

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

RODRIGO VARGAS

**A EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO, DURANTE A PREENHEZ E A LACTAÇÃO,
ALTERA O METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO DA PROLE ADULTA DE
CAMUNDONGOS MACHOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

CASCADEL-PR

MAIO/2018

RODRIGO VARGAS

**A EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO, DURANTE A PREENHEZ E A LACTAÇÃO,
ALTERA O METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO DA PROLE ADULTA DE
CAMUNDONGOS MACHOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

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

Área de Concentração: Fatores que Influenciam a Morfofisiologia Orgânica

Orientadora: Dra Sandra Lucinei Balbo

Co-orientadores: Dr João Paulo de Arruda Amorim e Dra Maria Lúcia Bonfleur

CASCAVEL – PR

MAIO/2018

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

Vargas, Rodrigo

A exposição ao glifosato, durante a prenhez e a lactação, altera o metabolismo lipídico hepático da prole adulta de camundongos machos alimentados com dieta hiperlipídica / Rodrigo Vargas; orientador(a), Sandra Lucinei Balbo; coorientador(a), Maria Lúcia Bonfleur, coorientador(a)II, João Paulo de Arruda Amorim, 2018.

87 f.

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

1. Programação metabólica. 2. Glifosato. 3. Esteatose. 4. Fígado. I. Balbo, Sandra Lucinei. II. Bonfleur, Maria Lúcia. III. de Arruda Amorim, João Paulo. IV. 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

RODRIGO VARGAS

A exposição ao glifosato, no período de gestação e lactação, altera o metabolismo lipídico hepático na prole adulta de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

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

Orientador(a) - Sandra Lucinei Balbo

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

Elaine Manoela Porto Amorim

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

Antonio Marcus de Andrade Paes

Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Cascavel, 2 de julho de 2018

“O importante é não parar de questionar.”

Albert Einstein

Aos amados Verônica e Ildo Tessaro.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família que, mesmo longe, se fez presente quando precisei, em especial a minha mãe e minha avó. Vocês duas são os exemplos que perpetuarei por toda a minha vida.

Aos melhores amigos que alguém pode ter: Simone, Caroline, Emanuella, Felipe, Adriana, Eduardo, Chariane e Larissa. Seria impossível imaginar ter percorrido toda esta caminhada sem pessoas como vocês do meu lado. Vocês me incentivam positivamente sempre. Nada se comparará a vocês.

A minha família cascavelense: Ildo, Verônica, Ana Paula, Silvia Maria, Ildo Junior, Rafael e Antonella. Vocês me receberam tão bem na família que jamais pensei que não fosse.

Aos meus amigos da catequese, Jean, Rosiane, Marcelo, Caroline, Eloa, Gustavo e Gabriel, vocês são sucesso sempre. O suporte de vocês é inquestionável.

Aos amigos Andra, Gefferson, William e Mateus. Jamais me esquecerei das experiências boas que tivemos juntos. De todos os arrependimentos, talvez o maior deles seja o de não ter me dedicado e valorizado mais nossos momentos. Somente nós saberemos da intensidade de tudo que passamos. Jamais deixarão meu peito.

Ao meu afilhado Pedro Henrique, que faz minha vida transbordar de alegria desde sua chegada, fazendo com que as coisas mundanas pareçam insignificantes na sua inocência.

A minha cachorra Kira, que sempre participou pacientemente de todas as madrugadas de estudo.

Aos meus colegas de laboratório, em especial a Vera, Sandra, Carol e Jakeline que colaboraram ativamente para a conclusão deste trabalho.

As minhas orientadoras Sandra e Maria Lúcia, que me acompanham desde a graduação e acreditaram sempre em mim. O objetivo é chegar perto de onde vocês estão. Exemplos que serão seguidos.

Ao meu co-orientador João Paulo, por ter acreditado em mim e me feito, além de gostar, compreender a importância da histologia. Seremos parceiros sempre.

A todo corpo docente que fez parte da minha graduação e pós-graduação, em especial as professoras Rosemeire e Lucineia que, dentre as várias lições, me ensinaram a respeitar e tratar como igual qualquer pessoa, independentemente do grau de escolarização. Jamais esquecerei as senhoras.

A todos os demais, não citados, que colaboraram ativamente para que este sonho se tornasse realidade.

Muito obrigado.

RESUMO GERAL

No presente estudo, analisou-se se a exposição materna ao glifosato, durante a prenhez e lactação, altera o metabolismo lipídico hepático da prole adulta de camundongos alimentada com dieta hiperlipídica. Para isso, camundongos fêmeas adultos da linhagem C57BL/6 foram isoladas, após constatada a prenhez, e separadas em dois grandes grupos: 1) Grupo Controle (CTL), que recebeu dieta padrão e água *ad libitum* e 2) Grupo Glifosato (GF), que recebeu dieta padrão e água com 0,5% da formulação comercial de glifosato (Roundup Original DI®). O tratamento ocorreu do dia 0 até o 30º dia pós-natal, mantendo a mesma suplementação alimentar. No 60º dia pós-natal, a prole foi separada em quatro grupos: os animais do grupo CTL foram subdivididos em 1a) Grupo CTL-DP-F1, que permaneceram com a mesma suplementação alimentar e 1b) Grupo CTL-DH-F1, que recebeu dieta com alto teor de gordura; os animais do grupo GF foram subdivididos em 2a) Grupo GF-DP-F1, que continuaram recebendo a dieta padrão e 2b) Grupo GF-DH-F1, que receberam dieta com alto teor de gordura. Aos 150 dias de vida os animais sofreram eutanásia e foram coletadas amostras biológicas para análise plasmática e histológica. O ganho de peso corporal foi similar entre os animais do grupo CTL-DP-F1 e GF-DP-F1, porém menor em relação aos animais que ingeriram dieta hiperlipídica. Todavia este parâmetro foi significativamente menor nos animais do grupo GF-DH-F1 em relação aos CTL-DH-F1. O acúmulo de gordura aumentou nos animais do grupo CTL-DH-F1 em relação aos demais grupos aos 150 dias. Nos animais do grupo GF-DH-F1, a dieta aumentou em 75 e 60% o peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal, respectivamente, em relação aos grupos CTL-DP-F1 e GF-DP-F1. Interessantemente, o acúmulo de gordura foi aproximadamente 50% menor nos animais GF-DH-F1 em relação ao grupo CTL-DH-F1. As concentrações plasmáticas de COL e TG foram similares entre os grupos CTL-DP-F1 e GF-DP-F1 e significativamente menores em relação ao grupo CTL-DH-F1. O peso do fígado foi maior no grupo GF-DP-F1 quando comparado ao CTL-DP-F1. Destaca-se que o peso do fígado dos animais GF-DH-F1 foi maior em relação ao grupo CTL-DH-F1. O conteúdo total de lipídios do fígado foi semelhante entre os grupos CTL-DP-F1 e GF-DP-F1, diferentemente do conteúdo de triglicerídeos que foi significativamente maior nos animais do grupo GF-DP-F1. O grupo GF-DH-F1 apresentou conteúdo total de lipídios e de TG no fígado, menores em relação ao grupo GF-DP-F1. Os fígados dos animais que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram esteatose. Foi observada fibrose em 66,67% dos animais do grupo CTL-DH-F1 e em 40% do grupo GF-DH-F1. Enquanto nos animais do grupo CTL-DP-F1 não foram observados focos inflamatórios no tecido hepático, nos demais grupos foram observados infiltrados de leucócitos. Assim, demonstramos pela primeira vez que a exposição materna de camundongos machos ao glifosato leva à inflamação hepática na prole adulta. Quando a prole é exposta à dieta hiperlipídica, observamos que os descendentes de mães expostas ao glifosato apresentam acúmulo de gordura no tecido adiposo e fígado, bem como dislipidemia mais branda em relação à prole de mães controle que receberam dieta hiperlipídica.

Palavras-chave: Roundup, Fígado, Esteatose, Desregulador Endócrino, Programação Metabólica.

GENERAL ABSTRACT

In the present study, we evaluated the effects of maternal exposure to glyphosate, during pregnancy and lactation period, in hepatic lipid metabolism on adult mice offspring with high-fat diet-fed. Thus, female mice C57BL/6 were randomly divided in: 1) Control group (CTL), which received standard chow and pure water *ad libitum* and 2) Glyphosate group (GF), which received standard chow and water with 0.5% of commercial formulation of GF (Roundup Original DI®). The treatment occurred from day 0 at 30th postnatal day, keeping the same food supplementation. At 60th postnatal day, offspring was separated in four groups: CTL group animals were subdivided in 1a) CTL-DP-F1 group, which kept same food supplementation and 1b) CTL-DH-F1 group, which received high-fat diet; GF group animals were subdivided in 2a) GF-DP-F1 group, which kept the same food supplementation and 2b) GF-DH-F1 group, which received a high-fat diet. At 150 days of life, offspring were euthanized. Body weight gain were similar between CTL-DP-F1 and GF-DP-F1, however lower than high-fat diet-fed groups. Nevertheless, this parameter was significantly lower in GF-DH-F1 groups when compared to CTL-DH-F1. High-fat diet consumption increased fat pad mass in CTL-DH-F1 group in relation to others groups at 150 days of age. GF-DH-F1 group increased 75 and 60% retroperitoneal and perigonadal fat pads, respectively, in relation to CTL-DP-F1 and GF-DP-F1. Interestingly, fat pad accumulation was 50% lower in GF-DH-F1 group when compared to CTL-DH-F1 group. CHOL and TG fasting serum levels were similar between CTL-DP-F1 and GF-DP-F1 and significantly lower to CTL-DH-F1. Liver weight were higher in GF-DP-F1 group when compared to CTL-DP-F1. Stands out that liver weight in GF-DH-F1 were higher in relation to CTL-DH-F1. Liver total lipids content was similar between CTL-DP-F1 and GF-DP-F1, but the TG content was higher in GF-DP-F1 group. GF-DH-F1 shows liver total lipids content and TG lower in relation to GF-DP-F1. The groups that received high-fat diet showed steatosis on liver. It was observed fibrosis on liver of 66.67% in CTL-DH-F1 and 40% in GF-DH-F1. All the treatment groups had lobular inflammation. Thus, it was show for the first time that maternal exposure to glyphosate in male mice leads to hepatic inflammation on adult offspring. When we analyzed the offspring which received high-fat diet, we observed that puppies which mothers were exposed to glyphosate had fat pad accumulation on white adipose tissue and liver, as well as soft dyslipidemia in relation to control dams offspring which received high-fat-diet.

Key-words: Roundup, Liver, Steatosis, Endocrine Disruptor, Metabolic Programming

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
INTRODUÇÃO GERAL	15
REVISÃO GERAL DA LITERATURA.....	19
Desreguladores endócrinos	19
Glifosato	22
Obesidade.....	24
Metabolismo lipídico hepático e Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica	26
Programação metabólica.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ARTIGO CIENTÍFICO	48
ANEXO A	79
Comitê de Ética no Uso de Animais	79
ANEXO B	80
Normas da revista científica	80

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: A via esteroidogênica..... 20

Figura 2: Janela crítica de sensibilidade durante a gravidez humana para o desenvolvimento de componentes de síndrome metabólica mais tarde na vida..... 30

LISTA DE ABREVIATURAS

ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
AG	Ácido graxo
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato transaminase
ATP	Adenosina trifosfato
CNA	Comprimento nasoanal
COL	Colesterol
CTL	Grupo controle
CYP450	Citocromo P450
DH	Dieta hiperlipídica
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Dieta padrão
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
EPSPS	5-enolpiruvil-3-shikimato-3-fosfato sintetase
G1P	Glicose 1 fosfato
G6P	Glicose 6 fosfato
GCK	Glicoquinase
GF	Grupo glifosato
GLUT2	Transportador de glicose 2
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HFD	Dieta com alto teor de gordura
IMC	Índice de massa corporal
oGTT	Teste oral de tolerância à glicose
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDN	Lipogênese <i>de novo</i>
MDA	Malonaldeído
POP	Poluente Orgânicos Persistentes

RI	Resistência à insulina
ROS	Espécies de oxigênio reativo
SDS-PAGE	Eletroforese de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TG	Triglicerídeos
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	World Health Organization

INTRODUÇÃO GERAL

Em âmbito mundial, o Brasil despontou em 2008 como o maior consumidor de agrotóxicos, ultrapassando os Estados Unidos, e movimentando cerca de US\$ 73,3 bilhões, o que representou 19% do mercado global. Enquanto o mercado mundial de agrotóxicos cresceu aproximadamente 93% entre os anos de 2002 a 2012, o mercado brasileiro cresceu 190%, sendo que as lavouras de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar representaram cerca de 80% do total de vendas deste setor. Somente no ano de 2012, foram plantados 71 milhões de hectares no país, gerando um consumo de 835 milhões de litros de agrotóxicos pulverizados nestas lavouras, promovendo uma exposição média ambiental/ocupacional/alimentar de 4,5 litros de agrotóxicos por habitante brasileiro (ABRASCO, 2012).

Segundo o Dossiê Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO, 2012), cerca de 70% dos alimentos *in natura* consumidos no Brasil estão contaminados por agrotóxicos e aproximadamente 28% destes contém substâncias não autorizadas. Dados da *World Health Organization* (WHO) apontam que, entre os países em desenvolvimento, os agrotóxicos causam, anualmente, cerca de 70.000 intoxicações agudas e crônicas (WHO, 2012). Em geral, estas intoxicações estão relacionadas intrinsecamente com o uso inadequado desses produtos, sua alta toxicidade, a carência de equipamentos de proteção e a precariedade de órgãos de vigilância. Este quadro pode ser agravado pelo baixo nível socioeconômico e cultural dos trabalhadores rurais, que hoje perfazem cerca de 12 milhões de brasileiros expostos diretamente a estes compostos (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2001; VEIGA *et al.*, 2006). Muitos destes produtos, além de extremamente tóxicos, são de longa permanência e persistência no meio ambiente, alguns deles caracterizados como Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) (PINTO; PINTO; FILHO, 2007).

Com a necessidade de crescer a produtividade agrícola após a Segunda Guerra Mundial, aumentou-se a utilização destes POPs, levando ao maior acúmulo destes produtos poluentes nos solos e na água, os quais, ao longo da cadeia trófica, causam efeitos citotóxicos em animais expostos (COX,

1998; FELIX; NAVICKIENE; DOREA, 2007). Agindo de maneira similar aos POPs (KISSANE; SHEPHARD, 2017), destacam-se os herbicidas a base de glifosato.

O glifosato é o ingrediente ativo do Roundup® (Monsanto, Brasil) e classificado como um herbicida sistêmico e não seletivo desenvolvido para exterminar espécies de plantas de folhas largas, gramíneas (BENEDETTI *et al.*, 2004) e ciperáceas (COX, 1998). As propriedades herbicidas do glifosato foram descobertas por cientistas da Monsanto em 1970, sendo introduzido no mercado norte-americano em 1974 sob a marca Roundup®, expandindo-se rapidamente a diversos países do mundo (FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000), sendo possivelmente o mais importante herbicida já desenvolvido (WHO, 1994).

Humanos e mamíferos podem ter contato com resíduos de glifosato em práticas agrícolas (ACQUAVELLA *et al.*, 2004), pela alimentação (TAKAHASHI; HORIE; AOBA, 2001) ou mesmo pelo contato com águas contaminadas (COX, 1998), devido a ampla utilização e larga distribuição deste composto em ambientes doméstico e urbanos (MESNAGE *et al.*, 2015).

A presença de agrotóxicos no meio ambiente está possivelmente relacionada ao aumento do número de casos de anormalidades no sistema reprodutivo de animais, como hipospadias, criptorquidia, câncer testicular na puberdade, endometriose e câncer de mama (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 1996; OMRAN; SALAMA, 2016). Estes ainda apresentam uma íntima relação com a diminuição da contagem espermática, redução do volume ejaculado, além do aumento significativo de espermatozoides anormais ou mortos (MORRISSEY *et al.*, 1988; YOUSEF *et al.*, 1995), com frequência e intensidades variadas de acordo com a fase de vida à qual o organismo foi exposto.

Animais tratados com a formulação comercial do glifosato apresentaram menor ganho de peso corporal, ingesta alimentar e palatabilidade, devido a possíveis efeitos do herbicida ou seus metabólitos no centro neuronal, possivelmente no hipotálamo. O fígado destes animais apresentou menor peso, maior lipoperoxidação e maior atividade de Glutathione Peroxidase (GPx) (BEURET; ZIRULNIK; GIMENEZ, 2005), Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST) (BENEDETTI *et al.*, 2004) e Gama Glutamil

Transferase (γ -GT) (JASPER *et al.*, 2012), expressas pelo aumento de tecido conjuntivo e fibras colágenas nas células hepáticas (BENEDETTI *et al.*, 2004). Fêmeas e suas proles apresentaram maior lipoperoxidação no fígado e concentrações plasmáticas com médias características de portadores de síndrome anêmica, quando comparadas a animais não tratados, com redução significativa no número de eritrócitos, hematócitos e concentração de hemoglobina (BEURET; ZIRULNIK; GIMENEZ, 2005; JASPER *et al.*, 2012).

Perturbações durante o período perinatal podem prejudicar a programação metabólica e aumentar, conseqüentemente, a susceptibilidade à obesidade e comorbidades associadas em adultos (MERRILL *et al.*, 2014). Como exemplo histórico, a fome holandesa, entre 1944 e 1945, originou adultos com síndrome metabólica e intolerância à glicose devido à má nutrição no início de suas vidas (RAVELLI *et al.*, 1998; HULT *et al.*, 2010). Este tipo de modulação é utilizada em roedores com resultados similares aos observados em humanos (DAHRI *et al.*, 1991; FERNANDEZ-TWINN *et al.*, 2005).

Objetivando compreender a susceptibilidade de animais que sofreram perturbações no período perinatal à determinadas comorbidades, diferentes estratégias estão sendo utilizadas, tais como a administração de fármacos, suplementação alimentar e dietas selecionadas. Dentre os modelos de dietas experimentais, a Dieta Hiperlipídica (DH) possui um alto teor calórico, assemelhando-se aos alimentos presentes no cotidiano da população. A DH aumenta o peso e a massa corporal, o acúmulo de gordura, a ingesta alimentar (GOMES *et al.*, 2013) e induz a instalação de quadros de Resistência à Insulina (RI), inflamação (CANI *et al.*, 2007), hiperinsulinemia, hiperglicemia e Diabetes Mellitus (DM) (SRINIVASAN *et al.*, 2005).

Estudos recentes mostraram que a exposição à POPs no período perinatal pode prejudicar a programação metabólica, aumentando a susceptibilidade do desenvolvimento de comorbidades na fase adulta, alterando o peso corporal e concentrações plasmáticas de glicose e insulina, gasto energético, entre outros fatores (MERRILL *et al.*, 2014). Contudo, não existem trabalhos na literatura que expressam as conseqüências do glifosato sobre o perfil lipídico hepático em proles de fêmeas adultas de camundongo expostas durante o período de gestação e lactação. Assim, neste trabalho investigou-se se a exposição materna ao glifosato, durante a prenhez e

lactação, altera o metabolismo lipídico hepático da prole adulta de camundongos alimentados com DH. Acredita-se que a suplementação com a dieta hiperlipídica, em animais expostos ao glifosato durante prenhez e lactação, potencializa os efeitos deletérios do herbicida no metabolismo lipídico hepático de roedores.

REVISÃO GERAL DA LITERATURA

Desreguladores endócrinos

A exponencial exposição da população à diversos tipos de pesticidas, poluentes industriais e compostos químicos sintéticos presentes na alimentação, bem como nas bebidas e na produção de artefatos de plástico tem despertado maior interesse na possível interferência destes compostos na função de hormônios endógenos sexuais (DELLEGRAVE et al, 2007), podendo levar a uma grande variedade de anomalias reprodutivas e do desenvolvimento. A classe de compostos químicos que provocam alterações no sistema endócrino de animais denomina-se “desreguladores endócrinos” (AKINGBEMI; HARDY, 2001).

O termo desregulador endócrino é amplamente utilizado para identificar substâncias que alteram funções endócrinas e provocam efeitos adversos, tanto em organismos expostos como em suas proles (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 1996). Estas substâncias atuam ligando-se diretamente aos receptores celulares de determinados hormônios fazendo com que a célula responda a um falso estímulo (efeito agonista) ou impedindo-a de produzir uma resposta hormonal normal (efeito antagonista). Elas podem ainda atuar modulando as concentrações hormonais endógenas através da interferência em vias bioquímicas de produção, utilização ou metabolismo destes hormônios (OETKEN et al., 2004). Dentre uma extensa variedade de substâncias com estas características, destacam-se as de origem farmacológica, compostos de dioxina, resíduos plastificantes, fungicidas, pesticidas e herbicidas como os à base de glifosato (OMRAN; SALAMA, 2016).

Devido a comprovada importância econômica dos herbicidas à base de glifosato, estes têm sido amplamente utilizados nos mais diversos tipos de culturas agrícolas em todo mundo. Entretanto, estes compostos químicos são classificados como persistentes no ambiente, sendo potencialmente perigosos à saúde de animais e humanos ao longo da cadeia alimentar (DELLEGRAVE et al., 2007). A larga distribuição destes compostos no meio ambiente está

possivelmente relacionada ao aumento do número de casos de anormalidades no sistema reprodutivo de animais (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 1996; OMRAN; SALAMA, 2016), com frequência e intensidades variadas de acordo com a fase de vida à qual o organismo foi exposto.

O desenvolvimento do sistema sexual dos animais ocorre durante os períodos pré e neonatal, sendo hormonalmente regulado e extremamente sensível a substâncias exógenas que possuem efeitos endógenos, como o glifosato. Desequilíbrios hormonais neste período podem provocar efeitos adversos na formação dos órgãos reprodutivos de machos e fêmeas (MABLY; MOORE; PETERSON, 1992; DELLEGRAVE et al., 2007) devido a toxicidade que estes compostos provocam.

Esta citotoxicidade está associada com a perda da homeostase intracelular de cálcio, devido a alterações nos estoques celulares e/ou aumento da permeabilidade plasmática a este íon. Esta sobrecarga de cálcio leva a disfunções mitocondriais, desencadeando uma cascata de eventos que incluem a ativação de vias de sinalização que aumentam a produção de Espécies de Oxigênio Reativo (ROS) (KIM et al., 2013).

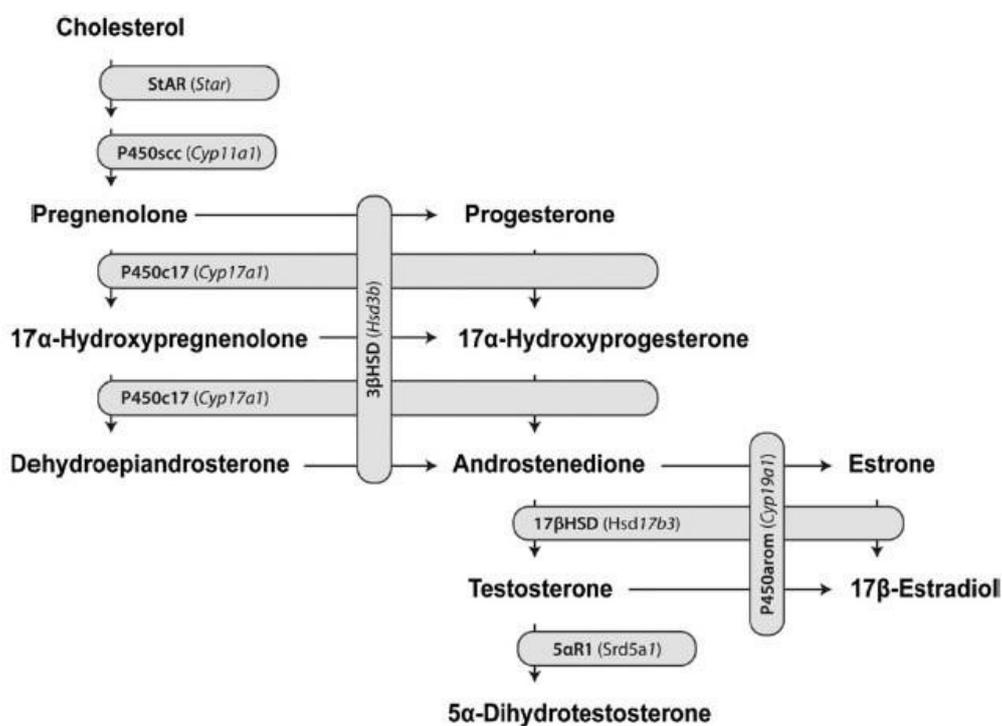
Devido aos expressivos resultados no dano celular causado a organismos expostos a estes compostos, como os à base de glifosato, tem-se intensificado as investigações sobre os possíveis efeitos endócrinos destas substâncias. As alterações nos sistemas reprodutivos destes animais estão possivelmente relacionadas à inibição da esteroidogênese causadas pela formulação comercial do glifosato. Segundo Walsh et al. (2000), o Roundup atua desregulando a expressão da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR), mostrando que este herbicida tem a capacidade de desregular a função reprodutivas de animais. Porém, quando isolado, o glifosato não altera a produção de esteroides, mostrando que é necessário ao menos algum outro componente da sua fórmula comercial para desregular a esteroidogênese.

Além disso, a exposição ao Roundup, *in vitro*, provocou uma diminuição na atividade da enzimática da aromatase, responsável pela síntese de estrogênio, em células de placenta humana em concentrações muito menores daquelas aceitáveis na agricultura (RICHARD et al., 2005). Estes desreguladores endócrinos podem lesionar o sistema reprodutor masculino através de interferências na divisão ou inibição da diferenciação celular das

células de Leydig, ainda não protegidas pela barreira hematopoiética, comprometendo diretamente a função das mesmas (DELLEGRAVE et al., 2007).

Richard et al. (2005), apontaram que o glifosato atua também como um desregulador da atividade enzimática do CYP450 aromatase em concentrações cem vezes menores daquelas recomendadas seguras ao uso. Durante a diferenciação sexual cerebral, altas concentrações de testosterona são convertidas, na hipófise e no tronco cerebral, em dihidrotestosterona pela enzima 5- α -redutase ou em estradiol, nos neurônios do sistema límbico e hipotalâmico, pela CYP450 aromatase, conforme Figura 1. O estradiol é uma importante via para masculinização do cérebro. Substâncias que são capazes de interferir nesta via podem inibir a diferenciação sexual dos machos (KELLY, 1991).

Figura 1 – A via esteroidogênica.



Fonte: FORGACS et al., 2012, p.393.

Glifosato

Com o passar dos anos, houve uma intensa preocupação com o meio ambiente, tanto da comunidade científica quanto da comunidade em geral. Em 1972, a Convenção de Estocolmo firmou um pacto global, obrigatório e legal no intuito de banir a produção, uso e disponibilidade de POPs. Muitos destes poluentes são extremamente tóxicos e de longa permanência e persistência no meio ambiente (PINTO; PINTO; FILHO, 2007). O aumento da utilização dos POPs como forma de aumentar a produtividade das lavouras corroborou com aumento do acúmulo destes compostos poluentes nos solos e na água, os quais, ao longo da cadeia trófica, causam efeitos tóxicos nos animais expostos a estes ambientes (COX, 1998; FELIX; NAVICKIENE; DOREA, 2007). Estudos recentes têm associado a exposição aos POPs à diversas patologias (THAYER et al., 2012; MERRILL et al., 2014). Com o mecanismo de ação similar a estes poluentes, os herbicidas a base de glifosato são os que apresentam maior abrangência mundial.

O glifosato (N-(fosfonometil) glicina, $C_3H_8NO_5P$) é um organofosfato, sendo o ingrediente ativo do Roundup® (Monsanto, Brasil) e classificado como um herbicida sistêmico e não seletivo desenvolvido para exterminar espécies de plantas de folhas largas, gramíneas (BENEDETTI et al., 2004), ciperáceas (COX, 1998) e arbustos lenhosos em pomares, vinhas, plantações de coníferas, entre outras (TIZHE et al., 2014). Ele inibe o crescimento destas plantas através da interferência na produção de aminoácidos aromáticos essenciais na rota enzimática do ácido chiquímico (COX, 1998), inibindo a síntese da enzima 5-enolpiruvoil-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), que sintetiza os aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (WILLIAMS, KROES, MUNRO, 2000; SCHONBRUNN et al., 2001). Esta via metabólica existe na maioria das plantas e microorganismos, porém não é compartilhada com os animais, fazendo com que seu efeito bloqueador seja restrito (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000; TIZHE et al., 2014; MESNAGE et al., 2015).

As propriedades herbicidas do glifosato foram descobertas por cientistas da Monsanto em 1970, sendo introduzido no mercado americano em 1974 sob a marca Roundup®, expandindo-se rapidamente a diversos países do mundo

(FRANZ; MAO; SIKORSKI, 1997; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000) sendo possivelmente o mais importante herbicida já desenvolvido (WHO, 1994). A formulação comercial de glifosato combinada com surfactantes é considerada mais tóxica que somente o composto glifosato, sendo necessária, em média, um terço da dose de Roundup® para matar um rato em relação a quantidade de glifosato isolado (PEIXOTO, 2005). O uso de surfactantes provavelmente contribui para a toxicidade aguda das formulações de glifosato, evidência que contraria algumas sugestões de que são os surfactantes que tornam possível esta toxicidade (BRADBERRY; PROUDFOOT; VALE, 2004; JASPER et al., 2012).

Humanos e mamíferos podem ter contato com resíduos de glifosato em práticas agrícolas (ACQUAVELLA et al., 2004), pela alimentação (TAKAHASHI; HORIE,;AOBA, 2001) ou mesmo pelo contato com águas contaminadas (COX, 1998), devido a ampla utilização em ambientes doméstico e urbanos (MESNAGE et al., 2015). Devido ao uso indiscriminado e a repetitivas aplicações necessárias para o controle de ervas daninhas, grandes quantidades de glifosato são encontradas em corpos d'água e campos de pastagem tornando-os perigosos aos animais que fazem uso destes (AYOOLA, 2008; TIZHE et al., 2014).

Apesar das empresas produtoras de herbicidas a base de glifosato afirmarem que o mesmo apresenta uma baixa toxicidade e respeito pelo meio ambiente, evidencias recentes indicam que o mesmo pode não ser tão seguro quanto anteriormente era previsto. *In vivo*, o glifosato pode ser metabolizado em ácido aminometilfosfônico (AMPA) e no metabólito reativo glioxilato (SAMSEL; SENEFF, 2015), que reduz seletivamente a reatividade da cisteína em várias proteínas (FORD et al., 2017). Estudos recentes apontam que estes resíduos de glifosato apresentam um risco elevado às funções renais e hepáticas (TIZHE et al., 2014; MESNAGE et al., 2015), aumentando as concentrações de colesterol e triglicerídeos e inibindo as enzimas de oxidação dos ácidos graxos hepáticos, provocando, provavelmente, o desvio destes ácidos graxos da via de oxidação e os direcionando a outras vias lipídicas (FORD et al., 2017).

A exposição e o metabolismo de glifosato podem levar à excessiva produção de malonaldeído (MDA), que induz a perda de função de

determinadas proteínas e possui função mutagênica; e estresse oxidativo (VIVIAN; CLAUDIA, 2007) através da geração desregulada de espécies de oxigênio reativo (ROS) como ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio, cadeias de oxigênio, radicais hidroxila e peróxidos (BEURET; ZIRULNIK; GIMENEZ, 2005). Esta exposição pode comprometer a integridade celular através do dano oxidativo de proteínas e lipoperoxidação (SUN, 1990; CATALA; CERRUTI, 1997; RIKANS; HORNBOOK, 1997), além de alterações de funções genéticas críticas para o desenvolvimento, diferenciação e envelhecimento (LAVOIE; CHESSEX, 1997), sendo também associado a modulação do citocromo P450, diminuindo a concentração hepática desta proteína (LAMB et al., 1998; PEIXOTO et al., 2005).

O aumento exponencial desta exposição gera consequências a longo prazo em termos de comorbidades, mortalidade e custos econômicos, despertando um intenso interesse em compreender a contribuição dos fatores de risco “não tradicionais”, como os de natureza química, na epidemia de patologias associadas à obesidade, dislipidemias e Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM2) (TAYLOR et al., 2013).

Obesidade

A obesidade é possivelmente o mais antigo distúrbio metabólico, existindo relatos em múmias egípcias e esculturas gregas (BLUMENKRANTZ, 1997). A obesidade era vista como padrão de beleza e fertilidade na pré-história, mostrando-se sempre presente em corpos de homens e mulheres de forma acentuada. Hipócrates, em manuscritos da medicina greco-romana, alertava sobre os perigos da obesidade e afirmava que a morte súbita era mais comum em indivíduos naturalmente gordos quando comparados a magros. Seu discípulo, Galeno, dizia que a obesidade era devido à falta de disciplina e preconizava um tratamento que continha corridas, massagens, banho, descanso ou algum passatempo associado a alimentação farta, porém pouco calórica (CUNHA; NETO; JUNIOR, 2006). Estes padrões de beleza se alteraram com o passar do tempo, tendo seu auge com o Império Romano,

onde se idealizavam corpos esbeltos e magros, que obrigavam as mulheres a fazer excessivos jejuns (CUNHA, 1998).

Com o fim da Segunda Guerra Mundial, mudanças nos hábitos alimentares e redução da prática de atividades físicas propiciaram o reaparecimento de comorbidades como o sobrepeso e a obesidade. Como consequência deste novo cenário mundial, houve o crescimento e a expansão do capitalismo, permitindo o surgimento de novos mercados e o aumento da produtividade industrial (MENDONÇA; ANJOS, 2004). Diferentes fatores socioeconômicos e culturais alteraram o estilo de vida e conseqüentemente o padrão alimentar em todo mundo, tais como a alimentação fora de casa, o aumento da oferta de *fast-foods*, o aumento da utilização de alimentos industrializados (SANTOS; ENUMO, 2003) e o crescimento exponencial da utilização de equipamentos eletrônicos, contribuindo para o aumento do modo de vida sedentário e instalação da obesidade (ABREU; CARDOSO, 2008).

A obesidade é classificada como uma disfunção metabólica e apresenta parâmetros corporais caracterizados por um acúmulo excessivo de gordura, quando comparados com valores previstos para dada estatura, gênero e idade (MARTI; MARCOS; MARTINEZ, 2001), com sua própria fisiopatologia, comorbidades e capacidades desabilitantes (CONWAY; RENE, 2004). Segundo a *World Health Organization*, a principal causa da obesidade é o desequilíbrio energético gerado pela insalubre ingestão alimentar e o gasto de calorias por um indivíduo (WHO, 2015). No entanto, evidências recentes sugerem que grande parte da obesidade está associada ao baixo gasto energético que ao alto consumo de comida (CIOLAC; GUIMARÃES, 2004).

A obesidade é considerada uma epidemia mundial que atinge tanto países desenvolvidos como em desenvolvimento. Em 2014 mais de 1,9 bilhão de adultos com mais de 18 anos apresentavam sobrepeso. Destes, mais de 600 milhões de pessoas (11% dos homens e 15% das mulheres) eram identificados como obesos, com índice de massa corporal (IMC) maior ou igual a 30 (WHO, 2015). Segundo dados do sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), em 2014, 56,5% dos homens e 49,1% das mulheres brasileiras apresentavam sobrepeso sendo que 17,9%, tanto de homens como mulheres, apresentavam obesidade (BRASIL, 2015). Além disso, projeções da WHO para 2025 apontam

para prevalências de obesidade superiores à 50% nos Estados Unidos e maiores que 25% no Brasil (KOPELMAN, 2000).

Apresentando dados alarmantes ao redor do mundo, considera-se de extrema importância o conhecimento sobre a etiologia e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade para tratamento e prevenção desta patologia (EGUCHI et al., 2008), que geram gastos alarmantes aos cofres públicos (HALPERN, 1999) e conseqüentemente diminuem a expectativa de vida do paciente quando comparado a de não obesos (OLSHANSKI et al., 2005). Dentre as comorbidades intimamente associadas a obesidade destacam-se a cardiopatia isquêmica, hipertensão arterial (MONTEIRO; ANGELIS, 2007; FILHO et al., 2002), doenças renais (WILLMORE; COSTILL, 2001), doenças digestivas (CUNHA; NETO; JUNIOR, 2006), dislipidemia, hiperinsulinemia, altos níveis de LDL/colesterol e triglicérides, HDL-colesterol baixo (CIOLAC; GUIMARAES, 2004), diabetes mellitus (DM) (MARTYN; KANEKI; YASUHARA, 2008), além de certos tipos de câncer (BERGSTRÖM et al., 2001), como o de próstata (MACINNIS; ENGLISH, 2006), de pâncreas (GONZALEZ; SWEETLAND; SPENCER, 2003), e de mama (ENDOGENOUS HORMONES AND BREAST CANCER COLLABORATIVE GROUP, 2003), doenças respiratórias e osteoarticulares (SOWERS, 1998; FILHO et al., 2002; WALLEY, BLAKEMORE, FROGUEL, 2006), acidentes vasculares cerebrais (HALPERN, 1999), asma, problemas relacionados ao sono (GUH et al., 2009), esteatose hepática (STEMMER et al., 2012), resistência à insulina (ARAUJO et al., 2012) e a doença hepática gordurosa não alcóolica (DHGNA) (NEUSCHWANDER-TETRI, 2005).

Metabolismo lipídico hepático e Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica

O fígado é o principal órgão envolvido no controle do metabolismo lipídico. Com base nas condições hormonais e metabólicas do organismo, o fígado atua no direcionamento de gorduras fornecendo, para os tecidos periféricos, o substrato energético necessário (SPASSIANI; KUK, 2008). Estas gorduras podem ser oxidadas para produção de adenosina trifosfato (ATP) (NGUYEN et al., 2008) ou encaminhadas para os tecidos periféricos por VLDL,

sendo então armazenadas no tecido adiposo ou utilizadas pelo músculo esquelético (DURSTINE et al., 2002).

Após a digestão alimentar, os produtos do metabolismo chegam ao fígado onde os hepatócitos fazem a captação de glicose através de transportadores transmembranas de glicose tipo 2 (GLUT2). A glicose é então fosforilada pela enzima glicocquinase (GCK) gerando glicose-6-fosfato (G6P), podendo esta ser convertida em glicose-1-fosfato (G1P). A G1P é então adicionada às cadeias de formação de glicogênio pela enzima glicogênio sintetase (RUI, 2014). Quando a quantidade necessária de glicogênio armazenado é atingida, a glicose restante é redirecionada para a síntese de ácidos graxos (AG). Este processo é denominado de lipogênese *de novo* (LDN) hepática.

Na LDN, a glicose entra no fluxo glicolítico e desencadeia uma cascata metabólica, propiciando, dentre outros metabólitos, a formação do ácido palmítico e ácidos graxos insaturados. Estes compostos são esterificados com o gliceraldeído-3-fosfato para formação de triglicerídeos (TG). Sob condições normais, as VLDL fazem o redirecionamento de TG do fígado para o tecido adiposo (HUSSAIN; NIJSTAD; FRANCESCHINI, 2011; KAWANO; COHEN, 2013).

A insulina, no entanto, pode inibir a glicogenólise e gliconeogênese no fígado, inibindo a produção e liberação de glicose hepática e estimulando o acúmulo de glicogênio (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Este hormônio também tem o papel de alterar a quantidade de ácidos graxos livres liberados pelo tecido adiposo (BERGMAN, 1997). O fluxo destes compostos na veia porta modula a sensibilidade à insulina no fígado e regula assim a produção de glicose (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

A elevação do fluxo destes ácidos graxos livres derivados do tecido adiposo, visceral ou intra-abdominal, para o fígado (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005) e/ou defeitos nas vias de sinalização intracelular da insulina (PATTI; KAHN 1998) são fatores importantes para o desenvolvimento da resistência à insulina (RI). Concomitantemente, a gordura subcutânea abdominal libera produtos de lipólise na circulação sistêmica, contribuindo assim na diminuição destes efeitos no metabolismo hepático. O fígado, então, aumenta a síntese hepática e o acúmulo de TG no citoplasma do hepatócito

para que ocorra um reajuste no quadro de RI (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005). O acúmulo de TG pode ocorrer devido: 1) ao aumento da absorção de ácidos graxos da circulação, oriundos da lipólise do tecido adiposo ou de uma dieta altamente calórica; 2) à síntese *de novo* de ácidos graxos pela ativação da via lipogênica; 3) à diminuição da beta-oxidação de ácidos graxos; e/ou 4) à diminuição da secreção hepática de VLDL (BERLANGA et al., 2014).

Assim, este quadro clínico oriundo do aumento da adiposidade e RI está fortemente associado ao desenvolvimento de doenças hepáticas sem relação com o alcoolismo, devido a este acúmulo de TG no fígado que elas promovem. Essas comorbidades variam de uma esteatose hepática até um grave processo não inflamatório, chamado de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (DIEHL et al., 1999; MARCHESIN et al., 2003; BRUNT, 2001; ÂNGULO, 2002; ALBA; LINDOR, 2003; NEUSCHWANDER-TETRI, 2005; LIU; BENGMARK; QU, 2010).

A DHGNA é uma das principais doenças do fígado e atinge cerca de 30% da população mundial (NEUSCHWANDER-TETRI, 2005) e 80% da população obesa pode vir a desenvolver a doença (GUAJARDO-SALINAS; HILMY, 2010). A DHGNA engloba tanto uma simples esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo de gordura, até uma esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), onde além do acúmulo de gordura ocorre a presença de inflamação e degeneração hepatocelular, podendo ser acompanhada pelo surgimento de fibrose celular, e evoluir para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011).

O desenvolvimento da DHGNA/EHNA pode ser explicada pela hipótese de *two-hit*. No primeiro *hit* ocorre o acúmulo de gordura no hepatócito decorrente de certos mecanismos que levam a maior síntese ou importação de ácidos graxos quando comparado com a degradação ou exportação destes. O segundo *hit* é caracterizado pela possível ocorrência de inflamação e fibrose no fígado, já sensibilizado pela esteatose, devido a diversos estímulos que envolvem a ação de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo, entre outros mecanismos envolvidos no acúmulo de gorduras neste órgão (DAY; JAMES, 1998).

Programação metabólica

A instalação do quadro clínico de síndrome metabólica pode ser devido a vários fatores ambientais. Entre estes estão a dieta, o sedentarismo, fatores sociais, farmacológicos e outros (SAHU, 2004; LIMA, 2005). Em humanos, estudos tem mostrado que uma dieta desbalanceada da mãe, durante a gestação, pode levar ao surgimento de comorbidades como a obesidade (VICKERS et al., 2000), a síndrome metabólica (NÜSKEN et al., 2011), diabetes mellitus tipo 2 (MARTINS, 2009), hipertensão (McMILLEN; ROBINSON, 2005) e patologias cardiovasculares (VELKOSKA et al., 2008) no início da vida adulta da prole.

Evidências apontam ainda que a restrição alimentar durante a gestação, em humanos, aumenta a probabilidade do surgimento de neoplasias, insuficiência renal crônica, hipotireoidismo autoimune, osteoporose, hipertrofia cardíaca, depressão, asma e dificuldade auditiva na idade adulta, esquizofrenia, cirrose hepática, tumor de testículo, síndrome do ovário policístico, maior dificuldade de aprendizagem e menor capacidade profissional (MARTINS, 2009).

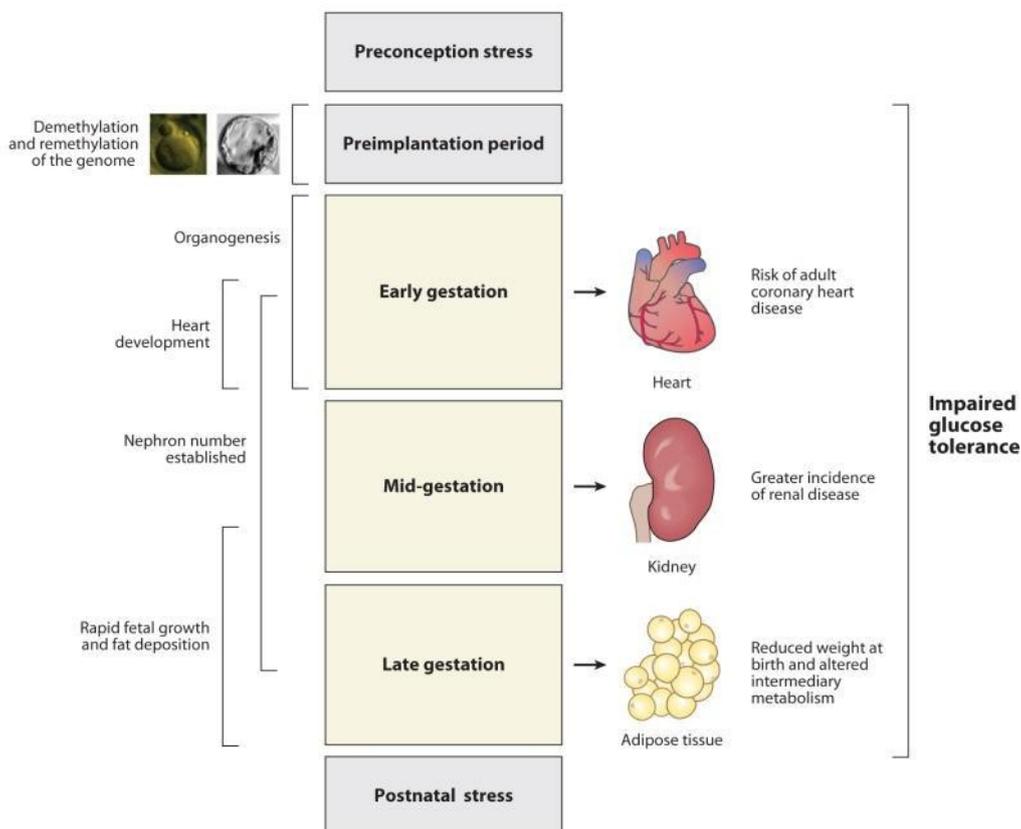
Devido ao desenvolvimento do sistema regulador do balanço energético ocorrer no período perinatal, condições ambientais desfavoráveis nesta fase podem reprogramar o metabolismo da prole, ajustando-o a estas condições, e prolongando estas consequências ao longo de toda vida (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WALL, 2011). A resposta adaptativa que a prole apresenta a estes fatores adversos é chamada de programação (LUCAS, 1991).

Com o intuito de explicar esta programação, a hipótese do “fenótipo econômico” sugere que o desenvolvimento do feto é sensível ao ambiente nutricional (HALES; BARKER, 1992), aumentando assim a chance de sobrevivência do indivíduo em condições nutricionais precárias e intermitentes, resultando num metabolismo pós-natal alterado (GOTTLIEB; CRUZ; BODANESE, 2008). Porém, se houver uma grande disponibilidade de nutrientes após o período lactacional, o indivíduo torna-se susceptível ao

surgimento de doenças metabólicas e cardiovasculares na idade adulta (DRAKE; WALKER, 2004; McMILLEN; ROBINSON, 2005; McARDLE; ANDERSEN; AMBLING, 2006; BARKER, 2007; LEANDRO et al., 2009).

Observa-se também que a fase gestacional a qual o feto foi exposto a determinadas condições intrauterinas adversas o torna propenso a um determinado tipo de doença (Figura II). Prejuízos no início da gestação propiciam ao feto maior predisposição do desenvolvimento de doenças coronarianas, na fase intermediária, há um maior risco de patologias renais e na fase final da gestação, torna o indivíduo mais propenso a apresentar menor peso pós-natal e alterações metabólicas, as quais poderão leva-lo a desenvolver obesidade e patologias associadas. Além disso, o surgimento de intolerância à glicose na fase adulta está relacionado a restrição alimentar desde o período de pré-implantação até o nascimento do indivíduo (RINAUDO; WANG, 2012). Fenótipos diferentes na idade adulta, em animais com múltipla gestação, também podem estar associado a distribuição de forma diferenciada de nutrientes na placenta entre os fetos, originando filhotes com pesos distintos (DESAI et al., 2007; NISSEN et al., 2011).

Figura II: Janela crítica de sensibilidade durante a gravidez humana para o desenvolvimento de componentes de síndrome metabólica mais tarde na vida.



Fonte: RINAUDO; WANG, 2012, p. 127.

A regulação da nutrição alimentar é tão crucial na vida intrauterina como após o nascimento, pois é nesta fase que ocorrem os eventos de plasticidade fisiológica. No período pós-natal, os efeitos da má nutrição são minimizados quando a matriz recebe uma alimentação balanceada durante o período de lactação. Entretanto, se a fêmea for submetida a dieta hiperlipídica ou restrição calórica, os efeitos das alterações provocadas no período gestacional podem ser amplificados (BUCKLEY; JAQUIERY; HARDING, 2005).

As consequências oriundas da nutrição materna à dieta hiperlipídica e hipercalórica expõe a prole ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e obesidade na fase adulta (ASCHERIO, 2002; VICKERS et al., 2003). Dietas desbalanceadas, na fase pós-natal, podem resultar em aumento do peso corporal afetando a regulação do apetite, alteram assim a resposta à insulina e leptina, hormônios importantes no circuito hipotalâmico ligados à regulação da

ingesta alimentar (VICKERS et al., 2000; VELKOSKA et al., 2008). Matrizes expostas a dietas hipoproteicas apresentaram proles com alterações no metabolismo hepático da glicose, do colesterol e alterações renais (GODFREY; BARKER, 2001).

A má nutrição no período gestacional também altera a circulação fetal, afetando o crescimento do fígado, provocando alterações permanentes em duas enzimas hepáticas: a fosfoenolpiruvatocarboxilase e a glicoquinase, ambas envolvidas na síntese e quebra da glicose (BARKER, 1998). Este desequilíbrio energético provocou o aumento de colesterol de alta densidade (HDL-colesterol), colesterol total e lipídeos totais em ratos. Além disso, houve uma considerável redução dos triglicerídeos plasmáticos e elevação do acúmulo de triglicerídeos hepáticos, devido a síntese reduzida da alipoproteína hepática que origina a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) (BERLEZE, 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRASCO. Associação Brasileira de Saúde Coletiva. **Dossiê ABRASCO – Um Alertas sobre os Impactos dos Agrotóxicos na Saúde**. Parte I – Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro, ABRASCO, 88 p., 2012.

ABREU, P. R.; CARDOSO, L. R. D. Multideterminação do Comportamento Alimentar em Humanos: Um Estudo de Caso. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 24, n. 3, p. 355-360, 2008.

ACQUAVELLA, J. F.; ALEXANDER, B. H.; MANDEL, J. S.; GUSTIN, C.; BAKER, B.; CHAPMAN, P.; BLEEKE, M. Glyphosate Biomonitoring for Farmers and their Families: Results from the Farm Family Exposure Study. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, p. 321-326, 2004.

AKINGBEMI, B. T.; HARDY, M. P. Oestrogenic and Antiandrogenic Chemicals in the Environment: Effects on Male Reproductive Health. **Annals of Medicine**, v. 33, n. 8, p. 391-403, 2001.

ALBA, L. M.; LINDOR, K. Review Article: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 17, n. 8, p. 977-986, 2003.

ANGULO, P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 1221-1231, 2002.

ARAÚJO, A.C.; BONFLEUR, M. L.; BALBO, S. L.; RIBEIRO, R. A. FREITAS, A. C. Duodenal–Jejunal Bypass Surgery Enhances Glucose Tolerance and Beta-Cell Function in Western Diet Obese Rats. **Obesity Surgery**, v.22, n. 5, p. 819-826, 2012.

ASCHERIO, A. Epidemiologic Studies on Dietary Fats and Coronary Heart Disease. **American Journal of Medicine**, v. 113 (Suppl 9B), p. 9S-12S, 2002.

AYOOLA, S. O. Histopathological Effects of Glyphosate on Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 4, n. 3, p. 362-367, 2008.

BARKER, D. J. P. In Utero Programming of Chronic Disease. **Clinical Science**, v. 95, p. 115-128, 1998.

BARKER, D. J. P. The Origins of the Developmental Origins Theory. **Journal International of Medicine**, v. 261, p. 412-417, 2007.

BENEDETTI, A. L.; VITURI, C. L.; TRENTIN, A. G.; DOMINGUES, M. A. C.; ALVAREZ-SILVA, M. The Effects of Sub-Chronic Exposure of Wistar Rats to the Herbicide Glyphosate-Biocarb®. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 227-232, 2004.

BERGMAN, R. N. New Concepts in Extracellular Signaling for Insulin Action: the Single Gateway Hypothesis. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 52, p. 359-385, 1997.

BERGSTRÖM, A.; PISANI, P.; TENET, V.; WOLK, A.; ADAMI, H. O. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. **International Journal of Cancer**, v.91, p. 421-430, 2001.

BERLANGA, A.; GUIU-JURADO, E.; PORRAS, J. A.; AUQUET, T. Molecular Pathways in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 7, p. 221-239, 2014.

BERLEZE, K. J. **Efeitos de Diferentes Dietas Sobre o Metabolismo de Lipídeos e de Carboidratos em Ratas Normonutridas e Desnutridas**. 2005. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Bioquímica/Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BEURET, C. J.; ZIRULNIK, F.; GIMENEZ, M. S. Effect of the Herbicide Glyphosate on Liver Lipoperoxidation in Pregnant Rats and their Fetuses. **Reproductive Toxicology**, v. 19, p. 501-504, 2005.

BLUMENKRANTZ, M. **Obesity: the world's metabolic disorder**. Beverly Hills, 1997. Disponível em: <<http://www.quantumhcp.com/obesity.htm>>. Acesso em: 19 jun. de 2016.

BRADBERRY, S. E.; PROUDFOOT, A. T.; VALE, J. A. Glyphosate poisoning. **Toxicology Review**, v. 23, n. 3, p. 159-167, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2014: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRUNT, E. M. Nonalcoholic Steatohepatitis: Definition and Pathology. **Seminars in Liver Disease**, v. 21, n. 1, p. 3-16, 2001.

BUCKLEY, A. J.; JAQUIERY, A. L.; HARDING, J. E. Nutritional Programming of Adult Disease. **Cell Tissue Research**, v. 322, p. 73-79, 2005.

CANI, P. D.; NEYRINCK, A. M.; FAVA, F.; KNAUF, C.; BURCELIN, R. G.; TUOHY, K. M.; GIBSON, G. R.; DELZENNE, N. M. Selective Increases of Bifidobacteria in Gut Microflora Improve High-Fat-Diet-Induced Diabetes in Mice through a Mechanism Associated with Endotoxaemia. **Diabetologia**, v. 50, p. 2374-2383, 2007.

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

CATALA, A.; CERRUTI, A. Non-Enzymatic Peroxidation of Lipids isolated from Rat Liver Microsomes, Mitochondria and Nuclei. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, p. 541-546, 1997.

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

CIOLAC, E. G.; GUIMARAES, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v. 10, n. 4, 2004.

COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1519-1523, 2011.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. **Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence and Survival? A Scientific Detective Story**. New York, NY, Dutton, 1996.

CONWAY, B.; RENE, A. Obesity as a disease: no lightweight matter. **Obesity Reviews**, v. 5, p. 145-151, 2004.

COX, C. Glyphosate (Roundup). **Journal of Pesticide Reform**, v. 18, n. 3, 1998.

CUNHA, A. C. P. T.; NETO, C. S. P.; JUNIOR, A. T. Indicadores de obesidade e estilo de vida de dois grupos de mulheres submetidas à cirurgia bariátrica. **Fitness & Performance Journal**, v. 5, n. 3, p. 146-154, 2006.

CUNHA, A. T. J. Obesidade infantil. **Monografia de pós-graduação**. Universidade do Contestado, 1998.

DAHRI, S.; SNOECK, A.; REUSENS-BILLEN, B.; REMACLE, C.; HOET, J. J. Islet Function in Offspring of Mothers on Low-Protein Diet During Gestation. **Diabetes**, v. 40, n. 2, p. 115-120, 1991.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: A Tale of Two "Hits"? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998.

DELLEGRAVE, E.; MANTASE, F. D.; OLIVEIRA, R. T.; ANDRADE, A. J. M.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. Pre- and Postnatal Toxicity of the Commercial Glyphosate Formulation in Wistar Rats. **Archives of Toxicology**, v. 81, p. 665-673, 2007.

DESAI, M.; GAYLE, D.; BABU, J.; ROSS, M. G. The Timing of Nutrient Restriction During Rat Pregnancy/Lactation Alters Metabolic Syndrome

Phenotype. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 196, p. 555e1-555e7, 2007.

DIEHL, A. M. Nonalcoholic Steatohepatitis. **Seminars in Liver Disease**, v. 19, p. 221-229, 1999.

DRAKE, A. J.; WALKER, B. R. The Intergenerational Effects of Fetal Programming: Non-Genomic Mechanism for the Inheritance of Low Birth Weight and Cardiovascular Risk. **Journal of Endocrinology**, v. 180, p. 1-16, 2004.

DURSTINE, J. L.; GRANDJEAN, P. W.; COX, C. A.; THOMPSON, P. D. Lipids, Lipoprotein and Exercise. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation**, v. 22, n. 6, p. 385-398, 2002.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The Metabolic Syndrome. **Lancet**, v. 365, p. 1415-1428, 2005.

EGUCHI, R.; CHEIK, N. C.; OYAMA, L. M.; NASCIMENTO, C. M. O.; MELLO, M. T.; TUFIK, S.; DAMASO, A. Efeitos do exercício crônico sobre a concentração circulante da leptina e grelina em ratos com obesidade induzida por dieta. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niterói, v. 14, n. 3, 2008.

ENDOGENOUS HORMONES AND BREAST CANCER COLLABORATIVE GROUP. Body Mass Index, Serum Sex Hormones, and Breast Cancer Risk in Postmenopausal Women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 16, 2003.

FELIX, F. F.; NIVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) como Indicadores da Qualidade do Solo. **Revista da Fapese**, v. 3, n. 2, p. 39-62, 2007.

FERNANDEZ-TWINN, D. S.; WAYMAN, A.; EKIZOGLU, S.; MARTIN, M. S.; HALES, C. N.; OZANNE, S. E. Maternal Protein Restriction Leads to Hyperinsulinemia and Reduced Insulin-Signaling Protein Expression in 21-month-old Female Rat Offspring. **American Journal of Physiology –Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, p. 368-373, 2005.

FILHO, G. R. O.; NICOLODI, T. H. C.; GARCIA, J. H. S.; NICOLODI, M. A.; GOLDSCHMIDT, R.; MAGO, A. J. D. Problemas clínicos pré-anestésicos de pacientes morbidamente obesos submetidos a cirurgias bariátricas: comparação com pacientes não obesos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 52, n. 2, 2002.

FORD, B.; BATEMAN, L. A.; GUTIERREZ-PALOMINOS, L.; PARL, R.; NOMURA, D. K. Mapping proteome-wide targets of glyphosate in mice. **Cell Chemical Biology**, v. 24, p. 1-8, 2017.

FORGACS, A. L.; DING, Q.; JAREMBA, R. G.; HUHTANIEMI, I. T.; RAHMAN, N. A.; ZACHAREWSKI, T. R. BLTK1 Murine Leydig cells: a novel steroidogenic model for evaluating the effects of reproductive and developmental toxicants. **Toxicological Sciences**, v. 127, n. 2, p. 391-402, 2012.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. **Glyphosate: A Unique Global Herbicide**, Monografia n 189, American Chemical Society. Washington, USA, 1997.

GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. P. Fetal Programming and Adult Health. **Public Health Nutrition**, v. 4, n. 2B, p. 611-624, 2001.

GOMES, R. M.; TOFOLO, L. P.; RINALDI, W.; SCOMPARIN, D. X.; GRASSIOLLI, S.; BARELLA, L. F.; OLIVEIRA, J. C.; BRANCO, R. C.; AGOSTINHO, A. R.; RIBEIRO, T. A.; GRAVENA, C.; MATHIAS, P. C. Moderate Exercise Restores Pancreatic Beta-Cell Function and Autonomic Nervous System Activity in Obese Rats Induced by High-Fat Diet. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, p. 310-321, 2013.

GONZALEZ, A.B.; SWEETLAND, S.; SPENCER, E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. **British Journal of Cancer**, v. 89, p. 519-523, 2003.

GOTTLIEB, M. G. V.; CRUZ, I. B. M.; BODANESE, L. C. Origem da Síndrome Metabólica: Aspectos Genético-Evolutivos e Nutricionais. **Scientia Medica**, v. 18, n. 1, p. 31-38, 2008.

GUAJARDO-SALINAS, G. E.; HILMY, A. Prevalence of Nonalcoholic Fat Liver Disease (NAFLD) and Utility of FIBRO spect II to Detect Liver Fibrosis in Morbidly Obese Hispano-American Patients Undergoing Gastric Bypass. **Obesity Surgery**, v. 20, p. 1647-1653, 2010.

GUH, D. P.; ZHANG, W.; BANSBACK, N.; AMARSI, Z.; BIRMINGHAM, C. L.; ANIS, A. H. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**, v.9, p. 88, 2009.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) Diabetes Mellitus: The Thrifty Phenotype Hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595-601, 1992.

HALPERN, A. A Epidemia de Obesidade. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 43, n. 3, 1999.

HULT, M.; TORNHAMMAR, P.; UEDA, P.; CHIMA, C.; BONAMY, A.K.; OZUMBA, B.; NORMAN, M. Hypertension, Diabetes and Overweight: Looming Legacies of the Biafran Famine. **PLoS One**, v. 5, 2010.

HUSSAIN, M. M.; NIJSTAD, N.; FRANCESCHINI, L. Regulation of Microsomal Triglyceride Transfer Protein. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 6, n. 3, p. 239-303, 2011.

JASPER, R.; LOCATELLI, G. O.; PILATI, C.; LOCATELLI, C. Evaluation of Biochemical, Hematological and Oxidative Parameters in Mice Exposed to the Herbicide Glyphosate-Roundup. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 5, n. 3, p. 133-140, 2012.

KAWANO, Y.; COHEN, D. E. Mechanisms of Hepatic Triglyceride Accumulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 4, p. 434-441, 2013.

KELLY, D. D. Sexual differentiation of the nervous system. **Principles of Neural Science**, 3 ed. Prentice-Hall, Connecticut, p. 959-973, 1991.

KISSANE, Z.; SHEPHARD, J. M. The rise of glyphosate and new opportunities of biosentinel early-warning studies. **Conservation Biology**, v. 00, p. 1-8, 2017.

KIM, Y. H.; HONG, J. R.; GIL, H. W.; SONG, H. Y.; SONG, S. Y.; Mixtures of glyphosate and surfactant TN20 accelerate cell death via mitochondrial damage-induced apoptosis and necrosis. **Toxicology In Vitro**, v. 27, p. 191-197, 2013.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, p. 635-643, 2000.

LAMB, D. C.; KELLY, D. E.; HANLEY, S. Z.; MEHMOOD, Z.; KELLY, S. L. Glyphosate is a Inhibitor of Plant Cytochrome P450: Funcional Expression of ThlaspiArvensae Cytochrome P45071B1/Reductase fusion protein in *Eschericia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 244, p. 110-114, 1998.

LAVOIE, J. C.; CHESSEX, P. Gender and Maturation Affect glutathione Status in Human Neonatal Tissues. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, p. 648-657, 1997.

LEANDRO, C. G.; AMORIM, M. F.; HIRABARA, S. M.; CURI, R.; CASTRO, R. M. Pode a Atividade Física Materna Modular a Programação Fetal Induzida pela Nutrição? **Revista de Nutrição**, v. 22, p. 559-569, 2009.

LIMA, R. M. Obesidade: O Mal do Século. **Revista Perspectivas**, v. 4, n. 8, p. 86-99, 2005.

LIU, Q.; BENGMARK, S.; QU, S. The Role of Hepatic Fat Accumulation in Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 42, 2010.

LUCAS, A. Programming in Early Nutrition in Man. **Ciba Foundation Symposium**, v. 156, p. 38-53, 1991.

MABLY, T. A.; MOORE, R. W.; PETERSON, R. E. In utero and lactation exposure of mal rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 114, p. 97-107, 1992.

MACINNIS, R.J.; ENGLISH, D.R. Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. **Cancer Causes Control**, v. 17, n. 8, p. 989-1003, 2006.

MARCHESINI, G.; BUGIANESI, E.; FORLANI, G.; CERRELLI, F.; LENZI, M.; MANINI, R.; NATALE, S.; VANNI, E.; VILLANOVA, N.; MELCHIONDA, N.; RIZZETTO, M. Nonalcoholic Fatty Liver, Steatohepatitis and the Metabolic Syndrome. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 917-923, 2003.

MARTI, A.; MARCOS, A.; MARTINEZ, J. Obesity and immune function relationships. **Obesity Reviews**, v. 2, p. 131-140, 2001.

MARTINS, R. M. A. **Origens Fetais de Doenças do Adulto**– Revisão Etiopatogênica da Doença mais Investigada: Diabetes Mellitus tipo II. 2009. 34p. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Universidade do Porto, Portugal.

MARTYN, J. A. J.; KANEKI, M.; YASUHARA, S. Obesity-induced Insulin Resistance and Hyperglycemia. **Anesthesiology**, v. 109, n. 1, p. 137-148, 2008.

McARDLE, H. J.; ANDERSEN, H. S.; AMBLING, L. Fetal Programming: Causes and Consequences as Revealed by Studies of Dietary Manipulation in Rats – a Review. **Placenta**, v. 27, p. 56-60, 2006.

McMILLEN, C.; ROBINSON, J. S. Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity and Programming. **Physiology Reviews**, v. 85, p. 571-633, 2005.

MENDONCA, C. P.; ANJOS, L. A. Aspectos das Práticas Alimentares e da Atividade Física como Determinantes do Crescimento do Sobrepeso/Obesidade no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 3, p. 698-709, 2004.

MERRILL, M.; KAREY, E.; MOSHIER, E.; LINDTNER, C.; FRANO, M. R.; NEWMAN, J. W.; BUETTNER, C. Perinatal Exposure of Mice to the Pesticide DDT Impairs Energy Expenditure and Metabolism in Adult Female Offspring. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

MESNAGE, R.; ARNO, M.; COSTANZO, M.; MALATESTA, M.; SERALINI, G-E.; ANTONIOU, M. N. Transcriptome Profile Analysis Reflects Rat Liver and Kiney Damage Following Chronic Ultra-Low Dose Roundup Exposure. **Environmental Health**, v. 14, n. 70, 2015.

MONTEIRO, A.; ANGELIS, I. Cirurgia bariátrica: uma opção de tratamento para a obesidade mórbida. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 1, n. 3, p. 19-26, 2007.

MORRISSEY, R. E.; SCHWETZ, B. A.; LAMB, J. C.; ROSS, M. D.; TEAGUE, J. L.; MORRIS, R. W. Evaluation of Rodent Sperm, Vaginal Cytology and Reproductive Organ Weight Data from National Toxicology Program 13-week Studies. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 11, p. 343-358, 1988.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Nonalcoholic Steatohepatitis and the Metabolic Syndrome. **American Journal of Medicine and Science**, n. 330, p. 326-335, 2005.

NGUYEN, P.; LERAY, V.; DIEZ, M.; SERISIER, S.; LE BLOC'H, J.; SILIART, B.; DUMON, H. Liver Lipid Metabolism. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 272-283, 2008.

NISSEN, P. M.; NEBEL, C.; OKSBJERG, N.; BERTRAM, H. C.. Metabolomics Reveals Relationship between Plasma Inositols and Birth Weight: Possible Markers for Fetal Programming of Type 2 Diabetes. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011/1110-7243, p. 1110-7251, 2011.

NÜSKEN, K. D.; SCHNEIDER, H.; PLANK, C.; TROLLMANN, R.; NUSKEN, E.; RASCHER, W.; DOTSCHE, J. Fetal Programming of Gene Expression in Growth-Restricted Rats Depends on the Cause of Low Birth Weight. **Endocrinology**, v. 152, p. 1327-1335, 2011.

OETKEN, M.; BACHMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; OEHLMANN, J. Evidence for Endocrine Disruption in Invertebrates. **International Review of Cytology**, v. 236, p. 1-44, 2004.

OLIVEIRA-SILVA, J. S.; ALVES, S. R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P. N.; MATTOS, R. C. O. C.; MOREIRA, J. C. Influência de Fatores Socioeconômicos na Contaminação por Agrotóxicos, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 13-135, 2001.

OLSHANSKY, S. J.; PASSARO, D. J.; HERSHOW, R. C.; LAYDEN, J.; CARNES, B. A.; BRODY, J.; HAYFLICK, L.; BUTLER, R. N.; ALLISSON, D. B.; LUDWING, D. S. A Potential Decline in Life Expectancy in the United States in the 21st Century. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 11, 2005.

OMRAN, N. E.; SALAMA, W. M. The Endocrine Disruptor Effect of the Herbicides Atrazine and Glyphosate on *Biomphalaria alexandrina* snails. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 4, p. 656-665, 2016.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The Insulin Receptor – A Critical Link in Glucose Homeostasis and Insulin Action. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 89-110, 1998.

PEIXOTO, F. Comparative Effects of the Roundup and Glyphosate on Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, p. 1115-1122, 2005.

PINTO, G. M. F.; PINTO, J. F.; FILHO, R. M. Avaliação de Contaminação Ambiental Causada por Poluentes Orgânicos Persistentes Utilizando Simulação Computacional. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 565-568, 2007.

RAVELLI, A. C.; VAN DER MEULEN, J. H.; MICHELS, R. P.; OSMOND, C.; BARKER, D. J.; HALES, C. N.; BLEKER, O. P. Glucose Tolerance in Adults After Prenatal Exposure to Famine. **Lancet**, v. 351, p. 173-177, 1998.

REMMERS, F.; DELEMARRE-VAN DE WALL, H. A. Developmental Programming of Energy Balance and its Hypothalamic Regulation. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 2, p. 272-311, 2011.

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.

RIKANS, L. E.; HORNBROOK, K. R. Lipid Peroxidation, Antioxidant Protection and Aging. **Biochimicaet Biophysica Acta**, v. 1362, p. 116-127, 1997.

RINAUDO, P.; WANG, E. Fetal Programming and Metabolic Syndrome. **Annual Review of Physiology**, v. 74, p. 107-130, 2012.

RUI, L. Energy Metabolism in the Liver. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 1, p. 177-197, 2014.

SAHU, A. Minireview: A hypothalamic Role in Energy Balance with Special Emphasis on Lepitin. **Endocrinology**, v. 145, p. 2613-2620, 2004.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate, pathways to modern diseases IV: cancer and related pathologies. **The Journal of Biological Physics and Chemistry**, v. 15, p. 121-159, 2015.

SANTOS, J. R.; ENUMO, S. R. F. Adolescentes com Diabetes Mellitus tipo 1: Seu Cotidiano e Enfrentamento da Doença. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 16, n. 2, p. 411-425, 2003.

SCHONBRUNN, E.; ESCHENBURG, S.; SHUTTLEWORTH, W. A.; SCHLOSS, J. V.; AMRHEIN, N.; EVANS, J. N.; KABSCH, W. Interaction of the Herbicide Glyphosate with its Target Enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phospate Synthase in atomic detail. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 98, p. 1376-1380, 2001.

SOWERS, J. R. Obesity and Cardiovascular Disease. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8, pt. 2, p. 1821-1825, 1998.

SPASSIANI, N. A.; KUK, J. L. Exercise and Fatty Liver. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 33, n. 4, p. 802-807, 2008.

SRINIVASAN, K.; VISWANAD, B.; ASRAT, L.; KAUL, C. L.; RAMARAO, P. Combination of High-Fat Diet-Fed and Low-Dose Streptozotocin-Treated Rat: A Model of type 2 Diabetes and Pharmacological Screening. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 313-320, 2005.

STEMMER, K.; PEREZ-TILVE, D.; ANANTHAKRISHNAN, G.; BORT, A.; SEELEY, R. J.; TSCHOP, M. H.; DIETRICH, D. R.; PFLUGER, P. T. High-fat-diet-induced obesity causes an inflammatory and tumor-promoting microenvironment in the rat kidney. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, 2012.

SUN, Y. Free Radical, Antioxidant Enzymes, and Carcinogenesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, p. 583-599, 1990.

TAKAHASHI, M.; HORIE, M.; AOBA, N. Analysis of Glyphosate and its Metabolite, Aminomethylphosphonic Acid, in Agricultural Products by HPLC. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, v. 42, p. 304-308, 2001.

TAYLOR, K. W.; NOVAK, R. F.; ANDERSON, H. A.; BIRNBAUM, L. S.; BLYSTONE, C.; DEVITO, M.; JACOBS, D.; KOHRLE, J.; LEE, D.; RYLANDER, L.; RIGNELL-HYDBOM, A.; TORNERO-VELEZ, R.; TURYS, M. E.; BOYLES, A. L.; THAYER, K. A.; LIND, L. Evaluation of the Association between Persistent Organic Pollutants (POPs) and Diabetes in Epidemiological Studies: A National Toxicology Program Workshop Review. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 7, 2013.

THAYER, K. A.; HEINDEL, J. J.; BUCHER, J. R.; GALLO, M. A. Role of Environmental Chemicals in Diabetes and obesity: a National Toxicology Program Workshop Report. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, p. 779-789, 2012.

TIZHE, E. V.; IBRAHIM, N. D-G.; FATIHU, M. Y.; ONYEBUCHI, I. I.; GEORGE, B. D. J.; AMBALI, S. F.; SHALLANGWA, J. M. Influence of 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.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C. Análise da Contaminação dos Sistemas Hídricos por Agrotóxicos numa Pequena

Comunidade Rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006.

VELKOSKA, E.; COLE, T. J.; DEAN, R. G.; BURRELL, L. M.; MORRIS, M. J. Early Undernutrition Leads to Long-Lasting Reductions in Body Weight and Adiposity Whereas Increased Intake Increases Cardiac Fibrosis in Male Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 1622-1627, 2008.

VICKERS, M. H.; BREIER, B. H.; CUTFIELD, W. S.; HOFMAN, P. L.; GLUCKMAN, P. D. Fetal Origins in Hyperphagia, Obesity and Hypertension and Postnatal Amplification by Hypercaloric Nutrition. **American Journal of Endocrinology Metabolic**, v. 279, p. E83-E87, 2000.

VICKERS, M. H.; BREIER, B. H.; MCCARTHY, D.; GLUCKMAN, P. D. Sedentary Behavior During Postnatal Life is Determined by the Prenatal Environment and exacerbated by Postnatal Hypercaloric Nutrition. **American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 154-1, p. 271-273, 2003.

VIVIAN, D. C. L.; CLAUDIA, B. R. M. Toxicity and Effects of a Glyphosate-Based herbicide on the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 147, n. 2, p. 222-231, 2007.

WALLEY, A. J.; BLAKEMORE, A. I. F.; FROGUEL, P. Genetics of Obesity and the Prediction of Risk for Health. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 2, p. 124-130, 2006.

WALSH, L. P.; McCORMICK, C.; MARTIN, C.; STOCCO, D. M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 769-776, 2000.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 21 maio 2016.

_____**World Health Organization**. 1994. Disponível em <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>>. Acesso em 21 de jun. 2016.

_____**World Health Organization**. 2015. Representação do Brasil. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Brasília, DF, 2012.

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.

WILLMORE, J.; COSTILL, D. **Fisiologia do Esporte e do Exercício**. São Paulo – SP, Manole, 2001.

YOUSEF, M. I.; SALEM, M. H.; BERTHEUSSEN, K. Toxic Effects of Carbofuran and Glyphosate on Semen Characteristics in Rabbits. **Journal Environmental Science and Health, Part B**, v. 30, n. 4, p. 513-534, 1995.

ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito da exposição ao herbicida glifosato durante a gestação e lactação sobre o metabolismo lipídico da prole adulta de camundongos C57BL/6

Efeito da exposição ao herbicida glifosato durante a prenhez e lactação sobre o metabolismo lipídico hepático da prole adulta de camundongos machos

C57BL/6

Rodrigo Vargas¹; Jakeline Liara Teleken¹; Ellen Carolina Zawoski Gomes¹;
João Paulo de Arruda Amorim²; Maria Lúcia Bonfleur¹; Sandra Lucinei Balbo^{1,*}

¹Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil.

²Laboratório de Histologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil.

Palavras-chave: Esteatose, Fígado, Programação, Roundup.

Título rápido: Glifosato altera o metabolismo lipídico hepático

Seção da revista: Biomedical Scienses

* Autor correspondente: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel 85819-110, PR, Brasil.

Endereço de e-mail: slbalbo@hotmail.com (Sandra Lucinei Balbo)

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi analisar se a exposição materna ao glifosato, durante a prenhez e lactação, altera o metabolismo lipídico hepático da prole adulta de camundongos machos alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica. Camundongos fêmeas C57BL/6 receberam água potável durante prenhez e lactação (grupo CTL) ou receberam a adição de 0,5% de Glifosato (Roundup original DI®) na água de beber (grupo GF). Ambos os grupos receberam ração comercial para roedores. Aos 60 dias de vida a prole (F1) foi separada em quatro grupos: CTL-DP-F1 e CTL-DH-F1, filhos de mães CTL alimentados com dieta padrão e hiperlipídica, respectivamente, e GF-DP-F1 e GF-DH-F1, filhos de mães GF alimentados com dieta padrão e hiperlipídica, respectivamente. Aos 150 dias de vida as proles foram eutanasiadas. Avaliou-se o acúmulo de gordura no tecido adiposo e perfil lipídico plasmático, bem como a histologia e perfil lipídico hepático. A exposição intrauterina ao glifosato induziu inflamação no fígado, aumentou o peso deste órgão e o conteúdo de colesterol e triglicerídeos. Os estoques de lipídios no tecido adiposo e fígado, bem como a dislipidemia, características da ingestão de dieta hiperlipídica, foi significativamente mais branda na prole adulta de ratos submetidos à exposição ao herbicida glifosato durante gestação e lactação, quando comparada a prole de mães controles. Conclui-se que a exposição perinatal ao glifosato induz injúrias no metabolismo de lipídios da prole adulta.

INTRODUÇÃO

Evidências demonstram que perturbações ou insultos gerados por alterações nutricionais e/ou metabólicas, assim como à exposição a agentes tóxicos em períodos críticos do desenvolvimento, podem ser responsáveis por efeitos adversos na vida adulta aumentando a prevalência de doenças não comunicáveis (CERF, 2015). O conceito DOHaD (do inglês “*Developmental Origins of Health and Disease*”) auxilia na compreensão do cenário atual devido às evidências epidemiológicas e experimentais convergirem para conexão entre o ambiente nutricional no início da vida e as alterações metabólicas na vida adulta (LUCAS, 1991; EBERLE; AMENT, 2012). Dentre estes insultos destaca-se à exposição aos agrotóxicos.

De acordo com a OMS 2010, a exposição aos agrotóxicos é considerada um problema de saúde pública mundial devido à relação com o desenvolvimento de diversas doenças. Dentre os diferentes tipos de agrotóxicos, o herbicida glifosato (N-fosfometil-glicina [$C_3H_8NO_5P$]) destaca-se como o herbicida mais utilizado no controle de pragas (JASPER et al., 2012). O glifosato é um herbicida não seletivo, de ação sistêmica do grupo químico glicina substituída, cuja formulação comercial mais conhecida é o Roundup® da Monsanto. Apesar de o glifosato ser classificado como um produto químico de baixa toxicidade (WILLIAMS et al., 2000), este herbicida pode contaminar organismos, incluindo os seres humanos, assim como alimentos, rações e ecossistemas (TAKAHASHI et al., 2001; ACQUAVELLA et al., 2004; CONTARDO-JARA et al., 2009). Estudos em roedores mostram que

a exposição direta ao glifosato, mesmo em baixa concentração, causa danos morfofuncionais em praticamente todos os órgãos: estômago, rim, cérebro, pâncreas, gônadas, coração, baço e fígado (DELLEGRAVE et al., 2007; AYOOLA, 2008; ROMANO et al., 2012; CAVALLI et al, 2013; CHLOPECKA et al., 2014; TIZHE et al., 2014; MESNAGE et al., 2015; OMRAN; SALAMA, 2016; SOUZA et al., 2017).

Em relação à exposição materna ao glifosato durante períodos críticos do desenvolvimento e seus efeitos sobre a prole, a literatura é bem escassa (DARUICH et al 2001; BEURET et al 2005; DALLEGRAVE et al., 2007, ROMANO et al., 2010; ROMANO et al., 2012). Especificamente sobre as alterações hepáticas, foi demonstrado que a exposição materna ao glifosato durante a prenhez de ratas *Wistar*, aumenta a lipoperoxidação hepática materna e na prole, sendo maior nos filhotes em relação às matrizes. Além disso, há aumento na enzima hepática glutathione peroxidase nos filhotes (BEURET et al., 2005). Também foram demonstradas alterações dose-dependentes na enzima isocitrato desidrogenase tanto nas mães como nos filhotes após exposição materna ao glifosato durante prenhez (DARUICH et al., 2001).

Devido aos efeitos adversos e considerando a escassez de estudos nesta área, bem como a grande exposição atual aos agrotóxicos, torna-se evidente a importância do desenvolvimento de estudos que relacionem a exposição a estes agentes tóxicos durante períodos críticos do desenvolvimento e as alterações morfofuncionais que podem ser ocasionadas na vida adulta da prole. Assim neste trabalho, nosso objetivo foi analisar se a exposição materna ao glifosato, durante a prenhez e lactação, altera o

metabolismo lipídico hepático da prole adulta de camundongos alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica.

METODOLOGIA

Composto químico

O composto químico utilizado no presente estudo foi o Roundup Original DI® (Monsanto, Brasil), uma formulação comercial de glifosato, composto de 445 g/L de sal de diamônio de glifosato, 370 g/L de equivalente ácido e surfactantes como o polietoxetilenina (POEA).

Obtenção dos animais

Todos os procedimentos experimentais descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Camundongos adultos da linhagem C57BL/6 com 60 à 90 dias de vida, \pm 25g, 6 machos e 12 fêmeas, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM), desta mesma instituição, sob condições de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura ($28\pm 2^\circ\text{C}$) controladas, onde foram mantidos por, aproximadamente, uma semana para aclimatação em caixas próprias de polipropileno com forragem de maravalha.

Acasalamentos e grupos experimentais

Caracterizado o ciclo estral das fêmeas, os animais foram induzidos ao cruzamento. Foi adotada a proporção de um macho para cada duas fêmeas, de maneira com que se obtenham linhagens geneticamente diferentes entre os animais analisados. A indução ao cruzamento ocorreu somente no período noturno. Após a fertilização, determinada pelo esfregaço vaginal, foi considerado o dia 0 e as fêmeas foram separadas aleatoriamente em dois grupos: 1) Grupo Controle (CTL) com seis fêmeas, que recebeu dieta padrão para roedores (BioBase, Águas Frias, SC, BRA) e água a vontade e 2) Grupo Glifosato (GF) com seis fêmeas, que recebeu dieta padrão e água com 0,5% da formulação comercial de glifosato (1ml GF/200ml H₂O), dose considerada baixa e similar aquelas encontradas nas águas após praticas agrícolas (CASSAULT-MEYER et al., 2014). O tratamento ocorreu desde o dia quatro da gestação até o 30º dia pós-natal. A ninhada foi selecionada somente após o 4º dia pós-natal para minimizar os efeitos comportamentais da matriz na lactação, sendo selecionados, aleatoriamente, quatro machos de cada prole. Após o 30º dia pós-natal, as proles foram desmamadas e receberam dieta padrão e água à vontade. Uma semana após o desmame, as matrizes foram eutanasiadas. No 60º dia pós-natal a prole foi separada em quatro grupos: os animais do grupo CTL subdivididos em 1a) Grupo CTL-DP-F1 (n=12), que mantiveram a mesma suplementação alimentar e 1b) Grupo CTL-DH-F1 (n=6), que recebeu dieta com alto teor de gordura e água a vontade; os animais do grupo GF foram

subdivididos em 2a) Grupo GF-DP-F1 (n=5), que continuaram recebendo a dieta padrão e água à vontade e 2b) Grupo GF-DH-F1 (n=6), que recebeu dieta com alto teor de gordura e água a vontade. A dieta hiperlipídica foi previamente descrita (Barella *et al.*, 2015) e sua composição está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição da dieta hiperlipídica e dieta padrão

Ingredientes [g (kg dieta) ⁻¹]	Dieta padrão (DP)	Dieta hiperlipídica (DH)
Caseína	200	200
Sacarose	100	100
Amido de milho	427.5	115.5
Amido dextrinado	132	132
Banha de porco	-	312
Óleo de soja	40	40
Celulose microcristalina	50	50
Mix mineral (AIN-93)	35	35
Mix vitamínico (AIN-93)	10	10
L-Cistina	3.0	3.0
Bitartarato de colina	2.5	2.5

Pesagem dos animais e controle hídrico alimentar

As proles foram pesadas individualmente e semanalmente, dos 60 aos 150 dias, para acompanhamento da evolução do peso corporal. O consumo alimentar também foi acompanhado semanalmente, sendo o consumo calculado pela razão entre a quantidade de alimento ofertada e a quantidade de alimento restante, dividido pelo número de animais em cada caixa. A ingestão calórica foi calculada pela quantidade de quilocalorias por grama de alimento (dieta padrão = 3,8 kcal/g, dieta hiperlipídica = 5,35 kcal/g).

Avaliação da obesidade

Após 8 horas de jejum, uma amostra de sangue foi coletada da cauda dos animais para análise da glicemia com ajuda de um glicosímetro (Tech Free®, SD, Biosensor, Korea). Aos 150 dias de vida os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (Anasedan®, Vetbrands, Brasil) e cloridrato de ketamina (Dopalen®, Vetbrands, Brasil) na concentração 9mg/kg e 90mg/kg, respectivamente, e eutanaziados por exsanguinação. O peso corporal e o comprimento naso-anal (CNA) foram obtidos para o cálculo do índice de Lee, (raiz cúbica do peso corporal (g) dividido pelo CNA (cm), multiplicado por 1000). As gorduras retroperitoneal e perigonadal foram coletadas e pesadas, assim como o fígado.

Parâmetros bioquímicos

O sangue coletado foi centrifugado a 4.000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos. Do plasma coletado, foi realizada a quantificação de colesterol (COL) e triglicerídeos (TG) e os valores foram mensurados através de kits comerciais, de acordo com as instruções do fabricante (Laborclin®, Bioliquid, Pinhais, PR, BRA).

Extração lipídica do fígado

Amostras do lobo hepático esquerdo de cada animal foram removidas e preservadas a -84°C, para posterior extração lipídica. O tecido foi descongelado e macerado com Politron. Em seguida, foi adicionado 20x o peso

do tecido de solução clorofórmio/metanol (solução de Folch) na proporção de 2:1. Os tubos foram deixados em repouso overnight à temperatura ambiente, para extração dos lipídios. No dia seguinte, o extrato foi filtrado, em papel filtro, em frascos previamente pesados os quais foram secados sob uma atmosfera de N₂. A quantidade de gordura extraída foi determinada gravimetricamente (FOLCH et al., 1957). O extrato evaporado foi diluído em isopropanol. O conteúdo hepático de COL e TG foi mensurado através de kits comerciais, de acordo com as instruções do fabricante (Laborclin®, Bioliquid, Pinhais, PR, BRA).

Análise histológica

Um fragmento do lóbulo direito hepático foi removido de cada animal, em corte transversal do centro em direção a margem do órgão. As amostras foram fixadas em formol de Carson (formaldeído 37% (100 mL), metanol (15 mL) e PBS pH 7,4 (885 mL)) por 24 horas, lavadas em água corrente, desidratadas em série crescente de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em paraplast® (Sigma Co, St Louis, MO). Foram realizados cortes com 5µm de espessura, utilizando micrótomo rotativo manual (Olympus 4060), equipado com navalha de aço. Os cortes obtidos foram submetidos à técnica de coloração por hematoxilina-eosina (HE) para análise da esteatose hepática (KLEINER et al., 2003) e pelo tricrômio de Mallory para identificação de fibras colágenas. Na obtenção das imagens, foi utilizado microscópio óptico (Olympus BX61) equipado com câmera digital Olympus DP71 e software DP Controller 3.2.1.276.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para avaliação estatística entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. O *software* utilizado para as análises estatísticas foi o *GraphPadPrism*® versão 6.00 para *Windows* (San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Parâmetros corporais e plasmáticos

O ganho de peso corporal durante o período experimental foi similar entre os animais do grupo CTL-DP-F1 e GF-DP-F1 (Figura 1A e D). Os animais que ingeriram dieta hiperlipídica, tanto do grupo CTL-DH-F1 quanto do grupo GF-DH-F1, apresentaram ganho de peso maior em relação aos que ingeriram dieta padrão ($p < 0,0001$). Este parâmetro foi significativamente menor nos animais do grupo GF-DH-F1 em relação aos CTL-DH-F1 ($p = 0,0158$) (Fig. 1A e D). O consumo alimentar foi maior nos grupos CTL-DP-F1 e GF-DP-F1 em relação aos animais que ingeriram dieta hiperlipídica ($p < 0,0001$) (Fig. 1C e F). Resultados similares foram observados em relação à ingestão calórica ($p = 0,0014$), exceto o grupo GF-DP-F1 que foi semelhante a todos os demais grupos (Fig. 1B e E).

Aos 150 dias de vida os parâmetros corporais foram similares entre os animais do grupo CTL-DP-F1 e GF-DP-F1 (Tab. 2). A ingestão de dieta

hiperlipídica aumentou o peso corporal e o acúmulo de gordura nos animais do grupo CTL-DH-F1 em relação aos demais grupos (Tab. 2). Nos animais do grupo GF-DH-F1, a dieta não influenciou o peso corporal em relação aos grupos CTL-DP-F1 e GF-DP-F1, porém aumentou em 75 e 60% o peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal, respectivamente. Interessantemente, o acúmulo de gordura foi aproximadamente 50% menor nos animais GF-DH-F1 em relação ao grupo CTL-DH-F1 (Tab. 2).

Observa-se na tabela 2 que a concentração plasmática de glicose foi significativamente maior nos animais que receberam dieta hiperlipídica (CTL-DH-F1 e GF-DH-F1) ($p < 0,0001$). As concentrações plasmáticas de colesterol e triglicerídeos foram similares entre os grupos CTL-DP-F1 e GF-DP-F1 e significativamente menores em relação ao grupo CTL-DH-F1 (Tab. 2) ($p < 0,0001$).

Tabela 2 – Parâmetros corporais e plasmáticos nos animais dos grupos CTL-DP-F1, CTL-DH-F1, GF-DP-F1, e GF-DH-F1 aos 150 dias de vida.

	CTL-DP-F1	CTL-DH-F1	GF-DP-F1	GF-DH-F1
Peso corporal (g)	24,8 ± 0,4 ^b	35,4 ± 1,5 ^{a,c,d}	23,7 ± 0,9 ^b	27,9 ± 0,9 ^b
Comprimento nasoanal (cm)	9,2 ± 0,1	9,5 ± 0,1 ^c	8,9 ± 0,1 ^b	9,3 ± 0,1
Índice de Lee	309,6 ± 2,3 ^{b,d}	344,6 ± 4,3 ^{a,c,d}	321,1 ± 3,2 ^b	326,3 ± 5,6 ^{a,b}
Gordura retroperitoneal (% PC)	0,2 ± 0,1 ^{b,d}	1,7 ± 0,2 ^{a,c,d}	0,2 ± 0,1 ^{b,d}	0,8 ± 0,2 ^{a,b,c}
Gordura perigonadal (% PC)	1,0 ± 0,1 ^{b,d}	4,7 ± 0,4 ^{a,c,d}	0,9 ± 0,1 ^{b,d}	2,5 ± 0,6 ^{a,b,c}
Glicose (mg/dL)	96,7 ± 5,2 ^{b,d}	145,8 ± 7,1 ^{a,c}	92,3 ± 2,0 ^{b,d}	139,2 ± 4,3 ^{a,c}
Colesterol (mg/dL)	71,5 ± 4,0 ^b	133,3 ± 15,4 ^{a,c,d}	60,8 ± 1,2 ^b	87,1 ± 5,1 ^b
Triglicerídeos (mg/dL)	112,6 ± 6,3 ^{b,d}	224,3 ± 8,5 ^{a,c,d}	146,2 ± 9,7 ^b	162,7 ± 8,9 ^{a,b}

Dados expressos como média ± EPM (n= 5-12 animais, de 5-12 ninhadas). Diferentes letras sobre as médias indicam diferenças estatísticas entre os grupos. Análise de variância ANOVA de duas vias, seguida do pós teste de *Tukey*. P<0,05.

Parâmetros hepáticos

Observa-se na figura 2A que a exposição ao glifosato no período de gestação e lactação aumentou significativamente o peso do fígado na prole do grupo GF-DP-F1 quando comparado ao grupo CTL-DP-F1 (p=0,0015), e os animais dos grupos CTL-DH-F1 e GF-DH-F1 tiveram o peso deste órgão reduzido em relação aos que não ingeriram a dieta (p<0,0001). Entretanto, destaca-se que o peso do fígado dos animais GF-DH-F1 foi maior em relação ao grupo CTL-DH-F1 (Fig. 2A). O conteúdo total de lipídios do fígado foi semelhante entre os grupos CTL-DP-F1 e GF-DP-F1 (Fig. 2B), diferentemente do conteúdo de triglicerídeos que foi significativamente maior nos animais do grupo GF-DP-F1 em relação ao CTL-DP-F1 (Fig. 2D). Ambos os parâmetros foram maiores nos animais CTL-DH-F1 em relação aos CTL-DP-F1. No entanto, a prole que foi exposta ao glifosato e recebeu dieta hiperlipídica (GF-

DH-F1), apresentou menor conteúdo total de lipídios no fígado em relação à prole que foi exposta ao agrotóxico, mas não recebeu dieta (GF-DP-F1) (p -interação=0,0003). Na figura 2C observa-se que o conteúdo de colesterol do fígado foi significativamente menor no grupo CTL-DP-F1 em relação aos demais grupos estudados.

Análise histomorfológica

Os animais dos grupos que receberam dieta padrão (CTL-DP-F1 e GF-DP-F1) apresentaram tecido hepático com aspectos normais, sem acúmulo de gordura no interior dos hepatócitos ou deposição acentuada de tecido conjuntivo (Fig. 3A e B) (Tab. 3). Entretanto, os fígados dos animais que receberam a dieta hiperlipídica (CTL-DH-F1 e GF-DH-F1) apresentaram hepatócitos contendo vacúolos, núcleo deslocado para a periferia e delimitado por, às vezes, largos tecidos conjuntivos e infiltrados inflamatórios, característicos da esteatose (Fig. 3C-E). Observa-se na tabela 3 que 50% dos animais do grupo CTL-DH-F1, apresentaram esteatose grau 3 e 17% esteatose grau 1 (Fig. 3D). Além disso, 66,67% destes animais apresentaram esteatose microvesicular (Tab. 3) (Fig. 3D). Entretanto somente 40% dos animais do grupo GF-DH-F1 apresentaram esteatose grau 1 e não apresentaram esteatose microvesicular (Tab. 3) (Fig. 3E).

Na análise de tecido conjuntivo, os grupos que receberam dieta padrão não apresentaram acúmulo de tecido conjuntivo evidente no tecido hepático (Tab. 3). Entretanto, entre os grupos que receberam a dieta hiperlipídica, 66,67% dos animais do grupo CTL-DH-F1 apresentaram fibrose,

predominantemente na região periférica do lobo hepático (50%) (Fig. 3E). Diferentemente, nos animais do grupo GF-DH-F1 constatou-se o surgimento de fibrose na região periférica aos vasos hepáticos centrais (40%) (Tab. 3).

Enquanto nos animais do grupo CTL-DP-F1 não foram observados focos inflamatórios no tecido hepático, nos demais grupos foram observados infiltrados de leucócitos, característicos de processo inflamatório, em aproximadamente 60% das amostras analisadas (Tab. 3) (Fig. 3G e H). Não foi observada balonização nos hepatócitos em nenhum dos grupos estudados (Tab.3).

DISCUSSÃO

Atualmente, existe uma grande preocupação em relação aos efeitos da exposição aos agrotóxicos durante períodos críticos de desenvolvimento e seus consequentes impactos na vida adulta dos seus descendentes. Em nosso estudo, camundongos fêmeas que receberam glifosato durante a prenhez e lactação, apresentaram menor peso corporal e menor consumo alimentar e hídrico em relação aos animais controles (dados não apresentados). Estes resultados corroboram com dados da literatura que demonstraram que a administração de 0,5 ou 1% de glifosato a ratas Wistar durante prenhez, leva à redução do peso corporal e do consumo alimentar e hídrico (DARUICH et al. 2001; BEURET et al 2005). Considerando as alterações maternas encontradas em nosso estudo e já relatadas por outros pesquisadores, fomos investigar as repercussões da exposição materna ao glifosato durante prenhez e lactação sobre o metabolismo lipídico da prole adulta quando exposta à dieta padrão ou hiperlipídica. De modo especial, analisamos os aspectos histológicos do fígado destes animais.

Primeiramente em relação aos aspectos corporais e plasmáticos, observamos que os camundongos GF-DP-F1 não apresentaram diferenças no peso corporal e no acúmulo de gordura em relação aos animais do grupo CTL-DP-F1. Entretanto os animais que ingeriram dieta hiperlipídica, tanto do grupo GF-DH-F1 quanto do grupo CTL-DH-F1, apresentaram maior peso corporal e peso das gorduras retroperitonal e perigonadal em relação aos camundongos que ingeriram dieta padrão. Surpreendentemente, os dois depósitos de gorduras analisados foram 50% menores nos animais do grupo GF-DH-F1 em

relação aos CTL-DH-F1, apesar do consumo alimentar não ter sido diferente. Interessantemente, observamos resultados similares em relação às concentrações plasmáticas de triglicerídeos e colesterol. Recentemente, estudos tem demonstrado os efeitos nocivos do glifosato sobre o sistema digestório. Um estudo *in vitro* demonstrou que em doses muito baixas, o glifosato afeta a motilidade espontânea do jejuno de ratos (CHLOPECKA et al., 2014). Ratos expostos a dose de 375 mg/Kg peso corporal de glifosato, apresentaram degeneração das células epiteliais que envolvem a muscular da mucosa do estômago assim, como de glândulas estomacais e das células acinares pancreáticas (TIZHE et al., 2014). Estudos também demonstram que o glifosato causa perturbações da comunidade bacteriana intestinal normal (SHEHATA et al., 2013; KRÜGER et al., 2013). Desta forma, sugerimos que a exposição materna ao glifosato durante a prenhez e a lactação, tenha alterado o funcionamento e/ou a morfologia do sistema digestório levando ao aumento na excreção de lipídios nas fezes dos animais do grupo GF-DH-F1, todavia estudos futuros são necessários para comprovar nossa hipótese.

O fígado é o principal órgão responsável pela detoxificação e metabolismo de compostos químicos, devido à capacidade de modificação dos xenobióticos. Lesões neste órgão podem ocorrer no início ou durante o desenvolvimento do organismo, podendo resultar em diversas patologias (BENEDETTI et al., 2004). Diversos trabalhos mostram que o fígado é um órgão bastante afetado pela exposição ao glifosato (BEURET et al., 2005; AYOOLA, 2008; JASPER et al., 2012; TIZHE et al., 2014; MESNAGE et al., 2015). No presente estudo observamos que a exposição materna ao glifosato durante prenhez e lactação provocou aumento no peso do fígado e no conteúdo de COL e TG hepáticos na prole adulta que recebeu dieta padrão.

Apesar das análises histológicas não demonstrarem esteatose, observamos inflamação no fígado destes animais. Daruich e colaboradores (2001) demonstraram que a exposição de ratas prenhas ao glifosato induz alterações na atividade enzimática no fígado das mães e dos fetos, porém dependentes da dose de 0,5% e 1,0%. A atividade da isocitrato desidrogenase (ICD) nas mães foi menor em 0,5% e maior em 1,0% quando comparadas ao grupo controle. O mesmo foi observado em relação a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e não houve alteração em relação a atividade da malato desidrogenase (MD). Em relação aos filhotes, observaram redução somente na ICD dos fetos de mães que receberam 1,0% do herbicida. Ratas Wistar expostas a dose de 1% de glifosato durante o período de prenhez assim como seus fetos a termo, apresentaram lipoperoxidação hepática. Além disso, os fetos apresentaram aumento da enzima glutathione peroxidase (BEURET et al 2005). Estudos tem demonstrado que o glifosato em vertebrados age inibindo enzimas da família do citocromo P450 (STARK et al., 1992; RICHARD et al, 2005; SAMSEL & SENEFF, 2013). A exposição ao glifosato pode causar perda de potencial transmembrana mitocondrial e resultar em estresse oxidativo no fígado (ASTIZ et al., 2009; PEIXOTO, 2005). Tanto a apoptose quanto a autofagia estão envolvidas nos mecanismos de toxicidade do glifosato (GUI et al., 2012).

A prole submetida à dieta hiperlipídica apresentou redução no peso do fígado em relação aos que não ingeriram a dieta. Porém, foi maior nos animais que foram expostos ao glifosato no período perinatal. De modo esperado os parâmetros lipídicos no fígado foram maiores nos animais CTL-DH-F1 em relação aos CTL-DP-F1. Também foi observado a instalação de esteatose grau 1 e principalmente grau 3 nos animais que receberam a dieta, além de

inflamação. Interessantemente, a prole de mães expostas ao glifosato e que recebeu dieta hiperlipídica apresentou conteúdo total de lipídios no fígado menores e conteúdo de TG e COL similares à prole que foi exposta ao agrotóxico, mas não recebeu dieta. Destaca-se que apesar da dieta provocar esteatose nos animais GF-DH-F1, foi em menor grau em relação à prole que recebeu dieta, mas suas mães não foram expostas ao glifosato. Este resultado reforça nossa hipótese de redução da absorção de gordura pelo intestino da prole adulta causada pela exposição materna ao glifosato. Provavelmente o aporte de gordura absorvido não foi igual ao CTL-DH-F1, o que explica a redução do grau de esteatose nos animais GD-DH-F1. Recentemente foi demonstrado que o glifosato provoca redução no conteúdo lipídico nas brânquias, fígado, músculo e rins de peixe (PECHIAMMAL & VASANTHI, 2017). Resultados semelhantes foram observados por outros autores (SORNARAJAN & SINGH, 2002; RITA & MILTON, 2006), que sugerem que as alterações no conteúdo de gordura nos tecidos de peixes expostos ao glifosato podem ser devidas a lesões mitocondriais provocadas pelo estresse tóxico do herbicida, o qual altera a função do ciclo do ácido cítrico afetando o mecanismo de oxidação de ácidos graxos.

Em resumo, demonstramos pela primeira vez que a exposição materna de camundongos ao glifosato leva à inflamação hepática na prole adulta masculina. Quando a prole é exposta à dieta hiperlipídica, observamos que os descendentes machos de mães expostas ao glifosato apresentam acúmulo de gordura no tecido adiposo e fígado, bem como dislipidemia mais branda em relação a prole de mães controle que receberam dieta hiperlipídica. Mais estudos são necessários para investigar se estes efeitos são decorrentes de

possíveis lesões mitocondriais que levam ao estresse oxidativo, causadas pela exposição materna ao glifosato.

Figura 1.

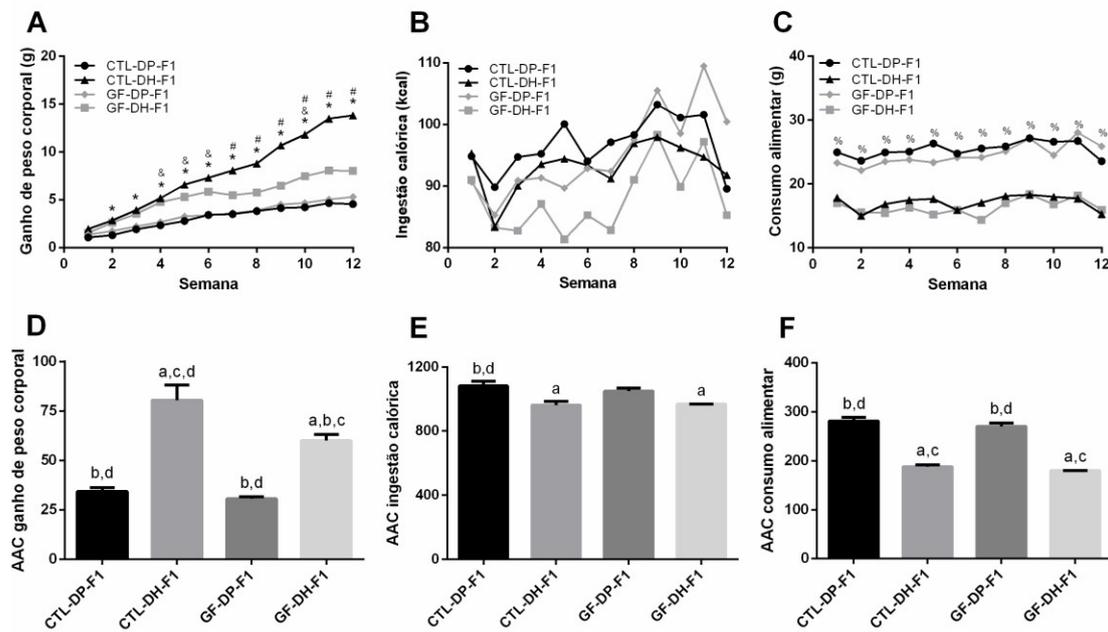


Figura 2.

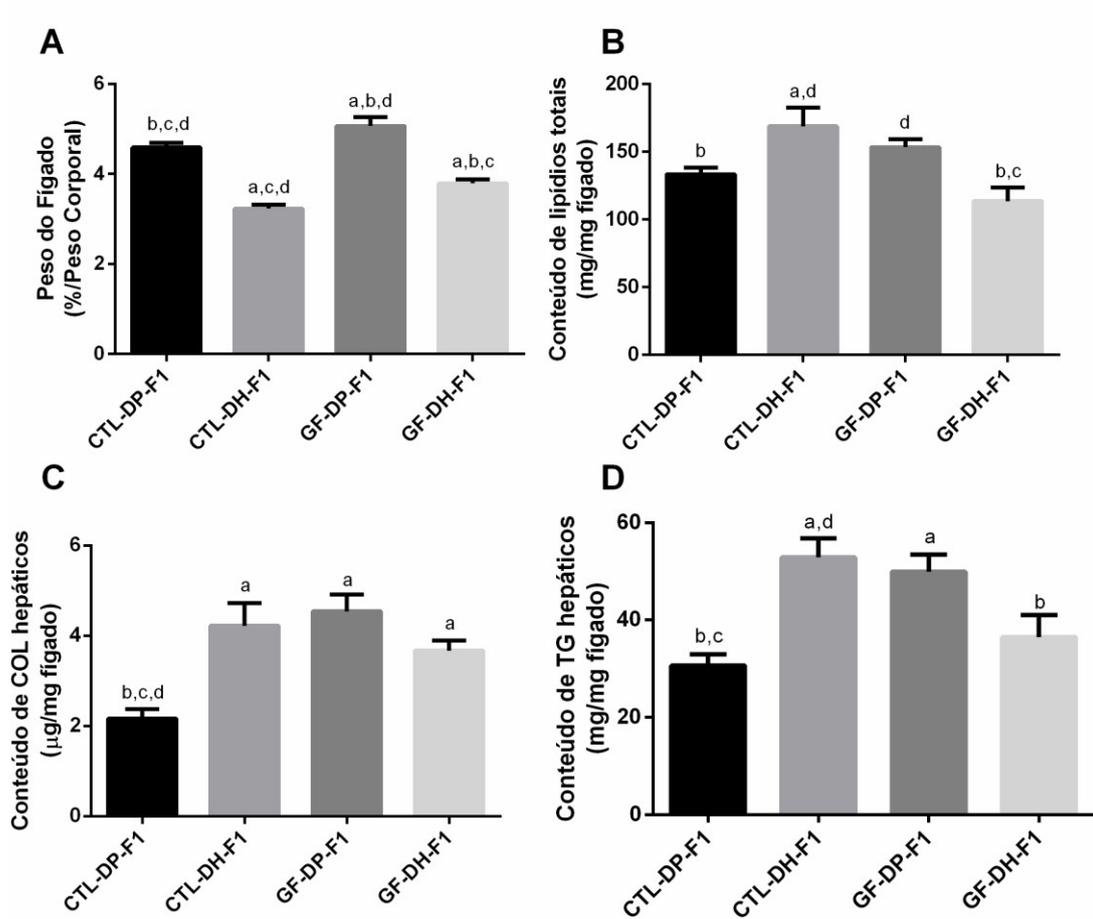


Figura 3.

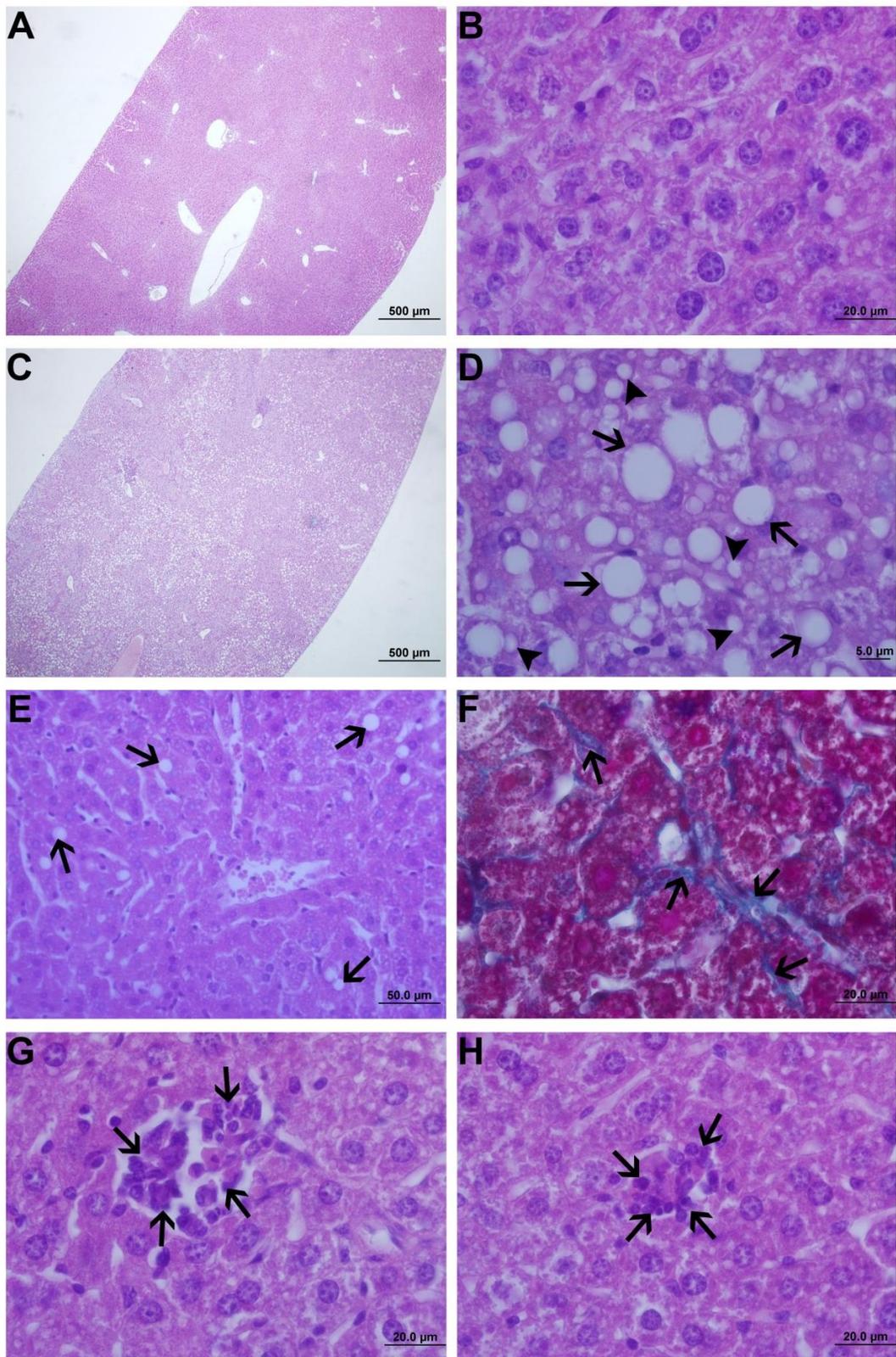


Tabela 3.

Item	Definição	Score/ Código	% Responsiva na categoria por grupo			
			CTL-DP-F1 (n=5)	CTL-DH-F1 (n=6)	GF-DP-F1 (n=5)	GF-DH-F1 (n=5)
Esteatose						
Grau	De baixo à médio poder de avaliação do envolvimento paracriminal pela esteatose					
	<5%	0	100%	33,33%	100%	60%
	5% - 33%	1	0%	16,67%	0%	40%
	>33% - 66%	2	0%	0%	0%	0%
	>66%	3	0%	50%	0%	0%
Localização	Distribuição predominante					
	Zona 3	0	0%	0%	0%	40%
	Zona 1	1	0%	33,33%	0%	40%
	Azonal	2	0%	66,67%	0%	20%
	Paracinar	3	0%	0%	0%	0%
Esteatose microvesicular	Agrupamento contínuo					
	Ausente	0	100%	33,33%	100%	100%
	Presente	1	0%	66,67%	0%	0%
Fibrose						
Estágio	Nenhum	0	100%	33,33%	100%	60%
	Perisinusoidal ou periportal	1	0%	0%	0%	0%
	Médio, zona 3, perisinusoidal	1A	0%	50%	0%	0%
	Moderado, zona 3, perisinusoidal	1B	0%	0%	0%	0%
	Portal/periportal	1C	0%	16,67%	0%	40%
	Perisinusoidal e portal/periportal	2	0%	0%	0%	0%
	Pontes de fibrose	3	0%	0%	0%	0%
	Cirrose	4	0%	0%	0%	0%
Inflamação						
Inflamação lobular	Avaliação global de todos os focos inflamatórios					
	Sem focos	0	100%	0%	20%	0%
	<2 focos por campo de 200X	1	0%	66,66%	60%	60%
	2-4 focos por campo de 200X	2	0%	33,34%	20%	40%
	>4 focos por campo de 200X	3	0%	0%	0%	0%
Injúria nos hepatócitos						
Balonização	Ausente	0	100%	100%	100%	100%
	Algumas células balonizadas	1	0%	0%	0%	0%
	Muitas células/balonização proeminente	2	0%	0%	0%	0%

Fig. 1. (A) Ganho de peso corporal; (B) Ingestão calórica; (C) Consumo alimentar; Área abaixo da curva do (D) ganho de peso corporal; (E) ingestão calórica e (F) consumo alimentar dos animais dos grupos CTL-DP-F1, CTL-DH-F1, GF-DP-F1 e GF-DH-F1 dos 60 aos 150 dias de vida. Os dados são expressos como média \pm EPM (n= 5-12 animais, de 5-12 ninhadas). Diferentes letras sobre as barras indicam diferenças estatísticas entre os grupos. *CTL-DP-F1 \neq CTL-DH-F1; &CTL-DP-F1 \neq GF-DH-F1; #CTL-DH-F1 \neq GF-DH-F1; %CTL-DP-F1/GF-DP-F1 \neq CTL-DH-F1/GF-DH-F1. Análise de variância ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de *Tukey*. $P < 0,05$.

Fig. 2. (A) Peso do fígado; Conteúdo hepático de (B) lipídeos totais; (C) COL; e (D) TG dos animais dos grupos CTL-DP-F1, CTL-DH-F1, GF-DP-F1, e GF-DH-F1 aos 150 dias de vida. Os dados são expressos como média \pm EPM (n= 5-12 animais, de 5-12 ninhadas). Diferentes letras sobre as médias indicam diferenças estatísticas entre os grupos. Análise de variância ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de *Tukey*. $P < 0,05$.

Figura 3. Fotomicrografia de fígados de animais dos diferentes grupos experimentais. A-B. Fígado com aspecto normal dos animais do grupo CTL-DP-F1; C-D. Presença de gotículas de gordura macrovesicular (seta) e microvesicular (cabeça de seta) nos animais do grupo CTL-DH-F1; E. Presença de gotículas de gordura macrovesicular (seta) nos animais do grupo GF-DH-F1. F. Presença de tecido conjuntivo na região periportal (seta) nos animais do grupo GF-DH-F1; G-H. Presença de infiltrados de leucócitos (seta)

nos animais do grupo GF-DP-F1. Coloração = Hematoxilina de Harris e Eosina (A, B, C, D e F) e tricrômio de Mallory (E).

Tabela 3 – Aspectos histomorfológicos nos animais dos grupos CTL-DP-F1, CTL-DH-F1, GF-DP-F1 e GF-DH-F1 aos 150 dias.

Referências

ACQUAVELLA JF, ALEXANDER BH, MANDEL JS, GUSTIN C, BAKER B, CHAPMAN P AND BLEEKE M. 2004. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the farm family exposure study. *Environ Health Perspect* 112:321-326.

ASTIZ M, ALANIZ MJ AND MARRA CA. 2009. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:2025-2032.

AYOOLA, S. O. 2008. Histopathological effects of glyphosate on juvenile african catfish (*clariasgariepinus*). *American-Eurasian J Agric & Environ Sci* 4:362-367.

BENEDETTI AL, VITURI CL, TRENTIN AG DOMINGUES MAC AND ALVAREZ-SILVA, M. The Effects of sub-chronic exposure of wistar rats to the herbicide glyphosate-Biocarb®. *Toxicol Letters* 153:227-232.

BEURET CJ, ZIRULNIK F AND GIMENEZ MS. 2005. Effect od the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reprod Toxicol* 19:501-504.

CASSAUL-MEYER E, GRESS S, SERALINI GE AND GALERAUD-DENIS I. An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ Toxicol Pharmacol* 38:131-140.

CAVALLI VLLO, CATTANI D, RIEG CEH, PIEROZAN P, ZANATTA L, PARISOTTO EB, FILHO DW, SILVA FRMB, PESSOA-PUREUR R AND ZAMONER A. 2013. Roundup disrupts male reproductive function by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radic Biol Med* 65:335-346.

CERF ME. 2015. High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction. *Pediatr Diabetes* 16: 71-78.

CHLOPECKA M, MENDEL M, DZIEKAN N AND KARLIK W. 2014. Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses - in vitro study. *Pestic Biochem Physiol* 113:25-30.

CONTARDO-JARA V, KLINGELMANN E AND WIEGAND C. 2009. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environ Pollut* 157:57-63.

DARUICH J, ZIRULNIK F AND GIMENEZ MS. 2001. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ Res* 85: 226-231.

DELLEGRAVE E, MANTASE FD, OLIVEIRA RT, ANDRADE AJM,
DALSENTER PR AND LANGELOH A. 2007. Pre- and postnatal toxicity of the
commercial glyphosate formulation in wistar rats. *Arch Toxicol* 81:665-673.

EBERLE C AND AMENT C. 2012. Diabetic and metabolic programming:
mechanisms altering the intrauterine milieu. *ISRN Pediatr* 975685.

FOLCH J, LESS M AND SLOANE-STANLEY GH. A simple method for the
isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*
226:497-509.

GUI YX, FAN XN, WANG HM, WANG G AND CHEN SD. 2012. Glyphosate
induced cell death through apoptotic and autophagic mechanisms. *Neurotoxicol
Teratol* 34:344-349.

JASPER R, LOCATELLI GO, PILATI C AND LOCATELLI C. 2012. Evaluation
of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the
herbicide glyphosate-Roundup. *Interdiscip Toxicol* 5:133-140.

KRUGER M, SHEHATTA AA, SCHROLD W AND RODLOFF A. 2013.
Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on
Clostridium botulinum. *Anaerobe* 20:74-78.

LUCAS A. 1991. Programming in early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 156:
38-53.

MESNAGE R, ARNO M, COSTANZO M, MALATESTA M, SERALINI GE AND ANTONIOU MN. 2015. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose roundup exposure. *Environ Health* 14: 70.

OMRAN NE AND SALAMA WM. 2016. The endocrine disruptor effect of the herbicides atrazine and glyphosate on *Biomphalaria alexandrina* snails. *Toxicol Industr Health* 32:656-665.

PECHIAMMAL K AND VASANTHI J. 2017. Effect of toxic impact of glyphosate on selected biochemical parameters of freshwater fish, *Cirrhinus mrigala*. *W J Pharma Pharmaceut Sci* 6:1737-1743.

PEIXOTO F. 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61:1115-1122.

RICHARD S, MOSLEMI S, SIPAHUTAR H, BENACHOUR N AND SERALINI GE. 2005. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect* 113:716-720.

RITA JJ AND MILTON, M. 2006. Effect of carbonate pesticide lannate (methonyl) on the biochemical components of the fresh water Cichlid *Oreochromis mossambicus* (eters.). *Indian. J Environ Ecoplan* 12:263-268.

ROMANO MA, ROMANO RM, SANTOS LD, WISNIEWSKI P, CAMPOS DA, SOUZA PB, VIAU P, BERNARDI MM, NUNES MT AND OLIVEIRA CA. 2012. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch Toxicol* 86:663-673.

ROMANO RM, ROMANO MA, BERNARDI MM, FURTADO PV AND OLIVEIRA CA. 2010. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Arch Toxicol* 209:309-317.

SAMSEL A AND SENEFF S. 2013. Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. *Interdiscip Toxicol* 6:159-184.

SHEHATA AA, SCHRODL W, ALDIN AA, HAFEZ HM AND KRUGER M. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Curr Microbiol* 66:350-358.

SORNARAJAN R AND SINGH AJA. 2002. Influence of commercial detergents on biochemical and physiological responses of a fresh water air breathing fish *Channa punctatus*. *Ad Biol* 21:23-24.

SOUZA JS, KIZYS MML, CONCEICAO RR, GLEBOCKI G, ROMANO RM, ORTIGA-CARVALHO TM, GIANNOCO G, SILVA IDCG, SILVA MRD, ROMANO MA AND CHIAMOLERA MI. 2017. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. *Toxicology* 377:25-37.

STARK DM, TIMMERMAN KP, BARRY GF, PREISSJ AND KISHORE GM.

1992. Regulation of the amount of starch in plant tissues by adp glucose pyrophosphorylase. *Science* 258:287-292.

TAKAHASHI M, HORIE M AND AOBA N. 2001. Analysis of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in agricultural products by HPLC.

Shokuhin Eiseigaku Zasshi 42:304-308.

TIZHE EV, IBRAHIM NDG, FATIHU MY, ONYEBUCHI II, GEORGE BDJ, AMBALI SF AND SHALLANGWA JM. 2014. Influence of zinc supplementation on histopathological changes in the stomach, liver, kidney, brain, pancreas and spleen during subchronic exposure of wistar rats to glyphosate. *Comp Clin Path* 23:1535-1543.

WILLIAMS GM, KROES R AND MUNRO IC. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharma* 31:117-165.

ANEXO A

Comitê de Ética no Uso de Animais

Universidade Estadual do Oeste do Paraná



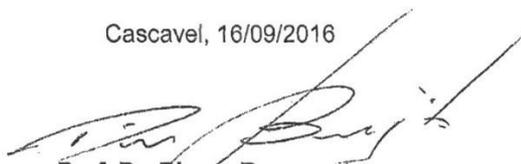
PARECER DE PROTOCOLO

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 científica
Anais da Academia Brasileira de Ciências



Publication of

Academia Brasileira de Ciências

Print version ISSN 0001-3765 On-line version ISSN 1678-2690

The journal Anais da Academia Brasileira de Ciências from 2012 onwards only considers online submissions. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, please visit the new, improved online submission website at <https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo>. Please read these instructions carefully and follow them strictly. In this way you will help ensure that the review and publication of your paper are as efficient and quick as possible. The editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions. Papers must be clearly and concisely written in English.

Aim and editorial policy

All submitted manuscripts should contain original research not previously published and not under consideration for publication elsewhere. The primary criterion for acceptance is scientific quality. Papers should avoid excessive use of abbreviations or jargon, and should be intelligible to as wide an audience as possible. Particular attention should be paid to the Abstract, Introduction, and Discussion sections, which should clearly draw attention to the novelty and significance of the data reported. Failure to do this may result in delays in publication or rejection of the paper. Articles accepted for publication become property of the journal.

Texts can be published as a review, a full paper (article) or as a short communication. Issues appear in March, June, September and December.

Types of Papers

Reviews

Reviews are published by invitation only. A proposal for a Review must be sent to the Editorial Office (aabc@abc.org.br), which will proceed accordingly.

Articles

Whenever possible the articles should be subdivided into the following parts: 1. Front Page; 2. Abstract (written on a separate page, 200 words or less, no abbreviations); 3. Introduction; 4. Materials and Methods; 5. Results; 6. Discussion; 7. Acknowledgments, if applicable; 8. References. Articles from some areas such as Mathematical Sciences should follow their usual format. In some cases it may be advisable to omit part (4) and to merge parts (5) and (6). Whenever applicable, the Materials and Methods section should indicate the Ethics Committee that evaluated the procedures for human studies or the norms followed for the maintenance and experimental treatments of animals.

Short communications

Short communications aim to report on research which has progressed to the stage when it is considered that results should be divulged rapidly to other workers in the field. A short communication should also have an Abstract and should not exceed 1,500 words. Tables and Figures may be included but the text length should be proportionally reduced. Manuscripts submitted as articles but found to fit these specifications will be published as short communications upon the author's agreement.

After the first screening, the articles will be evaluated by at least two reviewers, them being from educational and/or national and international research institutions, with proven scientific production. After due corrections and possible suggestions, the paper may be accepted or rejected, considering the reviews received.

We use the integrated Crossref Similarity Check program to detect plagiarism.

There are no APC and submission charges in the AABC.

Preparation of manuscripts

All parts of the manuscript should be double-spaced throughout. After acceptance, no changes will be made in the manuscript so that proofs require only corrections of typographical errors. The authors should send their manuscript in electronic version only.

Length of manuscript

While papers may be of any length required for the concise presentation and discussion of the data, succinct and carefully prepared papers are favored both in terms of impact as well as in readability.

Tables and Illustrations

Only high-quality illustrations will be accepted. All illustrations will be considered figures including drawings, graphs, maps, photographs as well as tables with more than 12 columns or more than 24 lines. Their tentative placement in the text should be indicated. The AABC do not charge the first 5 figures in black and white or scale of gray. Should the authors want colored figures in the hard copy, a cost may be generated for each one of them, as well as for each figure in black and white or scale of gray beyond 5. Figures that are published in colors only in the online version do not generate additional costs.

Digitalized figures

Figures should be sent according to the following specifications: 1. Drawings and illustrations should be in format EPS (PostScript) or AI (Adobe Illustrator) and never be inserted in text; 2. Images or figures in grayscale should be in format TIF and never be inserted in text; 3. Each figure should be saved in a separate file; 4. Figures should be submitted at high quality (minimum resolution

of 300dpi) at the size they are to appear in the journal, i.e., 8 cm (one column) or 16.5 cm (two columns) wide, with maximal height for each **figure and respective legend smaller than or equal to 22 cm**. The legends to the figures should be sent double-spaced on a separate page. Each linear dimension of the smallest characters and symbols should not be less than 2 mm after reduction;

5. Manuscripts on Mathematics, Physics or Chemistry may be typesetted in , or . The TEX, PDF and BIB files should be sent, and EPS files if there are any figures; 6. Manuscripts without mathematical formulae may be sent in RTF, DOC or DOCX.

Front page

The front page of the manuscript should present the following items: 1. Title of the article (the title should be short, specific, and informative); 2. Full name(s) of the author(s); 3. Full professional address of each author (institution, street, number, zip code, city/county, state if applicable, country, etc.); 4. Key words (four to six in alphabetical order); 5. Running title (up to 50 characters); 6. Academy Section (one out of our 10 areas) to which the content of the work belongs; 7. Name and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be provided. Should any of these requirements not be met, we may unsubmit your paper and ask for corrections.

Acknowledgments

These should be included at the end of the text. Personal acknowledgments should precede those of institutions or agencies. Footnotes should be avoided; when necessary they must be numbered. Acknowledgments to grants and scholarships, and of indebtedness to colleagues as well as mention to the origin of an article (e.g. thesis) should be added to the Acknowledgments section.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at their first occurrence in the text, except for official, standard abbreviations. Units and their symbols should conform to those

approved by the ABNT or by the Bureau International des Poids et Mesures (SI).

References

Authors are responsible for the accuracy of the References. Published articles and those in press may be included. Personal communications (Smith, personal communication) must be authorized in writing by those involved. References to thesis, meeting abstracts (not published in indexed journals) and manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (Smith et al., unpublished data) and should NOT be included in the list of references.

The references should be cited in the text as, for example, 'Smith 2004', 'Smith and Wesson 2005' or, for three or more authors, 'Smith et al. 2006'. Two or more papers by the same author(s) in the same year should be distinguished by letters, e.g. 'Smith 2004a', 'Smith 2004b' etc. Letters should also distinguish papers by three or more authors with identical first author and year of publication. References should be listed according to the alphabetical order of the first author, always in the order SURNAME XY in which X and Y are initials. If there are more than ten authors, use et al. after the first author. References must contain the title of the article. Names of the journals should be abbreviated without dots or commas. For the correct abbreviations, refer to lists of the major databases in which the journal is indexed or consult the World List of Scientific Periodicals. The abbreviation to be used for the Anais da Academia Brasileira de Ciências is An Acad Bras Cienc. The following examples are to be considered as guidelines for the References.

REFERENCES

ALBE-FESSARD D, CONDES-LARA M, SANDERSON P AND LEVANTE A. 1984a. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

ALBE-FESSARD D, SANDERSON P, CONDES-LARA M, DELAND-SHEER E, GIUFFRIDA R AND CESARO P. 1984b. Utilisation de la depression

envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. An Acad Bras Cienc 56: 371-383.

KNOWLES RG AND MONCADA S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J 298: 249-258.

PINTO ID AND SANGUINETTI YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus Theriosynoecum Branson, 1936 and validity of related Genera. An Acad Bras Cienc 56: 207-215.

Books and book chapters

DAVIES M. 1947. An outline of the development of Science. Thinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

PREHN RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5., Philadelphia. Proceedings ... , Philadelphia: J. B. Lippincott, p. 97-104.

UYTENBOGAARDT W AND BURKE EAJ. 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

WOODY RW. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.