

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

ARIADNE BARBOSA

**PROGRAMAÇÃO METABÓLICA POR EXPOSIÇÃO MATERNA AO
GLIFOSATO: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS MÚSCULOS EXTENSOR
LONGO DOS DEDOS E SÓLEO DE CAMUNDONGOS C57BL/6**

CASCAVEL-PR
(Agosto/2020)

ARIADNE BARBOSA

**PROGRAMAÇÃO METABÓLICA POR EXPOSIÇÃO MATERNA AO
GLIFOSATO: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS MÚSCULOS EXTENSOR
LONGO DOS DEDOS E SÓLEO DE CAMUNDONGOS C57BL/6**

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

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

ORIENTADOR: Marcia Miranda Torrejais

CASCADEL-PR
(Agosto/2020)

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

Barbosa, Ariadne

Programação metabólica por exposição materna ao glifosato : Avaliação morfológica dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de camundongos c57bl/6 / Ariadne Barbosa; orientador(a), Marcia Miranda Torrejais, 2020.

106 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. Programação metabólica. 2. Glifosato. 3. Exposição materna. 4. Fibras musculares esqueléticas. I. Torrejais, Marcia Miranda. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO



unioeste

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

ARIADNE BARBOSA

Programação metabólica por exposição materna ao glifosato: Avaliação morfológica dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de camundongos C57BL/6

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

Orientador(a) - Marcia Mirandá Torrejais

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

Rose Meire Costa

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

Sônia Maria Marques Gomes Bertolini

Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Cascavel, 4 de março de 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças para superar todas as dificuldades e conseguir chegar até aqui.

À toda minha família, em especial aos meus pais, Solange e Jumar, por todo o apoio, amor e confiança depositados em mim. Por não medirem esforços para que eu pudesse continuar meus estudos, sempre acreditando na minha capacidade e me incentivando a nunca desistir.

Agradeço à minha orientadora, professora Dr^a. Marcia pela oportunidade, confiança, dedicação e por todo o conhecimento que pude adquirir durante esses anos. Isso tudo auxiliou não somente em minha formação profissional, mas também pessoal.

Aos professores do Programa de Mestrado de Biociências e saúde, por toda a contribuição no trabalho, seja nas bancas ou no esclarecimento de dúvidas que surgiam no decorrer da pesquisa. Em especial às professoras Rose Meire e Lucinéia que sempre se disponibilizaram a ajudar.

Agradeço também os meus colegas do LABEM. Iniciando pela Pâmela e pela Camila, que estiveram presentes sempre que surgiam quaisquer dúvidas e por todos os ensinamentos passados. A Mylena, minha colega de mestrado, que conheço desde a graduação e se tornou uma grande amiga, que, além de me auxiliar muito no laboratório, esteve presente em toda essa caminhada, tornando-a mais leve. Aos demais colegas de laboratório, Leticia, Mikael, Rafa, Dani e Ana Paula que sempre se dispuseram a auxiliar tanto em atividades do laboratório, quanto em minha vida pessoal.

Às meninas do LAFEM, serei sempre grata por todo o auxílio na realização do experimento, esclarecimento das dúvidas que surgiram.

A Ana Caroline e Suelen, muito obrigada por todos os momentos de descontração e encorajamento, me ajudando a superar quaisquer incertezas que surgiram no caminho, sendo essenciais na realização deste trabalho, direta e indiretamente. Agradeço também ao Gustavo e Matheus, que mesmo longe sempre se fizeram presentes, nos momentos bons e ruins e também foram muito importantes no desenvolvimento desse trabalho. A Michele, Su, Aldair, Hellen, Fernanda, Bárbara, Milara, Pamella, Eliza e Thais saibam que a amizade de vocês foi essencial nesta etapa de minha vida.

RESUMO

BARBOSA, A. **Programação metabólica por exposição materna ao glifosato: avaliação morfológica dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de camundongos C57BL/6**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2020.

A exposição materna a diversos compostos xenobióticos, como o glifosato, pode promover alterações e adaptações morfológicas no feto, com efeito na saúde em longo prazo. O glifosato é um agrotóxico utilizado mundialmente, sendo associado à ocorrência de diversas doenças, entretanto, ainda não são conhecidos os efeitos na musculatura esquelética. Este trabalho objetivou avaliar a morfologia e morfometria das fibras musculares dos músculos extensor longo dos dedos (ELD) e sóleo (SOL) das fêmeas expostas ao glifosato durante a prenhez e lactação e a morfologia e morfometria das fibras musculares dos músculos ELD e SOL e junções neuromusculares (JNMs) de sua prole. Foram utilizados 12 camundongos fêmeas prenhas da linhagem C57BL/6, separadas em grupo controle (CTL), que recebeu água e, grupo glifosato (GF), que recebeu água com 0,5% de glifosato durante a prenhez e lactação. Após o desmame, a prole de machos foi separada em dois grupos: CTL-F1 (n=10), filhotes das mães CTL e GF-F1 (n=10), filhotes das mães GF. Em seguida, as fêmeas foram eutanasiadas, pesadas, mensurado o comprimento nasoanal (CNA) e, as gorduras foram coletadas e pesadas. Os músculos ELD e SOL foram coletados, pesados (g) e mensurados o comprimento (mm). Os mesmos procedimentos foram realizados na eutanásia da prole, ao completarem 150 dias de vida. O antímero direito dos músculos das mães e da prole foram fixados em metacarn para o estudo histológico das fibras musculares. O antímero esquerdo dos músculos ELD e SOL da prole foram fixados em Karnovsky para o estudo histoquímico das JNMs. As mães GF apresentaram menor ganho de peso corporal ($p=0,0327$) durante a gestação, menor peso (0,0103) e CNA ($p=0,0002$), quando comparados ao CTL. Quanto à prole, os animais GF-F1 apresentaram menor peso ($p=0,0153$) e CNA ($p=0,0463$) quando comparados ao CTL-F1. O músculo ELD do grupo GF-F1 apresentou menor número de núcleos centrais ($p=0,0409$) quando comparados ao CTL-F1, também observado no músculo SOL, mas não foi significativo. Quanto ao tecido conjuntivo, foi observado maior quantidade de tecido no músculo SOL ($p=0,0419$) do grupo GF-F1, quando comparado ao CTL-F1. Os resultados encontrados nas mães e na prole indicaram que a exposição ao glifosato durante o período de prenhez e lactação foi suficiente para alterar o metabolismo das mães, que ganharam menos peso durante a gestação e ficaram com menor peso e CNA, além de ser capaz de alterar o desenvolvimento da prole, que também apresentaram menor tamanho corporal e, menor número de núcleos centrais nas fibras do ELD e maior quantidade de tecido conjuntivo no SOL, podendo culminar em alteração na regeneração do tecido.

Palavras-Chaves: Programação Metabólica. Glifosato. Exposição Materna. Fibras musculares esqueléticas.

ABSTRACT

BARBOSA, A. **Metabolic programming by maternal exposure to glyphosate: Morphological evaluation of extensor digitorum longus and soleus muscle of C57BL/6 mice.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2020.

Maternal exposure to several xenobiotic compounds, such as glyphosate, can promote morphological alterations and adaptations in the fetus, with effect on long-term health. Glyphosate is a pesticide used worldwide, being associated with the occurrence of several diseases, however the effects on skeletal muscles are not yet known. This study aimed to evaluate the morphology and morphometry of muscle fibers of the extensor digitorum longus (EDL) and soleus (SOL) muscles of dams exposed to glyphosate during pregnancy and lactation and evaluate the morphology and morphometry of muscle fibers of the EDL and SOL muscles and the neuromuscular junctions (NMJs) of their offspring. Twelve pregnant female mice of the C57BL/6 strain were separated into a control group (CTL), which received water and glyphosate group (GF), which received water with 0.5% of glyphosate during pregnancy and lactation. After weaning, the offspring of males was separated into two groups: CTL-F1 (n=10), puppies of the CTL mothers and GF-F1 (n=10), puppies of GF mothers. Then, the females were euthanized, weighed, measured the nasoanal length (NAL) and the fats were collected and weighed. The EDL and SOL muscles were collected, weighed (g) and measured the length (mm) of both. The same procedures were performed in the euthanasia of the offspring, when they completed 150 days of life. The right antimeres of the mother's and offspring's muscles were fixed in metacarn for the histological study of muscle fibers. The left antimeres of the EDL and SOL muscles of the offspring were fixed in Karnovsky for the histochemical study of NMJs. GF mothers presented lower body weight gain ($p=0.0327$) during pregnancy, lower weight (0.0103) and NAL ($p=0.0002$) when compared to CTL. Regarding offspring, GF-F1 animals showed lower weight ($p=0.0153$) and NAL ($p=0.0463$) when compared to CTL-F1. The EDL muscle of the GF-F1 group showed a lower number of central nuclei ($p=0.0409$) when compared to CTL-F1, also observed SOL muscle although not significant. Regarding connective tissue, increased amount of tissue was observed in the SOL muscle ($p=0.0419$) of the GF-F1 group when compared to CTL-F1. The results found in mothers and offspring indicated that exposure to glyphosate during the pregnancy and lactation period was sufficient to alter the metabolism of mothers, who gained less weight during pregnancy and were lower weight and NAL. Besides being able to alter the development of offspring, which also had smaller body size and a smaller number of central nuclei in the fibers of the EDL and greater amount of connective tissue in the SOL, which may culminate in changes in tissue regeneration.

Key words: Metabolic programming. Glyphosate. Maternal Exposure. Muscle fibers Skeletal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fotomicrografia da estrutura do músculo estriado esquelético. Vista transversal (Mt) e longitudinal (Ml). Hematoxilina-Eosina (HE). Fibras multinucleadas com núcleos em posição periférica (seta). Endomísio (En).	17
Figura 2. Modelo esquemático da organização estrutural do músculo estriado esquelético.	18
Figura 3. Esquema de uma junção neuromuscular.	19

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach- Acetilcolina

AchE- Acetilcolinesterase

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ca²⁺- Cálcio

CEUA- Comitê de Ética no Uso de Animais

ELD- Extensor Longo dos Dedos

EPSPs- 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase

Hematoxilina-Eosina

JNM- Junção neuromuscular

JNMs- Junções neuromusculares

LAFEM- Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo

OF- Organofosforado

PM- Programação metabólica

SOL- Sólido

TSH- Hormônio tireoestimulante

UNIOESTE- Universidade Estadual do Oeste do Paraná

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1 Programação metabólica	12
3.2 Agrotóxicos	13
3.3 Músculo estriado esquelético e junções neuromusculares	16
3.4 Efeitos dos agrotóxicos organofosforados no músculo estriado esquelético ...	19
ARTIGO CIENTÍFICO 1	21
ARTIGO CIENTÍFICO 2	41
CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS	62
REFERENCIAS GERAIS	63
ANEXO A	71
ANEXO B	72
Normas da Revista Eistein.....	72
ANEXO C	80

1. INTRODUÇÃO

Variações na nutrição durante o período perinatal podem promover alterações metabólicas em longo prazo, o que pode alterar o desenvolvimento do indivíduo levando ao surgimento de doenças crônicas na vida adulta por meio da programação metabólica (PM) (FUIMAN; PEREZ, 2015). Fatores ambientais como o tabagismo materno, estresse, toxinas, entre inúmeras substâncias como os agrotóxicos, são exemplos de variações que podem promover tais efeitos (OZANNE, 2015). Assim, os insultos sofridos durante o primeiro momento da vida, podem induzir mudanças na saúde em longo prazo (CVITIC et al., 2018).

Além disso, o período gestacional é caracterizado por diversas alterações fisiológicas na mãe, tornando-a vulnerável à exposição a quaisquer toxinas (MAKELARSKI et al., 2014), dentre elas, a exposição à agrotóxicos. Isso torna-se um problema de saúde, uma vez que inúmeros casos de intoxicações por exposição a agrotóxicos são relatados anualmente (BARTH; BIAZON, 2010), o que é agravado no Brasil, devido a este ser um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo (ABRASCO, 2015).

Os organofosforados são agrotóxicos muito utilizados na agricultura e sua manipulação, sem o emprego das medidas de segurança necessárias, promove impactos no ambiente e na saúde (VALE et al., 2017). O glifosato é um herbicida organofosforado que está entre os 10 agrotóxicos mais comercializados no Brasil, correspondendo a 31,45% do total comercializado no país no ano de 2014 (BRASIL, 2016). Além disso, é o ingrediente ativo de mais de 750 herbicidas de amplo espectro, podendo ser utilizado na agricultura, silvicultura, usos urbanos e domésticos (GUYTON et al., 2015).

Em casos de intoxicação por glifosato, este é absorvido pelo organismo, podendo ser comumente encontrado nos intestinos, ossos e rins (ALMEIDA et al., 2016). Sabe-se também que o herbicida pode causar alterações biológicas em diferentes órgãos e tecidos levando a danos a junções celulares de células intestinais (VASILUK et al., 2005), alterações pulmonares em ratos (ADAM et al., 1997) e, efeitos tóxicos e mutagênicos em células embrionárias, fetais e placentárias (RICHARD et al., 2005).

Atualmente, a intoxicação por agrotóxicos está sendo associada ao surgimento de diversas comorbidades, tais como, doença mental, câncer, malformações e alterações na reprodução. Barbosa et al. (2001), relacionaram a exposição ao glifosato com aparecimento de casos de Parkinsonismo, alterações na espermatogênese e nos níveis de testosterona em animais adultos (DALLEGRAVE et al., 2007). Além disso, outros estudos observaram que o glifosato também pode causar stress oxidativo, prejudicando órgãos como fígado e rins (ZHU et al., 2012) e possuir efeito carcinogênico (GUYTON et al., 2015), pois, leva ao surgimento de neoplasias (SCHIMPF et al., 2017).

Sabe-se que compostos organofosforados promovem a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que é essencial para o funcionamento da contração muscular (BARBOZA et al., 2018) além de causar a degeneração (BRIGHT et al., 1991) e necrose das fibras musculares de ratos (DE BLEECKER et al., 1992). Porém, desconhecem-se trabalhos que avaliem os efeitos do organofosforado glifosato no tecido muscular dos animais expostos, bem como, se a exposição materna à este herbicida pode alterar as fibras musculares da prole.

Com isso, acredita-se que este estudo seja de grande importância no entendimento dos impactos causados pelo glifosato no tecido muscular. Desta forma, a escolha dos músculos extensor longo dos dedos (ELD), característico de contração rápida, e, sóleo (SOL), músculo de contração lenta (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011) permitirão observar como esses efeitos podem se expressar em músculos de características distintas.

Sendo assim, levanta-se a hipótese de que, assim como outros compostos organofosforados, o glifosato também possa promover alterações nas fibras musculares, levando à necrose e/ou degeneração das fibras musculares dos músculos ELD e SOL das mães e prole expostas durante o período de prenhez e lactação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a morfologia e morfometria das fibras musculares dos músculos extensor longo dos dedos (ELD) e sóleo (SOL) das fêmeas expostas ao glifosato durante a prenhez e lactação, bem como a morfologia e morfometria das fibras musculares dos músculos ELD e SOL e junções neuromusculares (JNMs) de sua prole.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a morfologia dos músculos ELD e SOL das fêmeas e da prole expostos ao glifosato, quanto à:

- Área, diâmetro maior e diâmetro menor das fibras musculares;
- Alterações no tecido conjuntivo;
- Estrutura das fibras musculares;
- Área, diâmetros maior e menor das JNMs da prole.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Programação metabólica

O conceito de PM se refere aos insultos ou estímulos, que aplicados durante o primeiro momento da vida, que compreende o período intrauterino até a infância, podem resultar em alterações que persistirão ao longo dela. (SILVA et al., 2015; PADMANABHAN et al., 2016). Assim, o ambiente ao qual estamos expostos durante períodos críticos do desenvolvimento têm efeito permanente na estrutura dos tecidos e do metabolismo e, conseqüentemente, na saúde em longo prazo (GLUCKMAN, 2008).

No período perinatal, a organogênese e a diferenciação dos tecidos ocorrem de forma estritamente controlada e cronometrada, o que torna a mãe e o feto extremamente vulneráveis aos impactos de um ambiente hostil (GANU et al., 2012; MAKELARSKI et al., 2014). Assim, devido à grande plasticidade existente neste momento do desenvolvimento, um único genótipo pode gerar estados fisiológicos e morfológicos diferentes, em função das condições ambientais diversas (PADMANABHAN et al., 2016).

Embora a PM ocorra em busca da sobrevivência da prole, através da modulação do balanço energético, utilizando os nutrientes disponíveis de maneira mais eficiente (SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011). A longo prazo, as mudanças resultantes deste processo podem ser prejudiciais, levando ao desenvolvimento de doenças (PADMANABHAN et al., 2016). Desta forma, a nutrição materna, tabagismo, estilo de vida, fatores ambientais como toxinas, disruptores endócrinos e intervenções médicas durante a gravidez (OZANNE, 2015; PADMANABHAN et al., 2016), têm papel chave no desenvolvimento da PM.

Geralmente, as alterações decorrentes da PM se manifestam logo após o nascimento do indivíduo ou na forma de doenças crônicas que podem desenvolver-se apenas na vida adulta (JANG; SERRA, 2014). Também é possível que, as alterações decorrentes dos insultos ocorridos no primeiro momento da vida, resultem na herança de fatores de risco e um ciclo de transmissão de doenças entre as gerações (VICKERS, 2014; PADMANABHAN et al., 2016).

A epigenética é o estudo das mudanças mitoticamente ou meioticamente hereditárias, que resultam na alteração da expressão dos genes sem ocorrer mudanças na sequência de DNA (RUSSO et al., 1996). Acredita-se que alterações epigenéticas, como metilação do DNA, modificação das histonas, empacotamento de cromatina e expressão do microRNA, são os mediadores chave no desenvolvimento da PM (LANE, 2014). Isso ocorre pois a interação destes mecanismos epigenéticos promovem a diversidade de tipos celulares durante o desenvolvimento e mantém os perfis de expressão dos diferentes tipos de células durante toda a vida (REAMON-BUETTNER; BORLAK, 2007).

Para entender melhor como o ambiente estressor pode alterar o desenvolvimento da prole, são realizados estudos avaliando a prole de mães expostas a certas toxinas. Dentre estes, foi observado que a exposição materna ao glifosato promoveu na prole a modificação do eixo hipotálamo-hipófise gonadal, diminuição do hormônio tireoestimulante (TSH) (SOUZA et al., 2017), alterações no metabolismo celular (MARC et al., 2004), deficiência óssea (DALLEGRAVE et al., 2003), desenvolvimento reflexológico alterado, redução da atividade locomotora e ansiedade na vida adulta (GALLEGOS et al., 2016).

O estudo realizado com o composto organofosforado Diazinon, onde camundongos foram expostos à doses diárias durante a gestação, foi observado que sua prole apresentou função motora prejudicada em testes comportamentais e menor resistência ao teste de natação, indicando transmissão neuromuscular alterada, função cardiovascular e propriedades metabólicas alteradas no músculo esquelético (SPYKER; AVERY, 1977).

Sabe-se que o período fetal é determinante para o desenvolvimento do músculo esquelético e que as propriedades morfofuncionais são determinadas durante a embriogênese. Desta forma, acredita-se que adaptações musculares possam ocorrer como resposta a um ambiente uterino adverso (BAAR, 2010; DU et al., 2010).

3.2 Agrotóxicos

A exposição aos agrotóxicos e seus impactos tornaram-se um expressivo problema ambiental e de saúde pública, em função do uso intensivo e difuso destes produtos no Brasil (BRASIL, 2016).

A legislação brasileira define os agrotóxicos como:

Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989).

O modelo de produção agrária hegemônico no Brasil é marcado pela entrada do capitalismo no campo e pela chamada “Revolução Verde” (ABRASCO, 2015), um modelo baseado no intenso uso de agrotóxicos e fertilizantes sintéticos na agricultura, constituído por diversas estratégias e inovações tecnológicas, que visavam maior produtividade agrícola. Isso ocorreu através do desenvolvimento de pesquisas em sementes, fertilização de solos, utilização de agrotóxicos e mecanização agrícola (SERRA et al., 2016), que promoveram a modernização do campo. Desde então, o Brasil tem aumentado exponencialmente o uso de pesticidas, e este modelo de desenvolvimento vem resultando em impactos ambientais de curto, médio e longo prazo (BRASIL, 2016).

Dados mostram que, desde 2008, o Brasil se encontra entre os maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (ABRASCO, 2015). O que se deve ao fato de que, enquanto o mercado mundial tenha crescido 93% entre os anos de 2002 e 2012, o mercado brasileiro cresceu 190% nesse mesmo período. Em 2010 foram movimentados cerca de US\$ 7,3 bilhões no mercado nacional de agrotóxicos, representando 19% do mercado global, já em 2011 houve aumento de 16,3% das vendas, alcançando cerca US\$ 8,5 bilhões de dólares (SINDAG, 2012).

Com o aumento do uso de agrotóxicos, numerosas são as ocorrências de contaminação ambiental providas de descuidos de empresas fabricantes e formuladores de agrotóxicos, assim como do agronegócio. Além disso, é comum populações inteiras serem expostas aos riscos da contaminação (ARAUJO; OLIVEIRA, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, 3 milhões de casos de pessoas intoxicadas por agrotóxicos são relatados anualmente (SERPA et al., 2015). No Brasil, em 2014, foram notificados 6,26 casos de intoxicação aguda por agrotóxicos a cada 100 mil habitantes enquanto que, no período de 2007 a 2015, 84.206 casos de intoxicação foram notificados (BRASIL, 2016).

Os organofosforados (OF) são os pesticidas mais utilizados no mundo desde a década 70, e seu consumo tem aumentado drasticamente, bem como os relatos de intoxicação humana (BARTH; BIAZON, 2010). Os OF são compostos que possuem em sua estrutura um átomo de fósforo, e seu mecanismo de ação consiste na inibição das enzimas esterases, principalmente a AchE, enzima responsável pela degradação de acetilcolina (BARBOZA et al., 2001; SILVA et al., 2013).

Dentro do grupo dos OF, encontra-se o herbicida glifosato, um dos ingredientes ativos mais utilizados no país que, no ano de 2018, ocupou o primeiro lugar no ranking dos dez ingredientes ativos mais comercializados no Brasil (IBAMA, 2018). Além de fazer parte do grupo dos OF, o glifosato (N-(fosfometil)glicina) é um herbicida derivado da glicina, não seletivo, de ação sistêmica, pós emergente (AMARANTE JUNIOR, SANTOS, 2002), sendo o ingrediente ativo primário presente no Roundup® (MONSANTO, 2008). Este herbicida é comumente utilizado no controle de ervas daninhas, da vegetação de áreas não agrícolas, e ainda, atua como dissecante no período de colheita (TARAZONA, et al., 2017).

Este composto é absorvido rapidamente através da superfície da planta (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000) e seu mecanismo de ação consiste na alteração de diferentes processos bioquímicos vitais nas plantas, como a biossíntese de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (COUTINHO; MAZO, 2005). Ele impede o crescimento da planta, interferindo na produção de aminoácidos através da inibição da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs), que catalisa a condensação do ácido chiquímico e do fosfato piruvato, desta forma evitando a síntese de três aminoácidos essenciais: triptofano, fenilalanina e tirosina (YAMADA; CASTRO, 2007).

Inicialmente acreditava-se que o glifosato seria seguro para os humanos, pelo fato de a via metabólica deste composto não existir em vertebrados (MESNAGE et al., 2015). Porém, os estudos mostraram que os herbicidas à base de glifosato, causavam efeitos deletérios em diversas espécies, desde organismos encontrados no solo, espécies aquáticas como peixes e anfíbios, até no ser humano, então, este conceito foi mudado (BAI; OGBOURNE, 2016).

Estudos apontaram que a exposição ao glifosato pode causar stress oxidativo, afetando órgãos como fígado e rins (ZHU et al., 2012), aparecimento de

casos de Parkinsonismo (BARBOSA et al., 2001), alterações na espermatogênese e nos níveis de testosterona de animais adultos (DALLEGRAVE et al., 2007), surgimento de neoplasias (SCHIMPF et al., 2017), efeito carcinogênico (GUYTON et al., 2015), dentre outros.

Em estudo desenvolvido por Tizhe e colaboradores (2014), observou-se que ratos *Wistar* expostos ao glifosato, no período de oito semanas, apresentaram degeneração das células epiteliais da mucosa que envolve a mucosa muscular do estômago e suas glândulas, degeneração das células hepáticas, principalmente nas áreas portais do fígado, degeneração glomerular nos rins, infiltração de células mononucleares nos interstícios dos túbulos e necrose tubular, degeneração neuronal, degeneração das células acinares pancreáticas e células esplênicas despovoadas nas polpas vermelha e branca do baço.

3.3 Músculo estriado esquelético e junções neuromusculares

O músculo estriado esquelético é um tecido envolvido com a locomoção, postura, movimentos respiratórios (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007), e possui a maior massa celular e componente proteico do organismo (DESCHENES, 2004). Este tecido também desempenha diversas funções metabólicas, como homeostase energética, regulação de calor, sensibilidade à insulina e metabolismo de aminoácidos, sendo recentemente identificado como um órgão endócrino (BIOLO; CEDERHOLM; MUSCARITOLI, 2014).

Suas células, denominadas fibras musculares, possuem capacidade contrátil, formato alongado, delgadas e multinucleadas, com núcleos localizados periféricamente, próximos ao sarcolema (Figura 1). Seu diâmetro pode variar de 10 a 100 μm , alcançando até 10 cm de comprimento de acordo com a arquitetura do músculo (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007). São compostas por proteínas contráteis e elásticas, filamentos de actina e miosina, que permitem a contração e se organizam de forma a gerar um padrão de bandas claras e escuras de forma alternada, chamadas de estriações transversais, que formam os sarcômeros (SILVERTHORN, 2010).

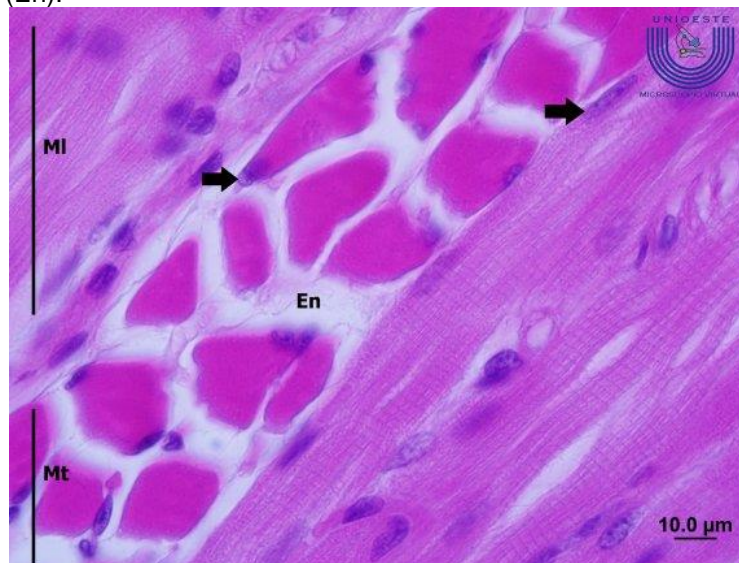
As fibras musculares possuem características distintas quanto a sua capacidade de contração, sendo importante ressaltar que os músculos escolhidos para o desenvolvimento do trabalho dispõem de características opostas quanto a

sua atividade metabólica. O músculo ELD é formado majoritariamente por fibras tipo II, caracterizadas como fibras de contração rápida com metabolismo glicolítico ou glicolítico-oxidativo. O músculo SOL é formado principalmente por fibras tipo I, de contração lenta e metabolismo oxidativo (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

Em camundongos, estudos demonstraram que, no músculo ELD, há grande predominância das fibras tipo IIB, que correspondem à cerca de 66% de todo o músculo. Já no SOL as fibras tipo I e IIA, correspondem respectivamente à cerca de 38% e 39% do total de fibras deste músculo (AUGUSTO; PADOVANI; CAMPOS, 2004).

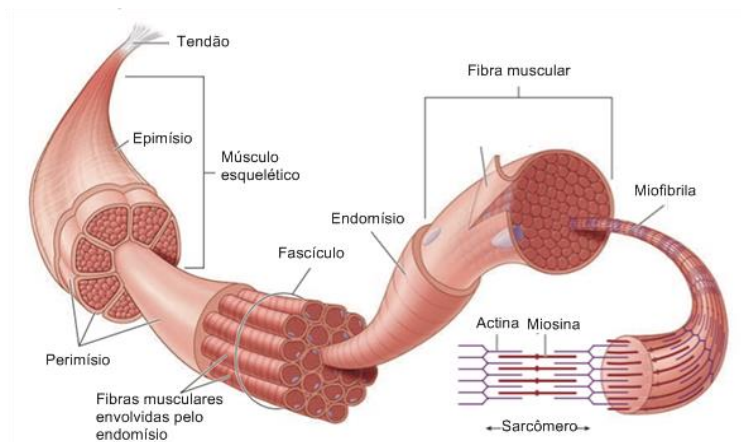
Envolvendo as fibras musculares encontra-se uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas, que constitui o tecido conjuntivo do músculo, e se organiza em três bainhas: o epímísio, que envolve todo o músculo; perimísio, que separa o músculo em fascículos, e o endomísio que envolve cada fibra muscular (Figura 2) (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007). Além de manter as fibras musculares unidas, o tecido conjuntivo também transmite a força de contração do músculo para os tendões e ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 1. Fotomicrografia da estrutura do músculo estriado esquelético. Vista transversal (Mt) e longitudinal (MI). Hematoxilina-Eosina (HE). Fibras multinucleadas com núcleos em posição periférica (seta). Endomísio (En).



Fonte: Brancalhão et al., (2016). Disponível em: <<http://projetos.unioeste.br/projetos/microscopio/>> (Acesso em 11/06/2018)

Figura 2. Modelo esquemático da organização estrutural do músculo estriado esquelético.

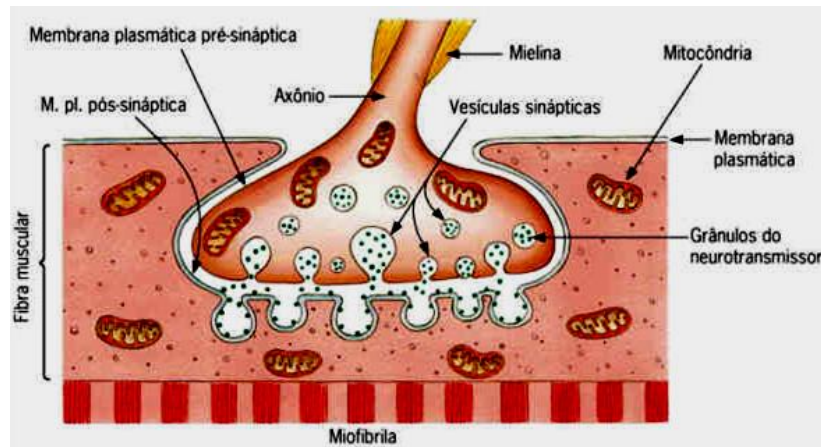


Fonte: Adaptado de <https://anatomia-papel-e-caneta.com/sistema-muscular/> (Acesso em 11/06/2018).

Estímulos provenientes do sistema nervoso controlam a atividade muscular e, participando deste mecanismo estão às junções neuromusculares (JNMs), que são regiões sinápticas localizadas entre os neurônios motores e as fibras musculares esqueléticas (BLOCH-GALLEGO, 2015; WU; XIONG; MEI, 2010), responsáveis pela transmissão dos impulsos nervosos (WU; XIONG; MEI, 2010), gerando a contração muscular (FAGERLUND; ERIKSSON, 2009).

A JNM é formada por três compartimentos: a membrana pré-sináptica, que consiste no neurônio motor, com seu corpo celular no corno anterior da medula espinal que se projeta pelos axônios mielínicos para inervar a fibra muscular (FAGERLUND; ERIKSSON, 2009), e atua na síntese, armazenamento e liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A fenda sináptica, que consiste na matriz extracelular estrutural e funcional, e facilita a adesão entre as membranas sinápticas. Por fim, há a membrana muscular (parte pós sináptica), que contém diversos receptores de ACh e outras moléculas importantes no estabelecimento e manutenção da JNM (PUNGA; RUEGG, 2012) (Figura 3).

Figura 3. Esquema de uma junção neuromuscular.



Fonte: Adaptado de <https://auladefisiologia.wordpress.com/2009/08/20/sistema-muscular/> (Acesso em 18/06/2018).

3.4 Efeitos dos agrotóxicos organofosforados no músculo estriado esquelético

A exposição de vertebrados e invertebrados aos OF leva a uma inibição da atividade hidrolítica da AchE (BARBOZA et al., 2018; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2013) que acarreta no aumento da disponibilidade de Ach. Devido ao fato da função da Ach estar diretamente ligada à excitabilidade da membrana pós sináptica, a redução da hidrólise de Ach pela AchE leva à superestimulação desse compartimento (BARBOZA et al., 2018; MENÉNDEZ-HELMAN et al., 2012), superestimulando então os receptores nicotínicos e muscarínicos (MOON; CHUN; LEE, 2015).

O aumento de sensibilização de receptores nicotínicos de Ach promove um influxo maior de cálcio (Ca^{2+}) para o citoplasma, potencializando a atividade sarcomeral. Contudo, ao entrar em estágio de fadiga, as células musculares, mesmo em meios tônicos de Ca^{2+} , não exercem mais atividade motora. Havendo uma disponibilidade constante de Ca^{2+} citoplasmático, proteínas sinalizadoras de necrose são ativadas, como as calpaínas (ZIMOWSKA, 2001), o que pode levar ao desarranjo das miofibrilas e do citoesqueleto celular (SULTAN et al., 2000).

Tendo em vista esta informação, estudos experimentais são realizados para observar as consequências da exposição ao OF em animais. Bright e colaboradores (1991), observaram em seu trabalho que a administração do OF Sarin, promoveu a degeneração das fibras musculares e infiltrado mononuclear no

diafragma de ratos dos grupos eutanasiados após quatro horas, e após três dias de administração de sarin, respectivamente.

De Bleecker e colaboradores (1992), expuseram ratos ao composto paraoxon e encontraram necrose acentuada no músculo diafragma (músculo misto), masseter e sóleo (músculos lentos). Em contrapartida, outros sete músculos mistos que possuíam predominância de fibras tipo II foram menos afetados pelo composto. Com isso, os autores levantaram uma correlação entre a capacidade oxidativa das fibras e a extensão da necrose, sendo que músculos com predominância de fibras tipo I, seriam mais suscetíveis à necrose induzida por OF.

Sabe-se que a exposição aos agrotóxicos é um problema de saúde pública, e que o contato com toxinas desde o período intrauterino até a infância pode alterar o desenvolvimento do indivíduo. Portanto, entender a organização e comportamento das fibras musculares das mães e prole expostos ao glifosato, pode contribuir na elucidação de como este herbicida afeta o músculo esquelético e suas respectivas funções.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

**Estudo das fibras musculares dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo
de mães expostas ao glifosato durante a prenhez e lactação**

Estudo das fibras musculares dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de mães expostas ao glifosato durante a prenhez e lactação

Study of muscle fibers of the extensor longus digitorum and soleus muscles of mothers exposed to glyphosate during the pregnancy and lactation

Resumo

Objetivo: Avaliar a morfologia e morfometria dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo das mães expostas ao glifosato durante a prenhez e lactação.

Metódos: Foram utilizados 12 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 que, após detecção da prenhez, foram separadas em Grupo Controle, que recebeu somente água, e, Grupo Glifosato, que recebeu água com 0,5% de glifosato durante o período de prenhez e lactação. Ambos os grupos receberam dieta padrão *ad libitum*. Após o desmame, as mães foram eutanasiadas, pesadas, mensurado o comprimento nasoanal, e as gorduras foram coletadas e pesadas. Os músculos extensor longo dos dedos e sóleo foram coletados e mensurados o comprimento e o peso. Em seguida, foram fixados em metacarn para a realização do estudo histológico das fibras musculares. **Resultados:** O Grupo Glifosato apresentou menor ganho de peso durante a prenhez, e também, menor peso corporal final e comprimento nasoanal, entretanto, os demais parâmetros corporais avaliados não apresentaram diferença significativa em relação ao Grupo Controle. Na análise das fibras musculares e tecido conjuntivo também não foram observadas diferenças significativas. **Conclusão:** A exposição a 0,5% de glifosato durante o período de prenhez e lactação resultou no menor ganho de peso na gestação, peso final e comprimento nasoanal. O que pode indicar que, apesar de não alterar a morfologia do tecido muscular diretamente, a exposição foi suficiente para interferir no metabolismo dos animais.

Descritores: Glifosato; Praguicidas; Toxicidade; Exposição materna; Fibras musculares esqueléticas.

Abstract

Objective: To evaluate the morphology and morphometry of the extensor longus digitorius and soleus muscles of mothers that were exposed to glyphosate during the period of pregnancy and lactation. **Methods:** Twelve female mice from the C57BL/6 lineage were used, which, after detection of pregnancy, were separated into a Control Group, which received only water and, Glyphosate Group, which received water with 0.5% of glyphosate during the pregnancy and lactation period. Both groups received *ad libitum* standard diet. After weaning, the dams were euthanized, weighed, measured nasoanal length and fats were collected and weighed. The extensor longus digitorium and soleus muscles were collected, and the length and weighing were measured. Then, the muscles were fixed in metacarn to perform the histological study of the muscle fibers. **Results:** Glyphosate Group presented lower weight gain during pregnancy and also lower final body weight and nasoanal length, however, the other body parameters evaluated did not present a significant difference in relation to the Control Group. Significant differences were also not observed in the analysis of muscle fibers and connective tissue. **Conclusion:** Exposure to 0.5% glyphosate during the pregnancy and lactation period resulted in lower weight gain during pregnancy, final weight and nasoanal length. Which may indicate that, despite not altering the morphology of muscle tissue, exposure was sufficient to interfere with animal metabolism, resulting in lower weight and nasoanal length.

Keywords: Glyphosate; Pesticides; Toxicity; Maternal exposure; Muscle fibers skeletal.

Introdução

O glifosato (N-(fosfonometil)glicina) é um composto organofosforado que ocupou o primeiro lugar na lista dos dez ingredientes ativos mais vendidos no Brasil no ano de 2018.⁽¹⁾ Está presente na formulação do Roundup, um dos herbicidas mais utilizados no mundo,⁽²⁾ que correspondeu a quase 72% do uso global de pesticidas em 2016.⁽³⁾ Seu mecanismo de ação consiste na inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfatossintase da via do chiquimato, responsável pela produção do intermediário corismato, composto necessário na síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais para o desenvolvimento da planta.⁽⁴⁾

Embora essa via não esteja presente nos mamíferos, estudos já demonstraram que o herbicida possui toxicidade em ratos,⁽⁵⁾ camundongos,⁽⁶⁾ bem como em humanos,⁽⁷⁾ estando associada a gênese de diversas doenças.⁽⁸⁾

No Brasil, ainda não há limite estabelecido de glifosato ou qualquer outro herbicida na água ou solo pelas agências controladoras. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA), o limite de glifosato em água potável compreende 700µg/L com dose diária aceitável de 0,05mg/kg por massa corpórea.⁽⁹⁾ Entretanto, é comum que a dose estipulada seja ultrapassada, o que aumenta sua concentração no ambiente.⁽¹⁰⁾

Em roedores, estudos experimentais demonstraram que a exposição a pesticidas aumenta a incidência de tumores,⁽⁶⁾ promove anormalidades no funcionamento do fígado, coração e cérebro,⁽¹¹⁾ assim como danos nas junções celulares de células intestinais, que levaram à maior permeabilidade de membrana.⁽¹²⁾ Já em estudos realizados com pesticidas organofosforados foi observado que estes promovem a inibição da enzima acetilcolinesterase (Ache),⁽¹³⁾ e levaram a degeneração⁽¹⁴⁾ e necrose das fibras musculares.⁽¹⁵⁾

Sabe-se que a gestação é um período de numerosas alterações fisiológicas, o que promove a vulnerabilidade tanto da mãe quanto do feto, sendo estritamente importante a redução da exposição a quaisquer toxinas neste período. Entretanto, a exposição materna a pesticidas torna-se cada vez mais comum, uma vez que pode ocorrer por meio do contato com o ar, água, comida contaminada, no ambiente de trabalho, durante a mistura de compostos químicos, aplicação de pesticidas, limpeza de equipamentos ou até indiretamente, durante o manuseio de plantações ou alimentos contaminados.⁽¹⁶⁾

Embora alguns estudos experimentais já relatem alterações nos tecidos e metabolismo da prole de ratos e camundongos expostos ao glifosato no período da gestação e lactação,^(2,17) pouco se conhece sobre os efeitos que a exposição pode promover na musculatura esquelética das mães expostas neste mesmo período. Sendo assim, a realização deste estudo torna-se de grande importância no entendimento das possíveis alterações musculoesqueléticas causadas pela exposição ao glifosato.

Objetivo

Avaliar a morfologia e morfometria dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo das mães expostas ao glifosato durante a prenhez e lactação.

Métodos

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE em 16/09/2016.

Obtenção dos animais

Inicialmente, foram utilizados 30 camundongos C57BL/6 em idade reprodutiva, sendo 20 fêmeas e 10 machos, com idade entre 60 e 90 dias de vida e média de peso corporal de 20g-25g. Os animais foram mantidos em condições de temperatura ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (12 horas claro/escuro) controladas, e receberam ração padrão para roedores (Supralab, São Leopoldo, RS, Brasil) e água filtrada *ad libitum* durante todo o experimento.

Cruzamentos

Passados sete dias de aclimação, foi realizado o esfregaço vaginal para acompanhamento do ciclo estral das fêmeas que foram alocadas para realização dos cruzamentos quando se encontravam em fase de proestro, na proporção de duas fêmeas para um macho, durante o período noturno. Na manhã do dia seguinte, foi realizado novamente o esfregaço vaginal para identificação de espermatozoides e determinação do ciclo estral para confirmação da prenhez. As fêmeas consideradas prenhas apresentavam a presença de espermatozoides ou permanência de quatro dias na fase de diestro após o cruzamento. As fêmeas que não estavam prenhas passavam novamente pelo processo de cruzamento, até a confirmação da prenhez.

Administração do glifosato

Confirmada a prenhez, as fêmeas foram alocadas em caixas individuais, sendo separadas nos Grupos Controle (CTL, n=6), que receberam água filtrada durante todo o período de prenhez (21 dias) e lactação (30 dias), e Grupo Glifosato (GF, n=6), que recebeu a adição de 0,5% do herbicida glifosato (Roundup®, Monsanto Brasil) na água de beber a partir do quarto dia de prenhez até o fim da

lactação. A dosagem escolhida mimetiza a contaminação direta de águas subterrâneas, pois se assemelha com a quantidade de pesticida encontrada na água após práticas agrícolas.⁽¹⁸⁾ A fórmula comercial de glifosato Roundup® Original DI (Monsanto, Brasil) utilizada contém 445g/L de sal de diamônio de N-fosfometilglicina equivalente a 370g/L (37,0%*m/v*) do componente ativo glifosato (N-fosfometilglicina).

Eutanásia das fêmeas

Após 30 dias de amamentação ocorreu o desmame e a eutanásia das mães foi realizada depois de completos dois ciclos estrais. Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (Anasedan®, Vetbrands, Brasil) e cloridrato de cetamina (Dopalen®, Vetbrands, Brasil) em concentração de 9mg/Kg e 90mg/Kg, respectivamente, e, por fim, eutanasiados.

Após a eutanásia, as mães foram pesadas, o comprimento nasoanal (CNA) foi mensurado, e as gorduras retroperitoneal e perigonadal foram coletadas e pesadas.

Coleta dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo

Para a coleta do músculo extensor longo dos dedos (ELD), a pele foi rebatida, e o músculo tibial anterior foi removido para a dissecação e remoção do ELD. Já o músculo gastrocnêmio foi retirado para a dissecação e remoção do músculo sóleo (SOL). Os músculos ELD e SOL foram pesados (g) em balança analítica (Shimadzu UX620H, São Paulo, Brazil) e seu comprimento (mm) foi mensurado com o auxílio de paquímetro digital (Digimess®, São Paulo, Brasil).

Estudo histológico

Para o estudo das fibras musculares, os músculos ELD e SOL do antímero direito dos membros pélvicos foram retirados e armazenados em recipiente de vidro com fixador metacarn, transferidos após 24hs para álcool 70% e incluídos em parafina, com protocolo de emblocamento em Álcool N-Butílico.

Os músculos ELD e SOL foram seccionados transversalmente e submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)⁽¹⁹⁾ para a análise morfológica das fibras musculares, quantificação dos números de núcleos e fibras, relação núcleo e fibra, área, diâmetro maior e diâmetro menor de cada fibra muscular a partir da análise de 10 campos microscópicos (objetiva de 40x) para cada animal. O mesmo procedimento de secção foi realizado para coloração de Tricrômico de Masson⁽²⁰⁾ que permite a quantificação do tecido conjuntivo, por meio da análise de 10 campos microscópicos para cada animal (objetiva de 20x).

As imagens das fibras musculares foram obtidas através do microscópio Olympus Bx60[®] acoplado a câmera Olympus DP71 (Tóquio, Japão), com auxílio do programa DP Controller 3.2.1 276. Foi utilizado o programa Image Pro Plus 6.0[®] (Media Cybernetics, Maryland, USA) para a análise morfológica e morfométrica dos materiais.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism[®] (La Jolla, USA) levando-se em consideração os resultados dos testes de normalidade. Para os dados que encontrados em normalidade, o teste estatístico empregado foi o teste *t* de Student, enquanto que para os dados que não estavam em normalidade foi utilizado o teste Mann-Whitney.

Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados

Dados do período de prenhez e lactação

O grupo GF apresentou menor ganho de peso durante a gestação ($p=0,0327$) quando comparados ao grupo CTL (Tabela 1). Porém, os dados de perda de peso durante a lactação, tempo de gestação, tamanho da ninhada, não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo CTL (Tabela 1).

Tabela 1. Dados do período de prenhez e lactação de camundongos dos Grupos Controle e Glifosato.

Dados do período de prenhez e lactação (n=6)		
	CTL	GF
Ganho de peso gestação (g)	12 ± 1,4 a	9,5 ± 1,9 b
Perda de peso lactação (g)	1,8 ± 1,9	1,3 ± 2,4
Tempo de gestação (dias)	19 ± 1,4	20 ± 0,82
Tamanho da ninhada	6,7 ± 1,6	5,0 ± 1,5

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras a e b representam grupos com diferença significativa ($p < 0,05$). Teste *t* de Student. CTL: Grupo Controle. GF: Grupo Glifosato

Dados corporais

Foi observado que os animais do grupo GF apresentaram menor peso corporal ($p=0,0103$) e CNA ($p=0,0002$) quando comparados aos animais do grupo CTL (Tabela 2). Em contrapartida, os parâmetros de pesos das gorduras retroperitoneal e perigonadal foram semelhantes entre os grupos (Tabela 2). Os dados de peso e comprimento dos músculos ELD e SOL também não apresentaram diferenças estatísticas quando realizada a comparação entre os grupos CTL e GF (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros corporais de camundongos do Grupo Controle e Glifosato.

Parâmetros corporais (n=6)		
	CTL	GF
Peso corporal final (g)	23 ± 1,3 a	22 ± 0,79 b
CNA (cm)	9,7 ± 0,5 a	9,2 ± 0,38 b
Peso das gorduras (mg)	469 ± 42	602 ± 173
Peso do músculo ELD (mg)	7,2 ± 1,8	10 ± 4,9
Comprimento do músculo ELD (mm)	7,3 ± 0,98	7,9 ± 1,0
Peso do músculo SOL (mg)	6,1 ± 0,81	6,2 ± 2,2
Comprimento do músculo SOL (mm)	6,1 ± 1,3	6,3 ± 1,2

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras a e b representam grupos com diferença significativa ($p < 0,05$). Teste *t* de Student. Teste Mann Whitney. CTL: Grupo Controle. GF: Grupo Glifosato. CNA: comprimento nasoanal. ELD: músculo extensor longo dos dedos. SOL: músculo sóleo.

Análise morfológica e morfométrica das fibras musculares

A avaliação das fibras musculares dos músculos ELD e SOL demonstraram fibras com morfologia preservada, mantendo o aspecto poligonal, presença de núcleos periféricos e eventual presença de núcleos centrais nos dois grupos estudados (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D).

Quanto à análise morfométrica das fibras musculares dos músculos ELD e SOL, nenhum dos parâmetros avaliados apresentou diferenças significativas entre os Grupos CTL e GF (Tabela 3).

Tabela 3. Análise morfométrica das fibras musculares e tecido conjuntivo dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de camundongos dos Grupos Controle e Glifosato.

Análise morfométrica das fibras musculares (n=6)				
	ELD		SOL	
	CTL	GF	CTL	GF
Área (μm^2)	115 \pm 34	152 \pm 86	157 \pm 24	187 \pm 69
Diâmetro maior (μm)	15 \pm 1,8	17 \pm 4,8	18 \pm 1,4	19 \pm 3,1
Diâmetro menor (μm)	9,6 \pm 1,4	11 \pm 3,2	11 \pm 0,83	12 \pm 2,7
Densidade de fibras	536 \pm 131	578 \pm 243	414 \pm 123	430 \pm 175
Número de núcleos periféricos	617 \pm 109	707 \pm 195	927 \pm 237	827 \pm 265
Número de núcleos centrais	1,0 \pm 0,71	0,80 \pm 1,3	2,2 \pm 2,4	1,8 \pm 2,5
Relação núcleo/fibra	1,2 \pm 0,16	1,3 \pm 0,22	2,3 \pm 0,34	1,9 \pm 0,15
Estimativa do tecido conjuntivo	187.856 \pm 28.560	204.849 \pm 68.240	261.437 \pm 54.452	237.983 \pm 46.669

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Teste *t* de Student. Teste Mann Witney. CTL: Grupo Controle.

GF: Grupo Glifosato. ELD: músculo extensor longo dos dedos. SOL: músculo sóleo.

Análise da quantidade de tecido conjuntivo

A coloração com Tricrômico de Masson evidenciou a presença de tecido conjuntivo entre as fibras musculares, principalmente no perimísio envolvendo os fascículos (Figuras 2A, 2B, 2C e 2D). Quanto à estimativa da quantidade de tecido conjuntivo nos dois músculos estudados, não foram observadas diferenças estatísticas entre os Grupos CTL e GF (Tabela 3).

Discussão

O estudo demonstrou que a exposição das fêmeas ao glifosato durante o período de prenhez e lactação, promoveu menor ganho de peso durante a gestação, o que também foi observado em outros trabalhos que expuseram ratas prenhas às concentrações de 1%^(11,21) e 0,5%⁽²⁾ de glifosato. Além disso, a exposição ao glifosato, também resultou em menor peso corporal final e CNA dos animais expostos, o que corrobora com os achados de Teleken et al.,⁽¹⁷⁾ que também expôs camundongos à concentração de 0,5% de glifosato durante estas fases de seu ciclo de vida.

Estes resultados também foram encontrados nos estudos de Beuret et al.,⁽²¹⁾ e McKenna et al.,⁽²²⁾ que mostraram que os animais expostos ao glifosato apresentaram menor consumo hídrico e alimentar, comparados aos animais não expostos, o que justifica o menor ganho de peso, menor peso corporal final e comprimento nasoanal dos animais GF, uma vez que a administração do glifosato pode refletir na redução da palatabilidade da água ingerida ou promover alterações nos centros reguladores da sede, devido aos efeitos do herbicida e seus metabólitos.⁽¹¹⁾

Embora estudos tenham demonstrado que a exposição a herbicidas organofosforados (OF) promoveram a degeneração⁽¹⁴⁾ e necrose das fibras musculares⁽¹⁵⁾ de ratos, o presente estudo não observou o mesmo nos animais expostos ao glifosato. Apesar da corrente associação de doenças na exposição ao herbicida, Mesnage et al.,⁽²³⁾ relatam que na exposição direta seu potencial tóxico é mínimo, o que pode justificar a ausência de alterações nos parâmetros morfológicos e morfométricos dos músculos ELD e SOL das mães no presente estudo.

Além disso, mesmo que demonstrada sua baixa toxicidade na exposição direta, também foi observado em estudo que o glifosato promoveu aumento na ocorrência de doenças nos descendentes de ratos expostos. Isto mostra que o herbicida possui a capacidade de promover alterações epigenéticas, que são transmitidas para as gerações seguintes. Dessa forma, apesar de sua toxicidade ser mínima durante a exposição direta, é necessário levá-lo em consideração na etiologia das doenças nas futuras gerações⁽²⁴⁾.

Conclusão

Os resultados mostraram que a exposição à 0,5% de glifosato, durante a prenhez e lactação, promoveu menor ganho de peso durante a gestação, menor peso e tamanho corporal das mães. Estes dados sugerem que mesmo não alterando as características morfológicas do tecido muscular diretamente, o glifosato pode interferir no metabolismo do animal, promovendo alterações no seu ciclo de obtenção e reserva de energia.

Agradecimentos

Ao programa de bolsas, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da pesquisa.

Referências

1. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil. Boletim anuais[Internet].Brasília(DF):IBAMA;2018[citado 2020 Abr 1].Disponível em:<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>
2. Ren X, Li R, Liu, J, Huang, K, Wu S, Li Y, Li C. Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses. *Environ Pollut.* 2018;243(Pt B):833-41.
3. Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur.* 2016;28(1):3.
4. Steinrücken HC, Amrhein N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochem Biophys Res Commun.**1980;94(4):1207-12.
5. Varayoud J, Durando M, Ramos JG, Milesi, MM, Ingaramo PI, Muñoz-de-Toro M, et al. Effects of a glyphosate-based herbicide on the uterus of adult ovariectomized rats. **Environ Toxicol.** 2017;32(4):1191-201.
6. George J, Prasad S, Mahmood Z, Shukla Y. Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin: a proteomic approach. *J Proteomics.* 2010;73(5):951-64.
7. Thakur DS, Khot R, Joshi PP, Pandharipande M, Nagpure K. Glyphosate poisoning with acute pulmonary edema. **Toxicol Int.** 2014;21(3):328-30.
8. Ubessi LD, Ubessi C, Kirchner RM, Jardim VMR, Stumm EM. Uso de equipamentos que proteção por agricultores que utilizam agrotóxicos na relação com problemas de saúde. *Rev enferm UFPE.* 2015;9(4):7230-8.

9. Barceló D. Environmental Protection Agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water. *J Chromatography A*. 1993;643(1-2):117-43. Review
10. Van Bruggen AH, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ*. 2018;616-17:255-68. Review.
11. Daruich J, Zirulnik F, Gimenez, MS. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ Res*. 2001;85(3):226-31.
12. Vasiluk L, Pinto LJ, Moore MM. Oral bioavailability of glyphosate: studies using two intestinal lines. *Environ Toxicol Chem*. 2005;24(1):153-60.
13. Barboza HT, Nascimento XP, Freitas-Silva O, Soares AG, Dacosta JB. Compostos organofosforados e seu papel na agricultura. *Rev Virtual Quim*. 2018;10(1):172-93. Review.
14. Bright JE, Inns RH, Tuckwell NJ, Griffiths GD, Marrs TC. A histochemical study of changes observed in the mouse Diaphragm after organophosphate poisoning. *Hum Exp Toxicol*. 1991;10(1):9-14.
15. e Bleecker JL, van den Abeele KG, De Reuck JL. Variable involvement of rat skeletal muscles in paraoxon-induced necrotizing myopathy. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1992;75(3):309-22.
16. Makelarski JA, Romitti PA, Rocheleau CM, Burns TL, Stewart PA, Waters MA, Lawson CC, Bell EM, Lin S, Shaw GM, Olney RS; National Birth Defects Prevention Study. Maternal periconceptional occupational pesticide exposure and neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2014;100(11):877-86..
17. Teleken JL, Gomes EC, Marmentini C, Moi MB, Ribeiro RA, Balbo SL, et al. Glyphosate based herbicide exposure during pregnancy and lactation malprograms

the male reproductive morphofunction in F1 offspring. *J Dev Oring Health Dis.*2020;11(2): 146-53.

18. Cassault-Meyer E, Gress S, Séralini GÉ, Galeraud-Denis I. An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014;38(1):131-40.

19. Junqueira LC, Junqueira LM. *Técnicas básicas de citologia e histologia.* 1rd ed. São Paulo: Livraria e Editora Santos; 1983. p. 13-48.

20. Bancroft JD, Steven A. *Theory and practice of histological techniques.* 3rd ed. Churchill Livingstone: Edinburg; 1990. p.740.

21. Beuret CJ, Zirulnik F, Giménez MS. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reprod Toxicol.* 2005;19(4):501-4.

22. McKenna K, Thompson C. Osmoregulation in clinical disorders of thirst appreciation. *Clin Endocrinol (Oxf).*1998;49(2):139-52.Review.

23. Mesnage R, Antoniou MN. Facts and fallacies in the debate on glyphosate toxicity. *Front Public Health.*2017;5:316.

24. Kubsad D, Nilsson EE, King SE, Sadler-Riggleman I, Beck D, Skinner MK. Assesment of glyphosate induced epigenetic transgenerational inheritance of pathologies and sperm epimutations: generational toxicology. *Sci Rep.* 2019;9(1):6372.

Figura 1. Fotomicrografias dos músculos extensor longo dos dedos (ELD) e sóleo (SOL) de camundongos C57BL/6, secção transversal, HE. **A:** CTL, músculo ELD. **B:** GF, músculo ELD. **C:** CTL, músculo SOL. **D:** GF, músculo SOL. Fibras poligonais (★), núcleos periféricos (→).

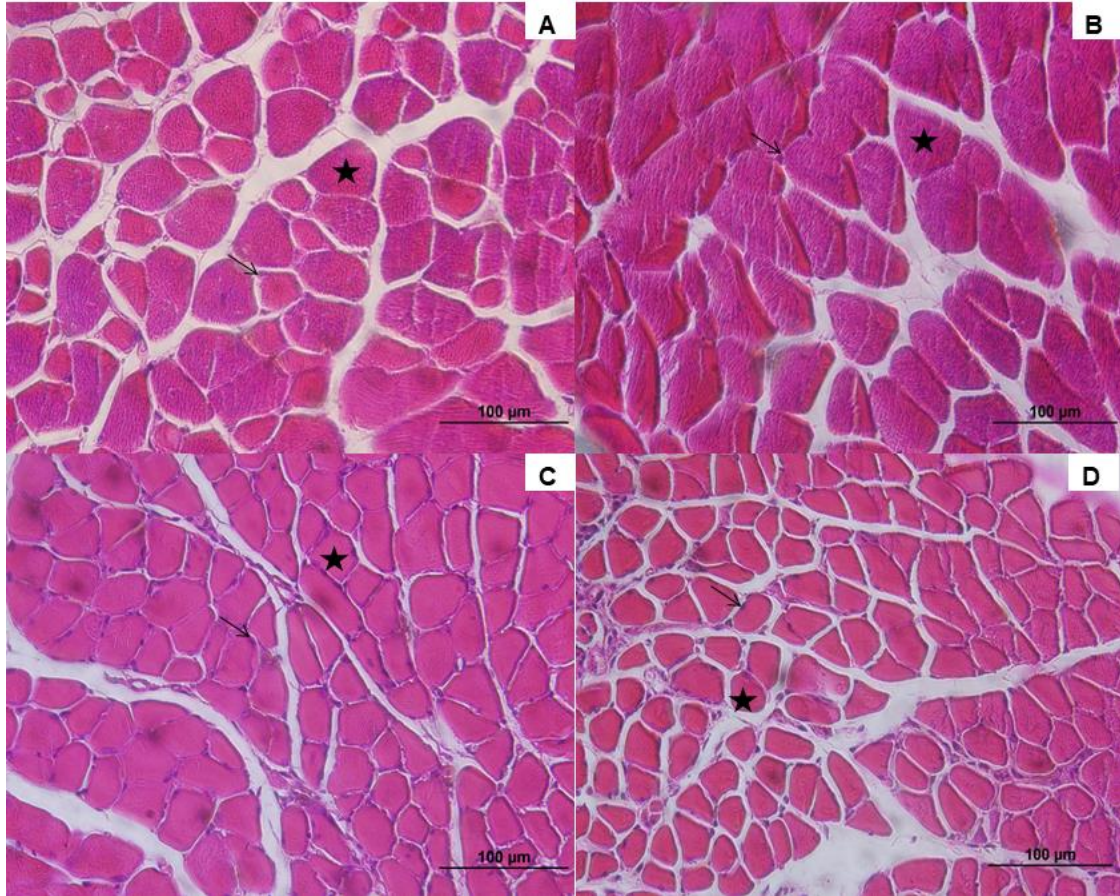
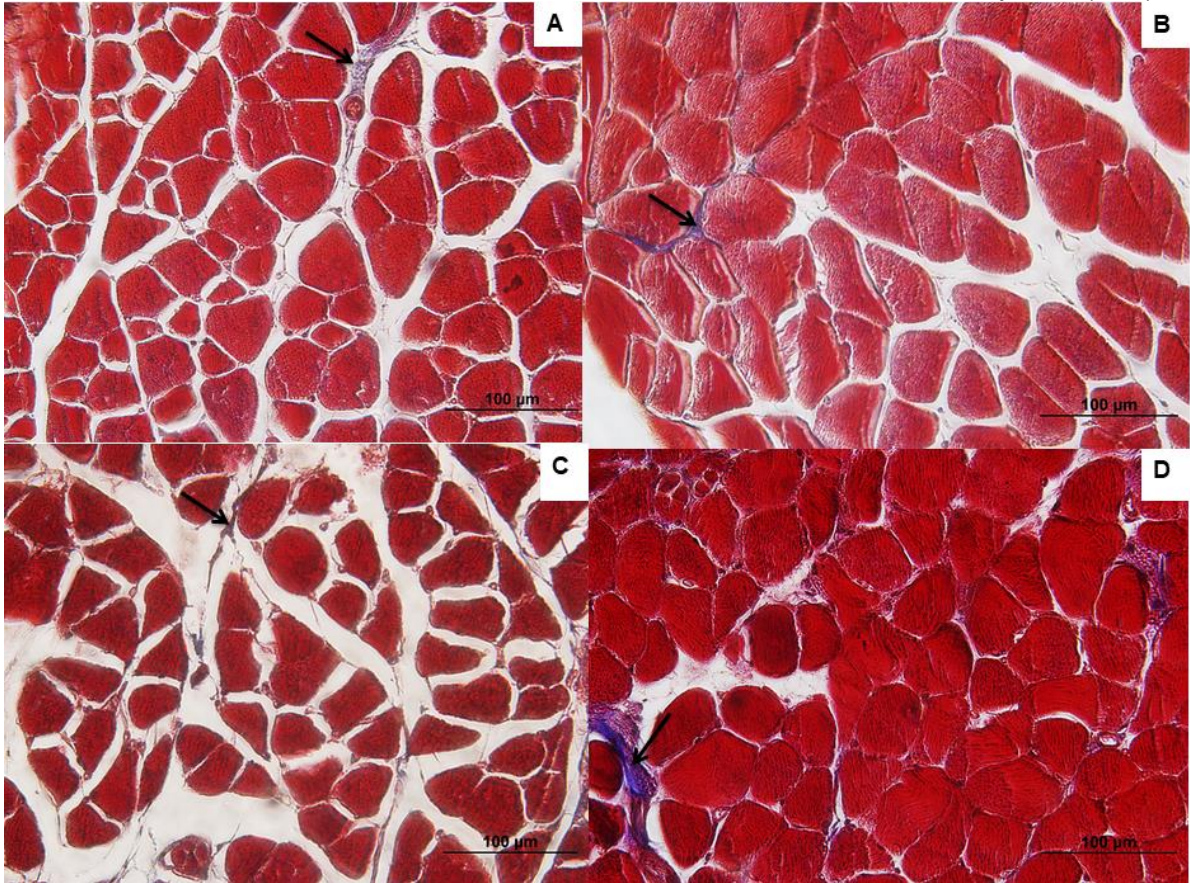


Figura 2. Fotomicrografias dos músculos extensor longo dos dedos (ELD) e sóleo (SOL) de camundongos C57BL/6, secção transversal corado com Tricrômico de Masson. **A:** CTL, músculo ELD. **B:** GF, músculo ELD. **C:** CTL, músculo SOL. **D:** GF, músculo SOL. Tecido conjuntivo (→).



ARTIGO CIENTÍFICO 2

Metabolic programming by maternal exposure to glyphosate affects the morphometric parameters of extensor digitorum longus and soleus muscle fibers of C57BL/6 mouse offspring

Metabolic programming by maternal exposure to glyphosate affects the morphometric parameters of extensor digitorum longus and soleus muscle fibers of C57BL/6 mouse offspring

Ariadne Barbosa, Ms.^{a*}, Mylena de Campos Oliveira, Ms^a, Jakeline Liara Teleken, Ms^a, Rose Meire Costa, Dr^a, Maria Lúcia Bonfleur, Dr^a Marcia Miranda Torrejais, Dr.^a

^aGraduate Program in Biosciences and Health - Master's Degree, Center for Biological and Health Sciences (CCBS), State University of Western Paraná (Unioeste), Cascavel, Paraná, Brazil.

*Corresponding author: Graduate Program in Biosciences and Health - Master's Degree, Center for Biological and Health Sciences (CCBS), State University of Western Paraná (Unioeste), Cascavel, Paraná, Brazil.

Home address: Rua da Lapa, 931, apto 34, bl 3, Bairro Maria Luiza, Cascavel, PR, Brazil.

Institutional Address: Rua Universitária, 1619, Jardim Universitário, Cascavel, PR, Brazil

Cell phone: (+55) 45 - 991490019

Institucional telephone: (+55) 45 - 3220 - 3194

E-mail: ariadne_barbosa@hotmail.com

Abbreviations: NMJ - neuromuscular junction, ELD - extensor digitorum longus, NAL - naso-anal length, CTL - control group, GP - glyphosate group, CTL-F1- control offspring, GP-F1 - glyphosate offspring, HE - hematoxylin-eosin.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the morphology and morphometry of muscle fibers and neuromuscular junctions (NMJs) of the extensor digitorum longus (EDL) and soleus (SOL) muscles in mouse offspring exposed to glyphosate. Twelve pregnant female C57BL/6 mice were divided into a control (CTL) group receiving water and a glyphosate (GP) group receiving 0.5% glyphosate during pregnancy and lactation. At weaning, male offspring were divided into two groups according to the group to which the dams belonged: CTL-F1 (n=10) born to CTL dams and GP-F1 (n=10) born to GP dams. The animals were euthanized at 150 days of life and weighed. The naso-anal length (NAL) was measured and retroperitoneal and periepididymal fat was collected and weighed. The EDL and soleus muscles were collected, weighed, and their length was measured (mm). The right antimere of the muscles was processed for histological study and the left one for histochemical study of NMJs. A reduction of 8% in weight ($p=0.0153$) and of 3% in NAL ($p=0.0463$) was observed in animals of the GP-F1 group compared to CTL-F1. There was also a 56% reduction ($p=0.0409$) in the number of central nuclei in the EDL muscle of the GP-F1 group. The same was observed in soleus muscle but the difference was not significant. Connective tissue was increased by 56% ($p=0.0419$) in soleus muscle of GP-F1 animals compared to the CTL-F1 group. In conclusion, glyphosate can interfere with offspring development, decreasing weight and NAL, in addition to altering the number of central nuclei and connective tissue in muscle fibers. These findings indicate changes in the mechanism of muscle tissue regeneration.

Keywords: Glyphosate. Pesticides. Toxicity. Skeletal muscle

1. Introduction

Stimuli or insults that occur in the first days of life may promote changes in the development of the organism that can lead to long-term problems (Padmanabhan et al., 2016, Silva et al., 2015). Maternal nutrition, maternal smoking, medical interventions during pregnancy, and exposure to xenobiotic compounds are important factors that can predispose to the occurrence of any changes or diseases that may manifest at birth or later in life (Lee et al., 2015, Ozanne, 2015, Padmanabhan et al., 2016).

Pesticides are xenobiotic compounds used in agriculture whose residues have been found in the environment and in foods (Lee et al., 2015). In addition, due to the increasing number of intoxications that affect more than three million people annually, the World Health Organization characterizes exposure to pesticides as a public health problem (Zancarro et al., 2019).

Glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] is a post-emergent, non-selective organophosphate herbicide commonly used for the control of weeds in various crops (Amarante Junior and Santos, 2002, Siroski et al., 2016). It is used in the formulation of Roundup, one of the most commercialized herbicides in the world. Glyphosate inhibits plant growth by interfering with the shikimate pathway, inhibiting 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (Boocock and Coggins, 1983), an enzyme involved in the metabolism of aromatic amino acids that are essential for plant development. Since this pathway is absent in vertebrates, it was believed that the exposure to glyphosate would not harm human health (Mesnage et al., 2015). However, both short-term and long-term exposure has been reported to promote changes in exposed individuals, which can be caused by direct or maternal exposure (Górniak et al., 2008). Within this context, studies demonstrated that maternal

exposure to glyphosate promoted changes in the masculinization of offspring (Romano et al., 2011) and in cell metabolism (Marc et al., 2004). In addition, bone deficiency in the fetus of exposed rats (Dallegrave, 2003) and changes in the reflexological development of offspring were observed, as well as reduced locomotor activity and anxiety in adult life (Gallegos et al., 2016).

The toxic effect of a substance can influence any period of embryo or fetal development in mammals but may vary according to the period of exposure. Organogenesis is the period most susceptible to the action of toxic agents and exposure during this period can lead to the occurrence of structural malformations (Górniak et al., 2008). Since the development and morphofunctional properties of muscle tissue are determined during this period, muscular adaptation may occur in response to an adverse uterine environment (Baar, 2010, Du et al., 2010). Therefore, the aim of the present study was to evaluate the morphology and morphometry of muscle fibers and neuromuscular junctions (NMJs) of the extensor digitorum longus (EDL) and soleus muscles in mouse offspring exposed to glyphosate during pregnancy and lactation.

2. Materials and methods

C57BL/6 mice, 60 to 90 days old, were obtained from the central animal house of Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) and kept in the sectorial animal house of the Laboratory of Endocrine Physiology and Metabolism (LAFEM) under controlled conditions of temperature ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and light (12-h light/dark). The animals received standard rodent chow (Supralab, São Leopoldo, RS, Brazil) and filtered water *ad libitum*. All experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Use of Unioeste on September 16, 2016 (Appendix A).

2.1 Mating

After 7 days of acclimation, a vaginal smear was obtained to determine the phase of the estrous cycle. Females in the proestrus phase were mated at a proportion of two females per male during the night. On the following day, another vaginal smear was obtained for observation of the presence of spermatozoa and determination of the estrous cycle to confirm pregnancy. Pregnancy was defined when the females exhibited spermatozoa in the smear or remained in the diestrus phase for 4 days after mating. The remaining females that were not pregnant were again mated until the confirmation of pregnancy.

2.2 Glyphosate administration

After the confirmation of pregnancy, the females were randomly divided into two groups: control group (CTL, n=6) that received pure water throughout pregnancy (21 days) and lactation (30 days), and glyphosate group (GP, n=6) that received 0.5% glyphosate herbicide (Roundup®, Monsanto Brazil) in drinking water over the same periods. The glyphosate dose administered to the animals mimics the amount found in groundwaters after agricultural practices (Cassault-Meyer et al., 2014). The commercial glyphosate formulation (Roundup® Original DI, Monsanto, Brazil) chosen contains 445 g/L N-(phosphonomethyl)glycine diammonium salt, corresponding to 370 g/L (37%, w/v) of the active component (N-(phosphonomethyl)glycine). The two groups received standard chow *ad libitum* throughout the experiment.

After 30 days of lactation, the pups were weaned and the mothers were euthanized after they had completed two estrous cycles.

2.3 Experimental groups

The birth of the animals was defined as postnatal day 0. The animals were weaned at 30 days of life and male offspring were divided into two experimental groups according to the group to which the mother belonged: control group (CTL-F1,

n=10) consisting of offspring born to dams that received only water during pregnancy and lactation, and glyphosate group (GF-F1, n=10) consisting of offspring born to dams that received 0.5% glyphosate in drinking water during the same periods. Both groups received standard diet (Supralab, Brazil) and water *ad libitum* from weaning to 150 days of life.

2.4 Euthanasia and collection of EDL and soleus muscles

The animals were euthanized at 150 days of life. First, the animals were anesthetized with 9 mg/kg xylazine hydrochloride (Anasedan®, Vetbrands, Brazil) and 90 mg/kg ketamine hydrochloride (Dopalen®, Vetbrands, Brazil). After the absence of skin reflex was confirmed, total exsanguination was performed by cardiac puncture using a heparinized syringe. Next, the body weight and naso-anal length (NAL) were measured.

For collection of the muscles, the skin was elevated and the tibialis anterior was removed for dissection and removal of the EDL muscle. Likewise, the gastrocnemius muscle was removed for exposure, dissection, and removal of the soleus muscle. The length (mm) of the EDL and soleus muscles was measured with a digital pachymeter (Digimess®, São Paulo, Brazil) and their weight was determined with an analytical scale (Shimadzu UX620H, São Paulo, Brazil). Next, the right and left antimeres were stored in glass flasks containing specific fixatives for the histological study of muscle fibers and histochemical analysis of NMJs.

2.5 Histological study

For analysis of muscle fibers, the right antimeres of the EDL and soleus muscles was removed, stored in a glass container with methacarn fixative, and embedded in paraffin using N-butyl alcohol.

Cross-sections of the EDL and soleus muscles were obtained and stained with

hematoxylin-eosin (HE) (Junqueira and Junqueira, 1983) and Masson's trichrome (Bancroft and Stevens, 1990). The HE-stained slides were used for the quantification of muscle fibers, nuclei, and nucleus/fiber ratio. Ten microscopic fields per animal (40x objective) were analyzed. The material stained with Masson's trichrome was used to quantify connective tissue. Ten microscopic fields per animal (20x objective) were analyzed by pixels quantification.

2.6 Morphological and morphometric study of NMJs

For the study of NMJs, the left antimeres of the EDL and soleus muscles were removed, immersed in Karnovsky's solution (Karnovsky, 1965) at room temperature, and cut longitudinally into three or four slices with stainless-steel blades. The sections obtained were submitted to the nonspecific esterase reaction (Lehrer and Ornstein, 1959).

For morphometric analysis, the area and major and minor diameters of 80 NMJs per animal were determined on microscopic images (20x objective).

2.7 Image analysis

Images of muscle fibers and NMJs were obtained with an Olympus Bx60® microscope coupled to an Olympus DP71 camera (Tokyo, Japan) using the DP Controller 3.2.1 276 program. The Image Pro Plus 6.0® program (Media Cybernetics, Maryland, USA) was used for morphological and morphometric analysis of the material.

2.8 Statistical analysis

The data were analyzed statistically using the GraphPad Prism® program (La Jolla, USA) considering the results of normality tests. The Student t-test was used for normally distributed data, while non-normally distributed data were analyzed by the Mann-Whitney test. A p value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1 Body data

Animals of the GP-F1 group exhibited a reduction of 8% ($p=0.0153$) in body weight and of 3% ($p = 0.0463$) in NAL length when compared to the CTL-F1 group (Table 1). In contrast, there was no significant difference in the weight or length of the EDL and soleus muscles between groups (Table 1).

Body Data (n=10)	CTL-F1	GP-F1
Body weight (g)	25 ± 1.5 a	23 ± 2.4 b
Nasoanal length (cm)	9.3 ± 0.25 a	9,0 ± 0.41 b
EDL weight (mg)	9.9 ± 1.4 a	10 ± 2.6 a
EDL length (mm)	7.3 ± 1.1 a	7,6 ± 1.0 a
SOL weight (mg)	9.5 ± 0.0019 a	8,8 ± 3.6 a
SOL length (mm)	5.6 ± 0.88 a	5,7 ± 0.65 a

Abbreviations: extensor digitorum longus; soleus.

Values are expressed as mean ± standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$). Body weight, EDL weight, EDL length, soleus length: Student *t*-test. Naso-anal length and soleus weight: Mann-Whitney test.

Table 1. Macroscopic parameters of mice in the control (CTL-F1) and glyphosate (GP-F1) groups at 150 days of age.

3.2 Morphological analysis of EDL and soleus muscles

Most muscle fibers of the EDL muscle had a polygonal shape but round fibers were also observed in the two groups studied (Figure 1A and 1B). Muscle fibers with sarcoplasm differentially stained (Figure 1C and 1D) were found in both groups, with a predominance in GP-F1. Central nuclei (Figure 1E and 1F) were present in the two groups studied.

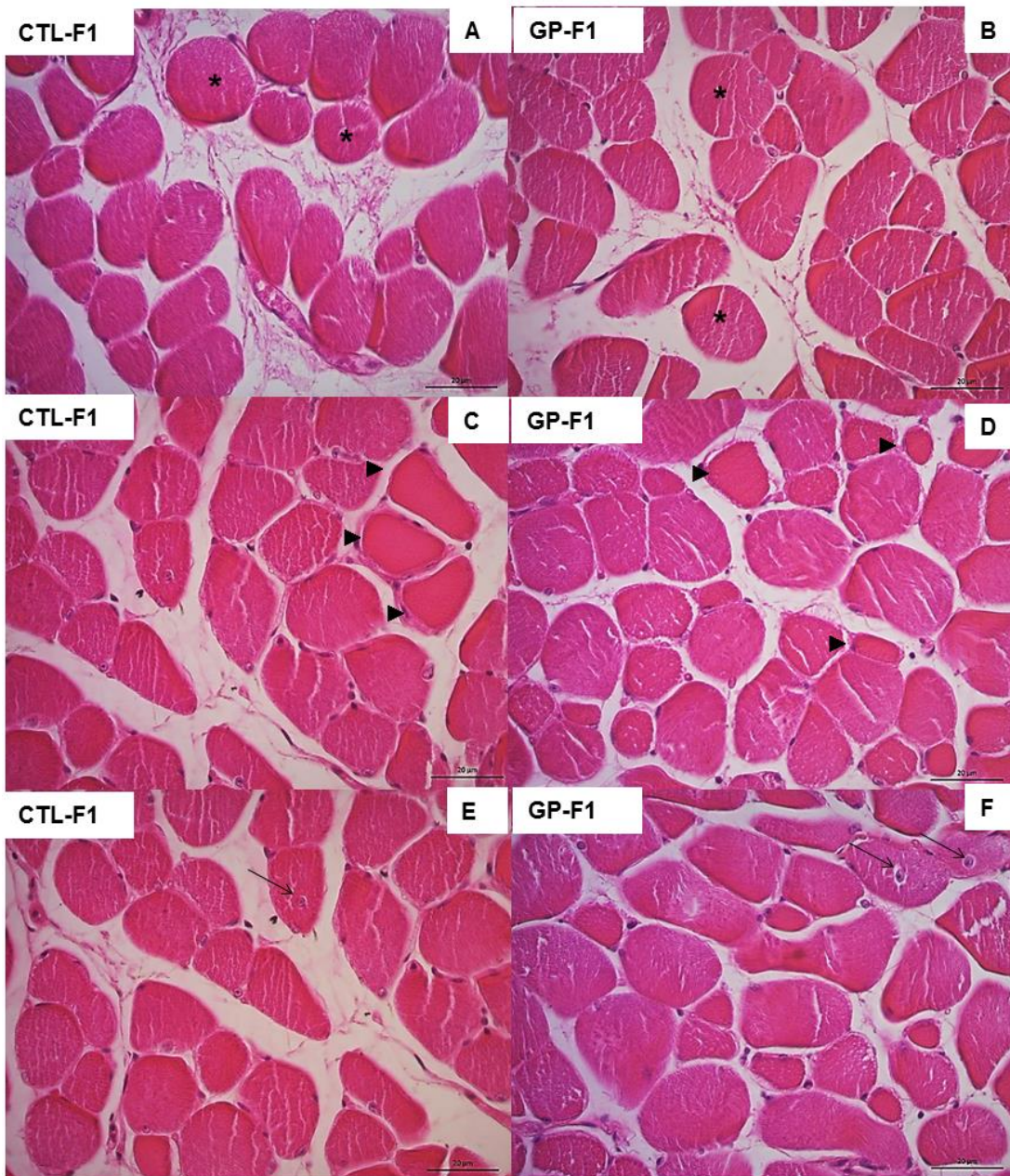


Figure 1. Photomicrographs of the extensor digitorum longus muscle of mice at 150 days of age. Control (CTL-F1); glyphosate (GP-F1). Cross-sections stained with HE. **A** and **B**: Round fiber (*). **C** and **D**: Muscle fibers with differentially stained sarcoplasm (▶). **E** and **F**: Central nucleus (→).

The soleus muscle consisted of polygonal and round muscle fibers (Figure 2A and 2B) in the two groups studied. Muscle fibers with sarcoplasm differentially stained (Figure 2C and 2D) were also found in both groups, with a predominance in GP-F1. Central nuclei, atrophied fibers (Figure 2E and 2F), and vessels containing

large amounts of blood (Figure 2G and 2H) characterizing hyperemia were observed in the CTL-F1 and GP-F1 groups.



Figure 2. Photomicrographs of the soleus muscle of mice at 150 days of age. Control (CTL-F1); glyphosate (GP-F1). Cross-sections stained with HE. **A** and **B**: Round

fibers (*). **C** and **D**: Muscle fibers with differentially stained sarcoplasm (►). **E** and **F**: Central nucleus (→), atrophied fibers (a). **G** and **H**: Hyperemia (thick arrow).

3.3 Morphometric analysis of EDL and soleus muscles

Morphometry of EDL muscle fibers showed a 56% reduction ($p = 0.0409$) in the number of central nuclei in GP-F1 animals compared to CTL-F1. In soleus muscle, a reduction in the number of central nuclei was observed in the GP-F1 group but the difference was not statistically significant. The other parameters of either muscle did not differ significantly between groups (Table 2).

Morphometric analysis	EDL		SOL	
	CTL-F1 (n=6)	GP-F1 (n=7)	CTL-F1 (n=6)	GP-F1 (n=7)
Area (μm^2)	243 \pm 19 a	222 \pm 59 a	238 \pm 24 a	222 \pm 50 a
Major diameter (μm)	21 \pm 0.77 a	19 \pm 2.4 a	21 \pm 1,3 a	21 \pm 1.7 a
Minor diameter (μm)	14 \pm 0.7 a	13 \pm 2.1 a	14 \pm 0,67 a	13 \pm 1.7 a
Nº of fibers	294 \pm 27 a	327 \pm 90 a	312 \pm 31 a	368 \pm 144 a
Nº of peripheral nuclei	453 \pm 78 a	441 \pm 119 a	544 \pm 87 a	535 \pm 102 a
Nº of central nuclei	1.3 \pm 0.52 a	0.57 \pm 0.79 b	4.0 \pm 1.7 a	2.7 \pm 1.5 a
Nucleus/fiber relation	1.5 \pm 0.27 a	1.4 \pm 0.051 a	1.8 \pm 0.27 a	1.6 \pm 0.43 a

Abbreviations: number.

Values are expressed as mean \pm standard deviation. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$). All EDL muscle parameters: Student *t*-test. Area, major diameter, minor diameter, number of internalized nuclei, and nucleus/fiber ratio of soleus muscle: Student *t*-test. Fiber count and number of peripheral and central nuclei: Mann-Whitney test.

Table 1. Morphometric analysis of extensor digitorum longus (EDL) and soleus (SOL) muscle fibers of mice in the control (CTL-F1) and glyphosate (GP-F1) groups at 150 days of age.

3.4 Evaluation of connective tissue in EDL and soleus muscles

Connective tissue predominated in the perimysium surrounding the fascicles of the EDL and soleus muscles in the two groups studied (Figure 3A-D). No significant

difference in the amount of connective tissue in EDL muscle was observed between groups. In contrast, connective tissue in soleus muscle was more abundant in the GP-F1 group, with a 51% increase ($p = 0.0419$) when compared to the CTL-F1 group (Table 3).

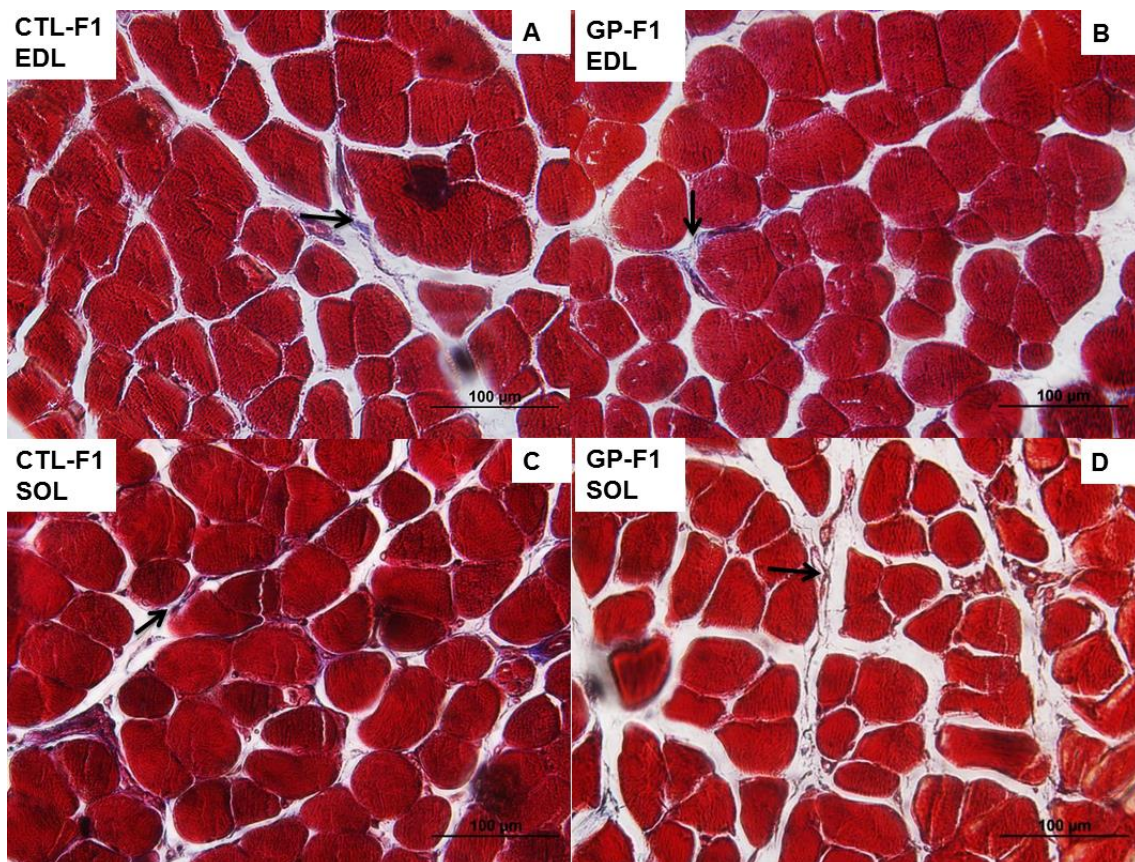


Figure 3. Photomicrographs of extensor digitorum longus (EDL) and soleus (SOL) muscles of mice in the control (CTL-F1) and glyphosate (GP-F1) groups at 150 days of age. Cross-sections stained with Masson's trichrome. Connective tissue (\rightarrow).

Analysis of the amount of connective tissue

	EDL		SOL	
	CTL-F1 (n=6)	GP-F1 (n=7)	CTL-F1 (n=6)	GP-F1 (n=7)
Pixels	84140 \pm 27769	80216 \pm 35748	80056 \pm 36474	120670 \pm 533304

Values are expressed as mean \pm standard deviation. Student *t*-test.

Table 3. Analysis of the amount of connective tissue in extensor digitorum longus (EDL) and soleus (SOL) muscles of mice in the control (CTL-F1) and glyphosate (GP-F1) groups at 150 days of age.

3.5 Morphological and morphometric evaluation of neuromuscular junctions in EDL and soleus muscles

Oval, round and elliptical NMJs were found in the two muscles studied of the CTL-F1 and GP-F1 groups. There was no significant difference in the area, major diameter or minor diameter of NMJs between groups in either EDL or soleus muscle (Figure 4).

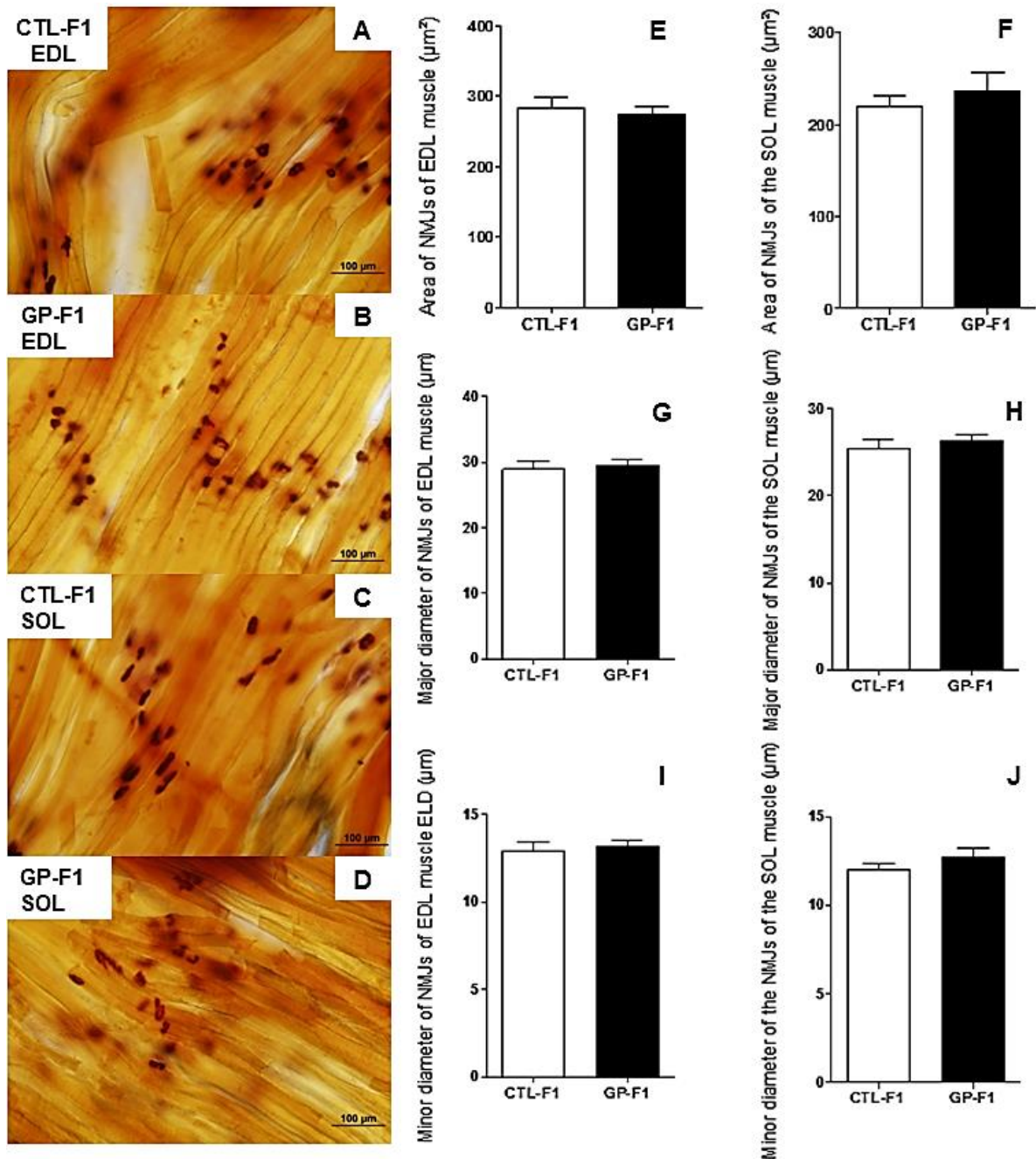


Figure 4. Photomicrographs of the neuromuscular junctions (NMJs) of the extensor

digitorum longus (EDL) and soleus (SOL) muscles of mice at 150 days of age. Longitudinal sections submitted to the nonspecific esterase technique. **A**: NMJs of EDL muscle in control (CTL-F1) group. **B**: NMJs of the EDL muscle in the glyphosate (GF- F1) group. **C**: NMJs of the SOL muscle in the CTL-F1 group. **D**: NMJs of the SOL muscle in GF-F1 group. **E**, **G** and **I**: Area, major diameter and minor diameter of NMJs of the EDL muscle in CTL-F1 and GP-F1, respectively. **F**, **H** and **J**: Area, major diameter and minor diameter of NMJs of the soleus muscle in CTL-F1 and GP-F1, respectively.

4. Discussion

The present study showed that maternal exposure to glyphosate resulted in a lower weight and shorter NAL of the offspring, as well as a smaller number of central nuclei in EDL muscle fibers and greater abundance of connective tissue in soleus muscle.

Previous studies have shown that the administration of glyphosate in drinking water can reduce palatability and induce changes in the thirst-regulating centers of exposed animals (Daruich et al., 2001). These events can reduce water and feed intake (Beuret et al., 2005, McKenna and Thompsom, 1998), with consequent weight loss of exposed animals (Daruich et al., 2001). Within this context, we believe that the altered palatability promoted by the herbicide was the key factor for the lower weight and shorter NAL of GP-F1 animals.

Studies demonstrated that pregnant females exposed to glyphosate during pregnancy and lactation have lower weight gain during gestation and a lower final body weight (Beuret et al., 2005, Teleken et al., 2019). Thus, the lower weight gain of dams may result in a smaller body size of the offspring as found in GP-F1 animals. In addition to this fact, the literature also shows that, after 18 days of life, weaning is already possible since the animal no longer feeds only on breast milk (Andrade et al.,

2002). We may thus infer that GP-F1 animals also consumed the water available for dams and their feed intake was consequently reduced because of the altered palatability caused by glyphosate, resulting in the lower weight and shorter NAL found.

Morphometric analysis of muscle tissue demonstrated a smaller number of central nuclei in EDL muscle fibers of GP-F1 animals. The same was observed for soleus muscle but the difference was not statistically significant. An important characteristic of skeletal muscle tissue is its plasticity, which enables the muscle to respond to different metabolic demands (Braun and Gautel, 2011, Buckingham and Rigby, 2019), as occurs in cases of occasional injuries (Santos et al., 2019).

Central nuclei are the key factor for the maintenance of tissue health since their presence in muscle fibers indicates increased protein synthesis of the cell (Minamoto and Salvini, 2002), which occurs during muscle regeneration (Kanazawa et al., 2017, Peretti et al., 2017). Thus, the reduction in the number of central nuclei in the GP-F1 group may indicate failure or a reduction in the regenerative capacity of muscle tissue in these animals, given the normal metabolic demands of the tissue.

Variations in microscopic staining can indicate morphological changes (Kumar, 2018). In the present study, the sarcoplasm of muscle fibers lost its affinity for standard stains particularly in the glyphosate group. This fact reinforces the deleterious effect of herbicides with systemic action on cells and tissues.

Analysis of the amount of connective tissue showed an increased abundance among soleus muscle fibers in GP-F1 animals. Muscle regeneration is known to comprise different phases. One phase is responsible for tissue remodeling, which occurs through extracellular matrix activation that induces the overproduction of different types of collagen (Mutsaers et al., 1997). Although the increase in

connective tissue is an indicator of muscle regeneration, collagen overproduction generally results in scar tissue formation that impairs muscle function (Lehto et al., 1986).

This was observed in cases of immobilization in which the increase in intramuscular connective tissue led to the loss of extensibility and movement limitation (Jarvinen et al., 2002). Thus, in view of the metabolic time point captured in the present study, it is not possible to state that the increase in connective tissue contributes to muscle tissue recovery since this result was associated with a reduction in the number of central nuclei.

According to the literature, the toxicity of glyphosate is low during direct exposure, with few changes in the subsequent generation; however, this herbicide can induce mutations that are transmitted across generations, a fact that can lead to the emergence of different diseases in descendants of exposed animals (Kubsad et al., 2019). However, in the present study, maternal exposure during pregnancy and lactation resulted in smaller offspring, as well as in muscle fiber alterations that may indicate a change in the mechanism of muscle regeneration in the offspring.

5. Conclusion

Maternal exposure to glyphosate during pregnancy and lactation resulted in a lower body weight and shorter NAL of the offspring, as well as in a reduction in the number of central nuclei in EDL muscle fibers and increased abundance of connective tissue in soleus muscle. These results suggest that exposure to glyphosate alters animal development, resulting in smaller animals, and influences the mechanism of muscle regeneration.

6. Acknowledgements

We thank CAPES for granting fellowships.

7. References

Andrade, A., Pinto, S.C., Oliveira, R.S. 2002. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*, primeira ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Amarante Junior, O.P., Santos, T.C.R. 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quím. Nova*.25,589-593.

Baar, K. Epigenetic control of skeletal muscle fibre type. 2010. *Acta Physiol.* 19, 477-487.

Bancroft, J.D., Steven A. 1990. *Theory and practice of histological techniques*, terceira ed. Churchill Livingstone, Edinburg.

Braun, T., Gautel, M. 2011. Transcriptional mechanisms regulatng skeletal musce differentiation, growth and homeostasis. *Mol. Cel. Biol*, 12, 349-361.

Beuret, C.J., Zirulk, F., Giménez, M.S. 2005. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnat rats and their fetuses. *Reprod. Toxicol.*19,501-504.

Boocock, M.R., Coggins, J.R. 1983. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Lett.* 154,127-133.

Buckingham, M., Rigby, P. W. J. 2014. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Dev. Cell*, 28, 225-238.

Cassault-Meyer E., Gress S., Séralini G.É., Galeraud-Denis I. 2014. An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 38, 131–140.

Dallegrave E., Mantese F.D., Coelho R.S., Pereira J.D., Dalsenter P.R., Langeloh A. 2003. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. *Toxicol. Lett.* 142, 45–52.

Daruich, J., Zirulnik, F., Gimenez, M. S. 2001. Effect of the herbicide glyphosate on Enzymatic activity in Pregnant rats and their fetuses. *Environ. Res.*85,226-231.

Du, M., Yan, X., Tong, J.F., Zhao, J., Zhu, M.J. 2010. Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. *Biol. Reprod.*82, 4-12.

Gallegos, C. E., Bartos, M., Bras, C., Gumilar, F., Antonelli, M. C., Minetti, A. 2016. Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and Lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring. *Neurotoxicology.*53,20-28.

Górniak, S.L., Spinosa, H.S., Bernardi, M.M. 2008. Toxicologia do desenvolvimento, in: Spinosa, H.S., Górniak, S.L., Palermo-Neto, J. *Toxicologia aplicada à medicina veterinária*, segunda ed. Manole, Barueri.

Jarvinen, T. A.H., Jarvinen, M., Kalimo, H. 2013. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscle, Ligaments and Tendons J.*3,337-345.

Junqueira L.C., Junqueira L.M.M. 1983. *Técnicas básicas de citologia e histologia*, primeira ed. São Paulo, Santos.

Kanazawa, Y., Ikegami, K., Sujino, M., Koinuma, S., Nagano, Mamoru., Oi, Y., Onishi, T., Sugiyo, S., Takeda, I., Kaji, H., Shigeyoshi, Y. 2017. Effects of aging on basement membrane of the soleus muscle during recovery following disuse atrophy in rats. *Exp. Gerontol.* 98,153-161.

Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27,1-149.

Kumar, V., Abbas, A., Aster, J. 2018. *Robbins Patologia Básica*. Décima Ed.

Guanabara Koogan.

Lee, I., Eriksson, P., Fredriksson, A., Buratovic, S., Viberg, H. 2015. Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and neuroprotein studies on endosulfan and cypermethrin. *Toxicology*. 335,1-10.

Lehrer, G.M., Ornstein, L. 1959. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6, 399-419.

Lehto, M., Jarvinen, M., Nelimarkka, O. 1986. Scar formation after skeletal muscle injury. *Arch. Orthop. Trauma. Surg.*104, 366-370.

Mckenna, K., Thompson, C. 1998. Osmoregulation in clinical disorders of thirst appreciation. *Clin. Endocrinol.*49,139–152.

Marc, J., Bellé, R., Morales, J., Cornier, P., Mulner-Lorillon, O. 2004. Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicol. Sci.*82, 436–242.

Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux De Vendômois, J., Séralini, G. E. 2015. Potencial toxic effects of glyphosate and its comercial formulations below regulatory limits. *Food Chem. Toxicol.*84,133-153.

Mutsaers, S.E., Bishop, J.E., Mcrouther, G., Laurent, G.J. 1997. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to Fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 5-17.

Ozanne, S. E. 2015. Metabolic programming-knowns, unknowns and possibilities. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 67-68.

Padmanabhan, V., Cardoso, R. C., Puttabyatappa, M. 2016. Developmental programming, a pathway to disease. *Endocrinology.*157,1328-1340.

Peretti, A.L., Antunes, J.S., Lovison, K., Karvat, J., Higuchi, G., Brancalhão, R.M.C., Bertolini, G.R.F., Ribeiro, L.F.C. 2017. Ação do exercício de subida em escada com

sobrecarga na morfologia do músculo tibial anterior de ratos Wistars após axonotmese. *Conscientiae Saúde*.16, 33-41.

Romano, M.A., Romano, R.M., Santos, L.D., Wisniewski, P., Campos, D.A., Souza, P.B., Viau, P. Bernardi, M.M., Nunes, M.T., Oliveira, C.A. 2012. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch. Toxicol.* 86,663-673.

Santos, V. C., Júnior, D. M., Sant'Ana, D. M G., Almeida, F. L. 2019. Vias de sinalização celular envolvidas no crescimento e manutenção do músculo estriado esquelético. *Arquivos do MUDI*, 23, 220-248.

Silva, J.P., Lamounier, J.A., Cremasco, G.N., Silva, V.R. 2015. Interferências da programação metabólica no desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades. *Salus J. Health Sci.* 1,91-99.

Siroski, P.A., Poletta, G.L., Latorre, M.A., Merchant, M.E., Ortega, H.H., Mudry, M.D. 2016. Immunotoxicity of commercial-mixed glyphosate in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Chem.-Biol. Interact.* 244, 64–70.

Teleken J.L., Gomes E.C.Z., Marmentini C., Moi M.B., Ribeiro R.A., Balbo S.L., Amorim E.M.P., Bonfleur M.L. 2019. Glyphosatebased herbicide exposure during Pregnancy and lactation malprograms the male reproductive morphofunction in F1 offspring. *J. DOHaD*.1-8.

Zancarro, V., Perondi, C.K., Conte, A., Locatelli, C. 2019. Ação protetora do trolox frente ao dano oxidativo induzido pelo glifosato e trop[®] em modelo animal. *RIES*. 8, 56-70.

CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS

A exposição dos camundongos ao glifosato durante o período de prenhez e lactação promoveu menor ganho de peso corporal durante a gestação e menor peso final e CNA nas mães expostas. Já nos filhotes, foi observado menor peso corporal e CNA, redução no número de núcleos centrais nas fibras do músculo ELD e aumento de tecido conjuntivo no músculo SOL da prole. Assim, os resultados encontrados nas mães e na prole indicam que a exposição ao glifosato durante este período foi suficiente para alterar o metabolismo das mães, que ganharam menos peso durante a gestação e ficaram com menor tamanho corporal, além de ser capaz de alterar o desenvolvimento da prole, que também apresentaram menor tamanho corporal, e tiveram alterações no funcionamento do mecanismo de regeneração do tecido muscular.

REFERENCIAS GERAIS

ABRASCO. Associação Brasileira de saúde coletiva. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde, Rio de Janeiro/São Paulo, 2015.

ADAM, A.; MARZUKI, A.; ABDUL, R. H.; ABDUL, A. M. The oral and intratracheal toxicities of ROUNDUP and its components to rats. *Veterinary and Human Toxicology*, v. 39, p. 47-51, 1997.

ALMEIDA, L. L.; TEIXEIRA, A. A. C.; BEZERRA, N. S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Efeito protetor da melatonina sobre intoxicações por herbicidas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, p. 174-180, 2016

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), 2014. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/446359/Programa+de+An%C3%A1lise+de+Res%C3%ADduos+de+Agrot%C3%B3xicos+-+Relat%C3%B3rio+2012+%282%C2%BA+etapa%29/3bc220f9-8475-44ad-9d96-cbbc988e28fa>>. Acesso em: 26 mai 2018.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária; UFPR. Seminário MERCADO DE AGROTÓXICO E REGULAÇÃO, Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-2012/rap-09-de-maio-de-2012-anvisa-agenor>>. Acesso em: 10 mai.2018.

ARAUJO, I. M. M.; OLIVEIRA, A. G. R. C. Agronegócio e agrotóxicos; impactos à saúde dos trabalhadores agrícolas no nordeste brasileiro. *Trabalho, educação e Saúde*, v. 15, n. 1, p. 117-129, 2017.

AUGUSTO, V.; PADOVANI, C. R.; CAMPOS, G. E. R. Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. *Brazilian journal of morphological sciences*, v. 21, n. 2, p. 89-94, 2004.

BAAR, K. Epigenetic control of skeletal muscle fibre type. *Acta Physiologica*, v. 19, n. 4, p. 477-487, 2010.

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, p.1-14, 2016.

BANCROFT, J.D.; STEVEN A. *Theory and practice of histological techniques*. 3rd ed. Churchill Livingstone: Edinburg; 1990.

BARBOSA, E. R.; COSTA, M. D. L.; BACHESCHI, L. A.; SCAFF, M.; LEITE, C. C. Parkinsonism after glycine-derivate exposure. *Movement Disorders*, v. 16, p. 562-581, 2001.

BARBOZA, H.T.G.; NASCIMENTO, X. P. R.; FREITAS-SILVA, O.; SOARES, A. G.; DACOSTA, J. B. N. Compostos organofosforados e seu papel na agricultura. *Revista Virtual de Química*, v. 10, p. 172-193, 2018.

BARTH, V.G.; BIAZON, A. C. B. Complicações decorrentes da intoxicação por organofosforados. *Revista de Saúde e Biologia*, v. 5, p. 27-33, 2010.

BIOLO, G.; CEDERHOLM, T.; MUSCARITOLI, M. Muscle contractile and metabolic dysfunction is a common feature of sarcopenia of aging and chronic diseases: From sarcopenic obesity to cachexia. *Clinical Nutrition*, p. 1-12, 2014.

BLOCH-GALLEGO, E. Mechanisms controlling neuromuscular junction stability. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 72, p. 1029-1043, 2015.

BRANCALHÃO, R.M.C.; RIBEIRO, L.F.C.; LIMA, B.; KUNZ, R.I.; CAVÉQUIA, M.C. Tecido muscular, 2016. Disponível em: <<http://projetos.unioeste.br/projetos/microscopio/>>. Acesso em: 22/08/2018

BRASIL. LEI Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989, 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm>. Acesso em: 26 mai. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. *Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde*, 2016. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agrotoxicos_otica_sistema_unico_saude_v1_t.1.pdf>. Acesso em: 25 mai. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Instrutivo operacional de vigilância em saúde de populações expostas à agrotóxicos, Brasília, 2013.

BRIGHT, J. E.; INNS, R. H.; TUCKWELL, N. J.; GRIFFITHS, G. D.; MARRS, T. C. A histochemical study of changes observed in the mouse Diaphragm after organophosphate poisoning. *Human and Experimental Toxicology*, v. 10, p. 9-14, 1991.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. *Química Nova*, v.28, p. 1038-1045, 2005

CVITIC, S.; NOVAKOVIC, B.; GORDON, L.; ULZ, C. M.; MÜHLBERGER, M.; DIAZ-PEREZ, F. I.; JOO, J. E.; SVENDOVA, V.; SCHIMEK, M. G.; TRAJANOSKI, S.; SAFFERY, R.; DESOYE, G.; HIDDEN, U. Human fetoplacental arterial and venous endothelial cells are differentially programmed by gestational diabetes mellitus, resulting in cell-specific barrier function changes. *Diabetologia*, v. 61, p. 1-14, 2018.

DAL PAI-SILVA, M.; CAVALHO, R.F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36 (suplemento especial), p. 21-31, 2007.

DALLEGRAVE, E. MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate- Roundup® in Wistar rats. *Toxicology Letters*, v. 142, p. 45-52, 2003.

DALFOVO, M. S.; LANA, R. A.; SILVEIRA, A. Métodos quantitativos e qualitativos: Um resgate teórico. *Revista Interdisciplinar Científica Aplicada*, v. 2, n. 4. P. 01-13, 2008.

DE BLEECKER, J. L.; VAN DEN ABEELE, K. G.; DE REUCK, J. L. Variable muscle involvement of rat skeletal muscles in paraoxon-induced necrotizing myopathy. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, v. 75, p. 309-22, 1992.

DESCHENES, M. R. Effects of aging on muscle fibre type and size. *Sports Medicine*, v.34, n.12, p.809-824, 2004.

DU, M.; YAN, X.; TONG, J.F.; ZHAO, J.; ZHU, M.J. Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. *Biology of Reproduction*, v. 82, n. 1, p. 4-12, 2010.

FAGERLUND, M. J.; ERIKSSON, L. I. Current concepts in neuromuscular transmission. *British Journal of Anaesthesia*, v. 103, n. 1, p. 108-114, 2009.

FERNANDES, T.; ROQUE, F.R.; MAGALHÃES, F.C.; CARMO, E.C.; OLIVEIRA, E.M. O treinamento físico aeróbico corrige a rarefação capilar e as alterações nas proporções dos tipos de fibra muscular esquelética em ratos espontaneamente hipertensos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 18, p. 267-272, 2012.

FUIMAN, L. A.; PEREZ, K. O. Metabolic programming mediated by n-3 essential fatty acid alters body composition and survival skills of a marine fish. *Proceeding of the Royal Society B*, v. 282, p.1-6, 2015.

GANU, R. S.; HARRIS, R. A.; COLLINS, K.; AAGAARD, K. M. Maternal diet; a modulator for epigenomic regulation during development in nonhuman primates and humans. *International Journal of Obesity Supplements*, v.2, p.14-18, 2012.

GIL, A. C. Como elaborar projetos de pesquisa. 4 ed. São Paulo: Atlas, 2007.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; COOPER, C.; THORNBURG, K. L. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 359, p. 61-76, 2008.

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

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Boletins Anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil. Boletim 2018. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em 18 fev 2020.

JANG, H.; SERRA, C. Nutrition, Epigenetics, and Diseases. *Clinical Nutrition Research*, v. 3, p. 1-8, 2014.

JESUS e VALE, D. B.; NASCIMENTO, D. V. S.; MACHADO, E. G.; REZENDE, F. A.; MELO, J. P. A utilização de organofosforados na agricultura brasileira: riscos para a saúde humana e danos ambientais – uma revisão bibliográfica. *Convibra*, 2017.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 178p.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 27, p. 1A-149A, 1965.

LANE R. H. Fetal programming, epigenetics, and adult onset disease. *Clinics in Perinatology*, v.45, p. 815-831, 2014.

LEHRER, G.M.; ORNSTEIN, L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. *Biophysical and Biochemical Cytology*, v. 6, p. 399-419, 1959.

MAKELARSKI, J.A.; ROMITTI, P.A.; ROCHELEAU, C.M.; BURNS, T.L.; STEWART, P.A.; WATERS, M.A.; LAWSON, C.C.; BELL, E.M.; LIN, S.; SHAW, G.M.; OLNEY, R.S. Maternal periconceptional occupational pesticide exposure and neural tube defects. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, v. 100, nº 11, p. 877-886, 2014.

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

MESNAGE, R.; DEFARGE, N.; DE VENDOMOIS, J.; SERALINI, G.E. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, v. 84, p. 133-153, 2015.

MONSANTO. FISPQ - Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. ROUNDUP NA, 2008. Disponível em: <<http://www.monsanto.com/global/br/produtos/documents/roundup-na-fispq.pdf>>. Acesso em: 30 mai. 2018.

MOON, J.; CHUN, B.; LEE, S. Variable response of cholinesterase activities following human exposure to different types of organophosphates. *Human and Experimental Toxicology*, p. 1-9, 2015.

OZANNE, S. E. Metabolic programming-knowns, unknowns and possibilities. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 11, p. 67-68, 2015.

PADMANABHAN, V.; CARDOSO, R. C.; PUTTABYATAPPA, M. Developmental programming, a pathway to disease. *Endocrinology*, v. 157, p.1328-1340, 2016.

PUNGA, A. R.; RUEGG, M. A. Signaling and aging at the neuromuscular synapse: lessons learnt from neuromuscular diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 12, n. 3, p. 340-346, 2012.

REAMON-BUETTNER S. M.; BORLAK J. A new paradigm in toxicology and teratology: altering gene activity in the absence of DNA sequence variation. *Reproductive Toxicology*, v. 24, p. 20–30, 2007.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G. E. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspective*, v. 113, p. 103-107, 2005.

RUSSO, V. E. A.; MARTIENSSEN, R. A.; RIGGS, A. D. epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Laboratory Press, NEW YORK, 1996.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: Histórico, Métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais, *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiology Review*, V. 91, P. 1447-1531, 2011.

SCHIMPF MG, MILESI MM, INGARAMO PI, LUQUE EH, VARAYOUD J. Neonatal exposure to a glyphosate based herbicide alters the development of the rat uterus. *Toxicology*, v. 1, p.2-14, 2017.

SERRA, L. S.; MENDES, M. R. F.; SOARES, M. V. A.; MONTEIRO, I. P. Revolução Verde: reflexões acerca da questão dos agrotóxicos. *Revista do CEDS*, v.1, p. 2-25, 2016.

SILVA, J. P.; LAMOUNIER, J. A.; CREMASCO, G. N.; SILVA, V. R. Interferências da programação metabólica no desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades. *Salus Journaul of Health Sciences*, v. 1, p.91-99, 2015.

SILVA, M. R.; CAMPOS, A. C. E.; BOHM, F. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. *Revista Saúde e Biologia*, v. 8, p. 46-58, 2013.

SILVERTHORN, D.U. *Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada*. 5ªed. Porto

Alegre: Artmed, 2010. 957p.

SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Vendas de defensivos agrícolas são recordes e vão a US\$ 8,5 bi em 2011. São Paulo, 2012. Disponível em:<<http://bit.do/sindag2256>>. Acesso em 25 mai.2018.

SIQUEIRA, S. L.; KRUSE, M. H. L. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. Revista da Escola de Enfermagem da USP, v. 42, p. 584-590, 2008.

SOUZA, J. S.; KIZYS, M. M. L.; CONCEIÇÃO, R. R.; GLEBOCKI, G.; ROMANO, R. M.; ORTIGA-CARVALHO, T. M.; GIANNÓCCO, G.; SILVA, I. D. C. G.; SILVA, M. R. D.; ROMANO, M. A.; CHIAMOLERA, M. I. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. Elsevier, Toxicology, v. 37, n. 7, p. 25-37, 2017.

SPYKER, J. M.; AVERY, D. L. Neurobehavioral effects of prenatal exposure to the organophosphate Diazinon in mice. Journal of Toxicology and Environmental Health: Current Issues, v.3, p. 989-1002, 1977.

SULLIVAN, E. L.; SMITH, M. S.; GROVE, K. L. Perinatal Exposure to High-Fat Diet Programs Energy Balance, Metabolism and Behavior in Adulthood. Neuroendocrinology, v. 93, p. 1–8, 2011.

SULTAN, K. R.; DITTRICH, B.T.; PETTE, D. Calpain activity in fast, slow, transforming, and regenerating skeletal muscles of rat. American Journal of Physiology-Cell Physiology, v. 279, p. 639-647, 2000.

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, p. 2723-2743, 2017.

TIZHE, E. V.; IBRAHIM, N. D. G.; FATIHU, M. Y.; ONYEBUCHI, I. I.; GEORGE, B. D. J.; AMBALI, S. F.; SHALLANGWA, J. M. Influence os zinc supplementation on histopathological changes in the stomach, liver, kidney, brain, pancreas and spleen during subchronic exposure of Wistar rats to glyphosate. Comparative Clinical Pathology, v. 23, p. 1535-1543, 2014.

VASILUK, L.; PINTO, L. J.; MOORE, M. M. Oral bioavailability of glyphosate: studies using two intestinal lines. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 24, p.153-160,

2005.

VICKERS, M. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients*, v. 2, p. 2165-2178, 2014.

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, p. 117-165, 2000.

WU, H.; XIONG, W.C.; MEI, L. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development*, v. 137, p. 1017-1033, 2010.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. Efeitos do glifosato nas plantas: Implicações fisiológicas e agrônômicas. *International Plant Nutrition Institute*, n. 119, p. 1-32, 2007.

ZHU, R.; WANG, Y.; ZHANG, L.; GUO, Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepatology Research*, v. 42, p. 741-749, 2012.

ZIMOWSKA, M.; SZCZEPANKOWSKA, D.; STREMINSKA, W.; PAPY, D.; TOURNAIRE, M. C.; GAUTRON, J.; BARRITAU, D.; MORACZEWSKI, J.; MARTELLY, I. Heparan sulfate mimetics modulate calpain activity during rat soleus muscle regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, v.188, p.178-187, 2001.

ANEXO A

**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

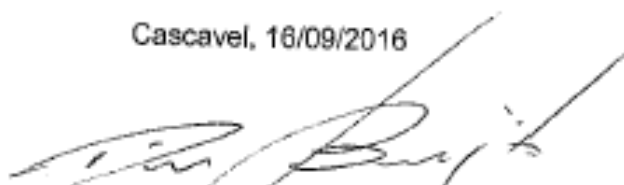
PARECER DE PROTOCOLO

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

ATENÇÃO!

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

Cascavel, 16/09/2016



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

ANEXO B

Normas da Revista Einstein

einstein (São Paulo) é uma publicação oficial de divulgação científica do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, ISSN 1679-4508, com periodicidade trimestral, e cujo objetivo é registrar a produção e as contribuições da comunidade científica na área da saúde.

Serão aceitos artigos originais, em português e/ou inglês. Todos os artigos, após aprovação dos editores, serão encaminhados para análise e avaliação de no mínimo dois revisores, sendo o anonimato garantido em todo o processo de submissão. Os comentários serão devolvidos aos autores, para modificações no texto ou justificativas de sua conservação. Após as correções sugeridas pelos revisores, a forma definitiva do trabalho deve ser reencaminhada para a revista **einstein** (São Paulo), por meio do Sistema Gerenciador da Revista, no endereço eletrônico <http://apps.einstein.br/revista>. Somente após as aprovações finais dos revisores e editores, os artigos serão encaminhados para publicação. A responsabilidade pelos conceitos emitidos nos artigos é exclusiva dos autores. Os artigos aceitos para a publicação se tornam propriedade da revista. Somente o editor da **einstein** (São Paulo) pode autorizar a reprodução dos artigos em outro periódico. O conteúdo da **einstein** (São Paulo) está sob licença da Creative Commons (CC BY) Atribuição 4.0 Internacional (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pt>).

A revista adota o sistema Turnitin para identificação de plágio. Os casos de má conduta na publicação serão avaliados conforme critérios e recomendações do Committee on Publication Ethics (COPE; <http://publicationethics.org>).

A **einstein** (São Paulo) é uma revista de acesso aberto e não cobra nenhuma taxa para submissão, revisão, tradução e publicação de artigo. Todos os processos são executados eletronicamente e podem ser acessados no endereço eletrônico <http://apps.einstein.br/revista>.

SEÇÕES

A **einstein** (São Paulo) possui as seguintes seções: Artigo Original, Gestão e Economia em Saúde, Relato de Caso, Revisão, Revendo Ciências Básicas,

Aprendendo por Imagem, Avanços Médicos e Cartas ao Editor. A revista publica também uma subseção de revisões temáticas.

Artigo original

Destinado à divulgação de resultados da pesquisa científica. Os trabalhos devem ser originais e inéditos, e sua estrutura deve conter os seguintes itens: resumo estruturado (em português e inglês para artigos submetidos em português, e em inglês para artigos submetidos em inglês), introdução, objetivo, métodos, resultados, discussão, conclusão e referências. O Artigo Original deve ter, no máximo, 3.000 palavras e até 30 referências.

Gestão E economia Em saúde

Artigos destinados à divulgação de conhecimento, que expressem conceitos e reflitam as práticas vigentes em gerenciamento, administração e economia em saúde. Devem conter os seguintes itens: resumo estruturado (em português e inglês para artigos submetidos em português, e em inglês para artigos submetidos em inglês), introdução, objetivo, métodos, resultados, discussão, conclusão e referências. Devem ter, no máximo, 3.000 palavras e até 30 referências.

Relato de caso

Relata casos de uma determinada situação médica, especialmente rara e com dados novos para o leitor, descrevendo seus aspectos, história, condutas etc., incluindo breve revisão da literatura, descrição do caso e discussão pertinente. Deve ter, no máximo, 1.000 palavras e até 10 referências.

Revisão

Artigos de revisão podem ser narrativas e/ou sistemáticas, incluindo avaliação crítica da literatura sobre determinado assunto, devendo descrever os procedimentos adotados bem como a delimitação e os limites do tema, além de apresentar conclusões e referências. O texto deve ter, no máximo, 3.000 palavras e até 40 referências. Todas as revisões devem ser encaminhadas somente a convite do editor.

Revisão de ciências básicas

Artigos de revisão sobre temas de ciência básica cujo conhecimento tem repercussão clínica relevante. Deve ter, no máximo, 2.000 palavras e 30 referências.

Aprendendo por imagem

Uma imagem patognomônica típica de ultrassonografia, tomografia computadorizada, raioX, ressonância magnética, foto de cirurgia, microscopia ou

sinal clínico, seguida de um texto explicativo, de, no máximo, 300 palavras e com até 10 referências.

Avanços médicos

Seção destinada à publicação, nas diferentes áreas da saúde, de novidades diagnósticas e/ou terapêuticas de aplicação corrente. Discutem-se progressos já incorporados. O texto é livre e deve conter, no máximo, 1.000 palavras e 10 referências.

Cartas Ao Editor

Tem por objetivo comentar ou discutir trabalhos publicados na revista ou relatar pesquisas originais em andamento, achados científicos etc. Deve ter, no máximo, 150 palavras e 5 referências. As cartas ao Editor não passarão por revisão de pares e serão publicadas de acordo com a avaliação dos Editores.

As normas que se seguem devem ser obedecidas para todos os tipos de trabalhos e foram baseadas no formato proposto pelo International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), publicado no artigo Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals, disponível no endereço eletrônico <http://www.icmje.org/recommendations/browse/manuscript-preparation>.

Requisitos técnicos

Os autores devem submeter os artigos contendo:

- Texto digitado em espaço duplo, fonte Arial, tamanho 12, margem 2,5cm de cada lado, destacando cada seção do artigo.
- Permissão para reprodução do material e carta de transferência dos direitos autorais (disponível no sistema de submissão eletrônica).
- Declaração dos autores de que o manuscrito não está sendo avaliado e nem será submetido à publicação em outro periódico (disponível no sistema de submissão eletrônica).
- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos ou Animais da instituição onde o trabalho foi realizado, indicando número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE; www.saude.gov.br/plataformabrasil).
- Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), quando referente a artigos de pesquisa envolvendo seres humanos.
- Declaração de inexistência de conflitos de interesse de cada autor (disponível no sistema de submissão eletrônica).

Preparo do manuscrito

- **Título:** título do artigo, em português e inglês, que deve ser conciso, porém informativo.
- **Resumo:** resumo, em português e inglês, de não mais que 250 palavras. Para os artigos originais, devem ser estruturados (Objetivo, Métodos, Resultados, Conclusão), contendo as principais partes do trabalho e ressaltando os dados mais significativos. Para os artigos das demais seções, o resumo não deve ser estruturado.
- **Descritores:** especificar, no mínimo, cinco e, no máximo, dez descritores, em português e inglês, que definam o assunto do trabalho. Os descritores devem ser baseados nos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) publicado pela Bireme, que é uma tradução do Medical Subject Headings (MeSH), da National Library of Medicine, e está disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>.
- **Registro na base de Ensaio Clínicos:** indicar, para os Ensaio Clínicos, o número de registro em uma base de Ensaio Clínicos, como por exemplo, <https://clinicaltrials.gov>.*
- **Texto:** deve obedecer a estrutura exigida para cada categoria de artigo. Em todas as categorias de artigos, a citação dos autores no texto deve ser numérica e sequencial, utilizando algarismos arábicos entre parênteses e sobrescritos. As abreviaturas e siglas devem ser precedidas dos termos por extenso, quando citadas pela primeira vez no texto, e não devem ser usadas no título e no resumo. As abreviaturas nas legendas das tabelas e figuras devem ser acompanhadas de seu significado.
- **Agradecimentos:** inclui colaborações de pessoas que merecem reconhecimento, mas que não justificam sua inclusão como autor. Inserir agradecimentos por apoio financeiro, auxílio técnico etc.
- **Referências:** devem ser numeradas consecutivamente, na mesma ordem em que foram citadas no texto, e identificadas com números arábicos. A apresentação deve estar baseada no formato denominado Vancouver Style, e os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela List of Journals Indexed in Index Medicus, da National Library of Medicine, disponibilizados no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>.
- * **Nota importante:** a Einstein (São Paulo), em apoio às políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do ICMJE,

reconhece a importância destas iniciativas para o registro e a divulgação internacional de informação sobre estudos clínicos e somente aceita para publicação artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido um número de identificação em um dos Registros de Ensaio Clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e pelo ICMJE, disponíveis no endereço <https://clinicaltrials.gov> ou no site do PubMed, no item <clinicaltrials.gov>. O número de identificação deve ser apresentado ao final do resumo.

Para todas as referências, citar todos os autores, até o sexto. Acima de seis, citar os seis primeiros, seguidos da expressão et al., conforme exemplos a seguir:

Artigos de periódicos impressos

Bor-Seng-Shu E, Pedroso JL, Andrade DC, Barsottini OG, Andrade LA, Barbosa ER, et al. Transcranial sonography in Parkinson's disease. *einstein* (São Paulo). 2012;10(2):242-6. Review.

Artigos de periódicos eletrônicos

Lo WC, Li W, Jones EF, Newitt DC, Kornak J, Wilmes LJ, et al. Effect of imaging parameter thresholds on MRI prediction of neoadjuvant chemotherapy response in breast cancer subtypes. *PLoS One*. 2016;11(2):e0142047.

Livros

Tollesfboll TO, editor. *Biological aging. Methods and protocols*. New Jersey: Humana Press; 2007.

Capítulo de livros

Lui I, Keefe DL. Nuclear transfer methods to study aging. In: Tollesfboll TO, editor. *Biological aging. Methods and protocols*. New Jersey: Humana Press; 2007. p.191-207.

Trabalhos apresentados em congressos

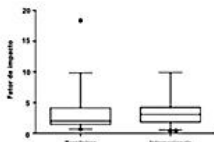
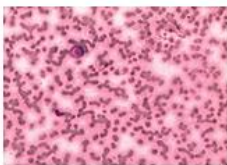
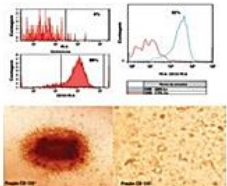
Salvalaggio PR, Coelho MP, Hidalgo R, Afonso RC, Ferraz-Neto BH. Keep your eyes on the enzymes. Grading early allograft dysfunction in liver transplantation. *Liver Transpl*. 2011;17(6):S294-S294. [Presented at Joint International Congress of ILTS, ELITA, and LICAGE; 2011 Jun 22-25; Valencia, Spain].

Teses

Silva RP. Aspectos genético-moleculares do sono e da privação de sono em humanos e roedores [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2013.

- **Tabelas:** todas as tabelas (no máximo quatro) devem ter título e cabeçalho para suas colunas e estar citadas no texto. A numeração das tabelas deve ser sequencial, em algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. No rodapé da tabela, deve constar legenda para abreviações e testes estatísticos utilizados.
- **Figuras:** todas as figuras (imagens, gráficos, fotografias e ilustrações) devem estar citadas no texto e ser submetidas no tamanho exato ou acima do pretendido para a publicação. Serão aceitas no máximo quatro figuras por artigo. A numeração deve ser sequencial, em algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. Se as figuras já tiverem sido publicadas, deverão vir acompanhadas de autorização por escrito do autor/editor, constando, na legenda da ilustração, a fonte original de publicação. Quando gravadas em arquivos digitais, a resolução deverá seguir as seguintes instruções:

diretrizes para formatação de figuras

tipo de imagem	descrição	Exemplo	Formato recomendado	cor	modo de resolução
Linha de arte	Imagem composta de linhas e texto que não contém tonalidade ou áreas sombreadas		tif ou eps	Monocromático 1 bit ou RGB	900 a 1.200 dpi
Tonalidade média	Tomográfico contínuo que não contém texto		tif	RGB ou escala de cinza	300 dpi
Combo	Imagem de meio tom mais texto ou elementos da linha de arte		tif ou eps	RGB ou escala de cinza	500 a 900 dpi

Exemplo da linha de arte foi retirado de: Loureiro LV, Callegaro Filho D, Rocha Ads A, Prado BL, Mutão TS, Donnarumma Cdel C, et al. Is there publication bias towards Brazilian articles on cancer. *einstein* (São Paulo). 2013;11(1):15-22; exemplo de tonalidade média foi retirado de: Pavon LF, Marti LC, Sibov TT, Miyaki LA, Malheiros SM, Mamani JB, et al. Isolation, cultivation and characterization of CD133+ stem cells from human glioblastoma. *einstein* (São Paulo). 2012;10(2):197-202; exemplo de combo foi retirado de: Souza CL, Perini GF, Hamerschlak N, Silveira PA. Plasma cell leukemia. *einstein* (São Paulo). 2013;11(1):1-52.

Fonte: Traduzido e adaptado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/pub/files/pec-images/#fig-format>

Exemplo da linha de arte foi retirado de: Loureiro LV, Callegaro Filho D, Rocha Ade A, Prado BL, Mutão TS, Donnarumma Cdel C, et al. Is there publication bias towards Brazilian articles on cancer. *einstein* (São Paulo). 2013;11(1):15-22; exemplo de tonalidade média foi retirado de: Pavon LF, Marti LC, Sibov TT, Miyaki LA, Malheiros SM, Mamani JB, et al. Isolation, cultivation and characterization of CD133+ stem cells from human glioblastoma. *einstein* (São Paulo). 2012;10(2):197-202; exemplo de combo foi retirado de: Souza CL, Perini GF, Hamerschlak N, Silveira PA. Plasma

cell leukemia. einstein (São Paulo). 2013;11(1):132.

Fonte: Traduzido e adaptado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/pub/filespec-images/#fig-format>

Submissão do manuscrito

Os artigos deverão ser enviados para a revista einstein (São Paulo) pelo endereço eletrônico <http://apps.einstein.br/revista>. Todos os autores deverão, obrigatoriamente, fazer seu registro na plataforma ORCID pelo endereço <https://orcid.org/signin>.

Instruções para submissão eletrônica

1. Prepare o artigo em formato Word (arquivo.doc), sem a identificação dos autores, que devem ser inseridos no campo <Autores/Colaboradores> do sistema.

O arquivo deverá conter apenas:

- texto;
- referências;
- tabelas.

As figuras (imagens, gráficos, fotografias e ilustrações) deverão ser anexadas em campo designado no sistema.

2. Prepare a carta de submissão (cover letter), contendo:

- título completo do trabalho em português e inglês;
- nome completo dos autores e afiliação institucional;
- nome do departamento e instituição ao qual o trabalho deve ser atribuído;
- nome, endereço, fax e e-mail do autor correspondente;
- fontes de auxílio à pesquisa (se houver);
- justificativa da importância para a publicação.

3. Preencha a carta de conflitos de interesse (modelo disponível no sistema de submissão eletrônica) que deverá ser assinada por todos os autores.

4. Obtenha a carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) contendo o número CAAE.

5. Finalize, anexando:

- arquivo (.doc), contendo apenas o corpo do artigo, as referências e as tabelas, sem a identificação dos autores e da instituição, inclusive na seção Métodos;
- figuras;
- carta de submissão (cover letter);

- carta de conflitos de interesse;
 - carta de aprovação no CEP.
6. Selecione no sistema:
- Declaração antiplágio e das boas práticas em animais ou seres humanos, de acordo com o trabalho;
 - Transferência dos direitos autorais e permissão para publicação;
7. Revise sua submissão e clique em <Salvar e preparar para envio>. Neste momento, o autor será redirecionado para o menu <Meus artigos> e deverá clicar na opção <Aprovar/Enviar> para finalizar a submissão do artigo.

ANEXO C

Normas da Revista Micron

DESCRIPTION

Micron is an interdisciplinary forum for all work that involves new applications of **microscopy** or where advanced microscopy plays a central role. The journal will publish on the design, methods, application, practice or theory of microscopy and **microanalysis**, including reports on optical, electron-beam, X-ray microtomography, and scanning-probe systems. It also aims at the regular publication of review papers, short communications, as well as thematic issues on contemporary developments in microscopy and microanalysis. The journal embraces original research in which microscopy has contributed significantly to knowledge in biology, life science, nanoscience and nanotechnology, materials science and engineering.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click [here](#) for more information on our author services.

Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our Support Center

Micron enables researchers to rapidly share their most exciting work with their colleagues. The expected time from submission to final decision is approximately **5 weeks**.

Note to the authors

No changes in the list authors will be accepted during the review process or after acceptance unless such a claim is duly justified by the authors.

AUDIENCE

Scientists and engineers involved in the design, application, practice or theory of microscopy and microanalysis.

IMPACT FACTOR

2019: 1.726 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

PubMed/Medline Research Alert BIOMED
 Current Contents - Life Sciences Web of Science
 Aqualine Abstracts BIOSIS Citation Index Elsevier BIOBASE Embase
 INSPEC
 Scopus
 Science Citation Index

EDITORIAL BOARD

Editors

F. Braet, The University of Sydney, Sydney, 2006, NSW 2006, Australia
 (Biological Sciences)

R.F. Egerton, University of Alberta, 11322 - 89 Avenue, Edmonton, T6G 2J1,
 Canada
 (Physical Sciences)

R. Romani, University of Perugia Department of Agricultural Food and Environmental Sciences, Borgo XX Giugno 72, 06100, Perugia, Italy

Editorial Board

P. Abellan, CNRS, Jean Rouxel Institute of Materials in Nantes, Physics of Materials and Nanostructures group, Nantes, France

Radiation chemistry, Radiation damage, Transmission electron microscopy, STEM, EELS

U. Aebi, University of Basel, Basel, Switzerland

Journal of Structural Biology in 1989

H. Assender, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

Polymers; Thin films; Coatings; Nanocomposites; Crystallization

D. Bhella, University of Glasgow MRC Virology Unit, Glasgow, United Kingdom

cryoTEM of biological macromolecules, tomography etc. My research focusses on the structure of viruses primarily using negative stain and cryo-transmission electron microscopy combined with three-dimensional image reconstruction. We are also interested in electron tomography of frozen hydrated preparations of viruses as well as resin-embedded virus infected cells. My focus from a virological perspective is in virus tropism and attachment and entry, replication complexes and virus morphogenesis. We are developing our interest in electron tomography of biologically relevant cell systems such as tissue explants and 3D (i.e. differentiated) cell cultures as well as correlative light and electron microscopy, although I could not be described as expert in these areas.

J. Billen, KU Leuven Department of Biology, Leuven, Belgium

E.J. Boekema, University of Groningen, Groningen, Netherlands

membrane proteins single particle averaging cryo-EM photosynthesis

G. Botton, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

Materials Characterization, Electron Microscopy, Nanoscale Materials, Electron Energy Loss Spectroscopy, Plasmonics

G. Cox, The University of Sydney Australian Centre for Microscopy & Microanalysis, Sydney, Australia

(Biological Sciences)

Y.F. Dufrêne, Catholic University of Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

atomic force microscopy, single-molecules, single-cells, forces, cell surfaces, microbes

A. Gregorc, University of Maribor Faculty of Agriculture and Life Sciences, Ljubljana, Slovenia

J.R. Harris, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

(Biological Sciences)

Holzenburg, University of Texas Health Rio Grande Valley, School of Medicine, Department of Molecular Science, Harlingen, Texas, United States

In the MIC, of which I am the Director, we are imaging anything from ants to atoms and from Alzheimer's to zeolites. In between there is an emphasis on metals, geological materials, nano particles, nano fibers, shape memory alloys, hydrogels, thin films, semiconductors, superconductors and polymers/composite materials by means of bright field, dark field, ED, HOLZ, Kikuchi, STEM, EELS, EDS, HRTEM and cryo. of My "personal" research speciality is in the field of 3D macromolecular structures using tomographic approaches

P. Jena, Wayne State University School of Medicine, Detroit, Michigan, United States

cell secretion, membrane fusion, porosome, fusion pore, membrane transport

A. Kirkland, University of Oxford Department of Materials, Oxford, United Kingdom

The development of quantitative phasing methods, applications of aberration corrected HRTEM for structural studies of nanomaterials, direct electron detectors and the development of computational image processing and theory for enhancing resolution in the TEM.

M. Lekka, Henryka Niewodniczanskiego Institute of Nuclear Physics, Krakow, Poland

Nanobiomechanics of tissue and cells in cancer; Nanomedicine; Adhesive interactions of cells with microenvironment; Biophysics of membrane-cytoskeleton interactions in cancer invasion; Microscopy (atomic force, fluorescence, electron) in biological applications

J. Lucocq, University of St Andrews School of Medicine, St. Andrews, United Kingdom

H. Luensdorf, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany
For many years I am mainly doing energy-filtered TEM in the biological and microbiological/ environmental area, especially the ultrastructural analysis of autochthonous biofilms. Within this context I'm also constantly working with nanoparticles as long as they are suitable and/or of value for labeling and tracing of macromolecules of biological/immunological importance in our institutes research. Among others I also did and do over the years negative-staining analysis of macromolecules and 3D modeling by Single-Particle Averaging (EMAN program). In general, I have to do everyday TEM in our Helmholtz-Center of Infection Research on demand of my colaborators and divers non- institutional university partners. If there remain further questions do not hesitate to contact me.

Q. Luo, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

J. Reyes Gasga, UNAM Institute of Physics, Mexico D.F., Mexico
Electron diffraction and electron microscopy of materials (metals, ceramics and biomaterials).

J. A. Slater, Diamond Light Source, Didcot, United Kingdom

Electron Microscopy

D. J. Taatjes, University of Vermont, Burlington, Vermont, United States

Electron microscopy; Atomic force microscopy; Confocal microscopy; Super-resolution microscopy; Immunofluorescence

M. Varela del Arco, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

material physics; scanning transmission electron microscopy; electron energy-loss spectroscopy; magnetism; thin films; interfaces; complex oxides

J. Verbeeck, University of Antwerp, Wilrijk-Antwerp, Belgium

P. Verkade, University of Bristol, Bristol, United Kingdom

Correlative Light Electron Microscopy, Correlative Microscopy, Sample processing, Electron Microscopy, Probes

P. Xi, Peking University Department of Biomedical Engineering, Beijing, China

Optical nanoscopy, confocal and multiphoton microscopy, and biomedical optical instrumentation

Y. Zhu, Brookhaven National Laboratory, Upton, New York, United States

My research focus is on understanding the structure-property relationship of transition metal oxides, strongly correlated electron systems and multiferroics, and energy materials. My research experience includes the use of advanced electron microscopy, such as quantitative imaging, diffraction, spectroscopy, and holography, as well as synchrotron x-ray and neutron scattering to understand electronic structure and inhomogeneity and to study electrons, spins and lattice correlation

J.M. Zuo, University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign, Illinois, United States

Electron diffraction; High resolution electron microscopy; Nanostructure characterization; Crystallography

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

Submission Checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

E-mail address

Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

Include keywords

All figures (include relevant captions)

All tables (including titles, description, footnotes)

Ensure all figure and table citations in the text match the files provided

Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare

Journal policies detailed in this guide have been reviewed

Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

The manuscript title accurately reflects the content

The abstract is complete and stand alone

The subject content is relevant to MICRON

The aims of study fully described and referenced

The results are presented properly

In case of use of animal experimentation, this is properly documented and supported by ethical approval of your host organization

The conclusions are well supported by the results and clearly communicated to the reader.

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of interest statement using this template and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step.

Note: Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required. If there are no interests to declare, please choose: 'Declarations of interest: none' in the template. This statement will be published within the article if accepted. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously

(except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright- holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations

and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that **50MB** is the **MAXIMUM POSSIBLE** file size for a **MANUSCRIPT** and individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be

in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class elsarticle.cls to prepare your manuscript and BibTeX to generate your bibliography.

Our LaTeX site has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with

in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should consist of no more than 500 words and should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon

abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork Electronic artwork General points

Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.

Number the illustrations according to their sequence in the text.

Use a logical naming convention for your artwork files.

Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.

For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.

Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate

source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.

Supply files that are too low in resolution.

Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and

pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/micron>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

Two authors: both authors' names and the year of publication;

Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of

publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp.281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material

together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their

proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. An offprint order form will be supplied by the Publisher for ordering any additional paid offprints.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.