkinson e alterações no *globus pallidus* e substância negra (GALLEGOS *et al.*, 2018), bem como aumento de ansiedade e prejuízos de memória de curto prazo (NISHIYORI *et al.*, 2014).

3.2.1 GBH e suas ações no sistema antioxidante

O sistema antioxidante está presente em células animais e vegetais, sua função é prevenir ou retardar oxidação de biomoléculas, uma vez, que está relacionado na eliminação das espécies reativas, portanto, este sistema proporciona proteção ao organismo, impedindo as reações ligadas à formação das espécies reativas ao oxigênio (EROS). Quando há um desequilíbrio entre produção de EROS e atividade enzimática do sistema antioxidante, ocorre o estresse oxidativo, resultando em danos teciduais, celulares, alterações nas membranas celulares e alterações no DNA (MAFRA *et al.*, 1999).

Muitos dos pesticidas mais comumente usados exercem seus efeitos tóxicos por meio da indução de estresse oxidativo. Foi demonstrado que a exposição aguda e crônica a GBH leva ao estresse oxidativo em vários tecidos (CATTANI *et al.*, 2014). Em particular, ocorrem alterações na atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), e diminuição nos níveis de glutathione reduzida (GSH) (SOBJAK *et al.*, 2017; GALLEGOS *et al.*, 2018; SOBJAK *et al.* 2018;).

O balanço redox pode ser avaliado medindo marcadores de defesa antioxidante, bem como atividades enzimáticas do sistema antioxidante (SOD, CAT, GST, GPx, GSH). Outras técnicas permitem de maneira direta avaliar o estresse oxidativo por meio da avaliação da produção de radicais livres (técnica de ressonância eletrônica de spin, ou métodos imuno-spin-trapping). É também possível realizar tal avaliação de maneira indireta, avaliando produtos finais dos danos oxidativos, como oxidação de proteínas e aminoácidos como carbonilas, 3-nitrotirosina, produtos finais de glicosilação, e quantificação de malondialdeído (MDA) que é um dos principais produtos da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, ou lipoperoxidação - LPO (SAVINI *et al.*, 2013).

Em peixes expostos a diferentes concentrações durante 96h do composto comercial, a frequência de reação de lipoperoxidação no músculo elevou cerca de 31,7% quando expostos a 2,25 mg.L⁻¹ de GBH. À atividade da SOD em células hepáticas foi significativamente reduzida quando expostos a 0,75 mg.L⁻¹ do composto e a atividade da GST se elevou quando os animais foram expostos a 0,37 mg.L⁻¹ (TEIXEIRA, *et al.*, 2018). Em ratos Wistar expostos a 375 mg.kg⁻¹ ao GBH por meio de gavagem, durante 8 semanas, houve um aumento nos níveis de MDA e diminuição de glutathione reduzida (GSH) no sangue, cérebro, coração, fígado e tecidos renais,

assim como reduções significativas também foram evidenciadas nas atividades da SOD e CAT nos eritrócitos (TURKMEN *et al.*, 2019).

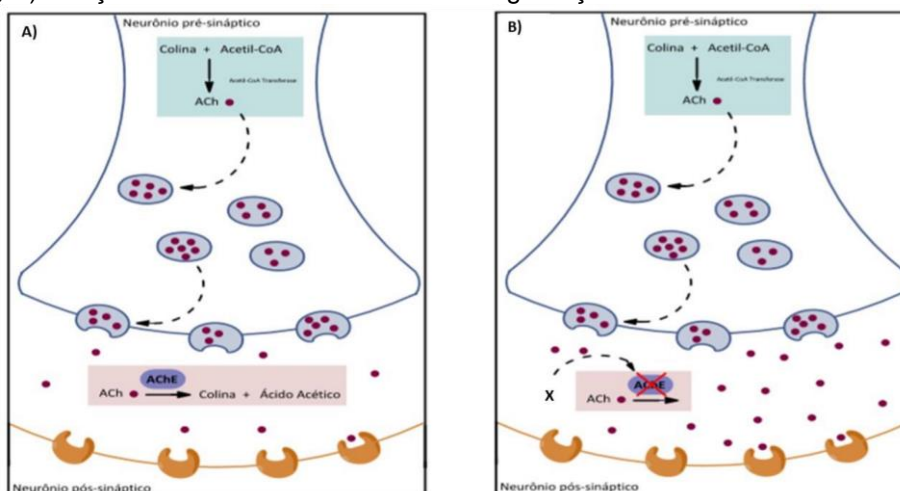
Experimento *in vitro* de células hepáticas submetidas a concentrações de 0 a 240 mg.L⁻¹ de GBH demonstraram citotoxicidade nos hepatócitos, com alterações morfológicas, como encolhimento celular, condensação dos cromossomos, redução da densidade celular, e sintomas como a tumefação, vacuolização e necrose focal. Em concentrações mais elevadas foram evidenciadas que as mitocôndrias dos hepatócitos apresentaram as cristas mitocondriais fragmentadas ou ausentes, e a maioria das estruturas das organelas destruídas, havendo também comprometimento no sistema antioxidante, resultando diminuição de GSH e SOD, aumentando as espécies reativas do metabolismo do oxigênio (EROS) intracelular, e MDA, produto secundário da lipoperoxidação (LUO *et al.*, 2017).

3.3.2 Herbicidas a base de glifosato: alterações na enzima colinesterase

A colinesterase (ChE) consiste em um grupo de enzimas presentes nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central, periférico e nas junções neuromusculares de invertebrados e vertebrados. Seu funcionamento é de extrema importância, pois catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em ácido acético e colina na fenda sináptica, permitindo que o neurônio do sistema colinérgico retorne ao seu estado de repouso após ser despolarizado (Figura. 3A) (ARAÚJO; SANTOS; GONÇALVES, 2016).

A enzima é um biomarcador conhecido para diagnósticos de efeitos neurotóxicos em organismos não-alvos, salientando que sua atividade pode ser comprometida na presença de organofosforados e carbamatos em sinergismo com outras variáveis ambientais, como riqueza e abundância de indivíduos, ocasionando acúmulo de acetilcolina nas sinapses e junções neuromusculares de vertebrados (Figura 3B) (NIMET; GUIMARÃES; DELARIVA, 2017).

Figura 3 – A) Representa a atividade normal ChE hidrolisando a Acetilcolina formando colina e ácido Acético; B) Inibição da enzima não ocorrendo a degradação do neurotransmissor acetilcolina



Fonte: (ARAÚJO; SANTOS; GONÇALVES, 2016).

Em estudo realizado em dois córregos pertencentes à Bacia do baixo rio Iguaçu (Brasil), foi verificada inibição na atividade da ChE no cérebro e músculo de amostras da espécie de peixe *Rhamdia quelen*, sendo que as coletas foram realizadas no período de plantio, quando uso de pesticidas para o controle de pragas é alto (SOBJAK, et al., 2018). Em outras pesquisas realizadas com peixes *Pseudoplatystoma corruscans* a exposição aguda ao GBH reduziu a atividade ChE no músculo (21 e 26,7% a 2,25 e 4,5 mg.L⁻¹) e aumentou cerca de 42% no cérebro (2,25 mg.L⁻¹) em comparação ao grupo controle (TEIXEIRA et al., 2018). Em bioensaios de 96h com peixes da espécie *Cnesterodon decemmaculatus* a exposição (1, 17,5 e 35 mg.L⁻¹), originou um efeito inibitório na atividade da ChE a partir da menor concentração testada (MENÉNDEZ-HELMAN et al., 2012).

Em experimentação de 28 dias foi realizada a administração diária de GBH por gavagem em ratos Wistar, com doses de 0,1 mg.kg⁻¹ e 0,5 mg.kg⁻¹ em cada grupo. A atividade da ChE reduziu significativamente quando comparado ao controle, observando-se um decréscimo de 35% de sua atividade (MILIĆ, et al., 2018). Distúrbios na atividade da ChE trazem sérios prejuízos aos organismos, pois sua inibição nas junções neuromusculares causa hiperestimulação das fibras, podendo causar tetania, paralisia e até a morte (KIRBY et al., 2000). Diante da importância desta enzima, avaliações dos potenciais efeitos que compostos pesticidas apresentem em inibir, ou ativar a ChE tem grande relevância, principalmente quando

não se tem conhecimento do que ocorre no organismo quando exposto ao GBH durante o período peripuberal.

3.3 SOBREPESO E OBESIDADE

Nas últimas três décadas o número de pessoas com sobrepeso e obesidade tem chamado atenção na agenda pública internacional devido a sua crescente prevalência, sendo considerada pela OMS como uma epidemia global. No Brasil, o sobrepeso e a obesidade aumentaram em todas as faixas etárias, em ambos os sexos, em todos os níveis de renda, mas com um crescimento maior nas famílias com baixa renda (DIAS *et al.*, 2017). Apesar disso, no Brasil apenas nos últimos 15 anos as políticas públicas assumiram prioridade no distúrbio devido a sua forte associação com as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), em particular as cardiovasculares, diabetes, dislipidemias, hipertensão arterial, aterosclerose, resistência à insulina, doenças hepáticas, dentre outras (FRANÇA *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2017).

A OMS define a obesidade como uma condição crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corpórea. Em âmbito global, a prevalência de sobrepeso e obesidade mais do que dobrou desde a década de 80, tendo sido constatados mais de 1,9 bilhões de adultos com sobrepeso, ou obesidade, em 2016 (MKUU; EPNERE; CHOWDHURY, 2018). Em relação à obesidade infantil, em 2014 foi estimado haver 41 milhões de crianças no mundo, com menos de cinco anos, que estavam com sobrepeso/obesidade (SE; JL, 2018). Em 2016, nas faixas etárias entre 5 e 19 anos, foi estimado um número de 340 milhões crianças e adolescentes que estavam acima do peso, ou obesas (OPAS, 2019). É previsto que até 2025, cerca 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões com obesidade. Entre as crianças, o número pode subir para 75 milhões com sobrepeso e obesidade, caso não sejam elaboradas novas políticas públicas de educação alimentar (ABESO, 2018).

A causa física central da obesidade é o desequilíbrio na ingestão alimentar e o sedentarismo. Entretanto, atualmente se sabe que as causas são multifatoriais, sendo elas: genéticas, metabólicas, neuroendócrinas, ambientais, sociais e culturais (SE; JL, 2018). Embora mudanças atuais na dieta e no comportamento são consideradas

fatores chaves para a epidemia da obesidade, existem indícios que demonstram o aumento da exposição humana a inúmeros produtos químicos sintéticos, como pesticidas, solventes, plásticos, medicamentos e corantes, que podem estar envolvidos no aumento do ganho de peso, existindo uma relação causal entre a epidemia de obesidade e a exposição a esses produtos químicos (BAILLIE-HAMILTON, 2002).

3.3.1 Estresse oxidativo associado à obesidade

A obesidade está associada à inflamação sistêmica crônica de baixo grau no tecido adiposo. Essa condição é influenciada pela ativação do sistema imune inato do tecido adiposo, que promove o estado pró-inflamatório e o estresse oxidativo. O tecido adiposo é um órgão de armazenamento necessário para a homeostase energética e função endócrina, sendo constituído por adipócitos e outras células, como fibroblastos, pré-adipócitos, células endoteliais e imunológicas que secretam hormônios e citocinas (adipocitocinas ou adipocinas) (MARSEGLIA *et al.*, 2015).

Embora seja difícil estabelecer a sequência temporal, o estresse oxidativo e a inflamação estão intimamente relacionados à obesidade (MELLO *et al.*, 2018). Foi verificado que o tecido adiposo em excesso promove o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6. O TNF- α é uma citocina que influencia na resposta inflamatória, a qual também aumenta a interação de elétrons com oxigênio para gerar ânions superóxidos (SAVINI *et al.*, 2013). Outros autores mencionam que o acúmulo de gordura promove aumento da atividade metabólica do miocárdio e elevação da taxa de consumo de O₂, e, conseqüentemente, a produção de EROS, tais como superóxidos e peróxidos de hidrogênios (FRANÇA *et al.*, 2013). Outra questão debatida entre os pesquisadores é que os obesos têm depleção de fontes antioxidantes, incluindo vitaminas A, C e E, e β -caroteno, o que os torna mais suscetíveis ao dano oxidativo (MARSEGLIA *et al.*, 2015). Estudos de Savini e colaboradores (2013) também abordam que uma das causas do desajuste no sistema antioxidante nos obesos ocorre pela menor ingestão de alimentos ricos em antioxidantes e fitoquímicos, como frutas, verduras e legumes.

O aumento das EROS pode desencadear alterações mitocondriais cuja a função principal é a produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP), assim como também são essenciais na eliminação das EROS (BOURNAT; BROWN, 2010). De acordo com Sohal e colaboradores (1990), cérebro o é extremamente acometido pela disfunção mitocondrial pelo fato de apresentar grande demanda metabólica, gerada principalmente pelo metabolismo energético mitocondrial, e, por conseguinte, apresentar maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo. Contudo, locais específicos do cérebro são mais propensos a lesões, sendo vistas alterações nas células hipotalâmicas em modelos obesos (VELLOSO; SCHWARTZ, 2011). Nesta perspectiva, estudos vêm demonstrando que a obesidade está associada a alterações nos neurônios do hipotálamo, ocasionando um desequilíbrio no metabolismo energético (MELLO *et al.*, 2018; TONIAZZO *et al.*, 2019). Conforme explica Savini e colaboradores (2013), é possível que EROS estejam envolvidos no controle do peso corporal, produzindo diferentes efeitos sobre os neurônios hipotalâmicos que controlam a saciedade e o comportamento da fome.

Em experimentos com ratos Wistar no período pré-puberal, machos e fêmeas foram isolados socialmente, com alimentação ou não a dietas hiperlipídicas (16% de gorduras saturadas e 26% insaturadas). O isolamento social durante o período pré-púbere, associado a dieta, pode exercer efeitos a longo prazo nos parâmetros do status oxidativo e na função mitocondrial, uma vez que foram verificadas no hipotálamo, aumento da atividade SOD nas fêmeas, decréscimo de GPx em ambos os sexos, elevação na atividade do complexo IV na cadeia transportadora de elétrons e diminuição da massa mitocondrial nas fêmeas (TONIAZZO, *et al.*, 2019).

De acordo com Savini e colaboradores (2013), a obesidade induzida por dieta hiperlipídica também se correlaciona com a disfunção mitocondrial e o aumento do estresse oxidativo nos músculos esqueléticos e no fígado. Nos tecidos musculares esqueléticos, os pesquisadores verificaram que o excesso de dieta hiperlipídica faz com que ocorra acúmulo intramiocelular de lipídeos (IMLC), causando distúrbios na função muscular e “lipotoxicidade” (UNGER *et al.*, 2010). Relativamente, a lipotoxicidade foi atribuída à elevação da produção de EROS (ANDERSON *et al.*, 2009). No fígado de camundongos foi investigado o efeito da dieta hiperlipídica no período perinatal, a dieta continha 29% de gordura. Os autores revelaram que a dieta materna diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx, SOD, e aumentou os marcadores de estresse oxidativo em ambos os sexos das proles (MIRANDA *et al.*,

2018). Em ratos obesos submetidos à terapia anti-retroviral, houve redução das concentrações de glutathiona testicular, SOD, CAT e elevação da LPO, sendo possivelmente efeitos oriundos da obesidade (OYEYIPO *et al.*, 2018).

Em uma pesquisa realizada com 30 pessoas separadas em 3 grupos, contendo 10 indivíduos cada, sendo estes: grupo dos sedentários com índice de massa corpórea (IMC) normal (IMC-NS); grupo dos sedentários com IMC elevado (IMC-ES) e grupo dos praticantes de atividade física com IMC normal (IMC-NPAF). Os resultados revelaram que o grupo IMC-ES possuiu níveis significativamente reduzidos de CAT, GST e TBARs quando comparados aos demais. Segundo os autores, o sobrepeso e a obesidade interferem na função das enzimas CAT e GST, ocasionando decréscimo na eficiência antioxidante e maior probabilidade de aumento do estresse oxidativo (NETO; PAULA, 2011).

3.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E RADICAIS LIVRES

Conforme já apresentado anteriormente, as espécies reativas ao oxigênio (EROs) podem promover disfunções metabólicas. Estas moléculas são oriundas de uma pequena quantidade do oxigênio consumido (2 a 5%) que é reduzida parcialmente, produzindo esta variedade de substâncias químicas altamente reativas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Radical livre é o conceito utilizado para um átomo, ou molécula, altamente reativa, que inclui em sua última camada eletrônica um número ímpar de elétrons (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). São formados a partir de reações de óxido-redução por meio do processo fisiológico, desempenhando funções biológicas de suma importância, sendo considerados necessários e normais até certa concentração. No sistema imune participam de mecanismos de defesa durante o processo de infecção, funcionando também como moléculas sinalizadoras na manutenção da homeostase intracelular, fertilização do óvulo, ativação de genes, dentre outras funções (BARBOSA *et al.*, 2010). Contudo, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos provenientes do oxigênio (EROS), pois alguns deles não apresentam elétrons despareados em sua última camada (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As EROS são divididas em grupos radicalares e não-radicalares. No grupo dos radicalares de maior interesse biológico enquadram-se o radical ânion superóxido

($\bullet\text{O}_2$), radical hidroxila ($-\text{OH}$), radical peróxido ($\text{ROO}\bullet$) e radical alcoxil ($\text{RO}\bullet$). Já no grupo dos não-radicalares, enquadra-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (BARREIROS; DAVID, 2006). Quando ocorre elevação da produção das EROS há um desequilíbrio orgânico, ocasionando o estresse oxidativo e conseqüentemente danos teciduais. Devido à tendência das EROS realizarem reações com componentes celulares, doando ou recebendo elétrons livres, acabam gerando danos ao DNA e alterações nas membranas celulares, sendo considerados a base da maioria das complicações de saúde (AROKOYO *et al.*, 2018).

A formação de EROS ocorre principalmente na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, citoplasma e membranas celulares. Dentro da mitocôndria o O_2 recebe quatro elétrons, sofrendo uma redução tetravalente, sendo seu resultado final a formação de água. Porém, no decorrer do processo são formados intermediários reativos, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais superóxido ($\bullet\text{O}_2$) e hidroxila ($-\text{OH}$) (CAVALCANTE *et al.*, 2009). A citocromo oxidase é uma enzima que catalisa esta reação, oxidando na extremidade da cadeia transportadora quatro moléculas de citocromo C, retirando um elétron de cada uma delas. Posteriormente, esses elétrons são incluídos no O_2 para formar água. É possível evidenciar que a enzima citocromo oxidase coordena a geração de EROS, diminuindo a produção excedente destes. Contudo, cerca de 2% a 5% do oxigênio sintetizado na mitocôndria são redirecionados em outra via metabólica e nesse processo o mesmo é reduzido a univalente, dando origem a mais EROS (BARBOSA, *et al.*, 2010).

3.4.1 Radical superóxido

O radical ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2$) é formado pela redução univalente do oxigênio molecular, ocorrendo em quase todas as células aeróbicas, principalmente na membrana mitocondrial por meio da cadeia transportadora de elétrons (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Sua performance como oxidante é considerada insignificante, entretanto, o mesmo possui capacidade em gerar radicais secundários como o radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$), que é considerado extremamente tóxico (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004; CAMPOS; YOSHIDA, 2004). A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a

dismutação de duas moléculas de $\bullet\text{O}_2$ em O_2 e H_2O_2 , salientando que quando não eliminados pelas enzimas catalase e peroxidases, podem gerar o radical hidroxila (OH) (BARREIROS; DAVID, 2006; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

3.4.2 Radical hidroxila

É considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de reagir com quase todas as moléculas biológicas (ANDRADE *et al.*, 2010). O radical é formado a partir de $\bullet\text{O}_2$ e H_2O_2 por meio das reações Fenton e Haber-Weiss, catalisados pelos íons Cobre (Cu^+) ou Ferro (Fe^{++}) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O radical também está envolvido no processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares, na inativação de proteínas e enzimas, pois oxida seus grupos sulfidrilas (SH) a pontes dissulfeto (SS), causando modificações estruturais no DNA por alterar as bases nitrogenadas e oxidar a desoxirribose, acarretando a ruptura da cadeia de DNA (BARREIROS; DAVID, 2006).

3.4.3 Peróxido de hidrogênio

Por meio da dismutação do $\bullet\text{O}_2$ catalisada pela enzima SOD e várias oxidases, é formada a molécula H_2O_2 (BARREIROS; DAVID, 2006). O H_2O_2 não é considerado um radical livre, pois não apresenta um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica, porém, é extremamente deletério por ser o formador do radical -OH. Apto a atravessar membranas celulares, apresenta seu potencial tóxico aumentado na presença dos íons Cu^+ e Fe^{++} , elevando sua toxicidade em função da atividade catalítica destes metais (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O H_2O_2 também está envolvido na oxidação de grupos sulfidrilas (-SH) de proteínas, e pode causar a ruptura das fitas de DNA. Contudo, por meio das enzimas glutathione peroxidase e catalase, o mesmo pode ser removido.

3.5 SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO

De acordo Amorim e Tirapegui (2008), o sistema de defesa antioxidante é caracterizado como qualquer substância que, quando exposta a moléculas oxidáveis, possui a competência de prevenir, ou retardar, a oxidação de biomoléculas. Portanto, este sistema consiste em proteger o organismo, mitigando as consequências provindas das reações ligadas à formação de EROS. Os antioxidantes podem ser divididos em sistemas enzimáticos incluindo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx) (MAFRA *et al.*, 1999), bem como uma ampla diversidade de substâncias antioxidantes não enzimáticas que são de fontes dietética, ou endógena, tais como as vitaminas E e C, o Cobre, Zinco, Selênio, o β -caroteno, a ubaquinona e os flavonóides (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

3.5.1 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD é uma metaloenzima existente em grande abundância nos organismos eucarióticos. É responsável por catalisar a dismutação do radical $\bullet\text{O}_2$ em oxigênio e H_2O_2 (Figura 4A). Esta enzima é classificada em três tipos distintos de acordo com o metal associado. A SOD-CuZn está presente principalmente no citoplasma, e é caracterizada como a primeira linha de defesa antioxidante, necessitando de íons de cobre para a atividade catalítica, e íons de zinco para promover a estabilidade da estrutura proteica. A SOD-Mn, com manganês em seu sítio ativo, é localizada na mitocôndria (BARREIROS; DAVID, 2006). A superóxido dismutase extracelular (SODEC), presente nos interstícios e nos fluidos extracelulares, é responsável pela atividade catalítica do radical superóxido no plasma, linfa e fluido sinovial, estando abundante no tecido pulmonar, protegendo o órgão contra o estresse oxidativo (ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2005).

3.5.2 Catalase

A catalase é uma heme proteína citoplasmática tetramérica responsável por catalisar a redução de H_2O_2 em H_2O e O_2 . A enzima está localizada na matriz dos peroxissomas e na mitocôndria. É de suma importância seu papel no organismo, pois

a eliminação do H_2O_2 decresce a formação do radical $-OH$ por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss (BARBOSA, *et al.*, 2010) (Figura 4B).

3.5.3 Glutationa peroxidase e Glutationa redutase.

A Glutationa peroxidase (GPx) também catalisa a redução H_2O_2 , usando como substrato a glutatona reduzida (GSH). A GSH é um tripeptídeo gamaglutamila-cisteína-glicina. Apresenta atividade redutora, sendo coordenado pelo grupamento tiol (-SH), presente na cisteína. Sua função é extremamente importante, pois protege contra lesões provenientes da exposição ao íon de ferro, à radiação, à luz ultravioleta, ao oxigênio hiperbárico, dentre outros. O contato com diferentes componentes oxidantes oxida a GSH para sua forma oxidada (GSSG) (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005). Percebe-se que as CAT e GPx apresentam funções similares, sendo que a ação conjunta destas enzimas é extremamente importante para evitar a geração do radical hidroxila (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007) (Figura 4C).

A Glutationa-redutase (GR) promove a oxidação da GSSG em GSH, garantindo o ciclo íntegro e de proteção celular. A GR é uma flavoproteína que depende da NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida). O decréscimo de NADPH, a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), ou períodos de jejum, promovem o prejuízo da função da GR, sendo que uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

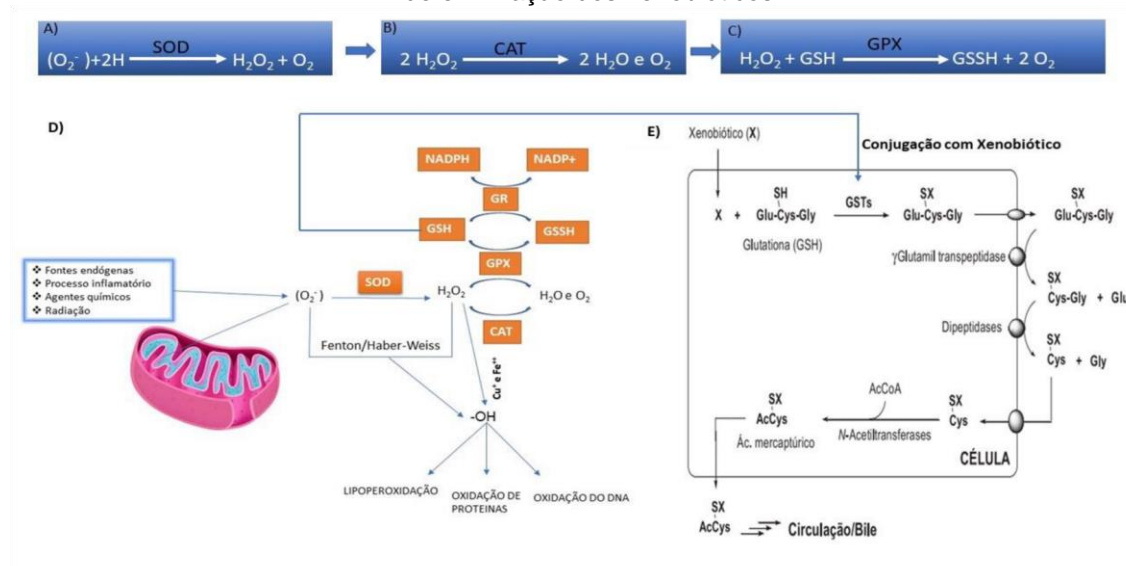
3.5.4 Glutationa transferase

As glutatonas S-transferases (GSTs) englobam-se na família de enzimas multifuncionais por executar atividades como: detoxificação celular e excreção de substâncias fisiológicas e xenobióticas, o que contribui para a diminuição dos danos celulares (WILCE; PARKER, 1994). A enzima catalisa o ataque nucleofílico da GSH a grupos eletrofílicos de compostos orgânicos (compostos endógenos e xenobióticos), convertendo tais compostos a condições menos tóxicas e aumentando sua solubilidade em água, (Figura 4E) sendo, portanto, um facilitador da eliminação de tais compostos (WILCE; PARKER, 1994; TORRES; SOARES; MAIA; 2004).

As GSTs encontram-se no meio biológico como homo-heterodímeros, possuindo dois sítios ativos por dímero. Cada sítio ativo apresenta no mínimo duas regiões de ligação, um para a glutathione (GSH), sendo muito específico para este tripeptídeo, e outro sítio de ligação com menor especificidade para os eletrófilos (HUBER; ALMEIDA, 2008). As enzimas nos mamíferos podem ser divididas em três grandes famílias: GSTs citosólicas, GSTs mitocondriais (enzimas solúveis) e GSTs microsomal associadas às membranas celulares. As GSTs citosólicas apresentam cerca de 5 a 40 vezes maiores atividades em relação às GSTs mitocondriais, e são divididas em nove classes: Alfa, Beta, Sigma, Theta, Kappa, Mu, Pi, Omega e Zeta (LEE *et al.*, 2002). Algumas GSTs, além da sua atividade catalítica, podem participar da síntese de prostaglandinas, atuar como transportadores intracelulares de vários componentes hidrofóbicos endógenos, tais como hormônios esteróides, heme, bilirrubinas, sais biliares e hormônios da tireoide (FREITAS; VAZ JUNIOR; MASUDA, 2008).

No esquema E da figura 4, pode-se visualizar como são os mecanismos de eliminação dos conjugados de glutathione para fora da célula. Quando formados, os conjugados GSH/xenobióticos são detectados por transportadores específicos e conduzidos para o meio intercelular. Posteriormente, os conjugados são clivados pela ação das enzimas γ -glutamil transpeptidase e dipeptidases, removendo um resíduo de ácido glutâmico. Adiante, ocorre a clivagem de um resíduo de glicina por dipeptidases, restando apenas o resíduo da cisteína ligada ao xenobiótico. O glutamato e a glicina podem ser reabsorvidos pela célula para a síntese de GSH, enquanto o conjugado cisteína/xenobiótico é acetilado pela ação de N-acetiltransferases, formando ácido mercaptúrico, que pode ser direcionado para a bile, ou, dependendo das características do xenobiótico (X), o correspondente ácido mercaptúrico poderá ser diretamente excretado na urina, ou metabolizado para ser eliminado (HUBER; ALMEIDA, 2008). Diante do exposto é possível observar uma ação conjunta dessas enzimas, com o objetivo de facilitar a eliminação dos conjugados de GSH.

Figura 4- A) Reação de dismutação do radical superóxido pela enzima Superóxido Dismutase; B) Reação de redução do peróxido pela enzima Catalase; C) Reação de redução do peróxido pela enzima Glutationa Peroxidase; D) Esquema do funcionamento em conjunto das enzimas do sistema antioxidante; E) Glutationa Transferase realizando a conjugação com glutatona reduzida, mecanismo de eliminação dos xenobióticos



Fonte: Esquemas A, B, C, D autoria própria; Esquema E (HUBER e ALMEIDA, 2008).

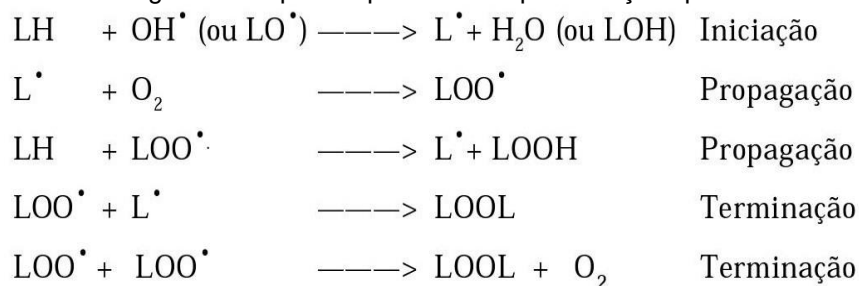
3.3.3 Lipoperoxidação

O radical -OH é considerado o principal desencadeador do processo de peroxidação lipídica, resultando em alterações nas funções biológicas das membranas celulares, acometendo estruturas e funções biológicas de proteínas, agressões ao DNA e até surgimentos de mutações (KOURYI; DONANGELO, 2003; BARBOSA *et al.*, 2010). A peroxidação lipídica, ou lipoperoxidação, é uma reação em cadeia que consiste na oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (BARBOSA, *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2013).

O mecanismo é dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. O processo é iniciado a partir da remoção de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular. Tal extração pode ser realizada pelo radical -OH , ou pelo radical alcóxila (LO^\cdot) e, por conseguinte, ocorre a formação do radical lipídico (L^\cdot). No início da propagação, rapidamente o L^\cdot reage com o O_2 , originando o radical peróxila (LOO^\cdot), o qual retira um novo átomo de hidrogênio do ácido graxo polinsaturado seguinte, originando outra vez um L^\cdot , sendo uma reação sequencial. A finalização do processo acontece quando os radicais produzidos anteriormente (L^\cdot e

LOO[·]) propagam-se até extinguir a si próprios (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) (Figura 4).

Figura 5- Etapas do processo de peroxidação lipídica.



Fonte: (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Como consequência ocorrem transtornos nas funções biológicas das membranas, como a perda da seletividade e a liberação dos conteúdos das organelas. A liberação excessiva de enzimas hidrolíticas dos lisossomos, por exemplo, pode resultar na formação de malonaldeído (MDA), que é considerado um dos produtos mais citotóxicos e que pode levar à morte celular. A lipoperoxidação pode estar ligada aos processos de carcinogênese e envelhecimento, sendo que seus metabólitos, em níveis excedentes, podem ser nocivos (MAFRA et al., 1999; FRANÇA et al., 2013)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO. **Mapa da obesidade**, 2018. Disponível em <<http://www.abeso.org.br/atitudesaudavel/mapa-obesidade>> Acesso em: 29 Novembro de 2019.

ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.79-85, 2010.

ANDRADE JÚNIOR, D.H. DE; SOUZA, R.B.; DOS SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. DE. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.31, n.1, p. 60-68, 2005.

ANDRIGHETT, M.S.; NACHTIGALL, G.R.; QUEIROZ, S.C.N. DE; FERRACIN, V.L.; AYUB, M.A.Z. Biodegradação de Glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 5, p. 1643–1653, 2014.

AMORIM, A.G.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais da relação entre exercício físico, estresse oxidativo e magnésio. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 5, p. 563-575, 2008.

ANDREOTTI, G.A.; KOUTROS, S.; HOFMANN, J.N.; SANDLER, D.P.; LUBIN, J.H.; LYNCH, C.F.; LERRO, C.C.; ROOS, A.J. DE; PARKS, C.G.; ALAVANJA, M.C.; SILVERMAN, D.T.; FREEMAN, L.E.B. Glyphosate Use and Cancer Incidence in the Agricultural Health Study. **Journal of the National Cancer Institute**, v.110, n. 5, p. 1-8, 2018.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.

AROKOYO, D.S.; OYEYIPO, I.P.; PLESSIS, S.S. DU; ABOUA, Y.G. Antioxidant Activities of Basella alba Aqueous Leave Extract In Blood, Pancreas, and Gonadal Tissues of Diabetic Male Wistar Rats. **Pharmacognosy Research**, v.10, n. 1, p. 3136, 2018.

ANVISA, **Monografias de agrotóxicos**, 2018. Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em: 02 de Maio 2018.

ANDERSON, J.E.; LUSTIG, M.E.; BOYLE, K.M.; WOODLIEF, T.L.; KANE, D.A.; LIN, C.; PRICE, J.C.; KANG, L.; RABINOVITCH, P.S.; SZETO, H.H.; HOUMARD, J.A.; CORTRIGHT, R.N.; WASSERMAN, D.H.; NEUFER, P.D. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 3, p. 573–581, 2009.

BARREIROS, A.L.B.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006.

BAIER, C.J.; GALLEGOS, C.E.; RAISMAN-VOZARI, R.; MINETTI, A.; Behavioral impairments following repeated intranasal glyphosate-based herbicide administration in mice. **Neurotoxicology and Teratology**, v.64, p. 63-72, 2017.

BARKER, D. J. P.; OSMOND, C.; WINTER, P.D.; MARGETTS, B.; SIMMONDS, S.J. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**, p. 578–580, 1989.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BRASIL. Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. **Lei 7802-1989 - Lei dos Agrotóxicos**, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumosagropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/lei-7802-1989lei-dos-agrotoxicos/view>>. Acesso em: 26 Novembro de 2019.

BENTO, C. P. M.; GOOSSENS, D.; REZAEI, M.; RIKSEN, M.; MOL, H.G.J.; RITSEMA, C.J.; GEISSEN, V. Glyphosate and AMPA distribution in wind-eroded sediment derived from loess soil. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 1079–1089, 2017.

BAILLIE-HAMILTON, P. F. Chemical toxins: A hypothesis to explain the global obesity epidemic. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 8, n. 2, p. 185– 192, 2002.

BIANCHI, M.L.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição Campinas**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BOHM, G.M.; ROMBALDI, C.V. Transformação genética e aplicação de Glifosato na microbiota do solo, fixação biológica de nitrogênio, qualidade e segurança de grãos de soja geneticamente modificada. **Ciência Rural**, v.40, n.1, p. 213-221, 2010.

BOHM, G.M.; SHENEIDER, L.; CASTILHOS, D.; AGOSTINETTO, D.; ROMBALDI, C.V. Controle de plantas daninhas, biomassa e metabolismo microbiano do solo em função da aplicação de Glifosato ou imazetapir na cultura da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 919-930, 2011.

BOULLU-CIOCCA, S.; DUTOUR, A.; GUILLAUME, V.; ACHARD, V.; OLIVER, C.; GRINO, M. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: Its relationship with the metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 197–203, 2005.

BURIGO, A.; VENÂNCIO, J. Impacto dos Agrotóxicos na alimentação , saúde e meio ambiente. **Laboratório Herbet de Souza**, p. 94, 2016.

BOURNAT, J.C.; BROWN, C.W. Mitochondrial dysfunction in obesity. **Obesity and nutrition**, n. 17, p. 446-452, 2010.

BRUSICK, D.; ARDEMA, M.; KIER, L.; KIRKLAND, D.; WILLIAMS, G. Genotoxicity Expert Panel review: weight of evidence evaluation of the genotoxicity of glyphosate, glyphosate-based formulations, and aminomethylphosphonic acid. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 56, p. 56-74, 2016.

CAMPOS, E.B.P. DE; YOSHIDA, W.B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n.4, p. 357-366, 2004.

CAVALLI, V.L. DE LIZ OLIVEIRA; CATTANI, D.; RIEG, C.E.H.; PIEROZAN, P.; ZANATTA, L.; PARISOTTO, E.B.; FILHO, D.W.; SILVA, F.G.M.B.; PESSOAPUREUR, R.; ZAMONER, A. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 335-346, 2013.

CAVALCANTE, A.G.M.; BRUIN, P.F.C.; O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1227-1237, 2009.

CATTANI, D.; CAVALLI, V.L. DE LIZ OLIVEIRA.; RIEG, C.E.H.; DOMINGUES, J.T.; DAL-CIM, T.; TASCA, C.I.; SILVA, F.R.M.B.; ZAMONER, A. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320, n. 1, p. 34-45, 2014.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J.P **O futuro roubado**: Porto Alegre, 2002.

COUTINHO, C.; MAZO, L.H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: Revisão. **Química Nova**, V. 28, N. 6, p.1038-1045, 2005.

DESAI, M.; JELLYMAN, JK.; ROSS, MG. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. International. **Journal of obesity**, v.39, n.4, p. 633-641, 2015.

DEFARGE, N.; TAKÁCS, E.; LOZANO, V.L.; MESNAGE, R.; VENDÔMOIS, J. SPIROUX DE; SÉRALINI, G.E.; SZÉKÁCS, A. Co-Formulants in Glyphosate-Based Herbicides Disrupt Aromatase Activity in Human Cells below. **Toxic Levels International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 3, p. 1-17, 2016.

DEFARGE, N.; VENDÔMOIS, J.; SPIROUX, D.E.; SÉRALINI, G. E. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticide. **Toxicology Reports**, v. 5, p.153-163, 2018.

DIAS, P.C; HENRIQUES, P.; ANJOS, L.A. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 7, p. 1-12, 2017.

DU, L.; LI, S.; QI, L.; HOU, Y.; ZENG, Y.; XU, W.;WANG,H.; ZHAO, X.; SUN, C. Metabonomic analysis of the joint toxic action of long-term low-level exposure to a mixture of four organophosphate pesticides in rat plasma. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 5, p. 1153–1161, 2014.

DRUART, C.; GIMBERT, F.; SCHEIFLER, R.; VAUFLEURY, A. DE. A full life-cycle bioassay with *Cantareus aspersus* shows reproductive effects of a glyphosate-based

herbicide suggesting potential endocrine disruption. **Environmental Pollution**, v. 226, p. 240–249, 2017.

FRANÇA, B.K.; ALVES, M.R.M.; SOUTO, F.M.S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R.F.; GUIMARÃES, A.; ALVES JUNIOR, A. Peroxidação lipídica e obesidade: métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de gastroenterologia**, v. 20, n. 5, p.199-206, 2013.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FREITAS, D. R. J. DE; VAZ JUNIOR, I.T.S.; MASUDA, A. Expressão e atividade enzimática de glutatona. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 99–104, 2008.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. **Diabetes**, v. 53, p.110-118, 2004.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M.H.G.; COLEPICOLO, P.; Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v.30, n.1, p. 206-213, 2007.

GALLEGOS, C.E.; BAIER, C.J.; BARTOS, M.; BRAS, C.; DOMINGUEZ, S.; MÓNACO, N.; GUMILIAR, F.; GIMÉNEZ, M.S.; MINETTI, A. Perinatal Glyphosate Based Herbicide Exposure in Rats Alters Brain Antioxidant Status, Glutamate and Acetylcholine Metabolism and Affects Recognition Memory. **Neurotoxicity Research**, p. 1–12, 2018.

GIEDD, J.; KESHAVAN, M.; PAUS, T. Why Psychiatric disorders in adolescence. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 12, p. 947–957, 2008.

GORE, A.C.; CREWS, C. DOAN, L.L.; LA MERRILL, M.; PATISAUL, H.; ZOTA, A. Introdução aos disruptores endócrinos (Des) um guia para governos e organizações de interesse público. **Endocrine Society**, p. 1-82, 2019.

GUYTON, K. Z.; LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; EL GHISSASSI, F.; BENBRAHIMTALLAA, L.; GUHA, N.; STRAIF, K. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet Oncology**, v. 16, p. 490–491, 2015

GUYTON, C. **Tratado de Fisiologia Médica**, 12ª Edição, 2011.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, p. 595–601, 1992.

HERNANDEZ-PLATA, L.; GIORDANO, M.; DÍAZ-MUNÓZ, M.; RODRÍGUEZ, V. The herbicide glyphosate causes behavioral changes and alterations in dopaminergic markers in male Sprague-Dawley rat. **NeuroToxicology**, v. 46, p. 79–91, 2015.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Agrotóxicos**, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>> Acesso em: 26 Novembro de 2019.

KERMACK W.O.; MCKENDRICK A.G.; MCKINLAY P.L. Death-rates in Great Britain and Sweden. Some general regularities and their significance. **International Journal of Epidemiology**, v. 30, p. 678–683, 2001.

KIER, L. D.; KIRKLAND, D. J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 283–315, 2013.

KIM, JK.; SAMARANAYAKE, M.; PRADHAN, S. Epigenetic mechanisms in mammals. **Cellular and molecular life sciences**, v.66, n.4, p. 596-612, 2009.

KOURYI, J.C.; DONANGELO, C.M.; Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v.16, n.4, p. 1-12, 2003.

KIRBY, M. F.; MORRIS, S.; HURST, M.; KIRBY, S.J.; NEALL, P.; TYLOR, T.; FAGG, A. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 780-791, 2000.

LEANDRO, C. G.; AMORIM, M.F.; HIRABARA, S.M.; CURI, R.; CASTRO, R.M. DE; Pode a atividade física materna modular a programação fetal induzida pela nutrição? **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 4, p. 559–569, 2009.

LEE, A.J.; HUNTLEY, J.; VAN DEN BROEK, A.; COATES, D.; ISAAC, R.E. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. **Veterinary Parasitology**. 105, 49-63, 2002.

LONDRES, F. **AGROTÓXICOS NO BRASIL: um guia para ação em defesa da vida**. 1º edição. Rio de Janeiro: AS-PTA - Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011, 191 p.

LOPES, F.M.; VARELA JUNIORA, A.S.; CORCINI, C.D.; SILVA, A.C. DA; GUAZZELLI, V.G.; TAVARES, G.; ROSA, C.E. DA; Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. **Aquatic Toxicology**, v.155, p. 322-326, 2014.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **The childhood environment and adult disease**, p. 38–55, 1991.

LUSHCHAK, O.V.; KUBRAK, O.I.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v.76, p. 932-937, 2009.

LUO, L.; WANG, F.; ZHANG, Y.; ZENG, M.; ZHONG, C.; XIAO, F. In vitro cytotoxicity assessment of roundup (glyphosate) in L-02 hepatocytes. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 52, n. 6, p. 410-417, 2017.

MAFRA, D.; ABDALLA, D.S.P.; COZZOLINO, S.M.F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição Campinas**, v.3, n.12, p. 205-212, 1999.

MARSEGLIA, L.; MANTI, S.; D'ANGELO, G.; NICOTERA, A.; PARISI, E.; ROSA, G. DI; GRITTO, E.; ARRIG, T. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 378-400, 2015.

MARTÍNEZ, M.A.; ARES, I.; RODRÍGUEZ, J.L.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; ANADÓN, A. Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. **Environmental Research**, v. 161, p. 212–219, 2018.

MESSER, L.C.; BOONE-HEINONEN, J.; MPONWANE, L.; WALLACK, L.; THORNBURG L.K. Developmental Programming: Priming Disease Susceptibility for Subsequent Generations. **Physiology & behavior**, v.176, p.37-51, 2015.

MENÉNDEZ-HELMAN, R.J.; FERREYROA, G.V.; AFONSO, M. DOS SANTOS; SALIBIÁN, A. Glyphosate as an Acetylcholinesterase Inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, p. 6–9, 2012.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, n. 6, p. 781–787, 2010.

MELLO, A.H. DE; COSTA, A.B.; ENGEL, J.D.G.; REZIN, G.T. Mitochondrial dysfunction in obesity. **Lifesciences**, 2018.

MILIĆ, M.; ŽUNEC, S.; MICEK, V.; KAŠUBA, V.; MIKOLIĆ, A.; LOVAKOVIĆ, B.T.; SEMREN, T.Z.; PAVIČIĆ, I.; ČERMAK, A.M.M.; PIZENT, A.; VRDOLJAK, A.L.; VALENCIA-QUINTANA, R.; SÁNCHEZ-ALARCÓN, J.; ŽELJEŽIĆ, D. Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 69, p. 154–168, 2018.

MIRANDA, R.A.; ALMEIDA, M.M. DE; ROCHA, C.P.D. DA; BRITO FASSARELLA, L. DE; SOUZA, L.L. DE; SOUZA, A.F.P. DE; ANDRADE, C.B.V. DE; FORTUNATO, R.S.; PAZOS-MOURA, C.; TREVENZOLI, I.H. Maternal high-fat diet consumption induces sex-dependent alterations of the endocannabinoid system and redox homeostasis in liver of adult rat offspring. **Scientific Reports**, p.1–12, 2018.

MONEKE, A.N.; OKPALA, G.N.; ANYANWU, C.U. Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 26, p. 4067-4074, 2010.

MKUU, R.S; EPNERE, K.; CHOWDHURY, M.A.B. Prevalence and Predictors of Overweight and Obesity Among Kenyan Women. **Preventing chronic disease public health research, practice, and policy**, v. 15, n. 44, p. 1-10, 2018.

NETO, J.M.F.A.; PAULA, L.B. DE.; Índices de estresse oxidativo em sujeitos com diferentes níveis de composição corporal e aderência a prática de atividade física. **Journal of biomotricity**, v. 5, n. 2, p. 117-131, 2011.

NIMET, J.; GUIMARÃES, A. T. B.; DELARIVA, R. L. Use of Muscular Cholinesterase of *Astyanax bifasciatus* (Teleostei, Characidae) as a Biomarker in Biomonitoring of Rural Streams. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 99, n. 2, p. 232–238, 2017.

NISHIYORI, Y.; NISHIDA, M.; SHIODA, K.; SUDA, S.; KATO, S. Unilateral hippocampal infarction associated with an attempted suicide: a case report. **Journal of Medical case reports**, v. 8, n. 1, p. 1–4, 2014.

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.

OLIVEIRA JR, R.S.; DVORANEN, E.C.; CONSTANTIN, J.; CAVALIERI, S.D.; FRANCHINI, L.H.M.; RIOS, F.A.; BLAINSKI, E. Influência do glyphosate sobre a nodulação e o crescimento de cultivares de soja resistente ao glyphosate. **Planta Daninha**, v. 26, n.4, p. 831-843, 2008.

OMOIKE, O.; LEWIS, R.C.; MEEKER, J.D. Association between urinary biomarkers of exposure to organophosphate insecticides and serum reproductive hormones in men from NHANES 1999–2002. **Reproductive Toxicology**, v. 176, p. 139-148, 2017.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Exposure to Highly Hazardous Pesticides: a Major Public Health Concern. Geneva**, 2010. Disponível em: <https://www.who.int/ipcs/features/hazardous_pesticides.pdf> Acesso em: 27 Novembro de 2019.

OPAS. **Obesidade entre crianças e adolescentes aumentou dez vezes em quatro décadas, revela novo estudo do Imperial College London e da OMS**, 2019.

Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5527:obesidade-entre-criancas-e-adolescentes-aumentou-dez-vezes-em-quatro-decadasrevela-novo-estudo-do-imperial-college-london-e-da-oms&Itemid=820> Acesso em: 29 Novembro de 2019.

OYEYIPO, I.P.; SKOSANA, B.T.; EVERSON, F.P.; STRIJDOM, H.; DU PLESSIS, S.S. Highly Active Antiretroviral Therapy Alters Sperm Parameters and Testicular Antioxidant Status in Diet-Induced Obese Rats. **Toxicological Research**, v. 34, n.1, p. 41-48, 2018.

ORTIZ-ORDOÑEZ, E.; URÍA-GALICIA, E.; RUIZ-PICOS, R.A.; DURAN, A.G.S.; TREJO, Y.H.; SEDEÑO-DÍAZ, J.E.; LÓPEZ, E. Effect of Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 61, n. 3, p. 443–452, 2011.

PIETROBON, C.; SENEM, J. Avaliação dos efeitos toxicológicos do herbicida Glifosato sobre o estômago de ratos Wistar machos. **Revista Cultivando o Saber**, v. 8, p. 172–183, 2015.

QUEIROZ, I.F.R.; VIANA, L. S.; FILHO, R.F.; RIBEIRO, M.A.; ALBUQUERQUE, I. M. N.; NETO, F. R. G. X. Contextualizando a realidade do uso de agrotóxicos na agricultura familiar. **Extensão em Ação**, v. 1, n. 13, p. 54–68, 2017.

RATTAN, S.; FLAWS, J. A. The epigenetic impacts of endocrine disruptors on female reproduction across generations. **Biology of Reproduction**, p. 1–10, 2019.

RAVELLI, G.P.; STEIN, Z.A.; SUSSER, M.W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy, **Journal Medicine**. v. 295, n.7, p. 349-353, 1976.

ROMANO, R.M.; ROMANO, M.U.; OLIVEIRA, C.A. DE; Glifosato como desregulador endócrino químico. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 5, n. 2, p. 359-372, 2009.

SAVINI, I.; CATANI, M.V.; EVANGELISTA, D.; GASPERI, V.; AVIGLIANO, L. Obesity Associated Oxidative Stress: Strategies Finalized to Improve Redox State. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p. 10497-10538, 2013.

SE, W.; JL, G. Childhood Overweight and Obesity Trends in the United States Obesity. **Journals Childhood Overweight and Obesity**, p. 1–7, 2018.

SILVEIRA, P.P.; PORTELLA A.K.; GOLDANI M.Z.; BARBIERI M.A. Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 6, p. 494-504, 2007.

SOBJAK, T.M.; ROMÃO, S.; NASCIMENTO, C.Z. DO; SANTOS, A.F.P. DOS; VOGEL, L.; GUIMARÃES, A.T.B. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of Rhamdia quelen fish. **Chemosphere**, v.182, p. 267-275, 2017.

SOBJAK, T. M.; ROMÃO, S.; CAZAROLLI, L.H.; SAMPAIO, S.C.; REMOR, M.B.; GUIMARÃES, A.T.B. Evaluation of the antioxidant system and neurotoxic effects observed in Rhamdia branneri (Teleostei: Heptapteridae) sampled from streams of the lower Iguazu River basin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 155, p. 162– 170, 2018.

SOHAL, R.S.; ARNOLD, L.A.; SOHAL, B. Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. **Free Radical Biology & Medicine**, v.10, p. 495–500, 1990.

TARAZONA, J.V.; COURT_MARQUES, D.; TIRAMANI, M.; REICH, H.; PFEIL, R.; ISTACE, F.; CRIVELLENTI, F. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 8, p. 2723–2743, 2017.

TEIXEIRA, J.M. DOS SANTOS; LIMA, V. DA SILVA; MOURA, F.R. DE; COSTA MARISCO, P. DA; SINHORIN, A.P.; SINHORIN, V.D.G. Acute toxicity and effects of Roundup Original® on pintado da Amazônia. **Environmental Science and Pollution Research**, p.1-7, 2018.

TONIAZZO, A.P.; ARCEGO, D.M.; LAZZARETTI, C.; MOTA, C.; SCHNORR, C.E.; PETTENUZZO, L.F.; KROLOW, R.; MOREIRA, J.C.F.; DALMA, C. Neurochemistry International Sex-dependent effect on mitochondrial and oxidative stress parameters in the hypothalamus induced by prepubertal stress and access to high fat diet. **Neurochemistry International**, v. 124, p. 114–122, 2019

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. D. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 243–248, 2004. TONI, L.R.M.; DE SANTANA, H.; ZAIA, D.A.M. adsorção de Glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, V. 29, N. 4, p. 829-833, 2006

TURKMEN, R.; BIRDANE, Y.A.; DEMIREL, H.H.; KABU, M.; INCE, S. Protective effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress, biochemical and histopathological changes induced by sub-chronic oral glyphosate based herbicide in rats. **Toxicology Research**, p. 1-8, 2019.

UNGER, R. H.; CLARK, G.O.; SCHERER, P.E.; ORCI, L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 209–214, 2010.

US EPA. **R.E.D. FACTS: Glyphosate**. p. 7, 1993. Disponível em: <<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0178fact.pdf>> Acesso em: 12 fevereiro, 2020.

VELLOSO, L. A.; SCHWARTZ, M. W. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. **International Journal of Obesity**, v. 35, n. 12, p. 1455–1465, 2011.

WAISSMANN, W. Health surveillance and endocrine disruptors. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 511-517, 2002.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WILLIAMS, TC.; DRAKE, AJ. What a general paediatrician needs to know about early life programming. **Archives of disease in childhood**, p. 1058-1063, 2014.

WILCE, M.C.J; PARKER, M.W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochimica et biophysica acta**, 1205, p. 1-18, 1994.

XAVIER, J.L.P.; SCOMPARIN, D.X.; RIBEIRO, P.R.; CORDEIRO, M.M.; GRASSIOLLI, S. Programação Metabólica: Causas e Consequências. **Visão Acadêmica**, v.16, n.4, p. 33-41, 2015.

ZEBRAL, Y.D.; LANSINI, L.R.; COSTA, P.G.; ROZA, M.; BIANCHINI, A.; ROBALDO, R.B. A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. **Chemosphere**, v. 12, n. 196, p. 260-269, 2018.

Exposure to Glyphosate-based herbicide during the peripubertal period potentiates changes in the antioxidant system and cholinesterase enzyme activity in adult mice submitted to high-fat diet.

Short title: Glyphosate potentiates changes in antioxidant system in obese mice

¹Renan Fernando Bruschi ²Ana Paula Farina Rosolen ²Suellen Camila Padilha

¹Camila Maria Toigo de Oliveira ²Maria Lúcia Bonfleur ¹Ana Tereza Bittencourt
Guimarães

1 – Laboratório de Investigações Biológicas (LInBio), CCBS, UNIOESTE, PR, Brasil

2 – Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM), CCBS, UNIOESTE,
PR, Brasil

* **Correspondência para:** Ana Tereza Bittencourt Guimarães

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

Laboratório de Investigações Biológicas

Cascavel, PR, Brazil CEP: 85819-110

Email: anatbguimaraes@gmail.com

ABSTRACT

Glyphosate-based herbicide (GBH) are the most used in agriculture worldwide.

In our research,

male and female mice of the C57BL6 were chronically exposed to low doses of GBH 50mg.kg⁻¹ during the peripubertal period, later

as adults, they were induced to obesity by means of hyperlipidic diet (DH). When the animals there were 150 days of life, they were obtained

biometric measurements euthanized heavy and dessected

retroperitoneal, perigonadal and brown adipose tissues. Hypothalamic and liver

tissues and soleus muscle were also sampled to analyze the performace of the

antioxidant system (SOD, CAT, GR, GST) and Lipoperoxidation Reaction (LPO), as

well as cholinesterase (ChE) enzyme activity. The GBH-DH animals tend to be more

heavier in both sexes compared to other groups, in the same way it was found out in

females, with Lee index and higher adipose tissues. We evidenced greater enzymatic

activities and LPO reaction in the liver of GBH-DH females when compared to GBH-

DP and CTL-DP. In muscle tissue, it was observed reductions enzymatic activities

and increasement of LPO in GBH-DH females, when compared to GBH-DP and CTL-

DP. In males, we didn't find statistical differences. With this research, we verified

exposure to GBH during the peripubetal period potentiated changes in the

antioxidant system and ChE in females that received a hyperlipidic diet, such

changes occurred in the liver and soleus muscle. In addition, we showed evidence of

obesogen effects when the organism is subjected to GBH in the peripubertal period

and the second hit (DH) it can amplifying the effects of programming.

Key words: Pesticides, Obesity, Metabolic Programming, Oxidative Stress

INTRODUCTION

In the last three decades, the number of overweight and obese people has drawn attention on international public agenda, due to its increasing prevalence, being considered by the World Health Organization (WHO) as a global epidemic.¹ In Brazil, excess weight and obesity increased in all ages groups both genders all income levels² becoming something of concern because of its strong association with chronic non-transmissible diseases, cardiovascular diseases, diabetes, dyslipidemias, arterial hypertension, atherosclerosis, insulin resistance, liver diseases among others.³ However, programming is not limited only to nutritional insults. Exposure to agrochemical is also related to several metabolic dysfunctions,^{4,5} emphasizing that exposure to these substances at certain stages of development may be related to the progress of obesity in adulthood.⁶ Currently, contact with these compounds has become a global health problem.⁷ The annual consumption of pesticides worldwide is about 2 million tons.⁸ Humans and other animals are exposed to these substances by air, contaminated soil, food and water.^{5,9} Brazil has already been the world's largest consumer pesticides with values above one million tons per year.¹⁰ One of the most commercialized agrochemicals in Brazil and in the world is Glyphosate-based herbicide (GBH), used in agriculture, silviculture, urban uses, domestic ones among others.^{11,12} Although apparently safe to use, GBH may be endocrine arcinogenic genotoxic disruptors¹³ and oxidative stress-inducing¹⁴ changing the functioning of the enzymes of the antioxidant system,¹⁵ besides the possibility of presenting anticholinesteric effects.¹⁶

In the present study, we questioned whether chronic exposure to low doses of GBH during the peripubertal period potentiates changes in enzymes of the antioxidant system and cholinesterase in the liver, in the hypothalamus and soleus

muscle of mice were induced to obesity by hyperlipidic diet as adults. The enzymatic analyses were performed in the liver for the reason this participates in several metabolic functions; in the hypothalamus, because it is involved in hormone synthesis and energetic balance and in the soleus muscle, because it is oxidative and it has an abundance of mitochondria.¹⁷ Besides that, our research verified the possibility of GBH to be an obesogenic substance, evaluating retroperitoneal, perigonadal and brown adiposes tissues, as well as body measurements. In our hypothesis, the mice exposed to GBH in the peripubertal period and subsequently submitted to administration of the second stressful agent (hyperlipidic diet), it will have exacerbated changes in biomarkers due to increased oxidative stress and the deleterious effects of obesity. Since the second “hit” can amplify or activate the effects of metabolic programming.

Methods

Experimental Design

The research was experimental with a completely randomized design in a factorial scheme and with a quantitative approach. Experiments were carried out at the State University of Western of Paraná (UNIOESTE). They were initiated after approval by the Ethics committee in research with animals (11/05/2018). The sample group was consisted of 47 mice (males and females) of the C57BL6 lineage allocated in the Sector Bioterium of the Laboratory of Endocrine Physiology and Metabolism (LEPM), in polypropylene plastic boxes with access to water *ad libitum*, controlled feeding, temperature set to 25°C and 12/12 hours dark light photoperiod. Initially, the animals were separated according to sex and allocated two experimental groups: Control Group (CTL, n=24; 12 males and 12 females) - the animals received daily

potable water by gavage; Glyphosate-based herbicide Group (GBH, n=23, 13 males and 10 females). The animals of the GBH group received 50 mg.Kg⁻¹ of glyphosate for 30 days per gavage¹⁸ with adjustment of acidity with hydrochloric acid to pH between 5 and 5,5. This adjustment was made to improve the action of the compound, since less ionized glyphosate molecules permeate the plasma membrane more easily¹⁹. The commercial compound used was the herbicide (Roundup Original DI®, Monosanto) which contains 445 g.L⁻¹ of N-phosphonomethylglycine diamonium salt corresponding to 370 (37,0% w/v) of the active glyphosate component (Nphosphomethylglycine). The CTL group that received drinking water also had its pH adjusted.

The animals used in the experiment are descended from 8 females with no degree of kinship, whose average number of progeny was 6 mouse puppies per female. After 60 days of life, the broods were redistributed according to sex and groups to avoid inbreeding in the strains. The animals were distributed in the experimental groups, they were renamed according to the exposure, or not, to GBH and the administration, or not, of the hyperlipidic diet (Fig. 1). The groups were subdivided into: Standard Diet Control (CTL-DP), n=12 (8 males and 4 females). In the period from 30 to 60 days they received water by gavage and were fed DP for the whole experimental period; Hyperlipidic Diet Control (CTL-DH), n=12 (4 males and 8 females). In the period from 30 to 60 days they received water by gavage and were fed with DP, and from 60 to 150 days they received DH; Glyphosate-based herbicide (GBH-DP), n=12 (6 males and 6 females). In the period from 30 to 60 days they were exposed daily to GBH and were fed with DP for the entire experimental period; Glyphosate-based herbicide with a hyperlipidic diet (GBH-DH), n=12 (7 males and 4

females). In the period from 30 to 60 they were exposed to GBH and were fed a hyperlipid diet DH from 60 to 150 days.

Composition of Diets

DP was composed of 70% carbohydrates, 20% proteins and 10% fats, containing a total of 3,8 Kcal.g⁻¹ (Nuvital, Brasil). DH was composed of 50% of crushed standard feed; 14,8% casein, 4% soybean oil and 31,2 lard, containing a total of 5,2 Kcal.g⁻¹.

Euthanasia and collection of biological material

At 150 days of life, the animals were weighted and the naso-anal length was measured, and these data were later used to calculate the Lee Index (LI). Then the animals were anesthetized with xylazine hydrochloride (Anasedan®, Vetbrands, Brazil) and ketamine hydrochloride (Dopalen®, Vetbrands, Brazil) in the concentrations of 9 mg.Kg⁻¹ e 90 mg.Kg⁻¹. After that sedation was certified by absence of the skin reflex, the animals were euthanized and the blood collected by cardiac puncture. Then, a laparotomy was performed, and the retroperitoneal, perigonal and brown fats were removed and weighed. Finally, the remaining tissues were collected: liver, hypothalamus and soleus muscle which were homogenized in 1 mL of 50 mM Tris HCL buffer pH 7.4, were centrifuged at 10.000 rpm for 10 minutes, at 4°C, and the supernatant was frozen -20°C to further analysis. The protein quantification of the samples was determined by Bradford method²⁰ using bovine serum albumin as standard. The liver samples were normalized to 1 mg of protein mL⁻¹ and were used for sequential analysis. The other tissues were used with the original protein concentrations.

Enzyme dosage associated with neurotoxicity

ChE analysis was done according to the method of Ellman *et al.*,²¹ modified for microplates by Silva de Assis²² whose principle is the measurement of thiocholine production when acetylthiocholine is hydrolyzed. This is done by continuous reacting the thiol with the 5:5-dithiobis-2-nitrobenzoate ion to produce the yellow-colored anion of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. The reaction was carried out in triplicate, in 300 μL of solution containing 0,05mM of 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) and 1,5mM acetylthiocholine (ATC). ChE activity was calculated in relation to protein concentration (mg/ mL), using the molar extinction coefficient of the DTNB ($1,36\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) and the protein quantification calculated from the crude sample. The results were expressed in $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$.

Enzyme dosage associated antioxidant system

The activity of superoxide dismutase (SOD) was evaluated according to the method proposed by Crouch *et al.*,²³ modified. The principle of this analysis is to quantify the complex formed between superoxide and tetrazolium blue (NBT), measured at 560nm for 1,5 hours. In final volume of 200uL containing 0,1 mg of protein.mL⁻¹, 0,09 mM de NBT, 0,015 mM de EDTA, 34,78 mM hydroxylamine sulfate, 79mM sodium carbonate buffer pH 10,2, DSO units were expressed in U.mg of protein⁻¹ with U represents 50% of reduction of NBT compared to white.

Catalase activity (CAT) was accompanied by a decrease in absorbance at 240nm, ²⁴ from the principle of peroxide dismutation, whose molar extinction coefficient is $40\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. The duplicates, in 300 μL of solution in a quartz cuvette at 25°C, showed final concentration of 0,01 mg of protein.mL⁻¹, as the mean of the

reaction showed final concentrations of 13,5 mM H₂O₂, 50 mM of TRIS-HCl pH 8,0 and 0,25 mM EDTA. The catalase enzyme activity results were expressed in mmol.min⁻¹.mg of protein⁻¹.

In the analysis of transferase glutathione (TGS) activity, the enzyme catalyzes the conjugation of reduced glutathione (GSH) with the synthetic substrate CDNB that produces a conjugate detected at 340nm.²⁵ During the essay, the enzymatic activity is proportional to the production speed of the conjugated compound. The essay was performed in triplicate in a quartz microplate, and the sample presented final concentration of 0,020 mg of protein.mL⁻¹. The middle of reaction showed final concentrations of 0,94 mM CDNB and 0,94 mM GSH. The molar extinction coefficient of the GSH / CDNB conjugate is 9,6 mM⁻¹.cm⁻¹ and the unit was expressed in nmol.min⁻¹.mg of protein⁻¹.

Glutathione reductase catalyze the reduction of disulfide glutathione (GSSG) through the oxidation of NADPH, whose decrease in absorbance is measured at 340 nm.²⁶ Essay was performed in duplicate, the mean of the reaction showed final concentrations of 0,138 mM NADPH, 3,81 mM GSSG and 3,75 mM EDTA. The molar extinction coefficient of NADPH is 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹. The unit was expressed in nmol.min⁻¹.mg de protein.

The determination of the lipoperoxidation reaction (LPO) was performed to indirectly quantify the peroxides, thus reflecting the intensity of the lipid peroxidation.²⁷ The TBARS²⁸ method was performed, comparing absorbance with Melodialdehyde (MDA) standard curve. For sample preparation, the mean containing a 0,33 mg / mL aliquot of sample protein in 6,7% trichloroacetic acid (TCA) in a final volume of 180 µL, was agitated in vortex, left in an ice bath for 5 minutes and centrifuged for 5 minutes at 12000 rpm at 4°C.

For the dosage of reactive substances of thiobarbituric acid (TBARS), 40 μ L of the supernatant, as well as different concentrations of MDA were added in microplate in triplicate at the mean of reaction containing 21,42 mM TBA, 17,86 mM of NaOH (used to solubilize TBA), 0,73 M TCA, 0,032 mM BHT, 3% ethanol (used to solubilize BHT) in PBS. The reaction was read at 22°C, after 60 minutes of incubation at 60°C, at an absorbance of 535 nm. The results of lipid peroxidation were expressed in MDA.mg nmol of protein⁻¹.

Statistical analysis

Descriptive and inferential statistics were calculated for the variables: body weight, naso-anal length, Lee index and weight of retroperitoneal, perigonal and brown fats. A similar procedure was also applied for the values obtained in the evaluation of the enzymes Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Reductase (GR), Glutathione Transferase (GST), Cholinesterase (ChE) and Lipoperoxidation reaction (LPO) for the organs: liver, hypothalamus and soleus muscle. Such variables were evaluated by means of the triple factor Variance Analysis, considering as fixed effects the exposure to the Glyphosate-based herbicide (GBH), diet (CTL and DH) and sex (M and F), with a significance level of 0,05. In case of significance, the groups were compared using the Tukey-NHSD test.

The variables mentioned were also standardized and analyzed through principal component analysis (PCA). In this analysis the factorial loadings were defined, which are defined as the correlations of each variable with the factor composition. This factor being a new statistical variable defined by the set of factorial loadings. The factorial loadings resulting from the PCA were evaluated separately of each sex, using a model of linear mixed effects (LMER), considering fixed effects on

Glyphosate-based herbicide (CTL and GBH) exposure and diet (DP and DH) and the mixed effects were the liver muscle and hypothalamic tissues evaluated in each individual. In case of statistical significance ($p < 0,05$), the evaluation between combinations of factors in a variety of adjusted linear models was performed using the minimum square method, which allows to estimate and contrast slopes of the trend lines. Statistical analyses were performed in the R Core Team program,²⁹ using packages ExpDes.pt, ggplot2, lmer and lsmeans.

Results

Biometric Analysis

We showed, over 18 weeks of experimentation, statistical differences between diets ($F=10,863$; $p=0,002$), with no distinction between groups ($F=0,013$; $p=0,910$). However, it was possible to visualize the interaction of factors ($F=2,958$; $p=0,00006$) and greater weight of the GBH-DH animals in relation to the other groups (Fig. 2).

Morphometric and biochemical association of tissues between groups

The next results presented refer to the linear summarization of the results found in the analyses in latent variables, which represent linear relation of the studied variables. The raw data that formed these latent variables (morphometric measurements and biochemical analysis for the experimental groups) are represented and described in supplementary material.

In this synthesis, it was verified that all the biomarkers are represented in the first main component (Dimension 1 - Dim. 1), and the positive scores of this component represent an increase in the activity of CAT, GR, GST enzymes and LPO reaction, as well as ChE enzyme activation, and the negatives scores represent the

SOD activation. The results of Dim. 1 are showing an indication of activation of the antioxidant system, occurrence of oxidative stress and activation of the cholinergic system (Figura 3A). Still evaluating the factorial loading of Dim. 1, a comparison was made between the groups, but between the sexes separately since they represented different activities.

Among females it was found that there were significant statistical differences ($F_4=68.960$; $p<0,0001$), and liver tissue showed higher activity of the enzymes CAT, GR, GST ChE and LPO reaction when compared to muscle and hypothalamic tissues, and also with stronger SOD activity (Fig.3A). Still in the liver of the females, when comparing the groups, we noticed a reduction in activities in the GBH-DP group in relation to CTL-DH ($t=5.672$; $p=0.0003$). In the GBH-DH group, we noticed enzymatic activation and the increase in lipoperoxidation reaction, with higher averages when compared to GBH-DP ($t=6.603$; $p<0.0001$) and CTL-DP ($t=6.844$; $p<0.0001$) (Fig. 3B).

In the muscle tissue of females, statistical differences were also seen with greater averages in GBH-DP compared to CTL-DH ($t=5.761$; $p=0.0003$). Differently it happens in GBH-DH, the activities of antioxidant system enzymes are reduced, we also observed an anticholinesterase action and an increase in lipoperoxidation when compared to GBH-DP ($t=6.423$; $p<0.0001$) and CTL-DP ($t=7.102$; $p<0.0001$) groups (Fig.3B).

In males, significant differences were observed just in comparisons between tissues ($F_2=151.37$; $p<0.0001$), with no statistical differences between CTL and GBH groups (Fig.3C). In this analysis in males, as well as in females, it was verified that SOD, CAT, GR, GST, ChE enzymes activity and LPO reaction were significantly

higher in the liver, when compared to muscle and hypothalamic tissues ($t=17.27$; $p<0.0001$).

The second main component (Dimension 2 - Dim. 2) was represented by the variables, weight of adipose tissues; Retroperitoneal (RP), Perigonodal (PG), Brown (MA) and Lee Index (IL) where as the positive scores represented the highest values of such variables especially in the animals groups that received the hyperlipidic diet (Figura 3A). When comparing the Dimension 2 factorial loading between female and males separately, it was possible to verify that the statistical differences were reflected only by the diet ($F_2=74.359$, $p<0,0001$; $F_2=82.716$, $p<0,0001$), respectively with the highest values observed among those with hyperlipidic diet, with no distinction between CTL and GBH experimental groups ($p>0,05$; Figuras 3D e 4E).

Discussion

The main result of this work was the potential action of metabolic programming by exposure to GBH in the peripubetal period of female mice fed with DH in adulthood, since they showed enzymatic changes in the antioxidant system and lipoperoxidation reaction (LPO) in the liver and muscle.

The adult mice, when euthanized, were 90 days without exposure to GBH, despite the cessation of administration, we evidenced that chronic exposure of low concentrations caused changes in the redox state and cholinesterase activity in females who were exposed to GBH in peripubetal period and later received a hyperlipidic diet (DH). In addition, a tendency to gain weight in both sexes in GBH-DH over the course of eighteen weeks is shown in Fig. 2. In a similar, way it is visualized in Fig. 3D since adipose tissues and Lee index, tend to be higher in GBH-DH females. However, in both analyzes there were statistical differences only in diet

factor. In our supplementary material, the biometric variables were analyzed individually with an interaction in the perigonadal tissue (PG), with an increase in the PG tissue in both sexes of the GBH-DH.

Indications of obesogen effects were found in this study, however, despite such indications the definition of obesogen effects is controversial, as already seen in the literature. According to Bali *et al.*,³⁰ exposure to GBH during perupubetal period until adulthood decrease the weight of mice. Although, there are data in the literature reporting that exposure to GBH promotes a decrease in the concentration of the tryptophan aminoacid,³¹ and such reductions in the aminoacid can compromise the formation of serotonin and melatonin in the brain³² and, therefore, they lead to obesity.³³ On the other hand, data show that the reduction or absence of tryptophan can also result in an inability of microbial control due to the impaired release of peptides, resulting in a highly inflamed digestive system with difficulties in absorbing nutrients through the intestine, which can lead to weight loss.³⁴ In our study, the herbicide concentrations are considered low, however, we have demonstrated important evidence of obesogenic effects that can occur when the organism is exposed during puberty. Although, it is of great relevance to emphasize that such indications are observed only with the presence of the second hit in adulthood. It is notesable that the increase in visceral fat is directly related to metabolic disorders, and its excess is associated with oxidative damage due to the inflammatory process that is triggered.³⁵

In relation to enzymatic activies analyzed and the evaluation of oxidative stress, was observed an increase in the enzymatic activities of SOD, CAT, GR, GST, and lipoperoxidation reactions in the liver of females in the GBH-DH group when comparing GBH-DP and CTL-DP, indicating an activation of the antioxidant system in

a sex function, as well as a potential effect of metabolic programming in GBH-DH females, with no differences between males. The liver is considered an organ with detoxifying action, and precisely for this reason the enzyme activities may have increased in this tissue. According to Myers *et al.*,³⁶ the residues of GBH and its metabolite AMPA in the hepatic organ are 10 to 100 times higher than that found in adipose tissues, muscles and most other tissues, which corroborates the wide differences of activity detected among the tissues investigated in this study. In the hepatic tissue in females, we observed an increase in the activity of the CAT enzyme due to the production of hydrogen peroxide (H_2O_2), since its function is to prevent its accumulation which is usually the result of the dismutation of the superoxide by the enzyme dismutase superoxide.³⁷ Oxidizing molecules act in the cell cytoplasm increasing the concentration of oxidized glutathione (GSSG) and reduced glutathione depletion, and this oxidation is reversible by the action of Glutathione reductase (GR) with expenditure of NADPH ensuring the maintenance of the integrity of the mean.³⁸ Similarly, the increase in GST is justified since the enzyme performs cell detoxification activities and excretion of physiological and xenobiotic substances, contributing to the mitigation of cell damage.³⁹ It is also important to emphasize that GBH solutions do not alter redox reactions only during exposure in the peripubertal period, as long as in the other periods of development changes in the redox state are also reported with exposure of 1% GBH in pregnant rats resulted in higher GPx activities and the lipoperoxidation reaction in the liver of offspring.⁴⁰

Regarding the ChE activity in the liver of GBH-DH females, we evidenced an increase in this enzymatic activity. Although we haven't distinguished the types of cholinesterase in tissues according to the literature, the liver tissue has a higher concentration of butyrylcholinesterase (BChE) since the enzyme is synthesized in the

organ.⁴¹ Among the functions of this enzyme, it is suggested that it is also involved in cellular detoxification.⁴¹ In this sense, we suggest that its elevation in the GBH-DH female group may be contributing to the elimination of xenobiotics.

However we see an increase in enzymatic activities in the liver, this barrier seems to have been sufficient to prevent oxidative damage in the hypothalamic tissue, or possibly the hematoencephalic barrier may have acted to protect this organ. But in the muscle tissue, changes were seen. In the soleus muscle, the set of enzymes in the antioxidant system showed a reduction in its activity in females of GBH-DH in relation to GBH-DP and CTL-DP. The enzyme inactivation may have occurred due to the high oxidative stress detected by the high values of malondialdehyde (supplementary material) resulting from the lipoperoxidation reaction. Excess fat makes muscle tissue unable to oxidize lipids, and its abundance leads to intramiocellular accumulation (IMCL), affecting muscle normal function.⁴² It has been reported that possible deleterious IMCL effects are the result of increased EROS which promotes compromise of the antioxidant defense system of muscle cells.⁴³ The issue of great relevance in this result is that exposure to a GBH and later, exposure to the second hit (hyperlipidic diet) intensified the changes in muscle tissue, leading to a compromise in the enzymes activity. No significant changes were found in the muscle tissue of males.

At the neuromuscular junctions, there is a higher concentration of acetylcholinesterase.⁴⁴ In the soleus muscle of females there was a decrease in ChE activity in GBH-DH, corroborating the information presented in the literature in which organophosphates present anticholinesterase mechanisms.⁴⁵⁻⁴⁷ Due to the decrease in enzymatic activity, hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine is prevented, which remains active for a longer period in the synaptic cleft, a fact that increases

cholinergic transmission.⁴⁴ Disorders in ChE activity bring serious damage to organisms, and its inhibition at neuromuscular junctions causes hyperstimulation of the fibers, which can cause tetany, paralysis and even death.⁴⁸

Based on the above, the study of enzymatic activities showed changes only in females, precisely for that reason, we presume that the endocrine mechanisms may have acted by causing these enzymes of the antioxidant and cholinergic system to act in different ways between males and females. Although, not yet fully clarified how these regulatory mechanisms are, it is possible that hormones such as androgens can influence the activity of the studied enzymes.⁴⁹⁻⁵¹ However, one of the limitations of this study is that we do not quantify animal hormones, but despite this, there is strong evidence in the literature demonstrating that GBH acts as an endocrine disruptor.⁵²⁻⁵⁴

In short, in this study, it was possible to ascertain that the peripubertal exposure to GBH potentiates the alterations in the antioxidant system and cholinesterase in the liver tissue and soleus muscle of females who received a hyperlipidic diet. We suggest that GBH-DH females are more prone to pathologies caused by glyphosate, since the installation of oxidative stress can affect several inheritable cellular processes which influence programming, altering gene expression and epigenetic, molecular, biochemical processes.⁵⁵ In addition, with these findings, new perspectives are conceived in relation to the obesity pandemic, since we observed evidence of obesogenic effects when the organism was subjected to both hits. In view of the difference in enzymatic activities between males and females, it is suggested that in future works are carried out analyzes of hormonal profile, relating the hormone levels to the enzymatic activities of the antioxidant system and cholinesterases to oxidative stress, as well as assessing the occurrence of

transgenerational pathologies in subsequent generations of mice exposed to GBH and DH.

Ethical Standards

All experiences were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation at UNIOESTE.

Referências

1. Caballero B. The global epidemic of obesity: An overview. *Epidemiol Rev.* 2007; 29, 1-5.
2. Dias PC, Henriques P, Dos Anjos LA, Burlandy L. Obesity and public policies: The Brazilian government's definitions and strategies. *Cad Saude Publica.* 2017; 33, 1-12.
3. França BK, Melo Alves MR, Silveira Souto FM, *et al.* Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *GE J Port Gastreenterologia.* 2013; 20, 199-206.
4. De Long NE, Holloway AC. Early-life chemical exposures and risk of metabolic syndrome. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2017; 10, 101-109.
5. Instituto Nacional de Câncer. Agrotóxico. 2019. <https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos> (Acesso 21 Novembro 2019).
6. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN, Heindel JJ. Effects of endocrine disruptors on obesity. *Int J Androl.* 2008; 31, 201-207.

7. PAN Germany. Pesticides and health hazards - Facts and figures. 2012.
http://www.pan-germany.org/download/Vergift_EN-201112-web.pdf.
(Acesso 03 Dezembro 2019).
8. De A, Bose R, Kumar A, Mozumdar S. Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Springer Briefs Mol Sci*. 2014; 1-111.
9. Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P, Hens L. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Front Public Heal*. 2016; 4,1-8.
10. Londres F. *AGROTÓXICOS NO BRASIL Um Guia Para Ação Em Defesa Da Vida*, 2011. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços à Projetos em Agricultura Alternativa p. 190.
11. Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2000; 31,117-165.
12. Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, *et al*. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol*. 2015; 16, 490-491.
13. Romano RM, Romano MA, De Oliveira CA. Glifosato como desregulador endócrino químico. *Ambiência - Rev do Set Ciências Agrárias e Ambient*. 2009; 5, 359-372.
14. Brusick D, Aardema M, Kier L, Kirkland D, Williams G. Genotoxicity Expert Panel review: weight of evidence evaluation of the genotoxicity of glyphosate, glyphosate-based formulations, and aminomethylphosphonic acid. *Crit Rev Toxicol*. 2016; 46, 56-74.

15. Gallegos CE, Baier CJ, Bartos M, *et al.* Perinatal Glyphosate-Based Herbicide Exposure in Rats Alters Brain Antioxidant Status, Glutamate and Acetylcholine Metabolism and Affects Recognition Memory. *Neurotox Res.* 2018; 1-12.
16. Nimet J, Guimarães ATB, Delariva RL. Use of Muscular Cholinesterase of *Astyanax bifasciatus* (Teleostei, Characidae) as a Biomarker in Biomonitoring of Rural Streams. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2017; 99, 232-238.
17. Guyton C. Tratado de Fisiologia Médica - Guyton - 12ª Edição - 2011 - Ebook - Português.pdf. p.1173.
18. Romano RM, Romano MA, Moura MO, De Oliveira CA. A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. 2008; 45, 481-487.
19. de Carvalho SJP, Damin V, Dias ACR, Yamasaki GM, Christoffoleti PJ. Eficácia e pH de caldas de glifosato após a adição de fertilizantes nitrogenados e utilização de pulverizador pressurizado por CO₂. *Pesqui Agropecu Bras.* 2009; 44, 569-575.
20. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976; 72, 248-254.
21. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961; 7,88-95.
22. Silva de Assis HC. Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen. 1998.

23. Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GM, Buse MG. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*. 1981; 30, 235-241
24. Aebi H. Oxygen Radicals in Biological Systems. *Methods Enzymol*. 1984; 105,121-126.
25. Habig H, Pabst J, Jakoby B. Glutathione AA from Rat Liver The glutathione. 1976.
26. Sies, H.; R. Kock, O; Martino, E.; Boveris A. in the Catalytic Assay Using Yeast Glutathione Reductase. *Febs Lett*. 1979; 103, 287-290.
27. Lushchak O V., Kubrak OI, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*. 2009; 76,932-937.
28. Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978; 52, 302-310.
29. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found Stat Comput*. 2019;1(3.4.1).
30. Ait Bali Y, Ba-Mhamed S, 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.
31. Samsel A, Seneff S. Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. 2013; 11, 1416-1463.
32. Zimmermann RC, McDougale CJ, Schumacher M, et al. Effects of acute tryptophan depletion on nocturnal melatonin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 76,1160-1164.

33. Breisch ST, Zemlan FP, Hoebel BG. Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science*. 1976; 192, 382-385.
34. Hashimoto T, Perlot T, Rehman A, et al. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature*. 2012; 487,477-481.
35. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, et al. Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2015; 16, 378-400.
36. Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: A consensus statement. *Environ Heal A Glob Access Sci Source*. 2016;15, 1-13.
37. Barbosa KBF, Costa NMB, De Cássia Gonçalves Alfenas R, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr*. 2010; 23, 629-643
38. Ferreira, A.L.A.; Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*. 1997; 43, 61-68.
39. Wilce MCJ, Parker MW. Structure and function of glutathione S transferases. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Protein Struct Mol*. 1994; 1205,1-18.
40. Beuret CJ, Zirulnik F, Giménez MS. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reprod Toxicol*. 2005;19, 501-504.

41. Han Y, Ma Y, Liu Y, et al. Plasma cholinesterase is associated with Chinese adolescent overweight or obesity and metabolic syndrome prediction. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2019; 12, 685-702.
42. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2010; 1801, 209-214.
43. Anderson E, Lustig M, Boyle K, et al. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest.* 2009; 119, 573-581
44. Araújo CRM, Santos VLA, Gonsalves AA. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. *Rev Virtual Quim.* 2016; 8, 1818-1834.
45. Dos Santos Teixeira JM, Da Silva Lima V. De Moura FR. et al. Acute toxicity and effects of Roundup Original® on pintado da Amazônia. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018; 25, 25383-25389.
46. Sobjak TM, Romão S, Cazarolli LH, et al. Evaluation of the antioxidant system and neurotoxic effects observed in *Rhamdia branneri* (Teleostei: Heptapteridae) sampled from streams of the lower Iguazu River basin. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018; 155, 162-170.
47. Menéndez-Helman RJ, Ferreyroa G V., Dos Santos Afonso M, Salibián A. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2012; 88, 6-9.
48. Kirby MF, Morris S, Hurst M, et al. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Mar Pollut Bull.* 2000; 40, 780-791

49. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, et al. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: Structure- activity relationship. *Mol Pharmacol.* 1997; 51, 535-541.
50. Ahlbom E, Prins GS, Ceccatelli S. Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism. *Brain Res.* 2001; 892, 255-262.
51. Ahlbom E. Androgen treatment of neonatal rats decreases susceptibility of cerebellar granule neurons to oxidative stress in vitro. *Eur J Neurosci.* 1999; 11, 1285-1291.
52. Leonard ST, Hearn JK, Catling AD, Winsauer PJ. Learning and Performance Task. *Sci York.* 2011; 21, 121-134.
52. Defarge N, Takács E, Lozano VL, et al. Co-formulants in glyphosate based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *Int J Environ Res Public Health.* 2016; 13, 1-17.
53. Perego MC, Caloni F, Cortinovis C, et al. Influence of a Roundup formulation on glyphosate effects on steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa cells in vitro. *Chemosphere.* 2017; 188, 274-279.
54. Soso AB, Barcellos LJG, Ranzani-Paiva MJ, et al. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007; 23, 308-313.
55. Wright RO. Environment, susceptibility windows, development, and child health. *Curr Opin Pediatr.* 2017; 29, 211-217.

Figure legends

Figure 1: Representation of the experimental design. CTL-DP - Standard Diet Control Group; CTL-DH - Hyperlipidic Diet Control Group; GBH-DP - Glyphosate-based herbicide group with standard diet; GBH-DH - Glyphosate-based herbicide with hyperlipidic diet.

Figure 2: Weight in grams (g) of the animals over the eighteen weeks. The CTL-DP group is represented with red; CTL-DH green; GBH-DP aqua blue; GBH-DH lilac.

Figure 3: A) Diagram of principal component analysis ordenation (PCA). Liver - Green Ellipse, Muscle - Lilac Ellipse, Hypothalamus - Brown Ellipse. B) Average and standard errors of the factorial loadings of Dimension 1 of the PCA in female control mice (CTL) and exposed to Glyphosate-based herbicide (GBH) with standard and hyperlipidic diet. C) Average and standard errors of the factorial loadings of Dimension 1 of the PCA in males control mice (CTL) and exposed to Glyphosate-based herbicide (GBH) with standard and hyperlipidic diet. D) Average and standard errors of the factorial loadings of Dimension 2 of the PCA in females control mice (CTL) and exposed to Glyphosate-based herbicide (GBH) with standard and hyperlipidic diet. E) Average and standard errors of the factorial loadings of Dimension 2 of the PCA in males control mice (CTL) and Glyphosate-based herbicide (GBH) with standard and hyperlipidic diet. Note. Dimension 1 represents the enzymatic activities; Dimension 2 represents the adiposes tissues.

Figure 1

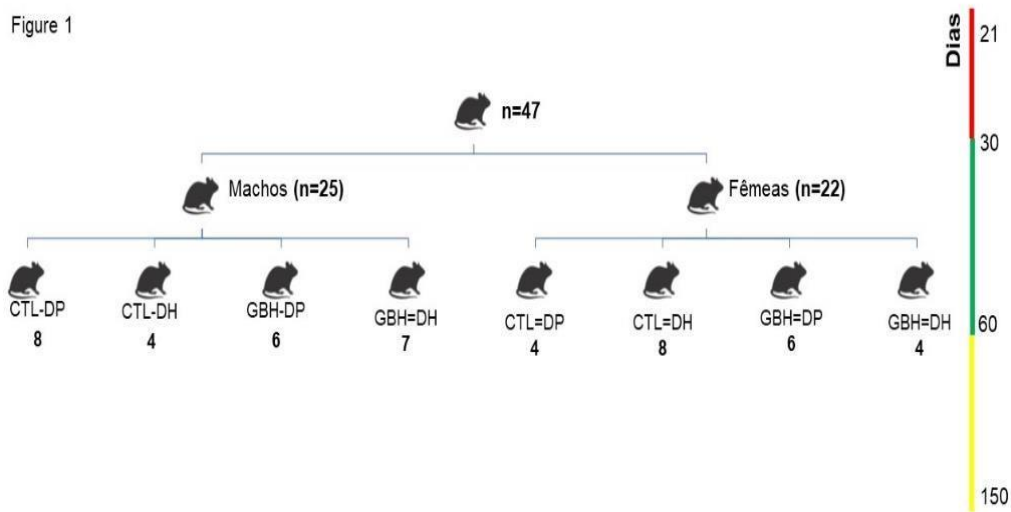


Figure 2

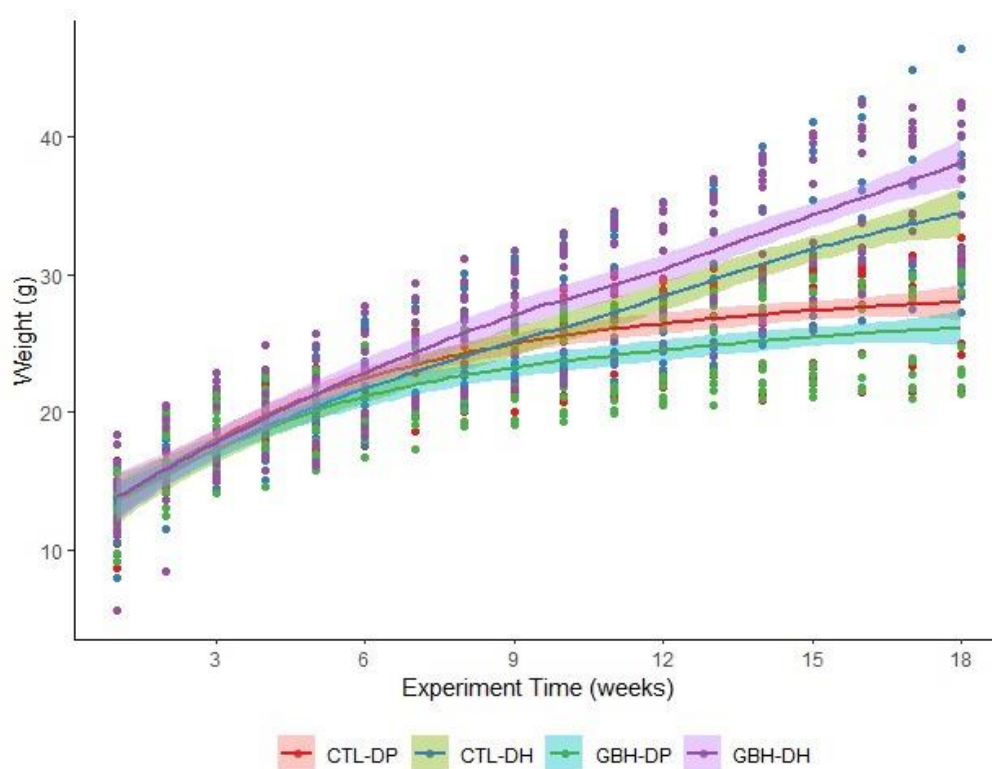
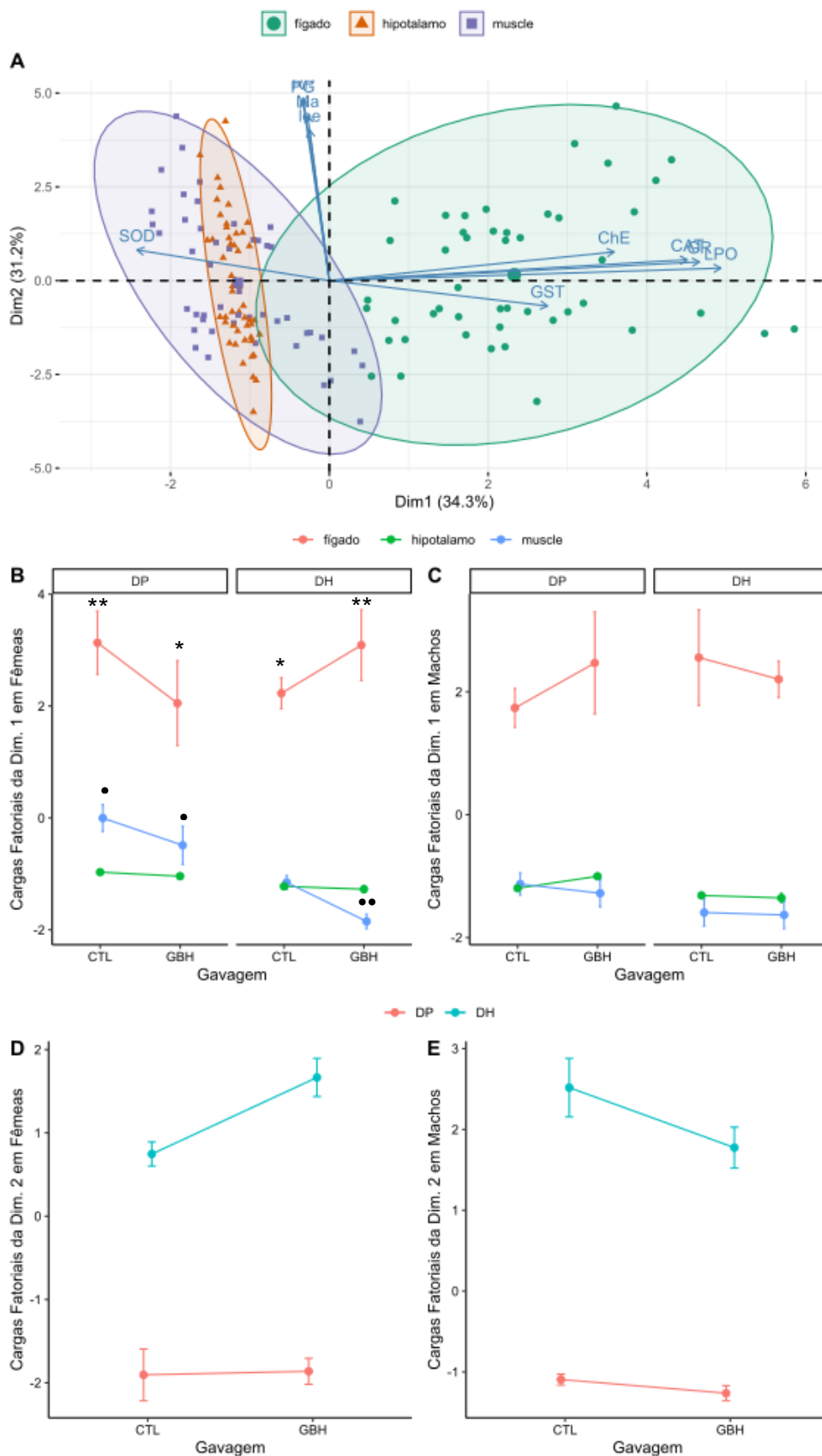


Figure 3



Note: The symbol (*) represents a statistical difference in the liver tissue of the females and the symbol (•) represents statistical differences in the soleus muscle of the females

Supplementary material

Biometric analyses

In relation to the weight of the animals, those who received a hyperlipidic diet had higher average ($F=113,88$; $p<0,0001$). But with more expressive values in males of both groups, CTL and GBH ($F=91,88$; $p<0,0001$). In considering the naso-anal (NA) length it was verified that the highest averages were obtained among males ($F=56,49$; $p<0,0001$) and in animals that received hyperlipidic diet ($F=15,45$; $p=0,0003$) with no difference between the groups that received GBH or not ($F=0,11$; $p=0,741$). In assessing the Lee Index, the difference was observed in the diet factor ($F=22,601$; $p<0,0001$) with higher rates in the mice that received a DH diet (Table 1). In the evaluation of the retroperitoneal fat (R), it was noticed significant differences in factors like, gender ($F=252,9$; $p<0,0001$) and diet ($F=9,1061$; $P=0,0046$), with higher averages in groups that received DH diet, with more expressive values in males (Table 1). In perigonodal fat (PG), differences were observed in the interaction between diets and groups ($F=5,86$; $p=0,02$); gender and diets ($F=5,8057$; $p=0,0211$) with higher average in males that received DH. There were also seen higher averages in GBH-DH when compared to CTL-DH group. The analysis of brown fat were showed statistical differences in the variables diet ($F=22,91$; $p<0,0001$) and sex ($F=11,34$; $p=0,0018$) with higher average in males in the group with DH diet (Table 1).

Analyses of cholinergic and antioxidant system activity

In the liver tissue there were no statistical differences in the interaction of the gender, diet and GBH factors in the enzymatic activities of SOD, CAT, GR and LPO

($p > 0,05$). About the activity of the GST enzyme, it was verified statistical significance only in relation to sex ($F=11,18$; $p=0,0019$), which it was observed the highest averages among all groups of male mice. In the evaluation of the activity of the ChE enzyme were detected statistical significance in the interaction activity in females in the GBH-DH group in relation to GBH-DP and CTL-DH (Table 2).

In the soleus muscle, we evidenced statistical differences in the SOD activity in the interaction between the factors sex and group ($F=4,34$, $p=0,044$), indicating that GBH-DP and GBH-DH females show greater reductions when compared to males. For CAT, there was difference in the isolated factors GBH ($F=5,90$; $p=0,020$), Diet ($F=11,58$; $p=0,002$) and sex ($F=13,10$; $p=0,0009$), and the enzymatic activity was higher among the CTL-DP females, with a reduction in activity in the other groups. In the cholinergic system, females revealed significantly higher average of ChE activity when compared to males. However, in GBH-DH group, females showed a reduction in such activity, exhibiting similar values to males ($F=4,928$; $p=0,032$). The other variables did not show significant statistical differences among the groups ($p > 0,05$; Table 2). In the hypothalamus, there was a reduction in SOD activity in females in the groups that received GBH regardless of diet ($F=2,93$; $p=0,095$). Meanwhile, in males, CAT activity increased in GBH-DP groups when compared to CTL-DP. In contrast, in GBH-DH group there was a reduction in relation to GBH-DP ($F=4,54$; $p=0,039$). The other variable did not show significant statistical differences between the groups ($p > 0,05$; Table 2).

Table 1 - Means and standard errors of adipose tissues and body measurements

SEX		Groups				Effects			
		CTL-DP	CTL-DH	GBH-DP	GBH-DH	Groups	Diet	Sex	Interaction
F	Peso (g)	22.1±0.33 ^{Aa}	30.0±1.1 ^{Ba}	21.9±0.63 ^{Aa}	32.2±1.71 ^{Ba}	F=0.0021 p=0.9641	F=113.81 p<0.0001	F=91.88 p<0.0001	F=4.7624 p<0.0355
	IL	332.98±10.47 ^A	357.59±5.05 ^B	332.24±5.75 ^A	360.44±4.76 ^B	F=0.216 p=0.644	F=19.867 p<0.0001	F=0.108 p=0.7443	F=0.0989 p=0.755
	NA	8.45±0.25	8.69±0.13	8.42±0.16	8.76±0.09	F=0.209P p=0.6501	F=11.5721 p=0.0016	F=48.593 p<0.0001	F=0.3269 p=0.571
	R (g)	0.039±0.003 ^A	0.45±0.007 ^B	0.038±0.008 ^A	0.52±0.046 ^B	F=1.2251 p=0.2755	F=252.953 p<0.0001	F=9.1061 p=0.0046	F=0.0937 p=0.7613
	P (g)	0.202±0.02 ^A	1.18±0.104 ^{Ba*}	0.202±0.44 ^A	1.68±0.235 ^{Ba**}	F=7.43 p=0.0097	F=297.1 p<0.0001	F=17.4 P<0.0001	F=0.5212 p=0.4749
	MA (g)	0.051±0.012 ^{Aa}	0.07±0.002 ^{Ba}	0.054±0.005 ^{Aa}	0.08±0.003 ^{Ba}	F=0.0031 p=0.9557	F=22.91 p=0.0001	F=11.345 p=0.0018	F=1.7534 p=0.1936
M	Peso (g)	29.8±0.73 ^{Ab}	40.6±1.93 ^{Bb}	28.3±0.66 ^{Ab}	37.06±1.4 ^{Bb}	F=0.0021 p=0.9641	F=113.81 p<0.0001	F=91.88 p<0.0001	F=4.7624 p<0.0355
	IL	341.44±3.81 ^A	359.32±7.78 ^B	335.24±4.84 ^A	347.48±5.02 ^B	F=0.216 p=0.644	F=19.867 p<0.0001	F=0.108 p=0.7443	F=0.0989 p=0.755
	NA	9.09±0.14	9.58±0.17	9.10±0.09	9.66±0.12	F=0.209 p=0.6501	F=11.5721 p=0.0016	F=48.593 p<0.0001	F=0.3269 p=0.571
	R (g)	0.08±0.014 ^A	0.63±0.023 ^B	0.06±0.008 ^A	0.63±0.057 ^B	F=1.2251 P=0.2755	F=252.953 P<0.0001	P=9.1061 F=0.0046	F=0.0937 P=0.7613
	P (g)	0.360±0.048 ^A	1.86±0.143 ^{Bb*}	0.288±0.015 ^A	2.01±0.186 ^{Bb**}	F=7.43 p=0.0097	F=297.1 p<0.0001	F=17.4 P<0.0001	F=0.5212 p=0.4749
	MA (g)	0.067±0.003 ^{Ab}	0.106±0.015 ^{Bb}	0.070±0.003 ^{Ab}	0.08±0.007 ^{Bb}	F=0.0031 p=0.9557	F=22.91 p=0.0001	F=11.345 p=0.0018	F=1.7534 p=0.1936

Note: Capital letters indicate statistical differences between the Diets, lower case between the Sexes, the symbol (*) between the groups. P-values in bold are the significant interactions between the factors

Table 2 - Means and standard errors of enzymatic activities in the hepatic tissues, soleus muscle and hypothalamus of the female (F) and Male (M) genders among the experimental groups.

TISSUE	SEX	ANALYZES	Groups				Effects				
			CTL-DP	CTL-DH	GBH-DP	GBH-DH	Groups	Diet	Sex	Interaction	
Liver	F	SOD	0.70±0.26	1.56±0.73	1.58±0.92	1.59±0.21	p=0.5838	p=0.1878	p=0.9068	F=0.0008; p=0.9778	
		CAT	103.4±18.9	69.9±14.4	63.7±28.4	55.4±14.2	p=0.733	p=0.7119	p=0.609	F=1.2461; p=0.2715	
		GR	19.29±1.83	9.2±2.36	16.4±3.11	17.8±2.10	p=0.9988	p=0.8732	p=0.967	F=0.6798; p=0.415	
		GST	168.2±11.3 ^a	164.7±7.13 ^a	159.8±26.3 ^a	152.2±25.8 ^a	p=0.8115	p=0.9842	p=0.0019	F=0.4111; p=0.5254	
		LPO	100.4±12.6	91.6±7.33	92.2±8.61	120.9±1.99	p=0.3297	p=0.5609	p=0.8565	F=1532; p=0.1507	
		ChE	12.6±3.25	9.8±2.85 [*]	7.4±4.45 [*]	22.0±5.91 ^{b**}	p=0.5265	p=0.050	p=0.013	F=6.657; p=0.0139	
		M	SOD	0.90±0.56	1.95±0.46	1.34±1.06	1.96±1.12	p=0.5838	p=0.1878	p=0.9068	F=0.0008; p=0.9778
	CAT	45.6±7.23	85.3±36.4	68±17.5	71.2±14.3	p=0.733	p=0.7119	p=0.609	F=2461; p=0.2715		
	GR	16.19±2.01	19.3±1.99	21±7.52	17.3±1.84	p=0.9988	p=0.8732	p=0.967	F=0.6798; p=0.415		
	GST	203±19.5 ^b	257.2±16.2 ^b	237.3±57.5 ^b	233.1±19.9 ^b	p=0.8115	p=0.9842	p=0.0019	F=0.4111; p=0.5254		
	LPO	96.8±8.75	99.2±11.1	102.8±10.3	101.9±10.7	p=0.3297	p=0.5609	p=0.8565	F=1532; p=0.1507		
	ChE	2.94±0.95	5.63±2.30	4.02±0.78	4.97±1.33 ^a	p=0.5265	p=0.050	p=0.013	F=6.657; p=0.0139		
	Muscle	F	SOD	13.1±4.11	11.3±3.45	5.1±1.11 ^{a*}	7.2±4.51 ^{a*}	p=0.3764	p=0.6141	p=0.6977	F=4.5876; p=0.0385
			CAT	34.1±9.2 ^{Aa}	16±1.87 ^{Ba}	20.2±2.9 ^{Aa}	10.0±3.60 ^{Ba}	p=0.0714	p=0.0459	p=0.0012	F=0.5472; p=0.464
GR			16.19±2.01	19.3±1.99	21±7.52	17.3±1.84	p=0.6426	0.5372	0.4281	F=0.1418; p=0.7091	
GST			44.41#	13.3±3.02	31.42±9.01 ^{Aa}	10.58±6.37 ^B	p=0.07	p<0.0001	p<0.0001	F=3.028; p=0.0897	
LPO			43.5±18.6	35.5±12.05	30.39±12.5 [*]	72.40±2.8 ^{b**}	p=0.5213	p=0.1023	p=0.7906	F=4.1861; p=0.0475	
ChE			2.48±0.28	2.75±0.59	3.70±1.06 ^{a*}	1.36±0.57 ^{**}	p=0.8869	p=0.1691	p=0.0052	F=4.2379; p=0.0463	
M			SOD	9±1.62	4.2±0.33	11.1±2.73 ^b	7.7±3.06 ^b	p=0.3764	p=0.6141	p=0.6977	F=4.5876; p=0.0385
CAT		14.5±1.89 ^{Ab}	9.98±2.5 ^{Bb}	10.4±3.44 ^{Ab}	10.7±1.54 ^{Bb}	p=0.0714	p=0.0459	p=0.0012	F=0.5472; p=0.464		
GR		6.87±1.72	8.51±3.17	6.67±1.64	5.66±2.1	p=0.6426	p=0.5372	p=0.4281	F=0.1418; p=0.7091		
GST		13.4±3.59	17.8±0.80	11.4±4.9 ^b	9.62±3.85	p=0.07	p<0.0001	p<0.0001	F=3.028; p=0.0897		
LPO		33.3±10.96	56.8±15.55	41.4±13.7	46.6±12.4 ^{a*}	p=0.5213	p=0.1023	p=0.7906	F=4.1861; p=0.0475		
ChE		1.73±0.44	1.33±0.74	1.65±0.37 ^b	1.44±0.51	p=0.8869	p=0.1691	p=0.0052	F=4.2379; p=0.0463		
Hypothalamus		F	SOD	13.9±4.31 [*]	8.36±3.17 [*]	3.96±0.65 ^{a**}	6.11±2.2 ^{a**}	p=0.7556	p=0.1588	p=0.4707	F=6.2349; p=0.0169
			CAT	7.23±1.37	5.26±0.88	7.77±1.04 ^{A*}	3.74±0.23 ^{B**}	p=0.07	p=0.0007	p=0.4073	F=12.5673; p=0.001
	GR		6.6±1.55	5.04±0.84	4.99±0.72	6.32±0.45	p=0.5451	p=0.708	p=0.2004	F=3.8864; p=0.056	
	GST		5.16±1.12	3.35±0.80	4.02±1.26	5.5±1.98	p=0.2821	p=0.7988	p=0.1552	F=4.0898; p=0.05	
	LPO		12.46±3.65	10.5±1.83	11.1 ±0.86	7.06±1.47	p=0.3238	p=0.6962	p=0.5859	F=0.0938; p=0.7611	
	ChE		2.8±0.2	2.76±0.40	2.54±0.52	3.13±0.59	p=0.2378	p=0.2462	p=0.3898	F=0.6849 0.4129	
	M		SOD	10.4±2.55	2.8±0.63	13.7±5.1 ^b	8.93±1.33 ^b	p=0.7556	p=0.1588	p=0.4707	F=6.2349; p=0.0169
	CAT	4.39±0.69	5.28±1.24	10±0.89 ^{A*}	4.11±0.90 ^{B**}	p=0.07	p=0.0007	p=0.4073	F=12.5673; p=0.001		
	GR	3.98±0.78	5.24±0.92	5.5±0.43	4.91±0.68	p=0.5451	p=0.708	p=0.2004	F=3.8864; p=0.056		
	GST	.99±0.83	±1.1	4.15±0.58	3.43±0.58	p=0.2821	p=0.7988	p=0.1552	F=4.0898; p=0.05		
	LPO	8.94±2.43	12.6±2.95	6.36±2.26	10.16±3.26	p=0.3238	p=0.6962	p=0.5859	F=0.0938; p=0.7611		
	ChE	1.98±0.32	2.45±0.22	2.81±0.22	2.88±0.51	p=0.2378	p=0.2462	p=0.3898	F=0.6849 0.4129		

Note: Capital letters indicate the statistically significant difference between Diets, minuscule between Sex, and the symbol (*) between groups

ANEXO A- AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Autorização

O protocolo intitulado “Efeitos do herbicida glifosato sobre a homeostase glicêmica e lipídica em camundongos obesos pela dieta hiperlipídica”, sob a responsabilidade de **Maria Lucia Bonfleur** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 11/05/2018.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2018 - 30/04/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongos: <i>Mus musculus</i> , camundongo isogênico C57BL/6.
N. de animais	144
Peso/Idade	45-20g/30 dias
Sexo	Masculino
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE - Campus Cascavel - PR.

Cascavel, 15/05/2018



Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 3730/2016 - GRE

ANEXO B - NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA

JOURNAL OF DEVELOPMENTAL ORIGINS OF HEALTH AND DISEASE

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Mission Statement

Journal of Developmental Origins of Health and Disease (J DOHaD) is the official scientific journal of the International Society for Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD).

JDOHaD publishes leading research in the field of Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). The Journal focuses on the environment during early pre-natal and post-natal animal and human development, interactions between environmental and genetic factors, including environmental toxicants, and their influence on health and disease risk throughout the lifespan. *JDOHaD* publishes work on developmental programming, fetal and neonatal biology and physiology, early life nutrition, especially during the first 1,000 days of life, human ecology and evolution and Gene-Environment Interactions. *JDOHaD* also accepts manuscripts that address the social determinants or education of health and disease risk as they relate to the early life period, as well as the economic and health care costs of a poor start to life. Accordingly, *JDOHaD* is multidisciplinary, with contributions from basic scientists working in the fields of physiology, biochemistry and nutrition, endocrinology and metabolism, developmental biology, molecular biology/epigenetics, human biology/ anthropology, and evolutionary developmental biology. Moreover clinicians, nutritionists, epidemiologists, social scientists, economists, public health specialists and policy makers are very welcome to submit manuscripts. The journal includes original research articles, short communications and reviews, and has regular themed issues, with guest editors; it is also a platform for conference/workshop reports, and for opinion, comment and interaction.

Categories of papers

Original research articles - This category is intended for full-scale basic, clinical or epidemiological studies including large controlled trials. Articles may contain up to 5,000 words (not including references, figures and tables) and should include an abstract of up to 250 words and 3–5 key words. (Exceptions to the length limitation will be considered for unusually large or complex studies.)

Brief reports - This category is for smaller, self-contained laboratory or clinical studies or analyses. Papers in this category may contain up to 2,500 words (not including references, figures and tables) and should include a maximum of 25 references, up to 2 illustrations (figures or tables), an abstract of up to 150 words and 3–5 key words.

Rapid communications - This category is for 'fast-breaking' new work, which is of great potential interest and can be succinctly presented.

Authors who wish to submit a rapid communication must first send an abstract to the Editor in

Chief, Michael Ross (DOHaDeditor@cambridge.org) for approval of submission in this category. Submissions that do not have prior approval will be reviewed on the regular track.

Papers in this category may contain up to 2,500 words (not including references, figures and tables) and should include a maximum of 25 references, up to 2 illustrations (figures or tables), an abstract of up to 150 words and 3–5 key words. Rapid communications will be reviewed and published on a “fast track” basis.

Reviews – *J DOHaD* will publish scholarly, comprehensive reviews that summarize and critically evaluate research in the field addressed and identify future implications. Reviews will be invited by the Editors but may also be submitted.

Authors wishing to submit papers in this category are advised to contact either the Editor-in-Chief or appropriate Associate Editor before doing so. Reviews may contain up to 5,000 words (not including references, figures and tables) and should include an abstract of up to 250 words and 3–5 key words. (Exceptions to the length limitation will be considered if justified by the scope of the Review).

Focus Papers – These papers focus attention on a research paper published in the same issue in the journal. Focus Papers should highlight, discuss and amplify the issues addressed in the research paper adding perspectives derived from the author’s own work and the literature and should consider the implications of the findings. Focus papers need not necessarily agree with the paper they address. Focus Papers may contain up to 1500 words (not including references, figures and tables) and 3–5 key words. No abstract is needed. Focus Papers are invited by the Editor-in-Chief.

Letters to the Editor - Letters are invited that discuss or comment on papers published in *J DOHaD*. They should not, however, be used as a means of publishing new work. Letters should have no more than 10 references and should not contain figures or tables. Acceptance will be at the discretion of the Editorial Board, and editorial changes may be required. Wherever possible, letters from responding authors will be included in the same issue.

Papers in all categories, whether invited or submitted, will be peer reviewed.

Clinical Trials

As a condition of consideration for publication, registration of clinical trials in a public trials registry is required. A clinical trial is defined by the International Committee of Medical Journal Editors (in accordance with the definition of the World Health Organisation) as any research project that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Trials must be registered before the start of patient enrollment. The registry must be accessible to the public at no charge. It must be open to all prospective registrants and managed by a not-for-profit organization.

There must be a mechanism to ensure the validity of the registration data, and the registry should be electronically searchable. An acceptable registry must include at minimum a unique trial number, trial registration date, secondary identification information if assigned by sponsors or others, funding source(s), primary and secondary sponsor(s), responsible contact person, research contact person, official scientific title of the study, research ethics review, the medical condition being studied, intervention(s), key inclusion and exclusion criteria, study type, anticipated trial start date, target sample size, recruitment status, primary outcome, and key secondary outcomes. Registration information must be provided at the time of submission. Trial registry name, registration identification number, and the URL for the registry should be included at the end of the abstract.

Originality and copyright

To be considered for publication in *J DOHaD*, a manuscript cannot have been published previously, nor can it be under review for publication elsewhere. (Previously published figures may be sparingly used in Reviews, with appropriate permission.) The posting of a brief summary of clinical trial outcomes on a pharmaceutical website (such as the PhRMA-sponsored database www.clinicalstudyresults.org) will not necessarily count as prior publication nor impede full consideration of a manuscript: *J DOHaD* will look at this on a case-by-case basis to determine the extent of overlap between the trial data posted and the manuscript as submitted, and will decide whether the manuscript contains a sufficiently new perspectives or sufficient additional data for it to count as original. Authors should declare when submitting manuscripts that such data have already been posted and *J DOHaD* will review this sympathetically. Papers with multiple authors are reviewed with the assumption that all authors have contributed materially to the research reported, have approved the submitted manuscript and concur with its submission to *J DOHaD*. A Copyright Transfer Agreement, with certain specified rights reserved by the author, must be signed and returned to the Editor by the senior author of accepted manuscripts (Signing on behalf of all the other authors), prior to publication. This is necessary for the wide distribution of research findings, and the protection of both author and the International Society for Developmental Origins of Health and Disease under copyright law.

Authorship

All individuals included as authors of papers must have contributed substantially to the scientific process leading up to the writing of the paper. Such contribution includes the conception and design of the project, the performance of experiments and the analysis and interpretation of data. In addition the author should have made a substantial contribution to drafting or critical revision of the manuscript for important intellectual content.

We are aware that authors sometimes receive assistance from technical writers, language editors and/or writing agencies in preparing manuscripts for publication. Such assistance must be noted in the cover letter and in the Acknowledgements section along with a declaration that the author(s) are entirely responsible for the scientific content of the paper.

Failure to acknowledge assistance from technical writers, language editors and/or writing agencies in preparing manuscripts for publication in the Acknowledgements section may lead to disqualification of the paper.

Under no circumstances will J DOHaD accept submissions by writing or editorial agencies on behalf of authors and there will be no correspondence with writing or editorial agencies regarding submitted or revised manuscripts.

Manuscript submission

All manuscripts must be submitted online via the website:
<http://mc.manuscriptcentral.com/dohad>

Detailed instructions for submitting your manuscript online can be found at the submission website by clicking on the 'Instructions and Forms' link in the top right of the screen; and then clicking on the 'Author Submission Instructions' icon on the following page.

The Editor-in-Chief will acknowledge receipt of the manuscript, provide it with a manuscript reference number and assign it to an Associate Editor and to reviewers.

The reference number of the manuscript should be quoted in all correspondence with the *J DOHaD* Office and Publisher.

Initial Submission

The following instructions must be followed carefully:

- The preferred file format for submission is Microsoft Word; however you can also submit Adobe Acrobat (.pdf) files readable with Acrobat Reader. The tables and figures should be included in the same file.
- Word Perfect or other word-processor files or Macintosh-based files are not acceptable.
- Tables should be placed at the end of the document and not within the text. • Do not use “enter” in order to start a new page. “Hard” page or section breaks must be used.
- A cover letter should be attached as a separate file. In the cover letter, the category under which the manuscript is submitted should be indicated and the corresponding author identified, including phone number, fax number and electronic mail address. The cover letter must include a statement regarding authorship (see Authorship section above).
- File-names should indicate the name of the first author of the paper or an abbreviated version thereof and the content of the file (text, tables, figures).
- Printed copies of the manuscript, tables and figures are not required and should not be sent.

Please note that correspondence regarding submitted and revised manuscripts will be with the Corresponding Author only.

Revised/Final Submission

- The uploaded manuscript must be in the form of a Word for Windows file with figures (prepared as instructed below) in separate files. Word Perfect or other word- processor files or Macintosh-based files are not acceptable.
- Do not use “enter” in order to start a new page. “Hard” page or section breaks must be used.
- Figures should be prepared using appropriate formats and saved as TIFF or JPEG files. It is essential that JPEGs are greater than 320dpi. PowerPoint files or figures “pasted” into Word files are not acceptable for revised or final submissions.
- File names should indicate the manuscript number assigned by the journal and the content of the file (text, figures).

Review process

Manuscripts submitted to *J DOHaD* including those for supplements will be reviewed by at least two external reviewers and evaluated by an Associate Editor. Authors are requested to suggest up to 4 reviewers who are especially qualified to referee the work and would not have a conflict of interest. Please provide the names, email addresses, fax numbers and mailing addresses of the suggested reviewers. If authors would prefer that a particular reviewer(s) not evaluate the paper, they may indicate this request with appropriate justification, which will be treated confidentially. Suggestions and requests regarding reviewers will be considered by the Editor without obligation to accept them.

Authors should note that manuscripts may be returned after initial review by the Editors if the paper is deemed unlikely to be reviewed favorably. This rapid rejection process enables the author to submit promptly for publication elsewhere.

Every effort will be made to provide the author with a review within 6 weeks of receipt of the manuscript. If the Editor requests that revisions be made to a manuscript before publication, a maximum of 3 months shall be allowed for preparation of the revision, except in unusual circumstances.

Manuscript preparation and style

The manuscript should be typed double-spaced throughout on 'Letter' or A4 paper. Pages should be numbered sequentially beginning with the Title Page. Margins should not be less than 2.5cm on all sides and the font should be clearly legible and uniform throughout.

A **Short Title** of up to forty-five characters should be provided on the title page and should be repeated at the top right of every following page. The names of the authors (e.g. Smith et al. or Smith and Jones) should be given at the top left of every page besides the title page.

The **Abstract** should be unstructured (i.e., no sub-headings) but must provide the reader with a self-contained summary of the paper. It should include a brief introduction to the paper, the method, the key findings, and the conclusions. A list of 3–5 key words or terms for indexing should follow the abstract.

The **Body of the Manuscript** should begin on page 3. For Regular Original Articles, Brief Reports, the format should include: Introduction, Method, Results, Discussion and Acknowledgements. These should be followed on a new page by the References.

Tables should be consecutively numbered as they appear in the text (Table 1, etc.). Each Table should be typed on a separate sheet with the Table number and heading above and any note below.

Figures should be consecutively numbered as they appear in the text (Figure 1, 2 etc). Use italic letters for parts a, b, c etc. Use abbreviation (Fig), except where starting a new sentence. Legends should be provided for each Figure. Scale bars should be added to photomicrographs and other similar images. Figures (scale bars, pie charts, etc) should be presented in two dimensions only.

All figures submitted to Journal of Developmental Origins of Health and Disease will be published in colour on Cambridge Journals Online free of charge.

How to Ensure Colour Online

To maximize the probability that figures will be published in colour, authors are encouraged to follow these figure submission guidelines:

- Submit a colour graphic as either TIFF or EPS files
- Submit figures at approximately the size at which they are to reproduce so that reduction or enlargement is not necessary.
- Line artwork should be supplied in black and white mode at a resolution of 1200 dpi; combination artwork (line/tone) at a resolution of 800 dpi; black and white halftone artwork should be saved in 'grayscale' mode at a resolution of 300dpi; colour halftone artwork should be saved in CMYK mode at a resolution of 400 dpi.
- Submit multipart figures in one single electronic file.

Author Requirements

It is not necessary for authors to indicate that a figure should be displayed in colour. CUP will assume that any author who submits figures in colour wants and agrees to their being produced in colour online. It is the author's responsibility to declare

otherwise. Colour figures must be submitted before the paper is accepted for publication, and cannot be received later in the process. Exceptions to Free Colour:

- Colour figures submitted to Journal of Developmental Origins of Health and Disease will be published in colour free of charge with the following exceptions:
- The colour figure file is deemed unusable due to production standards or poor colour quality and must be converted to black and white.
- The author gives explicit instructions to convert the colour figure to black and white.

What to Expect

Authors will see these colour figures when viewing their author page proofs on screen. Authors will NOT be allowed to submit colour figures to replace black and white figures in the page proof stage.

The use of **Abbreviations**, except those that are widely used, is strongly discouraged. They should be used only if they contribute to better comprehension of the manuscript. Acronyms should be spelled out at first mention. Metric system (SI) units should be used.

J DOHaD encourages submissions from all over the world. Authors who are not fluent in written

English are encouraged to seek assistance in this regard before submitting their manuscripts.

Acknowledgements

Here you may acknowledge individuals or organisations that provided advice and/or support

(non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

The Acknowledgements should be placed after the main body of the text before Financial

Support. If there are no Acknowledgements, the title should be inserted followed by "None". Papers that do not include an Acknowledgements section will not be reviewed.

Financial Support

Please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. This is particularly important in the case of research that is supported by industry. Support from industry not only includes direct financial support for the study but also support in kind such as provision of medications, equipment, kits or reagents without charge or at reduced cost and provision of services such as statistical analysis. For example, "This work was supported by the Medical research Council (grant number XXXXXXX)". Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semicolon, with "and" before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, "This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH)". Where no specific funding has been

provided for research, please provide the following statement: “This research received no specific grant from any funding agency, commercial or notfor-profit sectors.”

The Financial Support statement should be placed after the Acknowledgements and before the Conflicts of Interest section. Papers that do not include a Financial Support statement will not be reviewed.

Conflicts of Interest

Conflict of interest exists when an author has interests that might inappropriately influence his or her judgement, even if that judgement is not influenced. Because of this, authors must disclose potentially conflicting interests so that others can make judgements about such effects. At the time of submission authors should disclose any financial arrangements or connections they may have that are pertinent to the submitted manuscript and that may be perceived as potentially biasing their paper. Non-financial interests that could be relevant in this context should also be disclosed. If no relevant interests exist, this should be stated. This requirement applies to all the authors of a paper and to all categories of papers including letters to the editor.

The Conflicts of Interest section should be placed after Financial Support. If there are no interests to declare, the title should be inserted followed by “None”.

Papers that do not include a Conflicts of Interest section will not be reviewed.

Ethical Standards

Where research involves human and/or animal experimentation, the following statements should be included (as applicable): “The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guidelines on human experimentation (please name) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008, and has been approved by the institutional committees (please name) .” and “The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guides on the care and use of laboratory animals (please name) and has been approved by the institutional committee (please name).”

The Ethical Standards statement should be placed after the Conflicts of Interest section before the References. If the research does not involve human and/or animal experimentation, this statement should be omitted. Papers reporting the results of human and/or animal experimentation that do not contain an Ethical Standards statement will not be reviewed. For more information on the ethical standards and procedures of Cambridge Journals, please visit Cambridge Journals Online.

The requirements of DOH are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the ICMJE, and authors are encouraged to consult the latest guidelines, which contain useful, general information about preparing scientific papers.

For more specialised instances of the type of trials used in your paper, please see more specific guidelines below.

Animal studies

For studies involving laboratory animals, authors should consult the Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines (<http://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>).

Systematic Review/Meta-Analyses

For systematic reviews and meta-analyses, authors should consult the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) Statement (www.prisma-statement.org/). This policy includes all systematic reviews, including those for observational studies.

Randomised trials

For reporting results of randomised trials, authors should consult the CONSORT Statement (<http://www.consort-statement.org/>), which is an evidence-based, minimum set of recommendations for reporting randomized trials.

Supplemental on-line material

The online platform gives authors the opportunity to include data that would be impossible or impractical to include in the printed version. These data might substantially enhance the importance of the research and might also be of benefit to readers. Authors may include tables and figures as well as data such as videos, 3-D structures/images, extensive datasets and any other supplementary material not suitable for print duplication. All supplementary material must be submitted with the original manuscript. Supplementary data should be referred to in the text with the prefix "S" (e.g. Supplementary Table S1, Supplementary Figure S1). Supplementary files will not be copy-edited, and will be published as supplied.

References

References should be numbered consecutively (in superscript) as they appear in the text. Type the reference list with double-spacing on a separate sheet.

References (using Index Medicus abbreviations) should appear in the style as demonstrated below. Please note that if six authors or more, the first three authors should be listed and then 'et al.'. Examples:

1. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, et al. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr.* 2007; 97, 435-439.
2. Gilbert JS, Nijland MJ. Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295, 1941-1952.
3. Mitchell M, Schulz SL, Armstrong DT, Lane M. Metabolic and Mitochondrial Dysfunction in Early Mouse Embryos Following Maternal Dietary Protein Intervention. *Biol Reprod.* 2009 [Epub ahead of print].
4. Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of health and disease: an overview. In *Developmental Origins of Health and Disease* (eds. Gluckman P, Hanson M), 2006; pp. 1-5. Cambridge University Press, Cambridge. For work that is 'in press' i.e., accepted for publication but not yet published, '(In Press)' should be written in parenthesis and not the year of expected publication.

Proofs

The publisher reserves the right to copy-edit manuscripts. The corresponding author will receive page proofs for final proofreading. These should be checked and returned within 2 days of receipt. The publisher reserves the right to charge authors for excessive correction of non- typographical errors.

Offprints

The corresponding author will receive a PDF file of the article when it is published

Cambridge Language Editing Service

Cambridge recommends that authors have their manuscripts checked by an English language native speaker before submission; this will ensure that submissions are judged at peer review exclusively on academic merit. We list a number of third-party services specialising in language editing and / or translation, and suggest that authors contact as appropriate. Use of any of these services is voluntary, and at the author's own expense.

[http://journals.cambridge.org/action/stream?pagelId=8728&level=2&menu=Auth ors &pagelId=3608](http://journals.cambridge.org/action/stream?pagelId=8728&level=2&menu=Auth%20ors&pagelId=3608) *15 th january 2020*