

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

JAKELINE LIARA TELEKEN

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA PRÉ E PÓS-NATAL AO GLIFOSATO NO
SISTEMA REPRODUTOR DA PROLE DE CAMUNDONGOS MACHOS**

CASCAVEL- PR

Julho/2018

JAKELINE LIARA TELEKEN

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA PRÉ E PÓS-NATAL AO GLIFOSATO NO
SISTEMA REPRODUTOR DA PROLE DE CAMUNDONGOS MACHOS**

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

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Lúcia Bonfleur

COORIENTADORA: Profa. Dra. Elaine Manoela Porto Amorim

CASCADEL- PR

Julho/2018

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

Teleken, Jakeline Liara

Efeitos da exposição materna pré e pós-natal ao glifosato no sistema reprodutor da prole de camundongos machos / Jakeline Liara Teleken; orientador(a), Maria Lúcia Bonfleur; coorientador(a), Elaine Manoela Porto Amorim, 2018.

79 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. Desreguladores endócrinos químicos. 2. Programação fetal. 3. Agrotóxicos. 4. Sistema reprodutor masculino. I. Bonfleur, Maria Lúcia. II. Amorim, Elaine Manoela Porto. III. Título.



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

JAKELINE LIARA TELEKEN

Efeitos da exposição materna pré e pós-natal ao glifosato no sistema reprodutor da prole de camundongos machos

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


Orientador(a) - Maria Lucia Bonfleur

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


Sandra Lucinei Balbo

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


Renata Marino Romano

Universidade Estadual do Centro-Oeste - Campus de Guarapuava (UNICENTRO)

Cascavel, 27 de julho de 2018

AGRADECIMENTOS

Aos animais utilizados nesta pesquisa todo meu respeito e gratidão.

Aos professores Sandra, Sara, João Paulo, Sabrina, Ana Tereza e Rafael pela disponibilidade e atenção para esclarecer as minhas dúvidas.

Às acadêmicas de ciências biológicas Ariadne, Luana e Márcia pelo auxílio no cuidado dos animais e procedimentos experimentais, especialmente a Milara pelo auxílio nos procedimentos histológicos.

À Ana Cláudia, Carine e Sandra por todo auxílio nos experimentos.

À todos os membros do LAFEM pela colaboração nos experimentos, troca de ideias e incentivo diário.

À todos os professores e colegas do Mestrado em Biociências e Saúde pelo apoio, ensinamentos, amizade e incentivo, especialmente a turma de 2016.

Ao professor Roberto Bazotte e ao Dr. Cristiano da UEM pelo auxílio nas dosagens de LH e FSH.

À Carolina e ao Rodrigo pela companhia durante todo esse projeto, especialmente à Carol pela parceria, por estar sempre disposta a me ajudar e pela amizade que construímos.

À professora Elaine pela orientação, paciência e ensinamentos.

À professora Maria Lúcia pela confiança, ensinamentos, paciência, compreensão e amizade.

Às novas amigas que fiz nesse período, Ana, Carol, Carine, Gabi, Milara e Luana, como vocês foi muito mais leve e divertido.

Às minhas amigas Ana Flávia, Iara, Luana e Mariana, por estarem presentes em todos os momentos.

À todos os meus colegas de trabalho que sempre foram compreensivos e dispostos a trocar plantões e me ajudar no que fosse preciso.

À Poliana e a toda energia do reiki que foram fundamentais para que o meu caminho no mestrado fosse trilhado da melhor forma possível.

Aos meus pais, Irineu e Clair, por todo carinho e apoio. A toda minha família pelo amor incondicional, incentivo e confiança.

À Deus e ao mestre Jesus por me abençoarem e iluminarem meu caminho.

RESUMO

TELEKEN, J.L. **Efeitos da exposição materna pré e pós-natal ao glifosato no sistema reprodutor da prole de camundongos machos.** 79 Páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2018.

O aumento no uso de agrotóxicos em todo mundo, inclusive no Brasil, tem despertado atenção acerca dos efeitos tóxicos da exposição a essas substâncias. Entre os agrotóxicos, destaca-se o uso do herbicida glifosato, princípio ativo mais comercializado em todo mundo. A exposição ao glifosato foi associada ao desenvolvimento de problemas de saúde em humanos e animais, como câncer, malformações ao nascimento, problemas cardiovasculares e reprodutivos, alterações no sistema nervoso central, entre outros. Além disso, estudos recentes têm demonstrado que o glifosato age como desregulador endócrino, devido às suas ações sobre o sistema hormonal. A exposição a desreguladores endócrinos em períodos críticos do desenvolvimento, como o período neonatal, pode levar a programação fetal que predispõe o desenvolvimento de doenças na vida adulta. Assim, o objetivo deste trabalho foi de avaliar os efeitos da exposição materna ao glifosato, durante a prenhez e a lactação, nas mães e no sistema reprodutor da prole masculina na vida adulta. Para tanto, as fêmeas C57Bl6 receberam 0,5% de glifosato (ROUNDUP Original DI®) na água de beber (grupo GF) ou água pura (grupo CTL) durante a prenhez e lactação. A prole masculina foi separada em dois grupos, CTL-F1 e GF-F1, respectivamente, de acordo com a administração ou não de glifosato nas mães. Ambos os grupos receberam água e ração padrão a vontade durante todo o experimento. O peso corporal, os consumos hídrico e alimentar foram avaliados semanalmente e a descida dos testículos foi acompanhada a partir dos 21 dias de vida para avaliação do início da puberdade. Aos 150 dias, os camundongos da prole foram eutanasiados, e o sangue total foi coletado para posterior dosagens plasmáticas. Os órgãos reprodutores foram retirados e pesados. O epidídimo foi utilizado para contagem de espermatozoides. A hipófise foi retirada e utilizada para determinar a expressão proteica de LH. O testículo direito foi fixado em ALFAC e utilizado para as análises histomorfológicas, e o testículo esquerdo foi utilizado para dosagem de testosterona intratesticular. A exposição materna ao glifosato não alterou o peso corporal, o consumo alimentar e hídrico e o peso dos órgãos reprodutores da prole de machos. Todavia, observou-se um atraso no início da puberdade e uma diminuição do número de espermatozoides na cauda do epidídimo no grupo GF-F1, se comparado ao grupo CTL-F1. Embora na análise histológica não foi encontrada nenhuma alteração nos animais do grupo GF-F1, esses animais apresentaram diminuição na altura do epitélio seminífero em relação ao grupo CTL-F1. Quanto às dosagens hormonais, a concentração de testosterona intratesticular foi maior no grupo GF-F1 em relação ao grupo CTL-F1, apesar de a testosterona plasmática ter valores similares em ambos os grupos. O LH foi aumentado tanto no plasma quanto na hipófise do grupo GF-F1, enquanto que o FSH foi similar entre os grupos CTL-F1 e GF-F1. Os resultados sugerem que a exposição materna ao glifosato levou à programação fetal, o que culminou em alterações no sistema reprodutor na vida adulta da prole masculina.

Palavras-Chave: agrotóxicos, programação fetal, desreguladores endócrinos químicos, testosterona, ROUNDUP.

ABSTRACT

TELEKEN, J.L. **Effects of maternal exposure to glyphosate during pre and post-natal period on reproductive system in offspring male mice.** 79 Páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2018.

Increased use of pesticides worldwide, including in Brazil, has raised awareness of the toxic effects of pesticide exposure. Among the pesticides, glyphosate herbicide is the most commercially active ingredient in the world. Exposure to glyphosate has been associated with the development of health problems in humans and animals, such as cancer, birth defects, cardiovascular problems, changes in the central nervous system, reproductive system, among others. In addition, recent studies have shown that glyphosate acts as an endocrine disrupter because of its actions on the hormonal system. Exposure to endocrine disrupters at critical stages of development, such as the neonatal period, can lead to fetal programming predisposing to disease development in adult life. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of maternal exposure to glyphosate, during pregnancy and lactation, on the dams and reproductive system of male offspring in adulthood. Female C57Bl6 received 0.5% glyphosate (ROUNDUP Original DI®) in drinking water (GF group) or pure water (CTL group) during pregnancy and lactation. Male offspring were separated into two groups CTL-F1 and GF-F1, according to the administration or not of glyphosate for the dams. Both groups received standard diet and water *ad libitum* during the entire experiment. Body weight, water and food intake were evaluated weekly, and the testis descent was monitored at 21 days of age to evaluate the onset of puberty. At 150 days the offspring mice were euthanized and blood was collected for subsequent plasmatic analyzes. The reproductive organs were removed and weighed. The epididymis was used for sperm count. The pituitary was removed and used to determine the protein expression of LH. The right testis was fixed in ALFAC and used for histomorphological analysis, and the left testis was used for intratesticular testosterone assay. Maternal exposure to glyphosate did not alter body weight, food and water intake, and weight of reproductive organs of male offspring. However, there was a delay in the onset of puberty and a decrease in the number of spermatozoa in the tail of the epididymis in the GF-F1 group in relation to the CTL-F1 group. Although in the histological analysis no alteration was found in the animals of the GF-F1 group, these animals showed a decrease in the height of the seminiferous epithelium in relation to the CTL-F1 group. In relation to hormonal dosages, intratesticular testosterone levels was higher in the GF-F1 group than in the CTL-F1 group, although the testosterone plasma levels had similar values in both groups. LH was increased both in the plasma and in the pituitary GF-F1 group, whereas FSH was similar between the CTL-F1 and GF-F1 groups. Our results suggest that maternal exposure to glyphosate led to fetal programming that culminated with changes in the reproductive system in adult life of male offspring.

Keywords: pesticides, metabolic programming, endocrine disruptors chemicals, testosterone, ROUNDUP.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
INTRODUÇÃO	10
OBJETIVOS.....	12
Objetivo geral.....	12
Objetivos específicos	12
REVISÃO DE LITERATURA	13
1. Agrotóxicos	13
2. Desreguladores Endócrinos Químicos	17
3. Programação Fetal	18
4. Sistema Reprodutor Masculino	20
5. Infertilidade Masculina	23
6. Sistema Reprodutor X Glifosato	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ARTIGO CIENTÍFICO	36
ANEXO A – Parecer de Protocolo do CEUA.....	66
ANEXO B – Normas da revista científica.....	67

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração da organização celular no interior dos túbulos seminíferos 19
do testículo.

Figura 2 - Regulação por *feedback* do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular 20
no sexo masculino. Os efeitos estimulatórios estão indicados pelo símbolo + e
os efeitos inibitórios da retroalimentação negativa estão indicados pelo símbolo
-. FSH, hormônio folículo estimulante; GnRH, hormônio liberador de
gonadotrofinas; LH, hormônio luteinizante.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPc** – Adenosina monofostato cíclico
- AMPA** - Ácido aminometilfosfônico
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- DDT** - Dicloro-difenil-tricloroetano
- DEQ** – Desregulador endócrino químico
- DM2** – Diabetes Mellitus tipo 2
- EPA** - *United States Environmental Protection Agency*
- EPSPS** – 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase
- FSH** – Hormônio folículo estimulante
- GnRH** - Hormônio liberador de gonadotrofinas
- HHT** - Eixo hipotálamo-hipofisário-testicular
- IARC** – *International Agency for Research on Cancer*
- IPARDES** – Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social
- LH** – Hormônio luteinizante
- PARA** – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
- POPs** – Poluentes orgânicos persistentes
- STAR** – Proteína aguda de regulação da esteroidogênese
- SUS** – Sistema Único de Saúde
- OMS** – Organização Mundial da Saúde

INTRODUÇÃO

O crescente aumento no uso de agrotóxicos no mundo faz com que a exposição a essas substâncias tenha cada vez mais destaque no campo da saúde pública, tendo em vista a abrangência de populações expostas, nas fábricas de produção e em suas proximidades, na agricultura, no combate às endemias e por meio da água e de alimentos contaminados (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014). Entre 2005 e 2015, enquanto o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, no Brasil, o crescimento foi de 190%, colocando o País, desde 2008, entre os maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (ROSSI, 2015). O Paraná é o terceiro estado com maior consumo de agrotóxicos no Brasil, com 9,6 kg de agrotóxico/ha/ano. Considerando apenas o consumo legalizado, a região de Cascavel está entre as três com maior consumo de agrotóxico do Estado, chegando a 15,0 kg agrotóxico/ha/ano (IPARDES, 2013). Recentemente, demonstrou-se que o uso de agrotóxicos está positivamente associado a altas taxas de malformações congênitas encontradas nesse município entre os anos de 2003 a 2014 (DUTRA; FERREIRA, 2017).

Dentre os diferentes tipos de agrotóxicos, o herbicida glifosato destaca-se como o princípio ativo de maior utilização no Brasil (AGROFIT, 2013; ANVISA, 2012). O glifosato (N-(fosfometil)glicina) é um herbicida não seletivo, de ação sistêmica do grupo químico das glicinas substituídas, cuja formulação comercial mais conhecida é ROUNDUP® da Monsanto (MONSANTO, 2016). O seu mecanismo de toxicidade ocorre pela interferência na síntese de aminoácidos aromáticos essenciais (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000). O glifosato apresenta-se como o principal agrotóxico poluente de rios e de águas superficiais (COX, 1998) e pode contaminar organismos, alimentos, rações e ecossistemas (ACQUAVELLA et al., 2004; TAKAHASHI; HORIE; AOBA, 2001).

Os efeitos da exposição ao glifosato, bem como a outros agrotóxicos, podem ser agudos ou crônicos. Os efeitos agudos ocorrem por meio da exposição ocupacional ou acidental; efeitos crônicos, por sua vez, são causados principalmente pela presença de resíduos no meio ambiente (OMS, 2010). Recentemente, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou o glifosato como uma substância provavelmente cancerígena (GUYTON et al., 2014). Além do potencial efeito cancerígeno, estudos epidemiológicos demonstram que o glifosato pode induzir o autismo, e estudos em animais mostram que o glifosato pode induzir a

comportamento do tipo depressivo, com efeitos prejudiciais sobre o sistema cardiovascular e hepático, na coagulação sanguínea e no sistema reprodutor (BEURET; ZIRULNIK; GIMENEZ, 2005; CATTANI et al., 2017; CHAN et al., 2007; GOOD, 2017; NEIVA et al., 2010; ROMANO et al., 2012).

Especificamente sobre o sistema reprodutor, diferentes formulações de glifosato levam à redução da quantidade de espermatozoides e a problemas durante a gravidez (DALLEGRAVE et al., 2007; DARUICH et al., 2001; YOUSEF; SALEM; BERTHEUSSEN, 1995). Também foram verificados efeitos tóxicos e mutagênicos em células embrionárias, fetais e placentárias (MARC et al., 2002; MARC; MULNER-LORILLON; BELLÉ, 2004; RICHARD et al., 2005).

Devido aos efeitos sobre o sistema endócrino, o glifosato tem potencial para ser classificado como desregulador endócrino químico (DEQ) (ROMANO; ROMANO; OLIVEIRA, 2009). DEQs são substâncias que alteram a função do sistema endócrino, que, dependendo do período de exposição, podem gerar um *“imprint”* ou uma programação. O termo programação define a perturbação ou o insulto em um período crítico do desenvolvimento, causando alterações permanentes na fisiologia e no metabolismo do indivíduo com consequências irreversíveis (EBERLE; AMENT, 2012), haja vista que essas alterações podem levar ao desenvolvimento de doenças na vida adulta (HALES; BARKER, 1992). Os períodos críticos de desenvolvimento em que podem ocorrer a programação incluem a pré-concepção, a gravidez e a lactação até a adolescência (CERF, 2015). Do final da gestação até o início da vida pós-natal, acontece a diferenciação sexual do cérebro (MACLUSKY; NAFTOLIN, 1981). Alterações nesse processo podem levar a uma masculinização incompleta, algo que será percebido somente na puberdade e na vida adulta, causando anomalias na fertilidade e no comportamento sexual (GERARDIN; PEREIRA, 2002).

Alguns trabalhos têm demonstrado os efeitos negativos da exposição ao glifosato durante períodos críticos do desenvolvimento (prenhez, lactação e puberdade) sobre o sistema reprodutor masculino, tais como a diminuição na concentração de espermatozoides e alterações hormonais (DALLEGRAVE et al., 2007; ROMANO et al., 2010; ROMANO et al., 2012). Diante disso, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da exposição materna pré e pós-natal ao agrotóxico glifosato nas mães e na morfologia e fisiologia do sistema reprodutor masculino da prole de camundongos machos durante a vida adulta.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar os efeitos da administração de glifosato ROUNDUP® durante a prenhez e a lactação sobre as mães e o sobre o sistema reprodutor masculino da prole adulta (F1).

Objetivos específicos

Investigar se a exposição materna ao glifosato, durante prenhez e a lactação, causa alterações no peso corporal das mães, dias de gestação e número de filhotes ao nascimento.

Avaliar se a exposição materna ao glifosato, durante prenhez e a lactação, causa alterações nos parâmetros corporais, plasmáticos e concentração de espermatozoides da prole masculina (F1).

REVISÃO DE LITERATURA

1. Agrotóxicos

Os agrotóxicos são definidos como substâncias químicas utilizadas para repelir, destruir ou prevenir qualquer praga, tais como insetos, roedores, ervas daninhas e microrganismos. São utilizados, majoritariamente, na agricultura, mas podem ser empregados também na saúde pública, no combate a vetores; há também o uso doméstico, sendo aplicados em jardins e no combate a ervas daninhas (ALAVANJA, 2009).

A exposição aos agrotóxicos é considerada, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), um problema de saúde pública mundial, sendo associada como fator causal de agravos à saúde e mortes em todo mundo. Os efeitos da exposição podem ser agudos, por meio do contato ocupacional ou acidental, e/ou crônicos, causados principalmente pela presença de resíduos de agrotóxicos no meio ambiente. Nesse caso, toda a população pode estar exposta a essas substâncias por meio da água e dos alimentos contaminados (OMS, 2010). Em ambos os casos de intoxicação existem dificuldades no diagnóstico, devido ao alto custo e à inviabilidade da realização de exames em larga escala. Atualmente, na prática clínica, existem técnicas que permitem a identificação apenas de intoxicações agudas por agrotóxicos classificados como organofosforados e carbamatos (LONDRES, 2011).

Os efeitos mais comuns associados a exposição aos agrotóxicos são alergias, distúrbios gastrointestinais, respiratórios, endócrinos, reprodutivos e neurológicos, além de neoplasias, mortes acidentais e suicídio (OMS, 2010). Estudos com o agrotóxico dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), que atualmente está com uso proibido, mostram uma relação com o desenvolvimento de doenças metabólicas, obesidade, disfunção do tecido hepático entre outras. Devido a esses efeitos, os agrotóxicos são classificados como DEQs, por interferirem com a fisiologia do sistema hormonal (RODRIGUEZ-ALCALA et al., 2015).

O aumento no uso de agrotóxicos teve início após as grandes guerras mundiais para dar vazão aos produtos antes utilizados como armas químicas. A chamada “revolução verde” também ocorreu no Brasil por meio de mudanças na política agrícola, quando se passou a promover uma série de medidas para modernização do campo, incluindo o uso intensivo de agrotóxicos. É oportuno ressaltar que ainda hoje

são fornecidas isenções fiscais e tributárias para o comércio dessas substâncias (BRASIL, 2016; LONDRES, 2011).

Mundialmente são consumidos cerca de dois milhões de toneladas de agrotóxicos por ano, sendo 47,5% de herbicidas, 29,5% de inseticidas e 17,5% de fungicidas (DE et al., 2014). Segundo os dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná, em 2008, o Brasil foi o maior mercado mundial de consumo de agrotóxicos. Entre 2005 e 2015, o mercado mundial cresceu 93%, enquanto o mercado brasileiro cresceu 190%. Em 2010, por exemplo, o mercado nacional movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões, o que representa 19% do mercado global de agrotóxicos. Todavia, é importante ressaltar que esse aumento no consumo não tem sido proporcional ao aumento de área de cultivo (ANVISA, 2012).

Com o aumento considerável do uso de agrotóxicos no país, o risco de exposição da população a partir do trabalho e da contaminação da água e dos alimentos também vem aumentando. No período de 2007 a 2014, houve crescimento de 87% dos casos de intoxicação notificados, sendo que o total de notificações acumuladas no período alcançou 68.873 casos. Esses acidentes e problemas de saúde são incorretamente creditados ao uso incorreto destas substâncias e não à toxicidade inerente às formulações (BRASIL, 2016). Porém sabe-se que a “deriva técnica”, ou seja, a quantidade de agrotóxico disperso no meio-ambiente pelo ar e pela água após uma aplicação, acontece com pelo menos 30% do produto aplicado, mesmo que todas as recomendações de segurança sejam seguidas, devido a isso LONDRES (2011) afirma que o uso seguro de agrotóxicos na prática não existe.

Um dos agrotóxicos mais utilizados no mundo é o herbicida glifosato, que desde seu lançamento em 1974 até os dias atuais domina o mercado (DUKE; POWLES, 2008). No Brasil entre os dez agrotóxicos mais consumidos, o glifosato destaca-se na primeira posição (AGROFIT, 2013). O glifosato (N-(fosfonometil)glicina) é um herbicida não seletivo, de ação sistêmica do grupo químico das glicinas substituídas (MONSANTO, 2008). É comumente utilizado no combate a plantas daninhas prejudiciais. Nas culturas tradicionais, a sua aplicação é realizada antes ou após o plantio, desde que se utilizem equipamentos adequados para evitar a contaminação da planta cultivada. Não obstante, com o desenvolvimento de espécies transgênicas resistentes ao glifosato, a aplicação desse herbicida pode então ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento da planta (CERDEIRA et al., 2007).

O mecanismo de toxicidade do glifosato ocorre pela interferência na síntese de aminoácidos aromáticos essenciais, como a fenilalanina, a tirosina e a triptofano, por meio da inibição da atividade da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), alterando a via do ácido chiquímico e, assim, impedindo o crescimento da planta (DUKE; POWLES, 2008; WILLIANS; KROES; MUNRO, 2000). A sua efetividade como herbicida está associada ao seu baixo peso molecular e à alta solubilidade em água, o que facilita a sua rápida absorção e translocação nos tecidos vegetais (ANADON et al., 2009). Esse mecanismo de ação altamente específico faz com o que o glifosato seja classificado como de baixo risco pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA), já que a via do ácido chiquímico é encontrada em uma população bastante restrita de organismos, em sua grande maioria plantas verdes, e não é expressa em nenhum organismo do reino animal (BAI; OGBOURNE, 2016; WILLIANS; KROES; MUNRO, 2000).

No meio ambiente, o glifosato pode passar por três diferentes processos: a mineralização, a imobilização ou a lixiviação, dependendo das características do solo, como o pH, a quantidade de matéria orgânica, a concentração de fosfato, de cobre e de ferro, entre outros. Destaca-se entre os processos o de mineralização, o qual dá origem ao metabólito mais comumente encontrado do glifosato, o ácido aminometilfosfônico (AMPA). A lixiviação tem importância quando se considera a contaminação aquática desse agrotóxico (BAI; OGBOURNE, 2016).

A acumulação dos agrotóxicos no meio ambiente pode ser estimada pelo tempo de meia-vida dessas substâncias em diferentes locais. Um tempo de meia-vida longo e consequente degradação lenta aumentam o risco de contaminação ambiental a longo prazo, principalmente quando associados ao uso frequente e indiscriminado destas substâncias, o que é comumente observado nas práticas agrícolas atuais (AL-RAJAB; SCHIAVON, 2010). No solo, o tempo de meia-vida do glifosato e do AMPA podem ser bastante variáveis, entre 0,8 e 151 dias, variando de acordo com a qualidade do solo e as condições ambientais (BAI; OGBOURNE, 2016). Em ambientes marinhos, Mercúrio et al. (2015) demonstraram que o glifosato pode ter uma meia-vida entre 47 e 315 dias, dependendo de condições como a luminosidade e a temperatura.

Em animais, a toxicocinética do glifosato foi avaliada após administração por via endovenosa (100 mg/Kg) e oral (400 mg/Kg) em ratos Wistar. Neste estudo, foi demonstrado que o glifosato é amplamente distribuído no organismo e tem boa

penetração em todos os tecidos. O tempo de meia-vida observado foi maior após a administração oral (14,38 horas) quando comparada com a administração endovenosa (9,99 horas), provavelmente devido à absorção lenta e incompleta pela via oral, com uma biodisponibilidade de apenas 23,21%. O glifosato foi pouco metabolizado nesses animais, apenas 6,49% foi transformado em AMPA. Esse metabólito demonstrou ter eliminação semelhante ao glifosato, com um tempo de meia vida de 15,08 horas após administração oral (ANADON et al., 2009). A excreção do glifosato em ratos ocorre majoritariamente por via fecal, sendo encontrada nas fezes a presença de 62 a 69% da dose oral administrada. A excreção por via renal é menos significativa, cerca de 36% da dose oral é encontrado na urina (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Quanto aos riscos para saúde humana por meio de alimentos contaminados com glifosato, os dados são escassos e limitados. Verifica-se uma ausência de métodos analíticos com sensibilidade para detectar pequenas concentrações dessa substância. Entretanto, sabe-se que tanto plantações quanto espécies selvagens de áreas próximas a locais de aplicação de glifosato apresentam resíduos desta substância (BAI; OGBOURNE, 2016). No Brasil, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) descreveu em seu relatório de análises de 2013 a 2015 que não realiza a pesquisa de glifosato nas amostras devido à necessidade de implantação de uma metodologia específica para análise desta substância, o que sobrecarregaria a rotina de trabalho do laboratório; contudo, o programa pretende incluir essa metodologia nas próximas análises (ANVISA, 2016).

Outra questão importante a ser discutida com relação aos agrotóxicos é que as formulações comerciais dessas substâncias não contêm somente o ingrediente ativo, mas também os adjuvantes e os excipientes, que são utilizados para melhorar a estabilidade ou a penetração da substância ativa na célula alvo (VANDENBERG et al., 2017). A indústria declara esses adjuvantes como inertes e, na maioria das vezes, eles são excluídos dos testes de toxicidade, no quais é utilizado somente o ingrediente ativo. Alguns trabalhos; porém, vêm demonstrando que as formulações comerciais são mais tóxicas que o princípio ativo isolado (DEFARGE et al., 2016; MESNAGE et al., 2014; NOBELS et al., 2011).

Pesquisas que utilizaram diferentes formulações de glifosato demonstram que esses compostos podem causar alterações em diferentes órgãos e tecidos tanto *in vitro* como *in vivo*. Um estudo verificou que o glifosato inibe a proliferação e a

diferenciação celular de fibroblastos e induz a apoptose *in vitro* (MARTINI; GABRIELLI; VILA, 2012). Outro estudo concluiu que ratos Wistar expostos ao glifosato apresentam aumento da concentração do neurotransmissor excitatório glutamato no hipocampo, levando à toxicidade e ao estresse oxidativo (CATANNI et al., 2014). Vários trabalhos na literatura especializada demonstram a toxicidade do glifosato sobre o sistema reprodutor (CAVALLI et al., 2013; DALLEGRAVE et al., 2007; ROMANO et al., 2010; ROMANO et al., 2012). Atualmente, estudos demonstram que o glifosato, mesmo presente em baixas concentrações, tem atividade biológica (LARSEN et al., 2012) e potencial efeito como DEQ (ROMANO; ROMANO; OLIVEIRA, 2009).

2. Desreguladores Endócrinos Químicos

A comunidade científica tem um interesse cada vez maior em pesquisar grupos de substâncias que, quando presentes no meio ambiente, têm a capacidade de interferir com o sistema endócrino de animais e seres humanos (BILA; DEZZOTI, 2007). Essas substâncias são chamadas de DEQs e são definidas como substâncias que alteram a função do sistema endócrino e, conseqüentemente, causam efeitos adversos ao organismo exposto, podendo afetar também os seus descendentes (OMS, 2012).

O interesse pela pesquisa com os DE ocorreu após a publicação de alguns trabalhos de destaque em seres humanos. Entre esses, destaca-se estudos que comprovaram o aparecimento de câncer em filhas de mães que utilizaram dietilestilbestrol durante a gravidez, e o declínio na qualidade de sêmen de homens durante cerca de 50 anos na Dinamarca. Ademais, outras pesquisas que demonstraram que o agrotóxico DDT causa efeitos nocivos ao sistema reprodutor de jacarés, de mamíferos e de pássaros (BILA; DEZZOTI, 2007).

Recentemente, vários trabalhos têm demonstrado que os DE, incluindo os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), pesticidas, polímeros plásticos e aditivos alimentares, alteram o funcionamento do sistema nervoso, da tireoide e do sistema reprodutor (MAQBOOL et al., 2016). Além disso, podem levar ao desenvolvimento de câncer de mama, de próstata e de testículos, à obesidade e ao diabetes (DE COSTER; VAN LAREBEKE, 2012). Maqbool et al. (2016) descrevem que os efeitos associados aos DE seriam ocasionados pelo estresse oxidativo, devido à produção de espécies reativas de oxigênio, que, por sua vez, levam a lesões no DNA. Isso culminaria em

defeitos na síntese de lipídeos e proteínas, bem como na inibição de enzimas envolvidas na biossíntese dos esteroides, principalmente do citocromo P450. A principal fonte de exposição humana e animal aos DEQs se dá por intermédio da água contaminada, já que essas substâncias, depois de desprezadas, acabam contaminando os lençóis freáticos e os tratamentos convencionais não são capazes de removê-las (PONTELLI; NUNES; OLIVEIRA, 2016).

Sabe-se que o período mais sensível para exposição aos DE são os períodos críticos para o desenvolvimento, como a vida fetal e a puberdade. Essa exposição pode não causar efeitos imediatos como problemas teratogênicos, mas pode levar a um aumento da incidência de doenças ao longo da vida (OMS, 2012). Devido ao papel crítico desempenhado pelos hormônios, substâncias que mimetizam suas ações podem causar mudanças no ambiente materno fetal que alteram a trajetória normal do desenvolvimento do feto e podem programar o desenvolvimento de doenças na vida adulta desses indivíduos (PADMANABHAN; CARDOSO; PUTTABYATAPPA, 2016).

3. Programação Fetal

O termo “programação” foi descrito inicialmente por Lucas (1991) como uma mudança permanente e de longo prazo na estrutura ou na função de um organismo, resultante de um estímulo ou de um insulto em um período crítico do início da vida. Durante a mesma época, a nutrição fetal e pós-natal deficiente já havia sido relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) na vida adulta (BARKER, 2007; HALES; BARKER, 1992). A associação entre insultos ocorridos durante períodos críticos do desenvolvimento e o risco aumentado de doenças crônicas ao longo da vida possivelmente ocorra devido a efeitos ambientais que influenciam a expressão genica, por meio de mecanismos epigenéticos e efeitos de sinalização hormonal transmitidos ao feto durante a gestação e ao recém-nascido via lactação. O período em que esses insultos podem ocorrer incluem desde a vida pré-natal, pós-natal, infância até a adolescência, que são estágios caracterizados por um alto grau de plasticidade (SILVEIRA et al., 2007).

Foram propostas algumas hipóteses que explicam a programação metabólica. Hales e Barker (1992) descreveram a teoria do fenótipo poupador, a qual propõe que o feto é capaz de se adaptar ao ambiente intrauterino adverso otimizando o uso da oferta energética. Nessa perspectiva, os nutrientes são direcionados para órgãos

críticos em detrimento de outros órgãos, aumentando então a vulnerabilidade desses órgãos na vida pós-natal. Outra hipótese muito discutida é a da resposta adaptativa preditiva, em que o feto estima e prediz o ambiente pós-natal e promove, assim, adaptações em seu processo de desenvolvimento ainda na vida uterina (GLUCKMAN; HANSON, 2004). Diferentemente do que foi proposto por Hales e Barker (1992), essa nova teoria propõe que não há vantagem imediata nas alterações fisiológicas, haja vista que o objetivo é a sobrevivência do feto na vida pós-natal pelo menos até a idade reprodutiva (SILVEIRA et al., 2007). Recentemente, propôs-se uma terceira hipótese chamada de teoria do segundo “hit”, que sugere que os insultos ocorridos durante o período perinatal (primeiro “hit”) não seriam por si só suficientes para alterar o fenótipo do indivíduo na vida adulta; porém, a exposição a estressores na vida pós-natal podem agir como um segundo “hit” ativando ou amplificando os efeitos da programação fetal e levando ao aparecimento de doenças (PADMANABHAN; CARDOSO; PUTTABYATAPPA, 2015).

Os insultos que desencadeiam a programação fetal podem ser diversos, tais como doenças maternas e fetais, deficiência ou excesso de nutrientes, estresse, estilo de vida, intervenções médicas e exposição a químicos ambientais. Algumas dessas alterações podem levar a consequências já durante a vida pós-natal imediata, enquanto outras permanecem silenciadas até a vida adulta (PADMANABHAN; CARDOSO; PUTTABYATAPPA, 2016). Na literatura já foram descritas evidências experimentais ou epidemiológicas da programação fetal na síndrome metabólica, doença coronária, DM2, hipercolesterolemias, doença hepática gordurosa não alcoólica e problemas no sistema reprodutor (BARKER et al., 2007; DE GUSMÃO CORREIA et al., 2012; EBERLE; AMENT, 2012; HOFFMAN et al., 2018; OBEN et al., 2010).

Hormônios esteroides desenvolvem um papel fundamental durante o desenvolvimento fetal influenciando na diferenciação celular de órgãos sistêmicos, diferenciação sexual, desenvolvimento e função do sistema reprodutor. Nesse contexto, os sistemas reprodutivo e metabólico são os mais suscetíveis a uma exposição inapropriada a esteroides durante o desenvolvimento, o que pode culminar em patologias na vida adulta, como, por exemplo, exposição aos DEQs associada a problemas reprodutivos (CARDOSO; PUTTABYATAPPA; PADMANABHAN, 2015; HO, SHUK MEI et al., 2017)

O desenvolvimento do sistema reprodutor em mamíferos tem início logo nos primeiros dias de gestação e se prolonga até a puberdade. Esse prolongado período de desenvolvimento, crescimento e diferenciação promove uma ampla janela de suscetibilidade para ação dos DEQs (HO et al., 2017). Alguns trabalhos em roedores demonstram que a exposição materna aos DEQs durante as fases críticas do desenvolvimento causou problemas reprodutivos na prole durante a vida adulta. A prole masculina de camundongos expostos durante o período perinatal ao ftalato diisobutil, amplamente utilizado em produtos industriais, teve redução na concentração sérica e testicular de testosterona, bem como na concentração e motilidade dos espermatozoides na vida adulta (WANG et al., 2017). A administração de bisfenol A, substância classificada como DEQ que é comumente encontrada em polímeros plásticos, quando administrada durante a prenhez em ratas, levou ao aumento do estresse oxidativo e de alterações da morfologia testicular e inibição da espermatogênese (QUAN et al., 2016). Dallegrave et al. (2007) demonstraram que a administração do agrotóxico glifosato durante a prenhez e lactação causou alterações no sistema reprodutor da prole masculina tanto na vida adulta quanto na puberdade.

4. Sistema Reprodutor Masculino

O sistema reprodutor masculino é formado pelos testículos, epidídimos e órgãos acessórios, como as glândulas bulbouretrais, a vesícula seminal e a próstata. O testículo tem função dupla de produção de hormônios e de espermatozoides. O hormônio produzido é a testosterona, que é importante para espermatogênese, para a diferenciação sexual e seu metabólito ativo, a di-hidrotestosterona (DHT), que age nos tecidos alvos durante a puberdade e vida adulta, conferindo as características sexuais masculinas. Os testículos são constituídos pelos túbulos seminíferos altamente enovelados, entremeados por tecido conjuntivo frouxo, o interstício. No interstício, encontra-se as células de Leydig, sendo essas responsáveis pela produção de testosterona. As células de Sertoli nos túbulos seminíferos fornecem o suporte físico e nutricional para as células germinativas em desenvolvimento, ou seja, para o processo de espermatogênese (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Durante a vida fetal, células germinativas primordiais derivadas do endoderma do saco vitelino migram até a gônada e se diferenciam em espermatogônias no interior dos túbulos seminíferos. Na puberdade, devido à estimulação hormonal, o processo de espermatogênese torna-se ativo. Durante esse processo, as espermatogônias dão

origem aos espermatócitos primários, os quais, ao se dividirem durante a primeira divisão meiótica, dão origem aos espermatócitos secundários, que passam pela meiose II, originando as espermatídes, que, por fim, se diferenciam em espermatozoides (Figura1) (HALL, 2011).

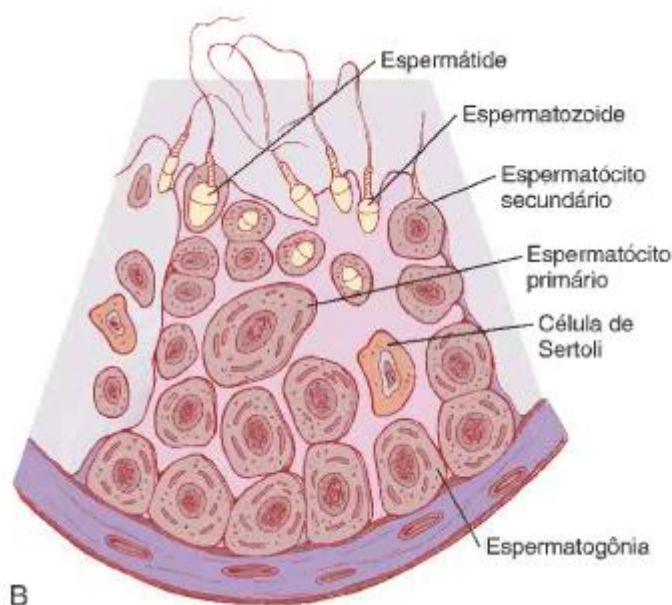


Figura 1. Ilustração da organização celular no interior dos túbulos seminíferos do testículo.

Fonte: Hall (2011).

O eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (HHT) constitui a relação entre o sistema nervoso central e o sistema reprodutor, e desempenha um papel fundamental na produção de hormônios esteroides e também na reprodução masculina. Fazem parte deste sistema o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o hormônio luteinizante (LH), o hormônio folículo-estimulante (FSH) e os hormônios esteroides sexuais (JEONG; KAISER, 2006). O GnRH é um peptídeo com dez aminoácidos secretados pelos neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo, é liberado no sistema vascular porta hipotalâmico-hipofisário, de onde é transportado para hipófise anterior na circulação porta hipofisária e estimula a liberação de duas gonadotrofinas, o LH e o FSH (HALL, 2011). As gonadotrofinas são glicoproteínas que agem sobre as gônadas por meio da ligação aos receptores localizados na membrana das células alvo nos testículos, principalmente por ativar o sistema de segundo mensageiro do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC). O LH age nas células de Leydig, estimulando a síntese de testosterona. O FSH atua no controle da produção de

espermatozoides, por intermédio da estimulação das células de Sertoli. Além de agirem nas gônadas regulando a gametogênese, os hormônios esteroides fazem a retroalimentação (*feedback*) sobre o hipotálamo e a hipófise (Figura 2) (EVERETT, 2006).

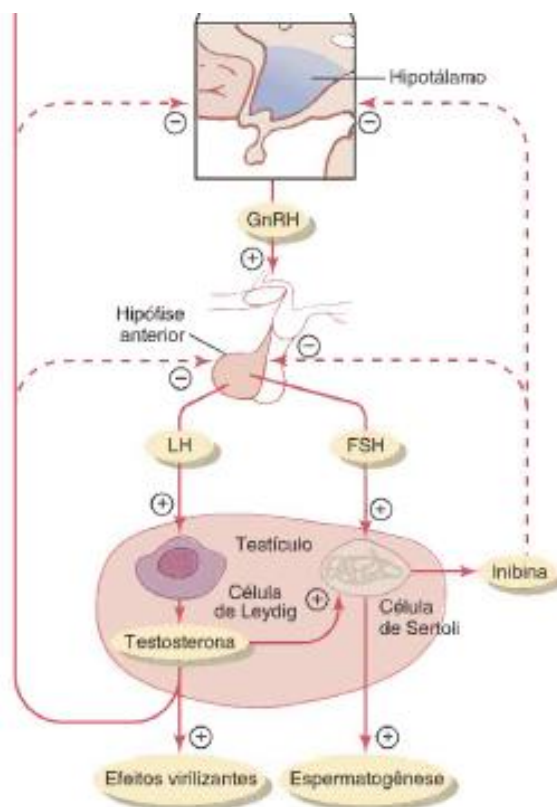


Figura 2. Regulação por *feedback* do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular no sexo masculino. Os efeitos estimulatórios estão indicados pelo símbolo + e os efeitos inibitórios da retroalimentação negativa estão indicados pelo símbolo -. FSH, hormônio folículo estimulante; GnRH, hormônio liberador de gonadotrofinas; LH, hormônio luteinizante.

Fonte: Hall (2011).

O desenvolvimento do sistema reprodutor ocorre durante a vida fetal. Inicialmente, as gônadas são indiferenciadas e têm os progenitores de ambas os sexos, uma complexa interação celular e hormonal leva ao desenvolvimento do fenótipo masculino. Para desenvolvimento do sistema reprodutor masculino é necessário um controle hormonal, e a testosterona é essencial para diferenciação morfológica do sistema reprodutor e também do eixo HHT (WILSON e DAVIES, 2007). A testosterona é produzida nos testículos pelas células de Leydig a partir do colesterol. A enzima 5-alfa-redutase converte a testosterona em um metabólito muito mais ativo a DHT. Durante o desenvolvimento fetal, os andrógenos exercem efeitos de logo prazo que incluem a organização de órgãos específicos durante as fases críticas da

morfogênese ou programação de atividades de enzimas que serão expressas mais tarde na vida (FOREST, 1983). As alterações nesses processos podem levar à masculinização incompleta que será percebida somente na puberdade e na vida adulta, causando anomalias na fertilidade e comportamento sexual (GERARDIN; PEREIRA, 2002).

5. Infertilidade Masculina

A infertilidade pode ser definida como a incapacidade de um casal sexualmente ativo e sem a utilização de métodos anticoncepcionais de estabelecer gravidez em um ano (OMS, 1999). Tal incapacidade pode afetar até 15% da população sexualmente ativa, com o componente masculino envolvido em até 50% dos casos, seja isolado ou em associação com alguma disfunção feminina (KLIESCH, 2017; PASQUALOTTO et al., 2004). No Brasil, estima-se que mais de 278 mil casais em idade fértil tenham dificuldade para conceber um filho. A Política Nacional de Atenção Integral em Reprodução Humana Assistida prevê o apoio do SUS para o tratamento da infertilidade (BRASIL, 2012). Estudos demonstram que a infertilidade masculina tem aumentado nas últimas décadas; entretanto, alguns fatores dificultam o estudo epidemiológico deste problema de saúde, como o fato de que a infertilidade masculina não é uma doença de notificação e por ser diagnosticada e tratada ambulatoriamente. Contudo, sabe-se que a infertilidade masculina está associada a sérios problemas psicossociais e conjugais e a onerosos custos para os serviços de saúde em todo mundo (WINTERS; WALSH, 2014).

As causas de infertilidade são bastante variáveis desde criptorquidismo, causas genéticas e abuso de substâncias ilícitas. Alguns fatores de risco também podem ser associados à raça, à região geográfica e à faixa etária (WINTERS; WALSH, 2014). Medicamentos tais como anti-hipertensivos, antipsicóticos, antidepressivos tricíclicos, entre outros, também podem estar associados a problemas de fertilidade (PASQUALOTTO et al., 2004). Recentemente, em uma revisão sistemática, foi demonstrado que o paracetamol, analgésico e antipirético comumente utilizado por grande parte da população mundial, em altas doses, pode afetar a morfologia do espermatozoide e causar supressão da síntese de testosterona (BANIHANI, 2017). A obesidade também está associada a problemas reprodutivos. Estudos demonstraram que homens com sobrepeso ou obesidade têm aumento na prevalência de oligozoospermia (concentração de espermatozoides menor que 20 milhões por

mililitro de sêmen ejaculado) em relação aos homens com peso normal (JENSEN et al., 2004). Ainda, a mobilidade dos espermatozoides em homens com sobrepeso e obesidade foi menor quando comparada com homens com peso normal (KORT et al., 2006).

Uma das causas do aumento da infertilidade masculina pode estar associada aos DEs durante as atividades laborais dos homens, como demonstrado na revisão sistemática de Queiroz e Waissmann (2004), em que o uso de substâncias como metais pesados, agrotóxicos, bifenilas policloradas, ftalatos, e PVC levou a alterações no sistema reprodutor masculino. O uso de agrotóxicos também foi considerado um fator de risco para infertilidade masculina em agricultores iranianos (GHAFARI; CHERAGHI; DOOSTI-IRANI, 2017).

6. Sistema Reprodutor X Glifosato

Pesquisas têm demonstrado que os efeitos do glifosato sobre o sistema reprodutor são mediados pela inibição da enzima aromatase, que é importante para conversão de testosterona em estradiol durante o processo de masculinização do cérebro; essa inibição foi observada em células placentárias e embrionárias humanas (BENACHOUR et al., 2007; RICHARD et al., 2005). Os efeitos tóxicos também podem ser mediados pela ação do glifosato de redução das concentrações da proteína aguda de regulação da esteroidogênese (STAR), demonstrado em culturas de células tumorais Leydig MA-10 (WALSH et al., 2000).

Um dos períodos críticos para ação dos DEQs é a puberdade. Pesquisadores avaliaram os efeitos da formulação comercial de glifosato ROUNDUP Transorb® no período pré-puberal. O glifosato foi administrado em ratos Wistar machos entre o 23º e 53º dias de vida por gavagem (5, 50 ou 250 mg/Kg). Os animais que receberam glifosato tiveram um atraso no início da puberdade, evidenciado pelo retardo na separação prepucial. Não houve diferenças na evolução de peso corporal entre os grupos estudados. Na dose de 250 mg/Kg, o peso dos testículos foi maior em relação ao controle. A concentração de testosterona diminuiu de forma dose dependente nos grupos que receberam glifosato (ROMANO et al., 2010).

Outro período crítico para o desenvolvimento ocorre durante a prenhez e a lactação. Dallegrave et al. (2007) avaliaram os efeitos do glifosato ROUNDUP® administrado por gavagem em ratas Wistar durante o período de prenhez e de lactação nas doses de 50, 150 e 450 mg/kg, na prole masculina durante puberdade e

na vida adulta. Não foi verificada toxicidade materna ou diferença no número de filhotes, peso ao nascimento e proporção de machos e fêmeas. Não houve diferença no peso do epidídimo e do testículo na puberdade e na vida adulta; porém, houve um aumento na concentração de espermatozoides anormais na puberdade e diminuição da concentração e na produção diária de espermatozoides na vida adulta. Verificou-se também que a concentração de testosterona diminuiu de forma dose dependente na puberdade.

Romano et al. (2012) avaliaram os efeitos da exposição materna ao glifosato no período de diferenciação sexual hipotalâmica (18º dia de prenhez até o 5º dia de vida da prole) no sistema reprodutor da prole masculina. Foi administrada a formulação comercial de glifosato ROUNDUP Transorb® por gavagem (50 mg/Kg). A prole oriunda das mães que receberam glifosato apresentou aumento das concentrações séricas de testosterona e estradiol. Foi observado também um aumento na expressão de RNAm de LH na hipófise, bem como aumento do conteúdo proteico desse hormônio na hipófise e no plasma no grupo tratado. Todavia, com relação ao FSH, observou-se apenas aumento do RNAm na hipófise, enquanto que as concentrações proteicas na hipófise e no plasma foram similares ao grupo controle. O grupo glifosato apresentou aumento da concentração e na produção diária de espermatozoide, bem como no peso da cabeça e da cauda do epidídimo. O peso dos testículos foi similar em ambos os grupos. A partir desses resultados os autores concluíram que a exposição materna ao glifosato altera o processo de masculinização, e sugerem que ocorreu um estímulo permanente na produção de LH ou uma falha no mecanismo de *feedback* negativo da testosterona sobre a produção de LH.

Outro estudo realizado somente com o ingrediente ativo glifosato isolado, administrado em ratos machos por gavagem nas doses de 5, 50 e 500 mg/Kg durante 5 semanas, demonstrou que não houve diferença no peso dos órgãos reprodutores, na concentração de testosterona, de estradiol e de progesterona. Não obstante, a concentração de espermatozoides foi menor nos ratos que receberam 500 mg/Kg (DAI et al., 2016).

A partir dos resultados desses estudos se verifica que os efeitos da exposição ao glifosato em períodos críticos do desenvolvimento são escassos e que os resultados diferem quanto ao tipo de formulação utilizada e ao período de exposição, justificando a necessidade de novos estudos para elucidar os mecanismos envolvidos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2013. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>. Acesso em: 01 out. 2016.

ALAVANJA, M. C. R. Pesticides Use and Exposure Extensive Worldwide. **Reviews on Environmental Health**, v. 24, n. 4, p. 303–309, 2009.

AL-RAJAB, A.J.; SCHIAVON, M.; Degradation of 14C-glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in three agricultural soils. **J Environ Sci**, v.22, p. 1374–1380, 2010.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRANAGAA, M. R.; MARTÍNEZA, M. A.; CASTELLANO, V. A.; MARTÍNEZA, M.; MARTINB, M.T.; NOZALB, M. J.; BERNAL, J. L.; Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology Letters**, v.190, p. 91–95, 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Segundo Seminário Mercado de Agrotóxicos e Regulação**, 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu++noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrototoxicos+em+20+12>>. Acesso em: 25 set. 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. **Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. Brasília, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013+2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>. Acesso em: 01 ago. 2017.

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M.; Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environ Sci Pollut Res**. 2016.

BANIHANI, S. A.; Effect of paracetamol on semen quality. **Andrologia**, 2017.

BARKER, D. J. P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 5, p. 412–417, 2007.

BENACHOUR, N.; SIPAHUTAR, H.; GASNIER, C.; TRAVERT, C. SERALINI, E. S.; Time- and Dose-Dependent Effects of Roundup on Human Embryonic and Placental Cells. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 53, p.126–133, 2007.

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.

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

BRASIL. **PORTARIA Nº 3.149, DE 28 DE DEZEMBRO DE 2012**, 2012. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt3149_28_12_2012.html. Acesso em: 05 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde, 2016. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agrotoxicos_otica_sistema_unico_saude_v1_t1.pdf>. Acesso em: 25 set. 2016.

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

CATTANI, D.; CESCO NETTO, P. C.; TAVARES, M. K.; PARISOTTO, E. B.; DE OLIVEIRA, P. A.; RIEG, C. E. H.; LEITE, M. C.; PREDIGER, R. D. S.; WENDT, N. C.; RAZERRA, G.; FILHO, D. W.; ZAMONER, A. DEVELOPMENTAL Exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, p.67-80, 2017.

CAVALLI, V. L. L.O.; CATTANI, D.; RIEG, C. E. H.; PIROZAN, P.; ZANATTA, L.; PARISOTTO, E. B.; FILHO, D. W.; SILVA, F. R. M. B. S.; PESSOA-PUREUR, R.; ZAMONER, A. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-

mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p.335–346, 2013.

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

CERDEIRA, A. L.; GAZZIERO, D. L. P.; DUKE, S. O.; MATALLO, M. B.; SPADOTTO, C. A.; Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosate-resistant soybean in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, 42:5, 539-549, 2007.

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

CORREIA, M. L. G.; VOLPATO, A. M.; ÁGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Developmental origins of health and disease: experimental and human evidence of fetal programming for metabolic syndrome. **J Hum Hypertens**, v. 26, n. 7, p. 405-419, 2012.

COX, C. Glyphosate (Roundup). **J. Pest. Reform**. 18, 3–17,1998.

DAI, P.; HU, P.; TANG, J.; LI, Y.; LI, C. Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. **Acta Histochem**, v. 118, n. 5, p. 519-26, 2016.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; OLIVEIRA, R. T.; ANDRADE, A. J.; DALSENER, P. R.; LANGELOH, A. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Arch Toxicol**, v. 81, n. 9, p. 665-73, 2007.

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

DE, A.; BOSE, R.; KUMAR, A.; MOZUMDAR, S. Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles. **Springer Briefs in Molecular Science**, 5-6, 2014.

DE COSTER, S.; VAN LAREBEKE, N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. **J Environ Public Health**, v. 2012, p. 1-52, 2012.

DE GUSMÃO CORREIA, M. L.; VOLPATO, A. M.; ÁGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Developmental origins of health and disease: experimental and human evidence of fetal programming for metabolic syndrome. **J Hum Hypertens**, 26(7):405-419, 2012.

DEFARGE, N.; TAKÁCS, E.; LOZANO, V. L.; MESNAGE, R.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G. E.; SZÉKÁCS, A. Co-Formulants in Glyphosate-Based Herbicides Disrupt Aromatase Activity in Human Cells below Toxic Levels. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 3, p. 264, 2016.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B.; Mini-review Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Manag Sci**, v. 64, p.319–325, 2008.

DUTRA, L. S.; FERREIRA, A. P.; Associação entre malformações congênitas e a utilização de agrotóxicos em monoculturas no Paraná, Brasil. **Saúde Debate**, V. 41, N. ESPECIAL, P. 241-253, 2017.

FOREST, M. G. Role of androgens in fetal and pubertal development. **Horm Res**. 18(1-3):69-83, 1983.

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

EVERETT, J W. **Pituitary and Hypothalamus: Perspectives and Overview**. In Neill, J. D. Ed. Knobil and Neill's Physiology of reproduction. 3rd. ed. Amsterdam: Ed Elsevier. p. 1289-1307, 2006.

GHAFAARI, M.; CHERAGHI, Z.; DOOSTI-IRANI, A.; Occupational risk factors among Iranian farmworkers: a review of the available evidence. **Epidemiol Health**, v. 39, 2017.

GERARDIN, D.C.C., PEREIRA, O.C.M. Reproductive changes in male rats treated perinatally with an aromatase inhibitor. Pharmacology, **Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 1, p. 301-305, 2002.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. The developmental origins of the metabolic syndrome. **Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 4, p. 183-187, 2004.

GOOD, P. Evidence the U.S. autism epidemic initiated by acetaminophen (Tylenol) is aggravated by oral antibiotic amoxicillin/clavulanate (Augmentin) and now exponentially by herbicide glyphosate (Roundup). **Clinical Nutrition ESPEN**, p. 1–13, 2017.

GUYTON, K. Z.; LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; EL GHISSASSI, F.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; SCOCCIANI, C.; MATTOCK, H.; STRAIF, K.; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER MONOGRAPH WORKING GROUP, IARC, LYON, F. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet. Oncology**, v. 16, n. 5, p. 490–1, 2015.

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

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.

HO, S. M.; CHEONG, A.; ADGENT, M. A.; Environmental Factors, Epigenetics, and Developmental Origin of Reproductive Disorders. **Reprod Toxicol**, 68:85-104, 2017.

HOFFMAN, F.; BORETTO, E.; VITALE, S.; GONZALEZ, V.; VIDAL, G.; PARDO, M. F.; FLORES, M. F.; GARCIA, F.; BAGNIS, G.; QUEIROZ, O. C. M.; RABAGLINO, M. B. Maternal nutritional restriction during late gestation impairs development of the reproductive organs in both male and female lambs. **Theriogenology**, v. 108, p. 331–338, 2018.

IPARDES. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Indicadores de desenvolvimento sustentável por bacias hidrográficas do Estado do Paraná**. Curitiba, 2013. Disponível em: <http://www.meioambiente.pr.gov.br/arquivos/File/indicadores.pdf> Acesso em: 07 nov 2016.

JENSEN, T. K. et al., Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. **Fertil Steril**. 82:863-870, 2004.

JEONG, K-H.; KAISER, U. B. **Gonadotropin-Releasing Hormone Regulation of Gonadotropin Biosynthesis and Secretion.** . In Neill, J. D. Ed. Knobil and Neill's Physiology of reproduction. 3rd. ed. Amsterdam: Elsevier, p. 1635-1637, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 12 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2013.

KLIESCH, S. Rationelle Diagnostik und Therapie des kinderlosen Mannes. **Urologe**, 2017.

KORT, H I. et al., Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. **J Androl.** 27: 450-452, 2006.

LARSEN, K.; NAJLE, R.; LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. **Environmental toxicology and pharmacology**, v.34, p. 811–818, 2012.

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

LUCAS A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, 156: 38–50; discussion 50–35, 1991.

MACLUSKY, N. J.; NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science**, v. 211, n. 4488, p. 1294-302, 1981.

MAQBOOL, F.; MOSTAFALOU, S.; BAHADAR, H.; ABDOLLAHI, M. Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. **Life Sci**, v. 145, p. 265-73, 2016.

MARTINI, C. N.; GABRIELLI, M.; VILA MDEL, C. A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. **Toxicol In Vitro**, v. 26, n. 6, p. 1007-1013, 2012.

MARC, J; MULNER-LORILLON, O; BOULBEN, S; HUREAU, D; DURAND, G; BELLÉ, R. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chem Res Toxicol**, v.15, p.326–331, 2002.

MARC, J; MULNER-LORILLON, O; BELLÉ, R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 245–249, 2004.

MERCURIO, P.; FLORES, F.; MUELLER, J.F.; CARTER, S.; NEGRI, A.P.; Glyphosate persistence in seawater. **Mar Pollut Bull**, v.85,p.385–390, 2015.

MESNAGE, R.; DEFARGE, N.; SPIROUX, V.J.; SERALINI, G.E. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. **BioMed Res. Int.**, 2014.

MONSANTO. **FISPQ - Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. ROUNDUP NA**, 2008. Disponível em: <<http://www.monsanto.com/global/br/produtos/documents/roundup-na-fispq.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2016.

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

NOBELS, I.; SPANOGHE, P.; HAESAERT, G.; ROBBENS, J.; BLUST, R. Toxicity Ranking and Toxic Mode of Action Evaluation of Commonly Used Agricultural Adjuvants on the Basis of Bacterial Gene Expression Profiles. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

OBEN, J. A.; MOURALIDARANE, A.; SAMUELSSON, A. M.; MATTHEWS, P. J.; MORGAN, M. L.; MCKEE, C.; SOEDA, J.; FERNANDEZ-TWINN, D. S.; MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, S. E.; SIGALA, B.; NOVELLI, M.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Journal of Hepatology**, v. 52, n. 6, p. 913–920, 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Endocrine Disrupting Chemicals – 2012**, 2012. Disponível em: <www.who.int/iris/bitstream/10665/78101/1/9789241505031_eng.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2016.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Exposure to Highly Hazardous Pesticides: a Major Public Health Concern. Geneva**, 2010. Disponível em:

<http://www.who.int/ipcs/features/hazardous_pesticides.pdf>. Acesso em: 01 out. 2016.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction**. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.

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

PASQUALOTTO, F. F.; LUCON, A. M.; SOBREIRO, B. P.; PASQUALOTTO, E. B.; SAMI ARAP, S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, v. 59, p.375-382, 2004.

PONTELLI, R. C.; NUNES, A. A.; OLIVEIRA DE, S. V. [Impact on human health of endocrine disruptors present in environmental water bodies: is there an association with obesity?]. **Cien Saude Colet**, v. 21, n. 3, p. 753-766, 2016.

QUAN, C.; WANG, C.; DUAN, P.; HUANG, W; YANG, K. Prenatal Bisphenol A exposure leads to reproductive hazards on male offspring via the Akt/mtor and mitochondrial apoptosis pathways. **Environmental Toxicology**, 2016.

QUEIROZ, E. K. R.; WAISSMANN, W. Exposição ocupacional e efeitos sobre o sistema reprodutor masculino. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, p. 485-493, 2006.

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.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M.; Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 30(7):1-3, 2014.

RODRIGUEZ-ALCALA, L. M.; SA, C.; PIMENTEL, L. L.; PESTANA, D.; TEIXEIRA, D.; FARIA, A.; CALHAU, C.; GOMES, A. Endocrine Disruptor DDE Associated with a High-Fat Diet Enhances the Impairment of Liver Fatty Acid Composition in Rats. **J Agric Food Chem**, v. 63, n. 42, p. 9341-9348, 2015.

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

ROMANO, M. A.; ROMANO, R. M.; SANTOS, L. D.; WISNIEWSKI, P.; CAMPOS, D. A.; SOUZA, P. B.; VIAU, P.; BERNARDI, M. M.; NUNES, M. T.; OLIVEIRA, C. A. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 4, p. 663-673, 2012.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; OLIVEIRA, C. A.; Glifosato como desregulador endócrino químico. **Ambiência Guarapuava**, v.5 n.2 p.359 – 372, 2009.

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

SILVEIRA, P. P.; PORTELLA, A. K.; GOLDANI, M. Z.; BARBIERI, M. A. Developmental origins of health and disease (DOHaD). *J Pediatr.*, 83(6):494-504, 2007.

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.

VANDENBERG, L. N.; BLUMBERG, B.; ANTONIOU, M. N. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? **J Epidemiol Community Health**, 71(6):613-618, 2017.

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.

WANG, X.; SHENG, N.; CUI, R.; ZHANG, H.; WANG, J.; DAI, J. Gestational and lactational exposure to di-isobutyl phthalate via diet in maternal mice decreases testosterone levels in male offspring. **Chemosphere**, v. 172, p. 260–267, 2017.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 31, n. 2 Pt 1, p. 117-165, 2000.

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, 2000.

WILSON, C. A.; DAVIES, D. C. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 133, n. 2, p. 331–59, 2007.

WINTERS, B. R.; WALSH, T. J.; The Epidemiology of Male Infertility. **Urol Clin N Am**, v. 41, p.195–204, 2014.

ARTIGO CIENTÍFICO

**GLYPHOSATE-BASED HERBICIDE EXPOSURE DURING PREGNANCY AND
LACTATION MALPROGRAMS THE MALE REPRODUCTIVE MORPHOFUNCTION
IN F1 OFFSPRING**

**Glyphosate-based herbicide exposure during pregnancy and lactation
malprograms the male reproductive morphofunction in F1 offspring**

Short Title: *Glyphosate: Malprogramming of male reproduction.*

Jakeline Liara Teleken¹, Ellen Carolina Zawoski Gomes¹, Carine Marmentini¹, Milara
Bruna Moi¹, Rosane Aparecida Ribeiro², Sandra Lucinei Balbo¹, Elaine Manoela
Porto Amorim³, Maria Lúcia Bonfleur^{1*}

¹ Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM), Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Brazil

² Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Campus UFRJ-Macaé, Macaé,
RJ, Brazil.

³ Laboratório de Histologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade
Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Brazil

***Correspondece to:** Maria Lúcia Bonfleur

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo,

Cascavel, PR, Brazil CEP: 85819-110

E-mail: mlbonfleur@hotmail.com

Fone: +55 45 3220 3257

ABSTRACT

One of the most consumed pesticides in the world is glyphosate, the active ingredient in the herbicide, ROUNDUP®. Studies demonstrate that glyphosate acts as an endocrine disruptor and that exposure to this substance at critical times in the developmental period may program the fetus to induce reproductive damage in adulthood. Our hypothesis is that maternal administration of glyphosate in mice during pregnancy and lactation will affect the development of male reproductive organs, impairing male fertility during adult life. Female mice consumed 0.5% glyphosate-ROUNDUP® in their drinking water (GLY group) or filtered water [control (CTL) group] from the 4th day of pregnancy until the end of the lactation period. Male F1 offspring were designated, according to their mother's treatment, as CTL-F1 and GLY-F1. Female mice that drank glyphosate displayed reduced body weight gain during gestation, but no alterations in litter size. Although GLY male F1 offspring did not exhibit modifications in body weight, they demonstrated delayed onset of puberty. Furthermore, 150-day-old GLY-F1 mice presented a lower number of spermatozoa in the cauda epididymis and reduced epithelial height of the seminiferous epithelium. Notably, intratesticular testosterone concentrations were enhanced in GLY-F1 mice, an effect associated with increased plasma and pituitary concentrations of luteinizing hormone (LH). Therefore, data indicate, for the first time, that maternal exposure to glyphosate-ROUNDUP® during pregnancy and lactation may lead to decreased spermatogenesis and disruptions in hypothalamus-pituitary-testicular axis regulation in F1 offspring.

Keywords: Developmental origins of health and disease, Endocrine disruptor chemical, Hypothalamus-pituitary-testicular axis, Pesticides, Spermatozoa, Testosterone.

INTRODUCTION

The use of pesticides increased after the world wars ¹ and, currently, exposure to these substances has become a global health problem ². The annual consumption of pesticides worldwide is about 2 million tons ³. Humans and other animals are exposed to these substances through the air, contaminated soil, food and water ^{2,4,5}. Glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine], the active ingredient in Monsanto ROUNDUP® herbicide, is the most consumed pesticide in Brazil and in the world ^{6,7}. Glyphosate is a broad-spectrum herbicide whose mechanism of plant toxicity occurs through interference with the production of essential aromatic amino acids by inhibition of the enzyme, enolpyruvylshikimate phosphate (EPSP) synthase, which is responsible for the biosynthesis of chorismic acid ⁸. Since this pathway of synthesis is not shared by any member of the animal kingdom, glyphosate has been classified as of low risk (United States Environmental Protection Agency, EPA) and some authors have described its use as safe for human and animal populations ^{6,9}. Despite this apparent safety, many studies have shown hazardous effects of exposure to glyphosate ^{10–15}, including effects on the endocrine system, leading to the classification of glyphosate as an endocrine disruptor chemical (EDC)^{12,15–18}.

Due to the critical role played by hormones during fetal development, substances that interfere with their actions, such as EDCs, can cause changes in the maternal environment that alter the normal trajectory of intrauterine development and potentially increase the risk of chronic diseases in adulthood ^{19,20}. The developmental origins of health and disease (DOHaD) phenomenon propose that, during specific developmental periods, tissues and organs are particularly sensitive to environmental exposures that program the organism for disease susceptibility later on in life ²¹. This phenomenon is well established in the literature for chronic diseases such as obesity,

Diabetes mellitus, metabolic syndrome and cardiovascular disease ²²⁻²⁴. In addition, data obtained with human and experimental rodent studies demonstrate that the concept of programming can also be applied to the reproductive system and that this system is extremely susceptible to DOHaD effects induced by EDCs ^{25,26}.

For the assessment of the toxicity of glyphosate on the reproductive system, only two studies have been conducted on maternal exposure, showing contradictory outcomes on male reproduction in offspring. At 140 days of age, offspring from female rats that were exposed to a commercial formulation of glyphosate-ROUNDUP® during the entire pregnancy and lactation period displayed a decrease in the number of spermatozoa without changes in plasma testosterone levels ¹⁶. However, the male F1 offspring from female *Wistar* rats, exposed to glyphosate-ROUNDUP® from the 18th day of pregnancy until to the 5th postnatal day, exhibited an increase in the number of spermatozoa, and in testosterone, estradiol, and luteinizing hormone (LH) levels ¹⁷. Therefore, more investigations are needed to characterize the actions of glyphosate as an EDC and its involvement in DOHaD. Herein, our hypothesis is that maternal administration of glyphosate during the pre and post-natal period will affect the hypothalamus-pituitary-testicular axis in the F1 offspring, malprogramming the physiological development of reproductive organs during fetal and neonatal life. As such, we evaluated the effects of maternal exposure to glyphosate on pubertal onset and reproductive morphofunction in male F1 offspring. Firstly, we performed a pilot study offering 0.5% or 1% glyphosate-ROUNDUP® in the drinking water to dams during pregnancy and lactation, as used in rats in previous studies ^{27,28}. Since the dams that received 1% glyphosate displayed a higher number of stillbirths, impaired maternal behavior or reduced survival of pups after birth, we conducted the study using the dose of 0.5%

glyphosate. Remarkably, our data provide the first evidence that maternal exposure to glyphosate during gestation and lactation delayed puberty onset, and impaired mature spermatozoa content in the cauda epididymis, effects that were linked with disruptions in hypothalamic-pituitary-testicular axis function in male F1 offspring.

Methods

Experimental mice groups

Maternal (F0) groups

Sexually mature male and female *C57Bl/6* mice (60-90 days old, 20-25 g) were obtained from the UNIOESTE's Central Animal Facility and maintained in the sectorial animal house of the Endocrine Physiology and Metabolism Laboratory at 28 ± 2 °C on a 12 h light-dark cycle (lights on at 8:00 am to 8:00 pm). Mice had free access to standard laboratory rodent chow diet (Supralab, São Leopoldo, RS, BRA) and filtered water. Two female mice in the proestrus phase of the estrus cycle were placed in a cage with one male during the dark period for mating. On the subsequent morning, vaginal smears were obtained from all females and examined by light microscopy. Pregnancy was confirmed in females in which spermatozoa were found or that remained in the diestrus phase of the estrus cycle for four days after mating. Pregnant females were maintained in individual cages and received filtered water [control (CTL) group, n=11] or 0.5% glyphosate (GLY group, n= 9; ROUNDUP Original DI®, Monsanto, BRA) in the drinking water from the 4th day of pregnancy until the end of the lactation period. This glyphosate dosage was previously used in pregnant rats ²⁷ and male adult rats ²⁸. The commercial formulation of glyphosate ROUNDUP Original DI® (Monsanto, São Paulo, SP, BRA) contains 445 g/L N-phosphonomethylglycine diammonium salt, which corresponds to 370g/L (37.0%

m/v) of the active component of glyphosate. The body weights of the mothers were recorded weekly during pregnancy and on the day of weaning. The duration of pregnancy and the number of pups were also registered.

F1 offspring groups

At 30 days of age, the CTL and GLY F1 offspring were weaned. Male F1 offspring were designated in accordance with their maternal treatments as CTL-F1 (n=12, from 12 litters) and GLY-F1 (n=8, from 8 litters). The mice were maintained from 30-150 days of age in collective cages with free access to standard rodent chow and filtered water. The descent of the testes was evaluated daily in the pups from the 21st day of life, by scrotum palpation, for determination of puberty onset. Figure 1 shows a representation of the F0 and F1 mice groups.

Biometric and plasma biochemical parameters

At 150 days of age, 8-h-fasted mice were weighed and the nasoanal length was measured. Blood was collected from the tip of the tail vein for glycemia measurement using a glucose analyzer (G-tech, Accumed-Glicomed, BRA). All mice were then anesthetized with xylazine (9 mg/kg body weight, Anasedan®, Vetbrands, BRA) and ketamine (90 mg/kg body weight, Dopalen®, Vetbrands, BRA). Once the skin reflex was absent, a total exsanguination was performed by cardiac puncture using a heparinized syringe. Plasma samples were stored at -80°C for posterior measurements of total cholesterol and triglycerides using colorimetric commercial kits (Bioliqid, Laborclin, Pinhais, BRA); plasma testosterone concentrations using ELISA kit (ab108666, ABCAM, Cambridge, UK); and LH and FSH plasma concentrations using the Milliplex Map assay kit mouse pituitary magnetic bead panel

(MPTMAG-49K, Merck, Millipore, MA, USA) with the immunoassay MAGPIX® platform.

Epididymal sperm count

The right epididymis was removed, and caput/corpus and cauda were used for counting spermatozoa, according to the protocol described by Marques and Oshio ²⁹. Small cuts were made in the epididymis and diluted in 50 µL of saline solution. Subsequently, 20 µL of the mixture was transferred to a volume of 6 mL of distilled water for immobilization of spermatozoa and counting with a hemocytometer.

Testis histopathology and morphometry

For histopathological analysis, the left testis was fixed in Alfac solution for 24 h. After fixation, the testis was embedded in Paraplast® (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), and serial sections of 5 µm in thickness were obtained, stained with hematoxylin-eosin and evaluated by light microscopy (Olympus DP71; Olympus BX60; Olympus, Japan) for qualitative histopathological analysis. Tubular cross-sections of the testis were randomly evaluated for signs of germ cell degeneration, detachment (appearance of breaking off cohorts of spermatocytes from the seminiferous epithelium), vacuolization (appearance of empty spaces in the seminiferous tubules) and the presence of multinucleated cells within the lumen of the seminiferous epithelium ³⁰. For morphometric analyzes, images were obtained from twenty testis sections per mouse and used for measurements of the tubular diameter (measured from the basal lamina to the basal lamina in the opposite direction), seminiferous epithelium (from the basal lamina to the most elongated

spermatid) and the luminal diameter ¹⁷ with Image Pro-plus 6.0® (Media Cybernetics, Maryland, USA) software.

Extraction of intratesticular testosterone

The extraction of intratesticular testosterone was performed following the protocol described by JEYARA *et al.* ³¹, with minor modifications. Firstly, the testis was homogenized in 250 µL phosphate-buffered saline (PBS) with the aid of a micro homogenizer (MA1102, Marconi, SP, Brazil). The homogenate was extracted with 5 mL diethyl ether and, after 5 min at room temperature, the upper phase was removed, and the precipitate was extracted again with 3 mL diethyl ether. The ether phases of the two extractions were combined, allowed to evaporate at room temperature, and then dissolved in 1 mL PBS. The samples were diluted again with PBS (1:20) and the testosterone concentrations were measured by ELISA kit as above described.

Western Blotting

For measurement of pituitary LH protein content in CTL-F1 and GLY-F1 mice, the gland was homogenized in 100 µL tissue protein extraction buffer containing antiprotease agents (T- PER®, Thermo Scientific, USA) using a sonicator (DESRUPTOR, Ultronique, BRA). The homogenate was centrifuged at 12,600 *g* at 4° C for 20 min. The supernatant was collected, and the protein concentration was measured by Bradford assay. Subsequently, the samples were incubated at 100 °C for 5 min with Laemmli buffer. Proteins (40 µg per lane) were separated by electrophoresis on biphasic polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Subsequently, samples were transferred to nitrocellulose membranes (Bio- Rad®, Hercules, CA, USA). The

membranes were treated with a blocking buffer (5% non-fat dried milk) and then incubated overnight with primary antibody against the β subunit of LH (β -LH; 1:500, ab180787, Abcam, Cambridge, UK). The specific band was visualized by incubating the membranes with secondary antibodies (1:10.000; Cell Signaling), followed by incubation with chemiluminescent reagents. The image was registered with the Chemi L-Pix Express photodocumentation system (Loccus Biotecnologia®, SP, BRA) and the band densitometry was measured using the LabImage analysis 1D software (Loccus Biotecnologia®, SP, BRA). Western blotting was repeated on all membranes using α -tubulin antibody (1:1000, T5168, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for control of protein expression.

Statistical analysis

Results are presented as means $\pm$ SEM of the number of mice/samples indicated in the table and figure legends. Data analysis was performed using GraphPad Prism version 6.0 for Windows (GraphPad Software ©, La Jolla, CA, USA) and R software³². Firstly, the data were submitted to the Shapiro-Wilk test for normality distribution evaluation. Parametric data were analyzed by unpaired Student's t-test and nonparametric data by the Mann–Whitney U-test. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Maternal (F0) group characteristics

The maternal GLY group displayed reduced body weight gain during pregnancy and exhibited lower body weight at the end of the lactation period, when compared with the CTL group (Tab. 1). However, no differences in the duration of gestation, or

in the number of pups, were observed between the GLY and CTL maternal groups (Tab. 1).

General and macroscopic reproductive characteristics in F1 offspring male mice

At 150 days of age, the body weight, total body weight gain and nasoanal length were similar in the GLY-F1 and CTL-F1 groups (Tab. 2). Furthermore, biochemical metabolic parameters, such as fasting glycemia, triglyceridemia and cholesterolemia, did not differ among GLY-F1 and CTL-F1 mice (Tab. 2).

To assess the toxicity of glyphosate on the male reproductive system, we first evaluated whether the herbicide alters the onset of puberty. Notably, the GLY-F1 mice presented a delay in testis descent, when compared with CTL-F1 mice (Tab. 3). This alteration was not associated with any modification in body mass, since the body weights of the mice on the day of testis descent were similar in the GLY-F1 and CTL-F1 groups (Tab. 3). In addition, at 150 days of age, GLY-F1 and CTL-F1 mice did not exhibit differences in the relative or absolute weights of reproductive tissues such as testis, epididymis, seminal vesicle and prostate (Tab. 3).

Epididymal sperm parameters

One of the bests parameters for estimation of reproductive toxicity is the sperm number. The GLY-F1 mice displayed a reduction of 70% in sperm number in the cauda epididymis, when compared with CTL-F1 mice ($P = 0.0019$; Fig. 1a). However, the number of spermatozoa did not differ in the caput/corpus of the GLY-F1 and CTL-F1 epididymis ($P = 0.14$; Fig. 1a).

Testis histopathology and morphometry

Histopathological analyzes demonstrated that GLY-F1 and CTL-F1 testis exhibited normal morphology, with normal seminiferous tubules, with concentric and normally organized germ cell layers, and no significant presence of debris in the lumen, acidophilic cells, vacuole formation, or degeneration (Fig. 1c). However, morphometric analysis showed that GLY-F1 seminiferous tubules displayed decreased height of the germinal epithelium, but without changes in the tubular and luminal diameters (Fig. 1b).

Hormone levels and protein expression

Although the plasma testosterone concentrations were similar between GLY-F1 and CTL-F1 mice ($P = 0.58$; Fig. 2b), the intratesticular testosterone content in GLY-F1 mice was 195% higher than that observed for CTL-F1 mice ($P = 0.02$; Fig. 2a). Additionally, the Gly-F1 mice displayed increased plasma LH concentrations and an enhancement of 111% in the β -LH pituitary protein content, when compared with the CTL-F1 group ($P = 0.008$ and $P = 0.015$; Fig. 2c). Plasma FSH concentrations were similar in GLY-F1 and CTL-F1 mice ($P = 0.808$; Fig. 2c).

Discussion

Although the DOHaD phenomenon has historically focused on the effects of under- and overnutrition, currently the field is expanding to cover effects of exposure to chemicals, including substances that act as EDCs³³. The long period of differentiation and maturation of the male reproductive system and its regulation by hormones makes this system susceptible to the DOHaD effects of EDCs³⁴. Our study demonstrated, for the first time, that exposure to a commercial formulation of

glyphosate-ROUNDUP® during pregnancy and lactation disrupts the male reproductive system in F1 male offspring. The commercial formulations of this herbicide, besides containing the active glyphosate ingredient, comprises other compounds that enhance glyphosate stability and penetration into vegetable cell ³⁵. Unfortunately, these ingredients have been declared inert by the industry and are excluded from toxicity tests, but studies have been showing that the toxicity of the herbicide formulation may not be due to glyphosate alone ^{36–38}. Therefore, we chose to use the glyphosate-ROUNDUP® formulation to mimic the substances used in agriculture and found in contaminated water, air and soil.

Despite scarce investigation, a study has reported that increased plasma glyphosate concentrations are related to shortening of gestation length in women ³⁹. However, as previously demonstrated for pregnant rats that ingest 0.5% glyphosate ²⁸, we found that GLY dams did not present alterations in the length of gestation or pup survival after birth. Additionally, in accordance with data obtained in female *Wistar* rats exposed to 1% glyphosate during pregnancy ^{13,27} and lactation ¹⁰, we observed lower body weight gain during pregnancy and at the end of lactation in GLY dams. It has been reported that pregnant rats exposed to 0.5 and 1% glyphosate demonstrate lower body weight gain during gestation and several disruptions in isocitrate dehydrogenase-NADP dependent enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and malic dehydrogenase activities in the liver, heart, and brain ²⁷. Interestingly, glyphosate dose-dependently decreased body weight gain and induced inflammation, oxidative stress and *de novo* lipogenesis in the liver of male *Wistar* rats ⁴⁰. We speculate that such effects also change intermediary metabolism and nutritional profile in GLY maternal mice groups in our study, contributing to the lower weight gain during gestation and lactation periods.

Remarkably, we observed that chronic exposure to glyphosate-ROUNDUP® during pregnancy and lactation delayed puberty onset in male F1 offspring without changing body weight. This effect was also observed in male *Wistar* rats exposed to glyphosate-ROUNDUP® from the 23rd to 53rd day of age, in which the delayed in preputial separation was not associated with changes in body weight in glyphosate-treated groups ¹². In addition to these data, indicating that maternal exposure to glyphosate during gestation and lactation may have endocrine disrupter actions in F1 sexual maturation, we found that 150-day-old GLY-F1 mice exhibited lower spermatozoa number in the cauda epididymis. This decrease in spermatozoa number was accompanied by a reduction in the epithelial height of the seminiferous tubules, indicating that maternal exposure to glyphosate may malprogram spermatogenesis. It is known that this process is dependent on a well-orchestrated hormonal environment in which LH stimulates Leydig cells to produce testosterone, and this androgen together with FSH stimulates spermatogenesis. In addition, testosterone reduces LH pituitary secretion via a negative feedback in the pituitary and hypothalamus ⁴¹. A previous study using male *Wistar* rats that were exposed to this herbicide from the pre-pubertal period (from the 23rd to 53rd day of age) also observed reductions in epithelial height and luminal diameter of seminiferous tubules, but such effects were linked to reduced testosterone plasma concentrations ¹². In contrast, in male F1 offspring from female rats that were treated with glyphosate-ROUNDUP® Transorb from the gestational day 18 to postnatal day 5, an increase in LH and testosterone plasma levels, associated with enhanced spermatogenesis, were reported ¹⁷. Here, we observed that maternal exposure to glyphosate also induced a hypothalamus-pituitary-testicular disruption by a different mechanism that reduces male sperm reserve, since GLY-F1 mice exhibited enhanced intratesticular

testosterone concentrations without modifications in plasma testosterone levels, but increased plasma and pituitary LH contents.

A testosterone surge from the testes is known to occur in neonatal rodents, which begins prenatally (at approximately embryonic day 18) and peaks on the day of birth ⁴². This testosterone surge is important to establish the sexually dimorphic brain circuitry that controls male differentiated behavior and reproductive physiological processes. Notably, this androgen surge acts on the developing brain and shapes its subsequent responsivity to the adult hormonal profiles that regulate male reproductive function. After the neonatal testosterone surge, plasma testosterone levels drop to low levels, where they persist until the onset of puberty ^{42,43}. Therefore, our results indicate that maternal glyphosate exposure during pregnancy and lactation may disrupt such male development regulation in the GLY-F1 group, which malprograms the reproductive system. We suggest that this malprogram may manifest not only due to disruptions in perinatal and postnatal androgen concentrations, induced by glyphosate, but also due to impairments in androgen actions in the brain of GLY-F1 mice, since most of the actions of testosterone in neurons occur due to its intracellular aromatization to estrogen via cytochrome P450 aromatase ^{42,43}. Supporting this hypothesis, it has been demonstrated that glyphosate dose-dependently inhibits aromatase activity in human embryonic 293 and placental-derived JEG3 cells ⁴⁴.

Furthermore, the higher intratesticular testosterone concentrations in the GLY-F1 group seem to contrast with the reduced epithelial height and lower number of spermatozoa in the cauda epididymis. However, although testosterone is important for spermatogenesis, its effect on this mechanism depends on the interaction of testosterone with androgen receptors (AR) in Sertoli cells ⁴⁵. Interestingly, a previous

study demonstrated that the glyphosate-ROUNDUP® formulation displayed a greater inhibition of the actions of AR, than glyphosate alone, in *HepG2* cells ⁴⁶. As such, our data indicate that the higher intratesticular testosterone concentrations may be due to increased LH plasma concentrations in GLY-F1 mice. However these enhanced intratesticular androgen levels fail to induce a compensatory increase in spermatogenesis to levels observed for CTL-F1 mice, suggesting that GLY-F1 testes present androgen resistance in Sertoli cells, due to compromised programming following maternal exposure to glyphosate.

In summary, our results demonstrate that maternal exposure to 0.5% glyphosate-ROUNDUP® Original DI, during pregnancy and lactation, delays puberty onset in male F1 offspring. Furthermore, maternal glyphosate exposure disrupts the hypothalamus-pituitary-testicular axis, enhancing LH secretion and increasing intratesticular testosterone concentrations, in an attempt to compensate the lower androgen activity and spermatogenesis in GLY-F1 mice. These findings indicate that glyphosate is an endocrine disruptor that may increase the risk of male infertility when individuals are exposed to this compound during critical moments of development.

Acknowledgments

This study forms part of the MSc. thesis of Jakeline Liara Teleken. We are grateful to professor Roberto Barbosa Bazotte Ph.D. and to Christiano Rodrigues Schamber Ph.D. for assistance with the immunoassay in the MAGPIX® platform, to Sandra Schmidt de Moraes for technical assistance and to Ariadne Barbosa, Marcia Rudy and Luana Sinhori for animal care.

Financial Support

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, PROAP, n: 817693/2015).

Conflicts of Interest

None.

Ethical Standards

All experiments were approved by the UNIOESTE's Committee on Ethics in Animal Experimentation.

References

1. Londres F. *AGROTÓXICOS NO BRASIL Um Guia Para Ação Em Defesa Da Vida.*; 2011.
2. The World Health Organization (WHO). Exposure To Highly Hazardous Pesticides: A Major Public Health Concern. *WHO Doc Prod Serv.* 2010.
3. De A, Bose R, Kumar A, Mozumdar S. Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles. 2014:5-6.
4. Acquavella JF, Alexander BH, Mandel JS, Gustin C, Baker B, Chapman P. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: Results from the farm family exposure study. *Environ Health Perspect.* 2004;112(3):321-326.
5. Bai SH, Ogbourne SM. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environ Sci Pollut Res.* 2016;23(19):18988-19001.
6. Duke SO, Powles SB. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag*

- Sci.* 2008;64(4):319-325.
7. AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
 8. Dill GM, Sammons RD, Feng PCC, et al. Glyphosate: Discovery, Development, Applications, and Properties. *Glyphosate Resist Crop Weeds Hist Dev Manag.* 2010;1-33.
 9. Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2000;31(2 I):117-165.
 10. Cattani D, Cesconetto PA, Tavares MK, et al. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Toxicology.* 2017;387:67-80.
 11. Good P. Evidence the U.S. autism epidemic initiated by acetaminophen (Tylenol) is aggravated by oral antibiotic amoxicillin/clavulanate (Augmentin) and now exponentially by herbicide glyphosate (Roundup). *Clin Nutr ESPEN.* 2017;1-13.
 12. Romano RM, Romano MA, Bernardi MM, Furtado P V., Oliveira CA. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Arch Toxicol.* 2010;84(4):309-317.
 13. Beuret CJ, Zirulnik F, Giménez MS. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reprod Toxicol.* 2005;19(4):501-504.
 14. Gallegos CE, Bartos M, Bras C, Gumilar F, Antonelli MC, Minetti A. Exposure

- to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring. *Neurotoxicology*. 2016;53:20-28.
15. de Souza JS, Kizys MML, da Conceição RR, et al. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. *Toxicology*. 2017;377:25-37.
 16. Dallegrave E, Mantese FD, Oliveira RT, Andrade AJM, Dalsenter PR, Langeloh A. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol*. 2007;81(9):665-673.
 17. Romano MA, Wisniewski P, Viau P, et al. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch Toxicol*. 2012;86(4):663-673.
 18. Pandey A, Rudraiah M. Analysis of endocrine disruption effect of Roundup ® in adrenal gland of male rats. 2015;2:1075-1085.
 19. Padmanabhan V, Cardoso RC, Puttabyatappa M. Developmental programming, a pathway to disease. *Endocrinology*. 2016;157(4):1328-1340.
 20. Bergman Å, Heindel J, Jobling S, Kidd K, Zoeller RT. *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals, 2012*. Vol 211.; 2012.
 21. Agarwal P, Morriseau TS, Kereliuk SM, et al. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2018;0(0):71-101.
 22. de Gusmão Correia ML, Volpato AM, Águila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. Developmental origins of health and disease: experimental and human evidence of fetal programming for metabolic syndrome. *J Hum Hypertens*.

- 2012;26(7):405-419.
23. Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992. *Int J Epidemiol*. 2013;42(5):1215-1222.
 24. Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med*. 2007;261(5):412-417.
 25. Ho S-M, Cheong A, Adgent MA, et al. Environmental Factors, Epigenetics, and Developmental Origin of Reproductive Disorders HHS Public Access. *Reprod Toxicol*. 2017;68:85-104.
 26. Chadio S, Kotsampasi B. The role of early life nutrition in programming of reproductive function. *J Dev Orig Health Dis*. 2014;5(1):2-15.
 27. Daruich J, Zirulnik F, Sofía Gimenez M. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ Res*. 2001;85(3):226-231.
 28. Cassault-Meyer E, Gress S, Séralini GÉ, Galeraud-Denis I. An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;38(1):131-140.
 29. Marques RM, Oshio LT. Em Roedores. 2009:36001.
 30. Sarkar D, Singh SK. Inhibition of testicular steroidogenesis and impaired differentiation of Sertoli cells in peripubertal mice offspring following maternal exposure to BDE-209 during lactation suppress germ cell proliferation. *Toxicol Lett*. 2018;290(March):83-96.
 31. Jeyaraj DA, Grossman G, Petrusz P. Altered bioavailability of testosterone in androgen-binding protein-transgenic mice. *Steroids*. 2005;70(10):704-714.
 32. R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 2015.

33. Haugen AC, Schug TT, Collman G, Heindel JJ. HHS Public Access. 2015;6(2):55-64.
34. Ho SM, Cheong A, Adgent MA, et al. Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. *Reprod Toxicol*. 2017;68(513):85-104.
35. Vandenberg LN, Blumberg B, Antoniou MN, et al. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *J Epidemiol Community Health*. 2017;71(6):613-618..
36. Defarge N, Takács E, Lozano VL, et al. Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(3).
37. Mesnage R, Defarge N, Spiroux De Vendômois J, Séralini GE. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *Biomed Res Int*. 2014;2014
38. Chłopecka M, Mendel M, Dziekan N, Karlik W. The effect of glyphosate-based herbicide Roundup and its co-formulant, POEA, on the motoric activity of rat intestine – In vitro study. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;49:156-162.
39. Parvez S, Gerona RR, Proctor C, et al. Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length : a prospective Indiana birth cohort study. 2018:1-12.
40. Tang J, Hu P, Li Y, Li C. Ion Imbalance Is Involved in the Mechanisms of Liver Oxidative Damage in Rats Exposed to Glyphosate. 2017;8(December):1-12.
41. Jin J, Yang W. Molecular regulation of hypothalamus – pituitary – gonads axis in males. *Gene*. 2014.
42. Clarkson J, Herbison AE, Clarkson J. Hypothalamic control of the male

- neonatal testosterone surge. 2016.
43. Lenz KM, McCarthy MM. hypothalamus. 2017;32(12):2096-2104.
 44. Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, Gasnier C, Traver C, Séralini GE. Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2007;53(1):126-133.
 45. Walker WH. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. 2011;1(2):116-120.
 46. Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon MC, Séralini GE. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*. 2009;262(3):184-191.

Table 1: Effects of glyphosate exposure during pregnancy and lactation on general maternal characteristics.

	CTL (n = 11)	GLY (n = 9)	<i>P-value</i>
Body weight gain in pregnancy (g)	10.89 ± 0.8	8.13 ± 0.4*	0.0089
Body weight at weaning (g)	26.00 ± 0.7	21.56 ± 0.7*	0.0007
Days of pregnancy	19.55 ± 0.3	19.56 ± 0.2	0.8772
Litter size	6.30 ± 0.5	5.10 ± 0.5	0.1088

Data are means ± SEM. *P < 0.05 versus CTL (Student's t-test).

Table 2: Effects of glyphosate on biometric nutritional parameters and fasting plasma biochemical parameters in F1 offspring male mice at 150 days of age.

	CTL-F1 (n = 11)	GLY-F1 (n = 6)	<i>P-value</i>
Body weight (g)	24.92 ± 0.4	23.40 ± 0.1	0.1235
Body weight gain (g)	4.49 ± 0.5	3.63 ± 0.6	0.2760
Nasoanal length (cm)	9.20 ± 0.1	8.90 ± 0.1	0.1927
Glucose (mg/dL)	108.60 ± 6.3	92.30 ± 2.0	0.0934
Total cholesterol (mg/dL)	91.17 ± 1.8	94.58 ± 1.7	0.2005
Triglycerides (mg/dL)	101.30 ± 6.2	116.20 ± 12.3	0.2577

Data are means ± SEM. Mann-Whitney U-test and Student's t-test.

Table 3: Effects of glyphosate on pubertal parameters and weight of reproductive organs of F1 offspring male mice at 150 days of age.

	CTL-F1 (n = 11)	GLY-F1 (n = 6)	<i>P-value</i>
<i>Pubertal parameters</i>			
Age at testis descent (days)	29.20 ± 0.9	34.20 ± 0.2*	0.0079
Body weight (BW) at testis descent (g)	12.42 ± 0.3	11.96 ± 0.3	0.3671
<i>Reproductive parameters at adulthood</i>			
Testis (mg)	104.6 ± 4.1	107.4 ± 3.1	0.9250
Testis in mg/100g BW	419.9 ± 15.1	461.6 ± 12.2	0.0629
Epididymis (mg)	33.1 ± 0.7	34.3 ± 2.3	0.5193
Epididymis in mg/100g BW	133.8 ± 1.9	155.3 ± 10.5	0.0829
Vesicle seminal (mg)	16.9 ± 1.3	15.4 ± 1.5	0.4756
Vesicle seminal in mg/100g BW	68.8 ± 5.3	70.2 ± 8.2	0.9990
Prostate (mg)	0.68 ± 0.1	0.78 ± 0.1	0.4035
Prostate in mg/100g BW	2.8 ± 0.3	3.6 ± 0.5	0.1820

Data are means ± SEM. Mann-Whitney U-test and Student's t-test.

Figure legends

Figure 1: Adult female and male *C57Bl/6* mice were mated, and pregnancy confirmed. Pregnant female mice consumed a standard rodent diet, in association with 0.5% glyphosate (GLY group) diluted in drinking water, or filtered water only [control (CTL) group], from the 4th day of gestation until the end of lactation period. At 30 days of age, the CTL and GLY offspring were weaned. Male F1 offspring were designated, in accordance with their maternal treatments as: CTL-F1 and GLY-F1. From 30-150 days of age, F1 offspring had free access to standard rodent chow and filtered water.

Figure 2: *Maternal glyphosate exposure reduces the spermatozoa reserve in the cauda epididymis and epithelial height of seminiferous tubules in F1 male offspring.* Means $\pm$ SEM of the sperm count in the caput/corpus and cauda epididymis (a) in 150-day-old CTL-F1 (n = 10) and GLY-F1 (n = 7) male mice. (b) Means $\pm$ SEM of tubule diameter, epithelial height and luminal diameter of the seminiferous tubules of 150-day-old CTL-F1 and GLY-F1 male mice. Representative histological sections stained with hematoxylin and eosin; seminiferous tubules (c) of 150-day-old CTL-F1 (n = 5) and GLY-F1 (n = 5) male mice. *Asterisk = lumen. Ep = epithelium. Arrowhead = interstice.* Scale bars = 50 μ m. In all experiments the "n" was reached using only one male F1 offspring from each litter of the maternal experimental groups. *P < 0.05 versus CTL-F1 (Mann-Whitney U-test, with the exception of spermatozoa counts, which were compared using Student's t-test).

Figure 3: *Maternal glyphosate exposure increases intratesticular testosterone concentration, due to an enhancement in pituitary and circulating levels of LH in F1 male offspring.*

Means $\pm$ SEM of intratesticular (a) and plasma (b) testosterone concentrations, and LH and FSH plasma concentrations (c) in 150-day-old CTL-F1 (n = 8-11) and Gly-F1 (n = 5-8) male mice. Protein content of β subunit of LH in the pituitary of 150-day-old CTL-F1 (n = 8) and Gly-F1 (n = 5) male mice. In all experiments the "n" was reached using only one male F1 offspring from each litter of the maternal experimental groups. *P < 0.05 versus CTL-F1 (Mann-Whitney U-test, with exception of LH and FSH data, which were compared using Student's t-test).

Figure 1.

Figure 1

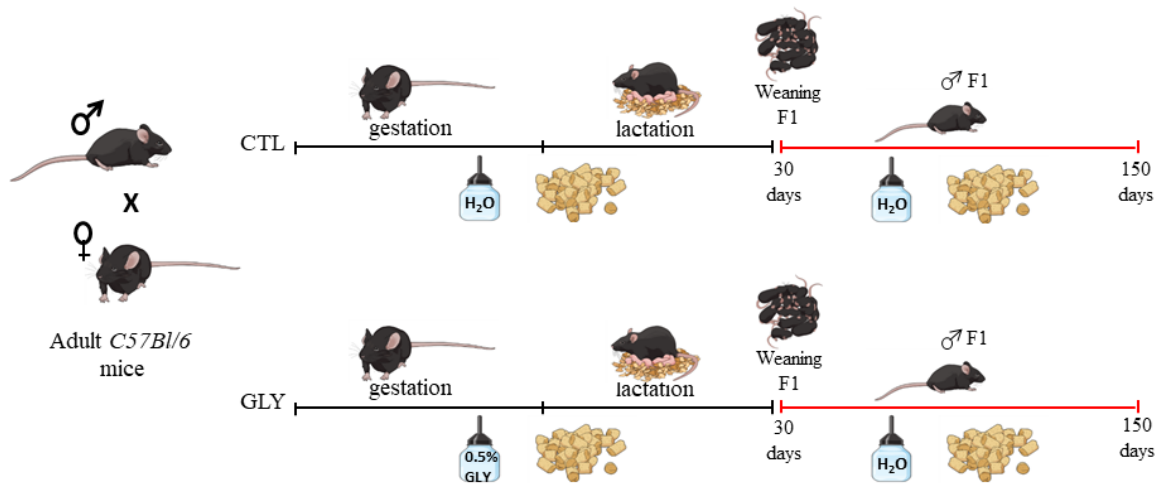


Figure 2

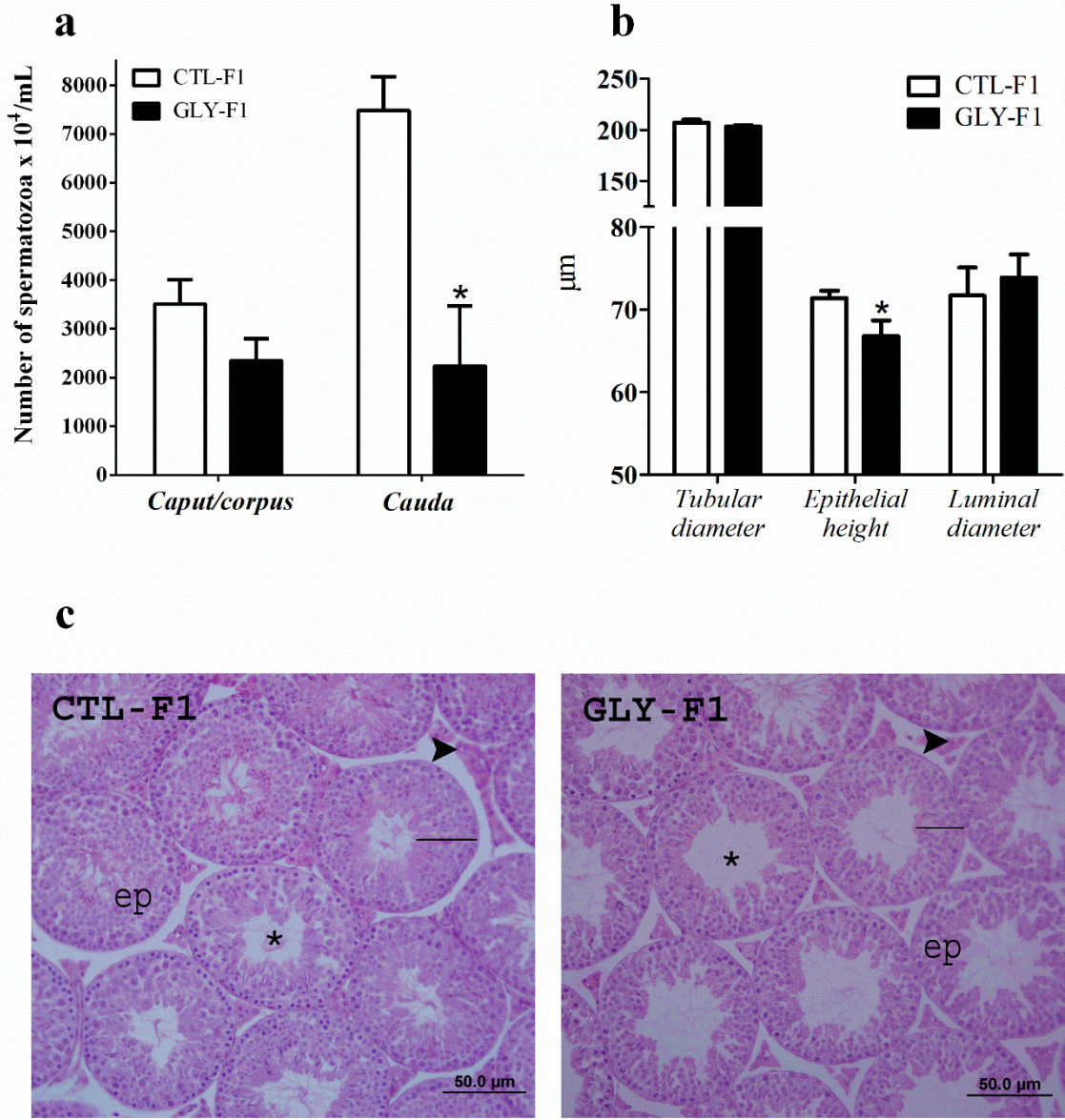
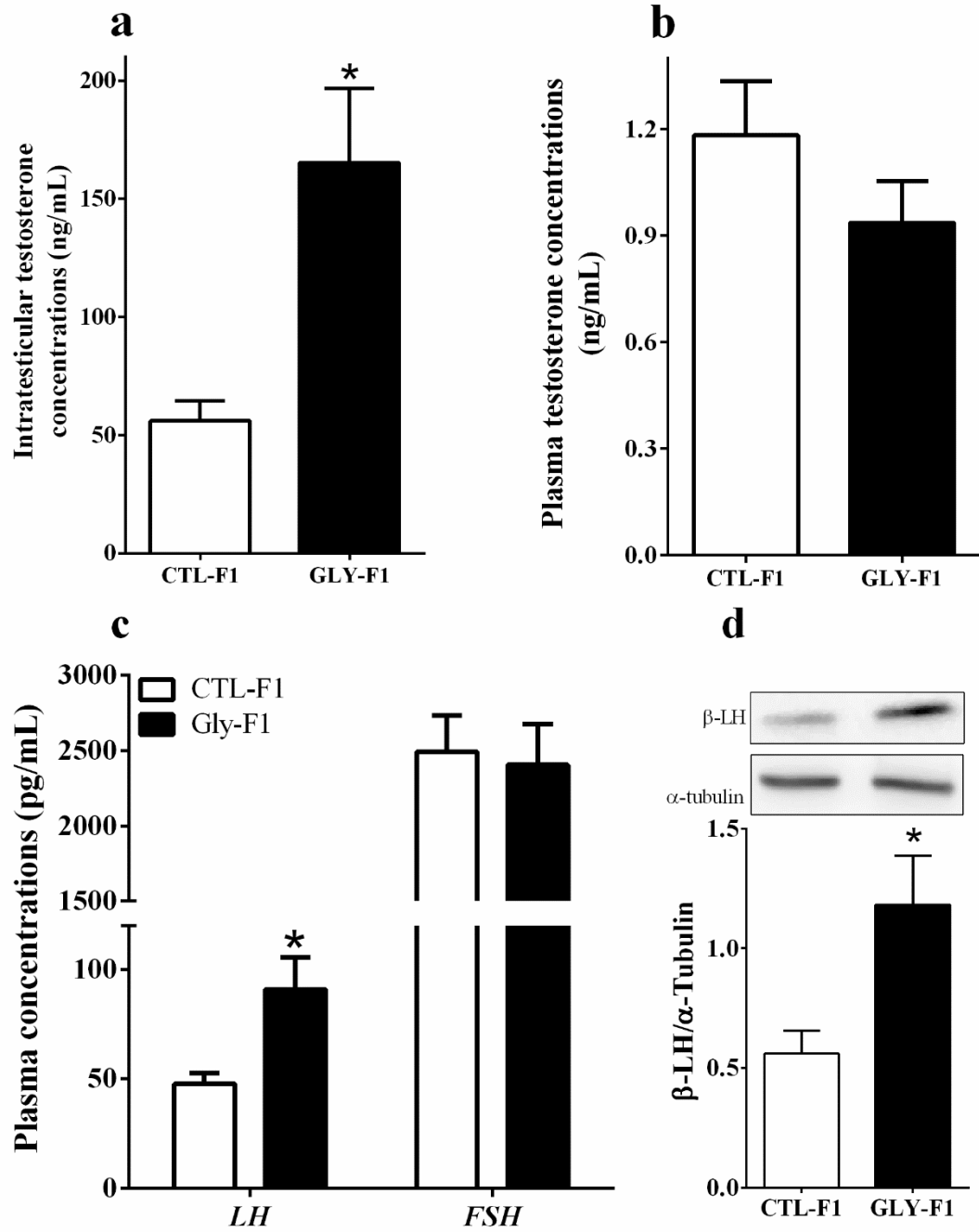


Figure 3



ANEXO A – Parecer de Protocolo do CEUA

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

PARECER DE PROTOCOLO

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

ATENÇÃO!

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

Cascavel, 16/09/2016

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

ANEXO B – Normas da revista científica

JOURNAL OF DEVELOPMENTAL ORIGINS OF HEALTH AND DISEASE

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Mission Statement

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

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

Categories of papers

Original research articles - This category is intended for full-scale basic, clinical or epidemiological studies including large controlled trials. Articles may contain up to 5,000 words (not including references, figures and tables) and should include an

abstract of up to 250 words and 3–5 key words. (Exceptions to the length limitation will be considered for unusually large or complex studies.)

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

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

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

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

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

Reviews – *J DOHaD* will publish scholarly, comprehensive reviews that summarize and critically evaluate research in the field addressed and identify future implications. Reviews will be invited by the Editors but may also be submitted. Authors wishing to submit papers in this category are advised to contact either the Editor-in-Chief or appropriate Associate Editor before doing so. Reviews may contain up to 5,000 words (not including references, figures and tables) and should include an abstract of up to 250 words and 3–5 key words. (Exceptions to the length limitation will be considered if justified by the scope of the Review).

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

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

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

Clinical Trials

As a condition of consideration for publication, registration of clinical trials in a public trials registry is required. A clinical trial is defined by the International Committee of Medical Journal Editors (in accordance with the definition of the World Health Organisation) as any research project that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Trials must be registered before the start of patient enrollment. The registry must be accessible to the public at no charge. It must be open to all prospective registrants and managed by a not-for-profit organization. There must be a mechanism to ensure the validity of the registration data, and the registry should be electronically searchable. An acceptable registry must include at minimum a unique trial number, trial registration date, secondary identification information if assigned by sponsors or others, funding source(s), primary and secondary sponsor(s), responsible contact person, research contact person, official scientific title of the study, research ethics review, the medical condition being studied, intervention(s), key inclusion and exclusion criteria, study type, anticipated trial start date, target sample size, recruitment status, primary outcome, and key secondary outcomes. Registration information must be provided at the time of submission. Trial registry name, registration identification number, and the URL for the registry should be included at the end of the abstract.

Originality and copyright

To be considered for publication in *J DOHaD*, a manuscript cannot have been published previously, nor can it be under review for publication elsewhere.

(Previously published figures may be sparingly used in Reviews, with appropriate

permission.) The posting of a brief summary of clinical trial outcomes on a pharmaceutical website (such as the PhRMA-sponsored database www.clinicalstudyresults.org) will not necessarily count as prior publication nor impede full consideration of a manuscript: *J DOHaD* will look at this on a case-by-case basis to determine the extent of overlap between the trial data posted and the manuscript as submitted, and will decide whether the manuscript contains a sufficiently new perspectives or sufficient additional data for it to count as original. Authors should declare when submitting manuscripts that such data have already been posted and *J DOHaD* will review this sympathetically.

Papers with multiple authors are reviewed with the assumption that all authors have contributed materially to the research reported, have approved the submitted manuscript and concur with its submission to *J DOHaD*. A Copyright Transfer Agreement, with certain specified rights reserved by the author, must be signed and returned to the Editor by the senior author of accepted manuscripts (Signing on behalf of all the other authors), prior to publication. This is necessary for the wide distribution of research findings, and the protection of both author and the International Society for Developmental Origins of Health and Disease under copyright law.

Authorship

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

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

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

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

Manuscript submission

All manuscripts must be submitted online via the website:

<http://mc.manuscriptcentral.com/dohad>

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

The Editor-in-Chief will acknowledge receipt of the manuscript, provide it with a manuscript reference number and assign it to an Associate Editor and to reviewers. The reference number of the manuscript should be quoted in all correspondence with the *J DOHaD* Office and Publisher.

Initial Submission

The following instructions must be followed carefully:

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

- Printed copies of the manuscript, tables and figures are not required and should not be sent.

Please note that correspondence regarding submitted and revised manuscripts will be with the

Corresponding Author only.

Revised\Final Submission

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

Review process

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

Authors should note that manuscripts may be returned after initial review by the Editors if the paper is deemed unlikely to be reviewed favorably. This rapid rejection process enables the author to submit promptly for publication elsewhere. Every effort will be made to provide the author with a review within 6 weeks of receipt of the manuscript. If the Editor requests that revisions be made to a manuscript

before publication, a maximum of 3 months shall be allowed for preparation of the revision, except in unusual circumstances.

Manuscript preparation and style

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

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

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

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

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

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

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

How to Ensure Colour Online

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

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

Author Requirements

It is not necessary for authors to indicate that a figure should be displayed in colour. CUP will assume that any author who submits figures in colour wants and agrees to their being produced in colour online. It is the author's responsibility to declare otherwise. Colour figures must be submitted before the paper is accepted for publication, and cannot be received later in the process.

Exceptions to Free Colour:

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

What to Expect

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

The use of **Abbreviations**, except those that are widely used, is strongly discouraged. They should be used only if they contribute to better comprehension of

the manuscript. Acronyms should be spelled out at first mention. Metric system (SI) units should be used.

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

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

Acknowledgements

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

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

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

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

Financial Support

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

the following statement: “This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors.”

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

Conflicts of Interest

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

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

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

Ethical Standards

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

The Ethical Standards statement should be placed after the Conflicts of Interest section before the References. If the research does not involve human and/or animal experimentation, this statement should be omitted. Papers reporting the results of human and/or animal experimentation that do not contain an Ethical Standards

statement will not be reviewed. For more information on the ethical standards and procedures of Cambridge Journals, please visit Cambridge Journals Online.

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

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

Animal studies

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

Systematic Review/Meta-Analyses

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

Randomised trials

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

Supplemental on-line material

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

prefix "S" (e.g. Supplementary Table S1, Supplementary Figure S1). Supplementary files will not be copy-edited, and will be published as supplied.

References

References should be numbered consecutively (in superscript) as they appear in the text. Type the reference list with double-spacing on a separate sheet. References (using Index Medicus abbreviations) should appear in the style as demonstrated below. Please note that if six authors or more, the first three authors should be listed and then 'et al.'. Examples:

1. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, et al. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr.* 2007; 97, 435-439.
2. Gilbert JS, Nijland MJ. Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295, 1941-1952.
3. Mitchell M, Schulz SL, Armstrong DT, Lane M. Metabolic and Mitochondrial Dysfunction in Early Mouse Embryos Following Maternal Dietary Protein Intervention. *Biol Reprod.* 2009 [Epub ahead of print].
4. Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of health and disease: an overview. In *Developmental Origins of Health and Disease* (eds. Gluckman P, Hanson M), 2006; pp. 1-5. Cambridge University Press, Cambridge.

For work that is 'in press' i.e., accepted for publication but not yet published, '(In Press)' should be written in parenthesis and not the year of expected publication.

Proofs

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

Offprints

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

Cambridge Language Editing Service

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

[http://journals.cambridge.org/action/stream?pageId=8728&level=2&menu=Authors
&pageId=3608](http://journals.cambridge.org/action/stream?pageId=8728&level=2&menu=Authors&pageId=3608) *10th March 2016*