

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

JAKELINE LIARA TELEKEN

**EFEITOS METABÓLICOS E TOXICIDADE DOS PESTICIDAS ATRAZINA E
GLIFOSATO *IN VIVO* E *IN VITRO***

CASCAVEL-PR

Fevereiro/2025

JAKELINE LIARA TELEKEN

**EFEITOS METABÓLICOS E TOXICIDADE DOS PESTICIDAS ATRAZINA E
GLIFOSATO *IN VIVO* E *IN VITRO***

TESE apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde – Doutorado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título Doutora em Biociências e Saúde.

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

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a. Maria Lúcia Bonfleur

COORIENTADORAS: Prof.^a Dr.^a. Rosane

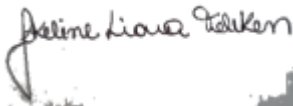
Aparecida Ribeiro e Prof.^a Dr.^a. Leticia Prates

Roma

CASCADEL-PR

Fevereiro/2025

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura:  Data: 22/04/2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Teleken, Jakeline Liara
Efeitos metabólicos e toxicidade dos pesticidas atrazina e glifosato in vivo e in vitro / Jakeline Liara Teleken; orientadora Maria Lúcia Bonfleur; coorientadora Rosane Aparecida Ribeiro. -- Cascavel, 2025.
59 p.

Tese (Doutorado Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em BioCiências e Saúde, 2025.

1. pesticidas. 2. metabolismo. 3. obesidade. 4. fígado. I. Bonfleur, Maria Lúcia, orient. II. Ribeiro, Rosane Aparecida, coorient. III. Título.

JAKELINE LIARA TELEKEN

Efeitos metabólicos e toxicidade dos pesticidas atrazina e glifosato in vivo e in vitro.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora 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:

Documento assinado digitalmente
 **MARIA LUCIA BOMFLEUR**
Data: 11/02/2025 14:53:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador(a) - Maria Lucia Bonfleur

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

Documento assinado digitalmente
 **SABRINA GRASSIOLLI**
Data: 15/02/2025 14:18:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

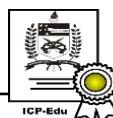
Sabrina Grassioli

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

Documento assinado digitalmente
 **RAFAEL ANDRADE MENOLLI**
Data: 11/02/2025 13:56:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rafael Andrade Menolli

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



Documento assinado digitalmente
Alex Rafacho
Data: 11/02/2025 13:41:27-0300
CPF: ***.799.478-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Alex Rafacho

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Documento assinado digitalmente
 **JOSEANE MORARI RICCIARDI DE AGUIAR**
Data: 11/02/2025 17:28:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Joseane Morari Ricciardi de Aguiar Universidade
Estadual de Campinas (UNICAMP)

Cascavel, 11 de fevereiro de 2025

RESUMO

O aumento do número de evidências de toxicidade relacionadas aos pesticidas tem alertado a sociedade e a comunidade científica em relação aos riscos dessas substâncias para o ambiente e para a saúde. Entre os pesticidas mais utilizados atualmente estão os herbicidas atrazina e glifosato. Ambos podem agir como desreguladores endócrinos e causar alterações indesejáveis no metabolismo. O objetivo deste trabalho foi avaliar em um modelo animal os efeitos metabólicos da exposição a formulações comerciais de pesticidas durante janelas críticas para o desenvolvimento, bem como avaliar se ocorrem diferenças entre a formulação comercial e o princípio ativo isolado na indução de estresse oxidativo e expressão gênica em uma linhagem de hepatócitos humanos. Resultados de um primeiro trabalho evidenciaram que a exposição materna durante gestação e lactação ao Herbicida a Base de Glifosato (HBG) promoveu redução do ganho de peso corporal e dos estoques de gordura retroperitoneal e perigonadal na prole adulta de camundongos machos alimentados com dieta hiperlipídica (DH). Além disso, foi observado maior tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, bem como menor grau de esteatose hepática. Em outro estudo, observou-se que camundongos machos e fêmeas expostos no período peripuberal ao herbicida a base de atrazina (HBA) na dose de 5 mg/kg de peso corporal e depois alimentados com DH por 90 dias, apresentaram respostas diferenciadas ao herbicida. Embora o peso corporal e a adiposidade tenham permanecido inalterados, os camundongos machos expostos ao HBA apresentaram hipertrofia dos adipócitos e *upregulation* de genes envolvidos na captação de ácidos graxos e na regulação de gotículas lipídicas no tecido adiposo perigonadal. Além disso, a exposição peripuberal ao HBA exacerbou a esteatose hepática em ambos os sexos, com aumento da acumulação ectópica de gordura em fêmeas, correlacionando-se com o aumento da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na captação e exportação de ácidos graxos. Em um terceiro estudo, avaliou-se a toxicidade diferencial entre o princípio ativo glifosato e o HBG em células HepG2. A exposição ao HBG resultou em aumento na produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial, adicionalmente a análise de sequenciamento de RNA revelou 7371 genes diferencialmente expressos em comparação ao glifosato isolado, com destaque para vias relacionadas ao estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático, autofagia e apoptose. A análise conjunta dos resultados demonstra que os HBG e HBA exibem potencial para agir como desreguladores endócrinos e obesógenos, respectivamente. Os efeitos observados variam de acordo com período de exposição e o sexo dos animais, evidenciando a complexa toxicidade desses compostos. O HBG demonstrou toxicidade ainda maior que o glifosato isolado em células HepG2. Esses resultados reforçam a necessidade de regulamentações mais rigorosas para pesticidas, enfatizando a importância de estudos que avaliem os efeitos a longo prazo, bem como a toxicidade de todos os ingredientes presentes nas formulações comerciais.

Palavras-chave: Agrotóxicos; Obesidade; Esteatose hepática; Estresse oxidativo; Hepatócitos.

METABOLIC EFFECTS AND TOXICITY OF THE PESTICIDES ATRAZINE AND GLYPHOSATE *IN VIVO* AND *IN VITRO*

ABSTRACT

The increased use of pesticides in Brazil and worldwide has raised concerns among society and the scientific community regarding the risks these substances pose to the environment and human health. Among the most widely used pesticides are the herbicides atrazine and glyphosate. Both can act as endocrine disruptors and cause undesirable metabolic changes. This study aimed to evaluate, in an animal model, the metabolic effects of exposure to commercial pesticide formulations during critical developmental windows, as well as to assess whether there are differences between the commercial formulation and the isolated active ingredient in inducing oxidative stress and gene expression in a human hepatocyte cell line. Results from an initial study showed that maternal exposure during gestation and lactation to the glyphosate-based herbicide (GBH) promoted a reduction in body weight gain and retroperitoneal and perigonadal fat stores in the adult offspring of male mice fed a high-fat diet (HFD). In addition, greater glucose tolerance and insulin sensitivity were observed, as well as a lower degree of hepatic steatosis. In another study, it was observed that male and female mice exposed in the peripubertal period to the atrazine-based herbicide (ABH) at a dose of 5 mg/kg body weight and then fed an HFD for 90 days, showed differentiated responses to the herbicide. Although body weight and adiposity remained unchanged, male mice exposed to ABH showed hypertrophy of adipocytes and upregulation of genes involved in fatty acid uptake and lipid droplet regulation in perigonadal adipose tissue. Furthermore, pubertal exposure to ABH exacerbated hepatic steatosis in both sexes, with increased ectopic fat accumulation in females, correlating with increased expression of genes encoding proteins involved in fatty acid uptake and export. In a third study, the differential toxicity between the active ingredient glyphosate and GBH was evaluated in HepG2 cells. Exposure to GBH resulted in increased production of hydrogen peroxide in the mitochondria, and RNA sequencing data showed 7371 differentially expressed genes compared to isolated glyphosate, highlighting pathways related to oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis. The joint analysis of the results demonstrates that GBH and ABH have the potential to act as endocrine disruptors and obesogens, respectively. The observed effects vary according to the exposure period and sex of the animals, evidencing the complex toxicity of these compounds. GBH proved to be even more toxic than the isolated active ingredient in hepatocytes. These results reinforce the need for stricter regulations for pesticides, emphasizing the importance of studies that assess long-term effects, as well as the toxicity of all ingredients present in commercial formulations.

Keywords: Pesticides; Obesity; Hepatic steatosis; Oxidative stress; Hepatocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Exposição a químicos ambientais em períodos críticos pode levar ao desenvolvimento de doenças na vida adulta	24
Figura 2 - Espectro da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo	28

LISTA DE ABREVIATURAS

DCNT	doenças crônicas não transmissíveis
DE	desreguladores endócrinos
DH	dieta hiperlipídica
DHGNA	doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DOHaD	origens desenvolvimentistas da saúde e doença
EFSA	<i>european food safety authority</i>
EH	esteatose hepática
EHNA	esteato-hepatite não alcoólica
EPA	agência de proteção ambiental americana
EPSPS	enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase
EROS	espécies reativas de oxigênio
HBA	herbicida a base de atrazina
HBG	herbicida a base de glifosato
HPG	eixo hipotálamo-pituitária-gônada
IARC	<i>international agency for research on cancer's</i>
IMC	índice de massa corporal
MAFLD	<i>metabolic associated fat liver disease</i>
OMS	organização mundial da saúde
PC	peso corporal
POEA	aminas polietoxiladas
TAB	tecido adiposo branco
TAM	tecido adiposo marrom
VLDL	lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 OBESIDADE E OBESÓGENOS.....	15
3.2 PESTICIDAS	17
3.2.1 Glifosato.....	18
3.2.2 Atrazina.....	21
3.3 ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DOENÇA – DOHaD.....	23
3.4 METABOLISMO HEPÁTICO E ESTEATOSE HEPÁTICA.....	26
4. MÉTODO	32
4.1 Exposição ao glifosato durante período de prenhez e lactação.....	32
4.2 Exposição à atrazina durante a puberdade	35
4.3 Análise da toxicidade do glifosato isolado e de formulação comercial em células Hep-G2.....	40
5. ARTIGOS	44
5.1 Glyphosate exposure during pregnancy and lactation changes body parameters, glucose homeostasis and liver histopathology in adult offspring male mice fed on a high fat diet.....	44
5.2 Pubertal Atrazine Exposure Promotes Adipocyte Hypertrophy and Hepatic Steatosis in Adult Mice on a High-Fat Diet.....	45
5.3 Comparative effects of glyphosate-based herbicide and glyphosate alone on oxidative stress and transcriptome in HepG2 cells.....	46
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	47
7. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

O crescimento na incidência e prevalência das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) tem alterado o perfil de doenças presentes na população e desafiado os sistemas de saúde. As DCNT são as principais causas de morte em todo mundo. Em 2019 elas foram responsáveis por 74% (41 milhões) das 57 milhões de mortes que ocorreram globalmente (IHME, 2024). A obesidade destaca-se dentro dessa problemática por ser também um fator de risco para o aparecimento de outras doenças como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão, problemas cardiovasculares e hepáticos, dislipidemias, entre outros. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2022 aproximadamente 43% dos adultos da população mundial apresentavam sobrepeso e 16% eram obesos (OMS, 2024). No Brasil, dados obtidos por inquérito telefônico em 2023 mostram que 61,4% dos brasileiros adultos tem sobrepeso e 24,3% são obesos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

A partir destes dados a comunidade científica internacional tem levantado a discussão sobre os fatores causais associados ao aumento na incidência de sobrepeso e obesidade. O desenvolvimento da obesidade é associado historicamente apenas a má alimentação por meio de uma dieta com alto teor calórico e lipídico, falta de exercícios físicos e fatores genéticos. Entretanto, atualmente a epidemia da obesidade não pode ser explicada apenas devido a esses fatores (Newbold, 2011). Nesse sentido, dentro da complexa rede de eventos que influenciam o processo saúde-doença vem recebendo atenção nos últimos 40 anos, os eventos que ocorrem no início da vida. Atualmente sabemos que a exposição a insultos ou fatores estressores nos períodos críticos para o desenvolvimento influenciam o desenvolvimento de doenças na vida adulta, um fenômeno conhecido como origens desenvolvimentistas da saúde e doença – DOHaD (Barker, 2007; Suzuki, 2018) .

O ambiente do início da vida inclui janelas de programação que se estendem desde o período de concepção até a adolescência. Fatores estressores durante a gestação e lactação podem alterar ou causar uma adaptação inadequada do metabolismo lipídico e proporcionar o desenvolvimento de obesidade na vida adulta (Hoffman *et al.*, 2021). A puberdade ou adolescência é marcada por modificações na

morfofisiologia e intensa produção de hormônios sexuais (Dutta; Sengupta, 2016). É um período importante para o desenvolvimento do tecido adiposo e insultos presentes nessa fase podem levar a alterações no desenvolvimento deste tecido e consequente alterações na homeostase metabólica (Holtrup *et al.*, 2017). Pesquisas em animais demonstraram que variações nutricionais durante a puberdade podem levar a alterações metabólicas na vida adulta (De Oliveira *et al.*, 2013a; Ibáñez *et al.*, 2017).

Dentre os insultos que podem desencadear a programação, destacam-se as substâncias que agem como desreguladores endócrinos (DE), que quando presentes durante pontos críticos do processo de adipogênese, podem contribuir para esse alarmante aumento nos índices de sobrepeso e obesidade. Essas substâncias químicas que estimulam o acúmulo de gordura e influenciam inadequadamente o metabolismo de lipídios são chamadas obesógenos (Newbold, 2011). Entre estas substâncias, encontram-se os pesticidas (Mostafalou; Abdollahi, 2017; Ren; Kuo; Blumberg, 2020). Interessantemente, estudos apontam que os efeitos obesógenos dos pesticidas só são observados após o tratamento com uma dieta hiperlipídica ou são exacerbados pela dieta, indicando que um segundo hit é necessário para o desenvolvimento da obesidade (Ren; Kuo; Blumberg, 2020).

A ação dos pesticidas como DE e obesógenos é preocupante tendo em vista que o consumo destas substâncias na agricultura vem crescendo em todo mundo a muitas décadas, o que tem implicações para saúde humana e animal devido a acumulação dessas substâncias no meio ambiente e, consequentemente, a exposição por meio do ar, água e alimentos contaminados (Alonso *et al.*, 2018). Entre os pesticidas mais utilizados no Brasil e no mundo destacam-se os herbicidas que tem como princípio ativo o glifosato e atrazina (Brovini *et al.*, 2021). O glifosato preenche oito de dez características necessárias para ser considerado um DE (Muñoz; Bleak; Calaf, 2021), embora ainda não seja reconhecido como tal pelas agências reguladoras. A atrazina, por outro lado, é classificada como DE e algumas pesquisas vem mostrando que ela age como substância obesógena (Cook *et al.*, 2019; Lim *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2018).

Vários estudos demonstraram as ações do glifosato como DE e a toxicidade destas interações (DE SOUZA *et al.*, 2017; PANDEY; RUDRAIAH, 2015; ROMANO, *et al.*, 2012; ROMANO, *et al.*, 2010). Em um estudo prévio do nosso laboratório demonstramos que a exposição a formulação comercial de glifosato (0,5 % de Roundup Original DI®) durante a prenhez e lactação em camundongos C57Bl/6 levou

a diminuição da espermatogênese e desregulação no eixo hipotálamo-hipófise-testicular na prole de machos aos 150 dias de vida (Teleken *et al.*, 2020a). Também demonstrados que a exposição a uma formulação comercial de glifosato (50 mg/kg/PC) agravou a obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos machos e fêmeas (Rosolen *et al.*, 2024).

Em relação a atrazina alguns estudos investigaram os efeitos da exposição ao princípio ativo isolado, porém os resultados variam de acordo com o período em que ocorreu a exposição e a dose utilizada. A administração crônica de atrazina (30 e 300 ug/kg) em ratos Sprague-Dawley adultos aumentou o peso corporal e o acúmulo de gordura intra-abdominal e levou ao desenvolvimento de resistência à insulina. Interessantemente quando esses mesmos animais foram alimentados com dieta hiperlipídica (40% de gordura) a dieta exacerbou ainda mais a resistência à insulina e obesidade (Lim *et al.*, 2009). A exposição a atrazina (200 ug/kg de peso corporal) por 20 semanas a partir dos 21 dias de vida em camundongos machos C57Bl/6 associada a dieta hiperlipídica no mesmo período aumentou a concentração de ácidos graxos livres no plasma e aumentou o conteúdo hepático de lipídeos e triglicerídeos, porém o desenvolvimento de esteatose hepática não foi avaliado (Jin *et al.*, 2014).

Uma importante questão que precisa ser considerada na avaliação da toxicidade dos pesticidas é a toxicidade do princípio ativo isolado comparada a toxicidade das formulações comerciais. Essas formulações geralmente são misturas do ingrediente ativo e de coformulantes, que são considerados inertes, porém são inertes somente em relação ao mecanismo de ação do pesticida, pois também podem causar danos tanto para ambiente quanto aos animais expostos. Infelizmente a maioria das agências reguladoras mundiais ignoram a toxicidade intrínseca dos coformulantes, estas substâncias são então geralmente excluídas dos requerimentos para estabelecer limites de tolerância (Mesnage; Benbrook; Antoniou, 2019). Estudos com glifosato demonstraram que as formulações comerciais podem ser mais tóxicas que o princípio ativo isolado (Mesnage *et al.*, 2021, 2022).

Desta forma, nossa hipótese é que a exposição a formulações comerciais de glifosato e atrazina durante janelas críticas para o desenvolvimento atuam como um primeiro insulto, o que poderia agravar o desenvolvimento da obesidade na idade adulta quando camundongos são expostos a um segundo estressor metabólico, a dieta hiperlipídica, e que esse agravamento da obesidade terá repercussões no

metabolismo. Postulamos ainda que a formulação comercial de glifosato terá maiores efeitos deletérios em hepatócitos quando comparada ao glifosato isolado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos dos pesticidas a base de glifosato e atrazina em diferentes janelas de programação sobre o metabolismo, e a toxicidade diferencial entre uma formulação comercial e o glifosato isolado em hepatócitos.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar o efeito da exposição materna peri e pós-natal a um herbicida a base de glifosato sobre a prole de machos adultos alimentados com dieta hiperlipídica.

Avaliar o efeito da exposição a um herbicida a base de atrazina durante a puberdade em camundongos machos e fêmeas alimentados com dieta hiperlipídica na vida adulta.

Analisar se a formulação comercial tem maior toxicidade que o princípio ativo isolado de glifosato em células HepG2.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 OBESIDADE E OBESÓGENOS

A obesidade é uma DCNT definida pela OMS como excesso de tecido adiposo que pode ser prejudicial à saúde (OMS, 2024). É resultado de relações complexas entre influências genéticas, metabólicas, socioeconômicas, culturais e fatores ambientais (APOVIAN, 2016). O índice de massa corporal (IMC) igual ou maior a 25 kg/m² é historicamente utilizado para caracterizar os indivíduos com sobrepeso, enquanto o IMC igual ou maior a 30 kg/m² representa obesidade. Recentemente um painel de especialistas propôs uma nova abordagem de diagnóstico da obesidade, com a finalidade de distinguir obesidade pré-clínica, quando indivíduo apresenta excesso de adiposidade corporal, sem comprometimento funcional de órgãos e sistemas bem como de atividades da vida diária, da obesidade clínica em que esse comprometimento já está ocorrendo. Os especialistas definem ainda que para o diagnóstico da obesidade clínica devem ser consideradas medidas antropométricas (circunferência abdominal ou medida direta da adiposidade) associadas ao IMC, em conjunto com critérios clínicos como sinais e sintomas de lesão de órgãos e redução de mobilidade com impacto na realização de atividades diárias (Rubino *et al.*, 2025).

Segundo a OMS, em 2022 aproximadamente 43% dos adultos da população mundial apresentavam sobrepeso e 16% eram obesos (OMS, 2024). No Brasil, dados obtidos por inquérito telefônico em 2023 mostram que 61,4% dos brasileiros adultos tem sobrepeso e 24,3% são obesos (Ministério da Saúde, 2023). Esses números alarmantes apontam para uma epidemia de obesidade mundial e demonstram que essa doença deve ser encarada como um problema de saúde pública (DE LORENZO *et al.*, 2019).

Uma recente revisão de HEINDEL e colaboradores (2024) reitera a complexidade da obesidade e discorre sobre os quatro principais modelos causais da atualidade. O modelo de equilíbrio energético postula que a obesidade resulta de um desequilíbrio crônico entre a ingestão calórica e o gasto energético, com o sistema nervoso central desempenhando um papel crucial na regulação do peso corporal por meio da integração de sinais homeostáticos e exógenos. O modelo carboidrato-

insulina enfatiza a hiperglicemia induzida pela ingestão de carboidratos, que eleva os níveis de insulina, promovendo a lipogênese e o armazenamento de gordura. O modelo de oxidação-redução concentra-se nas alterações do potencial redox mediadas por alimentos ultraprocessados e exposições ambientais, que podem gerar sinalizações metabólicas enganosas, comprometendo a homeostase energética. Por fim, o modelo de obesógenos sugere que a exposição a desreguladores endócrinos, especialmente durante períodos críticos de desenvolvimento, pode interferir na sinalização hormonal e na programação metabólica, aumentando a predisposição ao ganho de peso ao longo do ciclo de vida. Os autores propõem ainda a criação de um modelo integrado no qual a proposta central é que os produtos químicos ambientais podem gerar sinais autócrinos e endócrinos falsos, incluindo Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), as quais subvertem os mecanismos regulatórios normais de energia, aumentando a secreção de insulina, e alterando a eficiência energética, além de influenciar o apetite e o gasto energético, podendo assim levar ao ganho de peso. Além disso, o modelo integrado oferece uma base para futuras intervenções preventivas focadas na redução da exposição a produtos químicos ambientais, destacando a importância de considerar fatores ambientais e metabólicos na compreensão da obesidade.

Além disso a susceptibilidade à obesidade pode ser pelo menos em parte programada por exposição a substância obesógenas nos estágios iniciais do desenvolvimento (Heindel, 2019). Os obesógenos podem agir diretamente nos adipócitos, aumentando a quantidade dessas células, ou aumentando o acúmulo de gordura em células já existentes. Podem afetar também de forma indireta afetando mecanismos de regulação do apetite e saciedade, a taxa metabólica basal, o equilíbrio energético e a microbiota intestinal (Veiga-Lopez *et al.*, 2018).

Dentre as classes de substâncias que podem agir como obesógenos estão os pesticidas. Substâncias com probabilidade de alterar a função do tecido adiposo, aumentando a diferenciação e proliferação dos adipócitos, bem como a captação de lipídios aumentando o número e o volume dos adipócitos, podem agir ainda por meio de alterações neuroendócrinas no controle alimentar e no metabolismo de nutrientes. Entretanto, resultados dos efeitos obesógenos dos pesticidas ainda são inconclusivos, pois resultados conflitantes são encontrados em estudos tanto com humanos, quanto com animais (Pinos *et al.*, 2021). Cabe ressaltar que alguns trabalhos indicam que os efeitos obesógenos de alguns pesticidas só são observados após o tratamento com

uma dieta hiperlipídica ou são exacerbados pela mesma, indicando que um segundo “hit” é necessário para o desenvolvimento da obesidade. Outro fator importante a ser considerado, é que o dimorfismo sexual é comum quando examinamos efeitos dos DEs, incluindo os estudos relacionados à obesidade (Ren; Kuo; Blumberg, 2020).

3.2 PESTICIDAS

Pesticidas são uma classe de compostos químicos utilizadas para repelir, destruir ou prevenir qualquer praga, tais como insetos, roedores, ervas daninhas e microrganismos. Podem ser utilizados na saúde pública (no combate a vetores) e no uso doméstico, em que os pesticidas são aplicados em jardins e no combate a ervas daninhas. Porém, seu uso ocorre majoritariamente na agricultura (Alavanja, 2010). Os pesticidas de acordo com sua finalidade podem ser classificados como herbicidas, inseticidas, nematocidas e fungicidas (Ren; Kuo; Blumberg, 2020).

O consumo mundial de pesticidas atingiu 3,7 milhões de toneladas de ingredientes ativos em 2022, representando um aumento no consumo de 4% em relação a 2021, e o dobro do consumo em relação a 1990. Um dado preocupante mostra que entre 1990 e 2022 o consumo de pesticidas por área plantada aumentou 94% no mundo. O Brasil liderou o ranking de países em consumo absoluto com 801 mil toneladas e ocupou a terceira posição no consumo por área cultivada (FAO, 2024).

A produção agrícola no Brasil é favorecida pelas condições climáticas e pela grande quantidade de área agrícola cultivável disponível. Atualmente o Brasil é o segundo maior exportador de produtos agrícolas do mundo e, portanto, os pesticidas são extensamente utilizados no país devido à alta eficiência, baixo custo e legislação permissiva (Brovini *et al.*, 2021). Dos dez ingredientes ativos mais utilizados no Brasil, três são proibidos na União Europeia (acefato, atrazina e paraquat). Além disso, enquanto na União Europeia existe um limite para a quantidade total de pesticidas presentes na água, o mesmo não ocorre no Brasil. A estipulação de limites máximos por ingrediente ativo (e não para o total de agrotóxicos), tanto em alimentos quanto na água, facilita a formação de coquetéis de pesticidas, com efeitos que podem ser mais tóxicos do que dos princípios ativos isolados (IPEA, 2019).

Outra questão importante a ser discutida com relação aos pesticidas é que as formulações comerciais dessas substâncias não contêm somente o ingrediente ativo, mas também os adjuvantes e 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. Entretanto, alguns trabalhos vêm demonstrando que as formulações comerciais são mais tóxicas que o princípio ativo isolado (Defarge *et al.*, 2016; Mesnage *et al.*, 2014).

A exposição humana a pesticidas pode ocorrer em diferentes situações, como a exposição ocupacional, que é relativa aqueles indivíduos que trabalham com a produção, o transporte e a aplicação dessas substâncias, ou ainda com pessoas que residem em locais com alta circulação de resíduos de pesticidas e também devido ao acúmulo existente na água e alimentos contaminados. Impactos na saúde dos seres humanos abrangem desde problemas agudos como simples náuseas, dores de cabeça e irritações na pele até problemas crônicos, como por exemplo carcinogenicidade, neurotoxicidade, imunotoxicidade, toxicidade reprodutiva, toxicidade do desenvolvimento e efeitos de desregulação endócrina (Mostafalou; Abdollahi, 2017). Diante disso, a toxicidade dos pesticidas é de grande preocupação em todo o mundo. O tema agrotóxicos e saúde mobiliza conhecimentos e ações na saúde pública, que exigem uma perspectiva sistêmica de análise, desde o nível molecular ao social, requerendo conhecimentos de diferentes campos disciplinares, tais como biologia, toxicologia, clínica, epidemiologia, agronomia, geografia, sociologia, antropologia, economia e bioética (DIAS *et al.*, 2018).

Os três agrotóxicos mais comercializados no Brasil entre 2009 e 2018 foram glifosato, ácido diclorofenoxiacético (2,4D) e atrazina. Um interessante estudo avaliou o risco ambiental para os ecossistemas aquáticos dos três agrotóxicos mais comercializados no Brasil e demonstrou que 80% dos estados brasileiros tem alto risco ambiental para mistura de glifosato, 2,4D e atrazina (Brovini *et al.*, 2021).

3.2.1 Glifosato

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. O mecanismo de ação 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), ocasionando assim uma diminuição na síntese de proteínas e eventual morte das plantas (Duke; Powles, 2008; Williams, Gary M.; Kroes; Munro, 2000). Essa via de ação do glifosato não é encontrada em nenhum vertebrado, e devido a isso, quando foi lançado no mercado em 1976 o glifosato foi proposto como seguro para exposição humana e animal, em contraste com os pesticidas mais utilizados naquela época (2,4D e paraquat) que eram reconhecidamente tóxicos. A partir disso o glifosato se tornou o pesticida mais utilizado no mundo, posição que se mantém atualmente. No entanto, um número cada vez maior de evidências aponta para os efeitos tóxicos causados por este herbicida, especialmente quando considerados os surfactantes que são aplicados juntamente nas formulações (Peillex; Pelletier, 2020; Werner; Berndt; Mansfield, 2022).

Atualmente a literatura demonstra toxicidade do glifosato *in vivo*, *in vitro* e em estudos epidemiológicos (Lacroix; Kurrasch, 2023). Recentes revisões sistemáticas apontaram que a toxicidade das formulações contendo glifosato para saúde humana são claras em estudos conduzidos com culturas de células humanas como células sanguíneas, epiteliais, renais, hepáticas e gametas, porém os resultados variam de acordo com o tipo celular, a formulação de glifosato, o tempo de exposição e a dose. Em relação a estudos epidemiológicos os dados ainda são contraditórios, principalmente devido à dificuldade de estabelecer a concentração de glifosato em que ocorreu a exposição crônica (Agostini *et al.*, 2020; Meftaul *et al.*, 2020). A controvérsia mais recente ocorreu entre as próprias agências regulatórias. Em relação ao potencial carcinogênico do glifosato a *International Agency for Research on Cancer's* (IARC) classificou o glifosato como provável substância carcinogênica em 2015, enquanto a *European Food Safety Authority* (EFSA) segue classificando o glifosato como não carcinogênico para humanos. Essas diferenças refletem os diferentes testes e métodos utilizados por cada agência, devido à complexidade da interação do glifosato na natureza, porém os métodos de avaliação deveriam se adaptar e considerar a ação do glifosato como desregulador endócrino, com ação em baixas doses e que não seguem uma curva-dose resposta clássica (Davoren; Schiestl, 2018).

Desreguladores endócrinos são substâncias que podem interferir e alterar a função do sistema endócrino (GUARNOTTA *et al.*, 2022). O glifosato possui oito entre dez características principais para uma substância ser considerada DE (Muñoz; Bleak; Calaf, 2021). O período mais sensível para exposição aos DE são os períodos críticos para o desenvolvimento, como a vida fetal e a puberdade (GUARNOTTA *et al.*, 2022). Estudos demonstraram que a exposição ao glifosato nesses períodos causa toxicidade provavelmente devido à sua ação como DE (DE SOUZA *et al.*, 2017; KUBSAD *et al.*, 2019; TELEKEN *et al.*, 2020).

Wang e colaboradores (2022) após conduzirem uma revisão sistemática sobre a toxicidade do glifosato propuseram que o mecanismo de toxicidades deste pesticida ocorre por meio do estresse oxidativo, em que o glifosato causa um desequilíbrio no estado redox das células e aumento na produção de EROs que podem causar dano a lipídios, proteínas e ao DNA, com subsequente apoptose, autofagia e dano mitocondrial. Resultados de estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que a exposição a uma formulação comercial de glifosato (50 mg/kg/PC) agravou a obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos machos e fêmeas (Rosolen *et al.*, 2024).

As formulações comerciais de glifosato são misturas do ingrediente ativo e de coformulantes. Geralmente o ingrediente ativo glifosato representa entre 40 e 60% do produto concentrado. Os outros ingredientes são considerados inertes, porém são inertes somente em relação ao mecanismo de ação do pesticida, pois também podem causar danos tanto para ambiente quanto para os animais expostos. Infelizmente a maioria das agências reguladoras mundiais ignoram a toxicidade intrínseca dos coformulantes, tais substâncias são geralmente excluídas dos requerimentos para estabelecer limites de tolerância (Mesnage; Benbrook; Antoniou, 2019).

A heterogeneidade das formulações de pesticidas, tanto em termos de ingredientes ativos quanto de adjuvantes, representa um desafio para a avaliação de riscos e a regulamentação desses produtos. A composição exata, muitas vezes considerada confidencial, varia entre diferentes marcas e produtos, e até mesmo entre diferentes regiões geográficas de um mesmo produto. Essa variabilidade pode levar a diferenças significativas na eficácia e na toxicidade das formulações, dificultando a comparação de estudos e a extrapolação de resultados (Mesnage *et al.*, 2014; Mesnage; Antoniou, 2018).

Entre os coformulantes presentes em HBG, os surfactantes destacam-se por sua função na facilitação da absorção do princípio ativo pela planta. Devido a essa característica, são os coformulantes mais estudados e, frequentemente, associados a um maior potencial de toxicidade. As aminas polietoxiladas (POEA), por exemplo, são um tipo de surfactante comumente utilizado nessas formulações e que foi demonstrado ter maior toxicidade que o princípio ativo isolado. A citotoxicidade de HBG pode variar significativamente, em até 100 vezes, dependendo da composição específica dos coformulantes presentes na formulação (Mesnage; Benbrook; Antoniou, 2019).

Em relação às diferenças nos resultados entre o princípio ativo e as formulações comerciais, três hipóteses emergem, (1) os adjuvantes são a causa de toxicidade e não o glifosato, (2) os adjuvantes aumentam a permeabilidade do glifosato na célula e assim aumentam a toxicidade e (3) o glifosato e os adjuvantes têm efeitos sinérgicos (Lacroix; Kurrasch, 2023).

A falta de transparência sobre a composição dos coformulantes presentes em pesticidas impede uma avaliação precisa dos riscos à saúde humana e ao meio ambiente, dificulta a comparação de estudos e limita o desenvolvimento de políticas públicas eficazes. A variabilidade na composição dos produtos leva a resultados inconsistentes em testes de toxicidade, comprometendo a confiabilidade dos dados científicos. Para superar essas limitações, é fundamental a implementação de regulamentações que exijam a divulgação pública de todos os componentes presentes nos pesticidas (Mesnage; Benbrook; Antoniou, 2019).

3.2.2 Atrazina

Enquanto a comunidade científica ainda apresenta controvérsias em relação a algumas classificações de toxicidade do glifosato, em relação ao herbicida atrazina os indícios de toxicidade são mais evidentes. A atrazina foi banida da União Europeia desde 2002, porém ainda é extensamente utilizado em países como Brasil, Estados Unidos, Austrália e China. Este herbicida é classificado pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) como DE e pela IARC como substância carcinogênica (Singh *et al.*, 2018). É um herbicida da classe das tiazinas utilizado principalmente na agricultura para proteger as culturas de milho da invasão de ervas daninhas. Seu

mecanismo de ação nas plantas ocorre através da inibição de enzimas que participam da fotossíntese (Jin *et al.*, 2014; Vandenberg; Najmi; Mogus, 2020).

Zhao e colaboradores (2024) demonstraram em uma recente revisão de literatura que a atrazina apresenta efeitos tóxicos no sistema endócrino, manifestando-se através de diversos mecanismos moleculares. No eixo hipotálamo-pituitária-gônada (HPG), a atrazina influencia a expressão de kisspeptina, um hormônio crucial para a regulação da reprodução, consequentemente impactando a síntese de esteróides. Além disso, a atrazina pode interferir na síntese de DNA e na divisão celular e modificar os padrões de metilação do DNA, resultando em toxicidade reprodutiva e comprometimento do desenvolvimento. No sistema nervoso, a atrazina afeta a neurotransmissão dopaminérgica, alterando a expressão de genes como *Nurr1*, *Vmat2* e *Dat*, afetando assim a síntese e o transporte de dopamina, e podendo também influenciar outros neurotransmissores. No tecido adiposo, a atrazina pode reduzir o metabolismo basal, prejudicar a fosforilação oxidativa celular e induzir resistência à insulina.

Especificamente sobre sua ação como substância obesógena, alguns trabalhos demonstram que a exposição a atrazina tem efeitos negativos sobre o metabolismo em diferentes janelas de programação. A administração crônica de atrazina (30 e 300 ug/kg/PC) em ratos Sprague-Dawley adultos aumentou o peso corporal e o acúmulo de gordura intra-abdominal e levou ao desenvolvimento de resistência à insulina. Interessantemente quando esses mesmos animais foram alimentados com dieta hiperlipídica (40% de gordura) a dieta exacerbou ainda mais a resistência à insulina e obesidade (Lim *et al.*, 2009). Camundongos machos expostos cronicamente a atrazina (5 mg/kg/PC) desde a gestação até a idade adulta apresentaram impacto negativo no metabolismo hepático e redução na concentração de espermatozoides (Harper; Finger; Green, 2020). Assim, evidências sugerem que a exposição a atrazina e a outros pesticidas durante janelas críticas de desenvolvimento podem levar a alterações no metabolismo e contribuir para o rápido aumento da incidência de obesidade (Ren; Kuo; Blumberg, 2020).

3.3 ORIGENS DESENVOLVIMENTISTAS DA SAÚDE E DOENÇA – DOHaD

Em meados da década de 1980 um estudo epidemiológico inovador, publicado por Barker e colaboradores, encontrou uma relação positiva entre mortalidade por doença cardíaca em 1968-78 e mortalidade neonatal e infantil em 1921-1925 na Inglaterra e no País de Gales. A partir destes achados os pesquisadores propuseram que a má nutrição no período pós-natal aumenta a suscetibilidade aos efeitos negativos de uma dieta abundante na vida adulta, resultando no aumento de mortalidade por problemas cardiovasculares (Barker, 1986, 2007). Mais tarde outras pesquisas desse mesmo grupo demonstraram que a má nutrição no período pré e pós-natal, seguido de uma dieta rica em calorias, resulta em aumento no risco de desenvolver outras DCNT (HALES, C. N.; BARKER, 2013; HALES; BARKER, 2001).

A partir dessas primeiras pesquisas essa hipótese começou a ser extensamente testada, tanto em estudos epidemiológicos quanto em modelos experimentais com animais de laboratório. A ideia de que condições vivenciadas no início do desenvolvimento teriam impacto na carga de doenças experienciadas pelos indivíduos ao longo do curso de sua vida, foi primeiramente descrita como hipótese de Barker (BARKER, 2007). Mais tarde, na década de 1990, foi proposto o termo “programação fetal” ou “programação metabólica” para descrever esse fenômeno (LUCAS, 1991). Essa terminologia ainda é utilizada atualmente para descrever esse mecanismo do processo saúde-doença. No entanto, com a evolução desse importante ramo da ciência, considerando que o ambiente do início da vida inclui janelas de programação que se estendem desde o período de concepção até a adolescência e ainda que saúde é um conceito amplo e não pode ser limitado somente à ausência de doenças, atualmente este fenômeno é descrito como “origens desenvolvimentistas da saúde e doença” ou do inglês “*developmental origins of health and disease*” que dá origem à sigla DOHaD amplamente utilizada nesta área de pesquisa em todo mundo (Penkler *et al.*, 2019; Suzuki, 2018).

Além de diferentes nomenclaturas, também foram propostas várias teorias para explicar este fenômeno ao longo do tempo. Hales e Barker 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 assim a vulnerabilidade dos mesmos na vida pós-natal (HALES, C. N.; BARKER, 2013). 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. Essa 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 (Gluckman; Hanson, 2004; Silveira *et al.*, 2007). Outra teoria proposta mais recentemente é conhecida como 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 pode agir como um segundo hit ativando ou amplificando os efeitos da programação e levando ao aparecimento de doenças (Padmanabhan; Cardoso; Puttabyatappa, 2016).

Atualmente as pesquisas com DOHaD tem como objetivo fornecer uma perspectiva abrangente sobre o processo saúde-doença e propor uma relação sobre como diferentes experiências moldam os riscos de adoecimento ao longo de todo o curso de uma vida, podendo também fornecer importantes evidências científicas, bem como indicar caminhos para ações em saúde pública. É importante compreender a teoria DOHaD como uma proposta de que certas vias de desenvolvimento podem influenciar respostas individuais de suscetibilidade ou resiliência a doenças na vida adulta e não que conduzam inevitavelmente a tais doenças (Penkler *et al.*, 2019; Suzuki, 2018).

Os mecanismos moleculares pelos quais a programação pode ocorrer acontecem por meio de modificações epigenéticas, que são alterações na expressão gênica, porém não alteram a sequência do DNA. Sendo assim, modificações epigenéticas, como metilação de DNA, modificações de histonas e RNAs não codificantes estão envolvidas na mediação de como o ambiente no início da vida afeta a saúde posteriormente (Bianco-Miotto *et al.*, 2017).

Os estudos iniciais com a teoria DOHaD tinham como foco problemas cardiovasculares e mais tarde expandiram para abordar outras DCNT. Atualmente já foram descritas evidências experimentais ou epidemiológicas da programação na síndrome metabólica, DM2, hipercolesterolemias, doença hepática, problemas no sistema reprodutor, no sistema nervoso central, sistema renal e sistema respiratório (Barker, 2007; De Gusmão Correia *et al.*, 2012; Eberle; Ament, 2012; Hoffman *et al.*,

2018; Oben *et al.*, 2010; Suzuki, 2018). Outro fator que podemos destacar em relação aos avanços das pesquisas nesse campo diz respeito as janelas de programação. O foco inicial foi relacionado aos insultos durante o período pré e pós-natal, mas pesquisas nessa área se expandiram para demonstrar que a programação pode ocorrer desde a formação dos gametas até a puberdade ou adolescência (Suzuki, 2018).

A puberdade é a fase em que ocorre a maturação do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, caracterizada por elevações nas concentrações de gonadotropinas e hormônios sexuais (Dutta; Sengupta, 2016). HOLTRUP e colaboradores (2017) demonstraram que a adolescência também é um período importante para o desenvolvimento do tecido adiposo e que estímulos obesogênicos nessa fase podem levar à alteração no desenvolvimento desse tecido e consequentes modificações na homeostase metabólica. Segundo a OMS a adolescência em humanos compreende o período entre 10 à 19 anos, com média de início da puberdade de 11,5 anos, em camundongos a idade média do início da puberdade é de 42 dias (Dutta; Sengupta, 2016).

Pesquisas experimentais demonstraram os efeitos de insultos nutricionais na adolescência. Ratos Wistar que receberam uma dieta hipoproteica dos 30 aos 60 dias de vida desenvolveram maior acúmulo de gordura corporal e alterações prejudiciais no metabolismo glicêmico durante a vida adulta (De Oliveira *et al.*, 2013b). Outro trabalho que tinha como objetivo investigar os efeitos programadores de uma dieta rica em gorduras no metabolismo e no sistema reprodutor, verificou que ratos Wistar que receberam uma dieta com 35% de gordura dos 30 aos 60 dias de vida, apresentaram aumento no ganho de peso corporal, intolerância à glicose, maior acúmulo de gordura, diminuição na altura do epitélio e no diâmetro dos túbulos seminíferos na vida adulta (Ibáñez *et al.*, 2017).

Os fatores ou insultos que desencadeiam a programação podem ser diversos, tais como excesso ou falta de nutrientes, doenças maternas e fetais, estresse, estilo de vida, intervenções médicas e exposição a produtos 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). Entre os insultos ambientais que podem desencadear a programação encontra-se a exposição aos pesticidas, que tem recebido atenção dos pesquisadores em todo mundo devido ao uso indiscriminado dessas substâncias na

prática agrícola, que leva conseqüentemente a uma exposição humana aos pesticidas por meio de água e alimentos contaminados (Almeida *et al.*, 2019). Na figura 1 podemos observar os principais pontos descritos nessa seção.

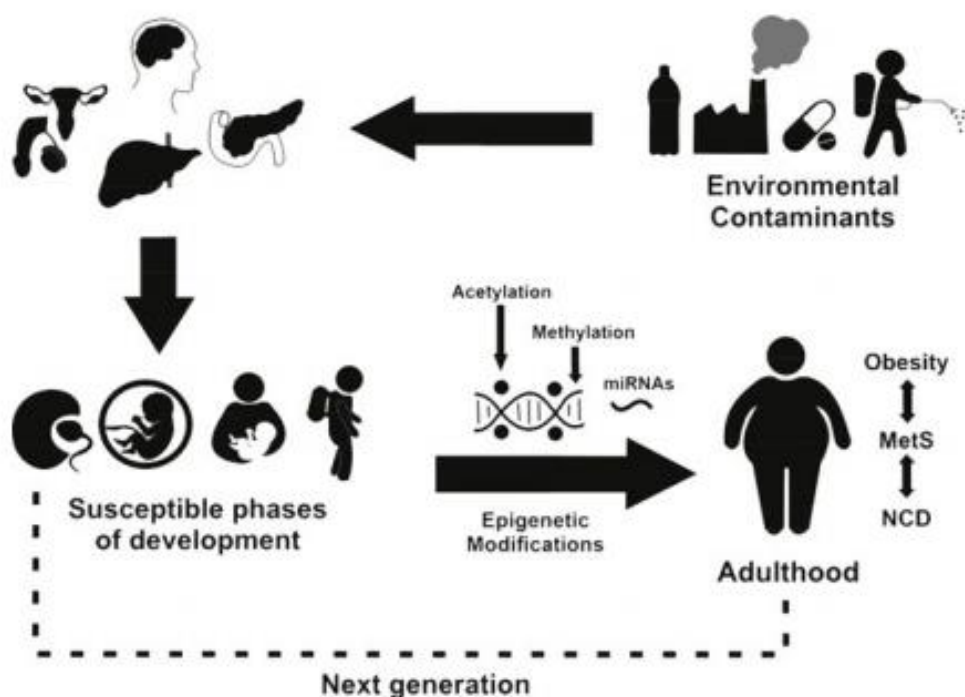


Figura 1. Exposição a químicos ambientais em períodos críticos pode levar ao desenvolvimento de doenças na vida adulta.

Fonte: Almeida et al, 2019.

3.4 METABOLISMO HEPÁTICO E ESTEATOSE HEPÁTICA

O fígado é um órgão central no metabolismo energético. Os hepatócitos são as principais células do parênquima hepático, as quais controlam as reações bioquímicas e as funções metabólicas. Tipos de células adicionais dentro do fígado incluem colangiócitos, células de kupffer, células estreladas e células endoteliais, cada uma com funções especializadas (Alves-Bezerra; Cohen, 2017).

Em relação ao metabolismo energético hepático, de forma resumida em estados pós-prandiais a glicose absorvida no trato gastrointestinal chega ao fígado e pode ser armazenada na forma de glicogênio (glicogênese) e/ou convertida em ácidos graxos através de uma série de processos enzimáticos denominados como

lipogênese *de novo*. Os ácidos graxos provenientes da lipogênese *de novo* ou diretamente dos lipídeos ingeridos na dieta são esterificados com glicerol e formam os triglicerídeos, os quais são armazenados em gotículas lipídicas nos hepatócitos ou secretados na corrente sanguínea como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), sendo transportados ao tecido adiposo para serem estocados. Durante o jejum ou exercício físico o glicogênio e os triglicerídeos são liberados na corrente sanguínea para serem utilizados como substrato energético pelos tecidos extra-hepáticos. Logo, é no fígado que vários nutrientes, hormônios, e sinais neurais regulam o metabolismo glicêmico e lipídico. (Han *et al.*, 2016; Rui, 2014).

Quando ocorre uma desregulação nesse processo metabólico gerando acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos, seja pelo excesso de ácidos graxos oriundos do tecido adiposo, ou por consequência do aumento de glicose intra-hepática, resultando no aumento da lipogênese *de novo*, a quantidade de triglicerídeos sintetizados no hepatócito excede à capacidade de secreção de VLDL e pode levar ao desenvolvimento de uma patologia conhecida como doença hepática gordurosa associada à disfunção metabólica (Jones, 2016).

Historicamente essa doença era chamada de doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA). Porém, em 2023 foi proposta uma nova terminologia denominada em inglês como *metabolic associated fat liver disease*, que dá origem ao acrônimo MAFLD. Essa nova nomenclatura tem uma melhor correlação com a fisiopatologia da doença (PIPITONE, *et al.*, 2023). A MAFLD inclui um espectro de doenças hepáticas crônicas variando de uma simples esteatose hepática (EH), na qual o indivíduo apresenta apenas acúmulo de lipídeos, até a esteatohepatite associada à disfunção metabólica. Sendo assim, esta condição tem se tornado cada vez mais comum paralelamente ao aumento da prevalência de obesidade e outros componentes da síndrome metabólica (Neuschwander-Tetri, 2017). Alguns autores consideram que a MAFLD é a manifestação hepática da síndrome metabólica (Heeren; Scheja, 2021). Essa patologia tem como primeira manifestação o acúmulo de gordura no fígado, ou mais especificamente acúmulo de lipídeos no interior dos hepatócitos, em pacientes que não fazem uso excessivo de álcool. Apresenta-se de forma assintomática na maioria dos pacientes acometidos e está associada com obesidade e outras características da síndrome metabólica como hipertensão, dislipidemia, adiposidade central e resistência à insulina ou diabetes (Buzzetti; Pinzani; Tsochatzis, 2016). É associada também ao aumento da mortalidade, particularmente relacionada a

doenças cardiovasculares e carcinoma hepatocelular. A MAFLD é a doença hepática mais comum no mundo ocidental, afetando cerca de 25% da população mundial. Entretanto, quando considerados somente pacientes obesos esse índice chega a 90% (Ipsen; Lykkesfeldt; Tveden-Nyborg, 2018).

O mecanismo relacionado ao desenvolvimento e progressão da MAFLD é complexo e multifatorial (Neuschwander-Tetri, 2017). O fígado tem uma relação direta com o tecido adiposo branco (TAB). O TAB libera os ácidos graxos pela lipólise durante estados catabólicos e esses ácidos graxos são a principal fonte para síntese de VLDL no fígado, mas o excesso de ácidos graxos liberados pelo TAB causa esteatose hepática, devido à capacidade saturável na produção de VLDL pelo fígado. Em indivíduos obesos, os adipócitos hipertróficos e resistentes à insulina têm taxas elevadas de lipólise, o que explica a conexão entre obesidade e MAFLD. O TAB também exerce várias ações hormonais, via adiponectina e PPAR α , as quais têm potencial para regular direta ou indiretamente o desenvolvimento da MAFLD. Em contraste, a ativação do tecido adiposo marrom (TAM) melhora a MAFLD, tendo em vista que a ativação do TAM usa os ácidos graxos provenientes dos lipídeos circulantes para gerar calor, diminuindo a quantidade de ácidos graxos que chegam ao fígado (Heeren; Scheja, 2021).

A lipogênese *de novo* é a via metabólica que sintetiza ácidos graxos a partir da Acetil-CoA, tipicamente essa via é responsável por 5 % dos ácidos graxos e VLDL produzidos no fígado. Porém em indivíduos com MAFLD esse percentual pode chegar a 25% ou mais. Esse aumento pode ser causado pelo acréscimo da indução de enzimas dessa via, que ocorre por ação dos fatores de regulação transcricional SREBP1 e ChREBP, os quais por sua vez estão elevados em condições de hiperglicemia e hiperinsulinemia. A lipogênese *de novo* está aumentada na MAFLD e contribui tanto para o aumento do acúmulo de lipídeos quanto para o aumento da secreção de VLDL. As partículas intermediárias ricas em triglicerídeos retornam ao fígado e são internalizadas através da ligação com o LDLR. Humanos com MAFLD têm altas concentrações de partículas intermediárias ricas em triglicerídeos (Neuschwander-Tetri, 2017).

A insulina é um regulador negativo da secreção de VLDL. A mesma suprime a lipólise no TAB e o consequente fluxo de ácidos graxos para o fígado. Fisiologicamente esses efeitos da insulina servem para suprimir a produção de gordura no fígado durante o estado pós-prandial em que os lipídeos ingeridos na dieta

devem ser utilizados pelos tecidos periféricos. Em indivíduos com MAFLD a supressão da produção de VLDL pela insulina é prejudicada, esses indivíduos geralmente apresentam resistência à ação da insulina tanto hepática quanto periférica. Em resumo, tal resistência causa inicialmente um aumento da secreção de VLDL, em um processo que neutraliza o acúmulo de lipídeos hepáticos e que em um primeiro momento é protetor para o fígado, contudo essa adaptação é limitada e em estágios mais avançados ocorre estresse intracelular no hepatócito e perda de função tecidual o que leva à diminuição na secreção de VLDL (Heeren; Scheja, 2021).

O simples armazenamento de ácidos graxos no fígado na forma de triglicerídeos, que é o primeiro componente da esteatose, na verdade pode ser um mecanismo adaptativo para remover esses ácidos graxos da circulação, tendo em vista que parte da patofisiologia e da magnitude desse acúmulo não estão diretamente relacionados a injúria do fígado. Porém durante a progressão da MAFLD o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos pode levar a lipotoxicidade e desencadear estresse celular, inflamação, morte celular e fibrose (Neuschwander-Tetri, 2017). Assim a principal característica da MAFLD é a esteatose, mas a doença também engloba a esteatohepatite associada ao metabolismo que é caracterizada por inflamação hepática, dano tecidual e fibrose (Ipsen; Lykkesfeldt; Tveden-Nyborg, 2018). A esteatohepatite associada ao metabolismo pode evoluir para cirrose e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Rinella, 2015; Schneier; Citti; Dieterich, 2015). Apesar da alta prevalência de MAFLD, somente uma pequena proporção dos pacientes desenvolvem esteatohepatite associada ao metabolismo com consequente aumento do risco de fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (Fig. 2) (Buzzetti; Pinzani; Tsochatzis, 2016).

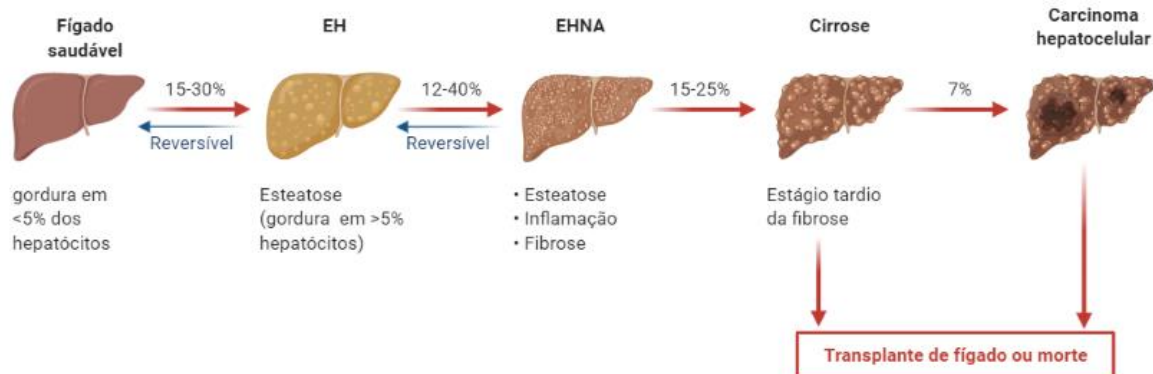


Figura 2. Espectro da doença hepática gordurosa associada a disfunção metabólica

Fonte: adaptado e criado em BioRender.com

Para o estudo dos mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento da MAFLD os modelos animais são ferramentas indispensáveis, embora o modelo ideal que mimetize todas as características da MAFLD humana não exista, vários modelos combinando intervenções dietéticas, manipulações genéticas e administração de substâncias químicas são opções bastante viáveis. Um dos modelos mais utilizados é o da dieta hiperlipídica, o qual consiste na oferta de uma dieta constituída de 45% a 75% de gordura e pode levar ao desenvolvimento de síndrome metabólica, esteatose hepática e esteatohepatite em animais experimentais (Flessa *et al.*, 2022).

Como visto acima o desenvolvimento da MAFLD tem relação direta com a obesidade e suas comorbidades, mas recentemente alguns trabalhos têm demonstrado que a exposição a pesticidas também pode influenciar o desenvolvimento e a progressão da doença. Um estudo realizado em pacientes com esteatohepatite associada ao metabolismo demonstrou que tais pacientes apresentavam maior concentração de glifosato excretado na urina quando comparados aos pacientes sem essa condição. Outro achado da pesquisa foi um aumento dose-dependente na exposição ao glifosato nos estágios de esteatohepatite com fibrose (Mills; Caussy; Loomba, 2020). Ratos Wistar expostos a determinada formulação comercial de glifosato durante 15 dias na vida adulta (100 e 250 mg/kg/PC) desenvolveram inflamação e esteatose no fígado (Pandey; Dhabade; Kumarasamy, 2019). Camundongos C57Bl6 expostos ao glifosato e a uma dieta ocidental (30% de gordura, 20% de sacarose) por 6 meses, apresentaram, na dose de 50 mg/kg,

aumento dos níveis de marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-6) e da peroxidação lipídica no fígado e no tecido adiposo. Além disso, resultou na regulação positiva de genes associados ao estresse oxidativo e à inflamação, enquanto regulou negativamente genes-chave relacionados ao ciclo celular (Romualdo *et al.*, 2023). A exposição a 0,5% de glifosato ou ROUNDUP durante a gestação causou danos ao metabolismo lipídico e esteatose hepática na prole no PND7 e PND21 (Ren *et al.*, 2019).

4. MÉTODO

4.1 Exposição ao glifosato durante período de prenhez e lactação

4.1.1 Animais e cruzamentos

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Camundongos machos e fêmeas da linhagem C57Bl/6 (com idade entre 60 e 90 dias, pesando entre 20 e 25g) foram alojados sob condições controladas de temperatura (28 ± 2 °C) e luminosidade (12 horas de escuro/12 horas de luz). Os animais foram alimentados com ração padrão para roedores (Supralab, Brasil) e água purificada ad libitum. Após um período de aclimação de 7 dias, duas fêmeas receptivas foram colocadas em uma gaiola com um macho adulto sexualmente ativo durante o período escuro (19h - 7h) para acasalamento. Esfregaços vaginais foram coletados na manhã seguinte de ambas as fêmeas, e a gravidez foi confirmada pela presença de espermatozóides no esfregaço ou quando a fêmea permaneceu na fase de diestro do ciclo estral por quatro dias.

4.1.2 Grupos Maternos e Exposição ao Glifosato

Uma vez confirmada a prenhez, as fêmeas foram aleatoriamente divididas em dois grupos experimentais: um grupo controle (CTRL, n = 11), que recebeu água filtrada durante a gestação (GD4 a GD21) e a lactação (30 dias) e um grupo exposto ao glifosato (GBH, n = 9) que recebeu 0,5% de glifosato (Roundup Original DI®, Monsanto, Brasil) na água de beber (DARUICH; ZIRULNIK; GIMENEZ, 2001; TELEKEN et al., 2020) durante o mesmo período. O herbicida à base de glifosato (HBG) utilizado neste estudo é uma formulação comercializada no Brasil como Roundup Original DI® (Monsanto, São Paulo, SP, BRA). Esta formulação contém 445 g/L de sal de diamônio do N-fosfonometilglicina (44,5% m/v) (equivalente à 370 g/L (37,0% m/v) de ácido glifosato). A dose de glifosato determinada para este estudo (0,5%) é equivalente a 1,85 mg/ml. Considerando que o peso corporal médio dos animais no grupo HBG foi de aproximadamente 22g e a ingestão média de água foi de 5 ml/dia, estima-se que a dose administrada foi de 420 mg/kg.

4.1.3 Grupos da prole

O nascimento da prole (F1) foi considerado como dia pós-natal (PND) 0 e o desmame ocorreu no PND30. Do PND60 ao PND150, a prole foi alimentada com uma dieta hiperlipídica (DH), formando assim dois grupos experimentais (denominados de acordo com o tratamento administrado às mães): CTRL-DH-F1 e HBG-DH-F1. Todos os animais receberam água purificada ad libitum até o PND150, quando foram eutanasiados. O peso corporal e a ingestão alimentar foram avaliados semanalmente (do PND60 ao PND150).

4.1.4 Composição da dieta

A ração padrão para roedores foi obtida da Supralab Brasil, e apresentava a seguinte composição: 70% de carboidratos, 20% de proteínas e 10% de lipídios, com densidade energética de 3,8 Kcal/g. A DH foi composta por amido (29,95%), caseína (14%), sacarose (12%), óleo de soja (4%), celulose microcristalina (5%), mistura mineral AIN 93 M (3,5%), mistura vitamínica AIN 93 M (1%), L-cistina (0,3%), bitartarato de colina (0,25%) e banha de porco (30%), apresentando densidade energética de 5,35 Kcal/g.

4.1.5 Teste de tolerância à glicose e à insulina

No PND143, os camundongos F1 foram submetidos a um jejum de 8 horas e, na manhã seguinte, foi realizado o teste oral de tolerância à glicose. O sangue foi coletado da cauda para verificar a glicemia de jejum (tempo 0) utilizando um glicosímetro e tiras reagentes (G-Tech Free®, SD Biosensor, Coreia). Após a administração oral de glicose (1,5 g/kg) por gavagem, a glicemia foi verificada novamente aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

O teste de tolerância à insulina foi realizado no PND145. Após um jejum de 2 horas (das 7h às 9h), o sangue foi coletado da cauda para verificar a glicemia de jejum (tempo 0). Insulina regular (Novolin®) foi administrada intraperitonealmente (0,75 UI/kg) e a glicemia foi verificada novamente aos 3, 6, 9, 12, 15 e 18 minutos. Para a

análise estatística, foram utilizados os valores absolutos da glicemia. Para o cálculo do KITT, os dados foram transformados logaritmicamente em logaritmo natural de Y ($Y = \ln(Y)$), seguido de uma regressão linear. A inclinação das curvas foi utilizada para verificar a sensibilidade à insulina nos grupos experimentais.

4.1.6 Eutanásia

A glicemia foi verificada no PND150 após um jejum de 8 horas (G-Tech Free®, SD Biosensor, Coreia). Os camundongos foram pesados e anestesiados com xilazina (9 mg/kg) (Anasedan®, Vetbrands, Brasil) e cetamina (90 mg/kg) (Dopalen®, Vetbrands, Brasil). Após a ausência do reflexo cutâneo foi medida a distância naso-anal e o sangue foi coletado por punção cardíaca, utilizando uma seringa heparinizada. O sangue foi transferido para um tubo, centrifugado (12.600 g, 10 minutos, 4 °C) e o plasma foi armazenado a -80 °C para dosagem de insulina, por radioimunoensaio. Posteriormente, foi executada laparotomia para extração e pesagem do tecido adiposo retroperitoneal branco, do tecido adiposo perigonadal e do fígado.

4.1.7 Índice HOMA-IR, HOMA-Beta e histopatologia hepática

A resistência à insulina e a função das células β foram avaliadas utilizando o modelo de avaliação da homeostase (HOMA – IR e β , respectivamente). Para isso, foram utilizados os valores de insulina de jejum ($\mu\text{U/L}$) e glicemia (mmol/L). Um fragmento do lobo hepático direito foi coletado de cada camundongo F1, em corte transversal do centro em direção à margem do órgão. As amostras foram fixadas em solução de formol de Carson (Formaldeído 37% p/v (10%), metanol (1,5%) e PBS, pH 7,4 (88,5%)) por 24 horas, em seguida lavadas em água corrente, antes da desidratação em concentrações crescentes de álcool. As amostras foram então diafanizadas em xilol e incluídas em Paraplast® (Sigma Co, St Louis, MO). Cortes de 5 μm de espessura foram obtidos utilizando um micrótomo rotatório manual (Olympus 4060), equipado com uma faca de aço. As seções foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise de esteatose hepática (KLEINER et al., 2005) e com tricrômio de Mallory para identificação de fibras colágenas. As imagens foram analisadas

utilizando um microscópio óptico (Olympus BX61) equipado com uma câmera digital (Olympus DP71) e o software DP Controller 3.2.1.276.

4.1.8 Análise de dados e estatística

Os dados são apresentados como médias $\pm$ erros padrão da média. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para análise de normalidade. Os dados paramétricos foram analisados utilizando o teste t de Student e os dados não paramétricos foram analisados utilizando o teste de Mann-Whitney. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ e as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software ©) e o programa estatístico R (R Coreteam, 2015).

4.2 Exposição à atrazina durante a puberdade

4.2.1 Animais e delineamento experimental

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIOESTE. Camundongos machos e fêmeas C57Bl/6 de 21 dias de idade foram obtidos do Biotério Central da UNIOESTE e alojados no biotério setorial do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo sob condições controladas (25 ± 2 °C) em um ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 7:00 às 19:00).

Do PND30 ao PND60, os camundongos machos e fêmeas receberam gavagem oral diária de água destilada (veículo; grupo controle - CTL, $n = 6$ por sexo de 6 ninhadas) ou 5 mg/kg de Proof®, um herbicida à base de ATZ (grupo ATZ, $n = 6$ por sexo de 6 ninhadas). O herbicida à base de ATZ, fornecido pela Syngenta (São Paulo, SP, BRA), contém 500 g/L de ATZ. Durante esse tempo, ambos os camundongos expostos ao CTL e ao ATZ foram alimentados com uma dieta padrão fornecendo 3,6 kcal/g (com a seguinte distribuição de macronutrientes: 9,9% de gordura, 65,9% de carboidrato e 24,1% de proteína; Nuvilab CR1, Quimtia, Colombo, PR, Brasil) e tiveram acesso ad libitum à água filtrada. A dose de herbicida à base de ATZ usada é 20 vezes menor que o NOAEL da exposição de camundongos à via oral (EPA,

2018), também é semelhante a relatos recentes (Cook et al., 2019; Harper et al., 2020).

s

4.2.2 Dieta Hiperlipídica

Do PND60 ao PND150, as fêmeas e os machos CTL e ATZ receberam uma DH (grupos CTL-HFD e ATZ-HFD, respectivamente) e beberam água filtrada ad libitum. A DH forneceu 6,2 kcal/g, com distribuição de macronutrientes: 40% de gordura, 33% de carboidrato e 27% de proteína. Esta dieta foi preparada em laboratório pela mistura de banha (composta predominantemente por ácidos graxos saturados; Aurora, Chapecó, SC, BRA), dieta padrão triturada Nuvilab CR1 (Quimtia S. A., Colombo, PR, BRA), suplementada com óleo de soja (Soya, São Paulo, SP, BRA) e caseína (PragSoluções, Jaú, SP, BRA) para corrigir o teor de ácidos graxos essenciais e proteínas, respectivamente.

4.2.3 Peso corporal, consumo e eficiência alimentar

O PC e o consumo alimentar dos camundongos foram avaliados semanalmente. A eficiência alimentar durante a exposição ao herbicida à base de ATZ (PND30 a PND60) ou o período de dieta hiperlipídica (PND60 a PND150) foi calculada como a relação entre o ganho total de peso corporal (peso final - peso inicial) e o consumo alimentar total no mesmo período (Santos et al., 2019).

4.2.4 Teste oral de tolerância à glicose e tolerância à insulina

Durante a última semana do período experimental, todos os camundongos machos e fêmeas CTL-HFD e ATZ-HFD foram submetidos a um jejum de 12 horas. Amostras de sangue foram coletadas da ponta da cauda para medir os níveis basais de glicose no sangue (tempo 0) utilizando um glicosímetro (Accu-Chek® Active, Roche, Alemanha). Em seguida, os camundongos receberam 1,5 g de glicose/kg de peso corporal por gavagem oral, e os níveis de glicose no sangue foram medidos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a gavagem.

O teste de tolerância à insulina foi realizado dois dias após o teste oral de tolerância à glicose. Todos os grupos de camundongos foram submetidos a um jejum

de 2 horas antes do teste. Os níveis basais de glicose no sangue (tempo 0) foram medidos usando um glicosímetro (Accu-Chek® Active, Roche, Alemanha). Posteriormente, 0,75 UI de insulina regular humana/kg de peso corporal (Humulin R, Eli Lilly, Indianapolis, EUA) foi administrada intraperitonealmente, e os níveis de glicose no sangue foram registrados 3, 6, 9, 12 e 15 minutos após a injeção.

4.2.5 Parâmetros biométricos e bioquímicos plasmáticos

Na última semana do período experimental, o sangue foi coletado da ponta da cauda de todos os camundongos machos e fêmeas em estado alimentado para obtenção de plasma para análise bioquímica. Ao final do período experimental (PND150), após um jejum de 8 horas, os camundongos foram pesados e o comprimento naso-anal foi medido. Posteriormente, os camundongos foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg de peso corporal; Anasedan®, Vetbrands, Brasil) e cetamina (100 mg/kg de peso corporal; Dopalen®, Vetbrands, Brasil) e, em seguida, decapitados. O índice de Lee, um índice de massa corporal para roedores, foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Lee} = \text{Peso corporal (g)} / \text{Comprimento naso-anal (cm)}$$

O sangue total foi coletado em microtubos heparinizados, centrifugados a 12.000 rpm e o plasma foi armazenado a -20°C. Os níveis de insulina alimentada e de jejum foram medidos usando um kit de ensaio ELISA (cat. no. EZRMI-13K, Merck, MA, EUA). Triglicerídeos alimentados e de jejum (cat. no. K117, Bioclin Química Básica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) e colesterol total (cat. no. K083, Bioclin Química Básica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) foram medidos usando kits colorimétricos enzimáticos. Além disso, foi realizada laparotomia através da qual fígado, tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal foram removidos e pesados.

4.2.6 Composição da massa corporal

A extração de gordura da carcaça foi realizada conforme descrito por Rosolen et al. (2024). Após a eutanásia, todos os órgãos torácicos e abdominais foram removidos, a carcaça de cada camundongo foi pesada para obtenção do peso úmido, em seguida, armazenada à -20°C. Para a extração lipídica total, as carcaças foram desidratadas a 60°C por 72 horas e posteriormente submetidas à extração de gordura

usando éter de petróleo em um extrator Soxhlet a 60°C por 3 horas. A quantidade de lipídios extraídos foi expressa como porcentagem do peso da carcaça multiplicando-se o peso total da gordura por 100 e dividindo-se pelo peso da carcaça. A porcentagem de massa corporal magra foi obtida subtraindo o peso da gordura, multiplicando por 100 e dividindo pelo peso da carcaça.

4.2.7 Histomorfometria do TAB perigonadal

O TAB perigonadal foi fixado em solução de formaldeído de Carson por 48 horas. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em álcool, clareados em xileno, e embebidos em Paraplast® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para obtenção de cortes de 5 µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina (HE). Na morfometria, foram registrados 6 campos para pelo menos 2 secções por TAV de cada camundongo utilizando um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha). O diâmetro de todos os adipócitos em cada campo foi medido manualmente utilizando a ferramenta de linha do software gratuito Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Os números de pixels foram convertidos automaticamente em micrômetros (µm) usando a calibração do software com uma lâmina de escala padrão 20.

4.2.8 Extração e quantificação de lipídios hepáticos

Fragmentos de 100 mg dos fígados de todos os grupos CTL-HFD e ATZ-HFD fêmeas e machos foram coletados, e os lipídios totais foram extraídos usando uma proporção de 2:1 de clorofórmio/metanol 21. O extrato foi filtrado, em seguida evaporado à temperatura ambiente e diluído em isopropanol para medição de TG e COL total, conforme descrito acima.

4.2.9 Histopatologia hepática

Fragmentos de fígado de 100 mg foram coletados de todos os grupos de camundongos fêmeas e machos, e fixados em solução de formaldeído de Carson por 48 horas. As amostras foram então desidratadas, clareadas e embebidas em Paraplast®. Secções de 5 µm de espessura foram obtidas, desparafinadas,

reidratadas e coradas com HE. Para análise histopatológica hepática, duas seções do fígado de cada camundongo coradas com HE foram selecionadas aleatoriamente e, em cada seção, 16 campos aleatórios foram fotografados com ampliação de 1000x usando um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). A avaliação do escore de esteatose hepática foi baseada no método relatado por Kleiner et al. (2005). Usando o software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), o número total de hepatócitos por imagem histológica (campo) e o número de hepatócitos com inclusões lipídicas por campo foram contados manualmente. Esses parâmetros foram usados para obter a porcentagem de esteatose hepática por campo. As porcentagens da área total afetada por esteatose hepática foram categorizadas da seguinte forma: escore 0 (sem esteatose, <5% dos hepatócitos afetados), escore 1 (esteatose leve, 5% a 33%), escore 2 (esteatose moderada, 34% a 66%) e escore 3 (esteatose grave, >66%). Além disso, o número de não-hepatócitos por campo (incluindo células inflamatórias, endoteliais, Kupffer e ductais) foi contado para obter a razão hepatócitos/não-hepatócitos por campo analisado.

4.2.10 PCR quantitativo em tempo real

Fragmentos de 50 mg de TAB perigonadal e fígado de camundongos fêmeas e machos ATZ-HFD e CTL-HFD foram utilizados para extração de RNA com um kit de purificação de RNA total (cat. no. DPK-108L, Cellco Biotech do Brasil, São Carlos, SP, Brasil). Após a extração total do RNA, observou-se que uma amostra de cada grupo não apresentou concentração e integridade adequadas e, portanto, não pôde ser utilizada nos experimentos de expressão gênica, resultando em um total de 5 amostras por grupo e por sexo. Em seguida, foi realizada a transcrição reversa do mRNA usando um kit de síntese de cDNA (cat. no. PRT-110L, Cellco Biotech do Brasil, São Carlos, SP, Brasil). Para análise da expressão de mRNA, 20 ng de cDNA foram analisados em duplicata misturando-se com Sybr Green qPCR Master Mix (Cat. No. PCK-106L, Cellco Biotech, São Carlos, SP, Brasil) e 10 μ M de cada primer forward e reverse. A amplificação foi detectada através do sistema AriaMx Real-Time PCR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). As sequências de primers utilizadas para expressão gênica foram adquiridas do fabricante (Exxtend Biotecnologia Ltda., Paulínia, SP, Brasil). Os níveis de mRNA foram determinados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$,

e a expressão relativa de mRNA de cada gene alvo foi normalizada para a da proteína ribossomal L32 (Rpl32).

4.2.11 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (SEM). A análise de dados foi realizada usando o GraphPad Prism versão 9.0 para Windows (GraphPad Software ©, La Jolla, CA, EUA). Primeiramente, os dados foram analisados quanto à distribuição de normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, submetidos a testes não pareados paramétricos (teste t de Student) ou não paramétricos (teste de Mann-Whitney U). O nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

4.3 Análise da toxicidade do glifosato isolado e de formulação comercial em células Hep-G2

4.3.1 Cultura de células e tratamentos

Células HepG2 obtidas do DSMZ - Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares, foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina e incubadas a 37°C em atmosfera umidificada (95% de ar, 5% de CO₂ v/v). Os experimentos utilizaram N-(fosfonometil)glicina (Merck, Darmstadt, Alemanha) e a formulação comercial Roundup® Original DI (Monsanto, Brasil) contendo 445 g/L de sal de diâmonio de N-fosfonometilglicina, correspondendo à 370 g/L (37,0% m/v) de glifosato. Ambas as soluções foram preparadas usando água destilada.

4.3.2 Ensaio de citotoxicidade

Células HepG2 foram semeadas em densidade de $2 \cdot 10^4$ células/poço em placas de 96 poços em 200 μ L de meio RPMI (200 μ L/poço). Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, o meio de cultura foi substituído por meio fresco

contendo glifosato ou GBH para obter a concentração final de 1, 10, 100 ou 500 ppm, e incubadas por 24 horas. Água foi usada como controle. O experimento foi realizado em triplicata. A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio MTT realizado conforme as instruções do fabricante (MTT Abcam: ab211091; Abcam, Cambridge, Reino Unido). A absorbância foi medida usando um leitor de microplacas CLARIOstar (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemanha).

4.3.3 Avaliação da produção de H₂O₂ mitocondrial

Estabelecemos uma expressão estável de mito-Hyper7 em células HepG2 por meio de transdução com lentivírus. Hyper7 é um indicador ultrasensível e pH estável para medir concentrações ultrabaixas de H₂O₂ (Pak et al., 2020). Os níveis de H₂O₂ foram medidos nessas células durante a exposição a 100 ppm de GBH ou GLY usando um leitor de microplacas CLARIOstar, a água foi usada como controle. O experimento foi conduzido a 37 °C sob atmosfera controlada contendo 5% de CO₂. A ventilação foi deixada aberta para permitir a livre difusão de O₂ para o sistema. A emissão do Hyper7 mitocondrial foi detectada após excitação a 400 nm e medição de emissão a 500 nm. A razão de intensidade de fluorescência (400/500 nm) foi calculada e plotada em função do tempo usando o software GraphPad Prism.

4.3.4 Sequenciamento de RNA

O RNA total foi isolado de células HepG2 após tratamento com 100 ppm de glifosato ou GBH por 24 horas. As amostras de RNA foram diluídas em água livre de RNase e 5 µl das amostras de RNA foram enviadas para sequenciamento, que foi realizado pela Novogene (Novogene GmbH, Cambridge, Reino Unido). A quantidade e a qualidade das amostras de RNA foram avaliadas usando os seguintes métodos: controle de qualidade preliminar realizado com eletroforese em gel de agarose a 1%, para testar a degradação do RNA e possível contaminação, a pureza e a quantificação preliminar das amostras foram medidas usando o Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, EUA), sendo também utilizado para verificar a integridade do RNA e a quantificação final; para o preparo da biblioteca utilizamos o Novogene NGS RNA Library Prep Set (PT042) e o mRNA presente na amostra total de RNA foi isolado com

esferas magnéticas de oligos d(T)₂₅. Este método é conhecido como enriquecimento de mRNA com cauda poliA. Posteriormente, o mRNA foi fragmentado aleatoriamente e a síntese de cDNA prosseguiu usando hexâmeros aleatórios e a enzima transcriptase reversa. Uma vez finalizada a síntese da primeira cadeia, a segunda cadeia é sintetizada com a adição de um tampão Illumina (preparação de biblioteca não direcional). Com isso e juntamente com a presença de dNTPs, RNase H e polimerase I de E. Coli, a segunda cadeia será obtida por tradução de Nick. Os produtos resultantes passam por purificação, reparo de extremidades, cauda-A e ligação de adaptadores. Fragmentos do tamanho apropriado são enriquecidos por PCR, onde primers P5 e P7 indexados são introduzidos, e os produtos são purificados. A biblioteca foi verificada com Qubit 2.0 e PCR em tempo real para quantificação e bioanalisador Agilent 2100 para detecção da distribuição do tamanho. As bibliotecas quantificadas foram agrupadas e sequenciadas na plataforma Illumina Novaseq X, de acordo com a concentração efetiva da biblioteca e a quantidade de dados usando a estratégia de leitura pareada 150 (PE150).

4.3.5 Western blotting

A expressão proteica de marcadores de estresse de retículo e estresse oxidativo foi avaliada por Western blotting. Células HepG2 foram semeadas em densidade de $7,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio RPMI. No dia seguinte, meio fresco com glifosato ou Roundup foi adicionado para atingir a concentração final de 100 ppm. Após 24 horas de incubação, a extração de proteína foi realizada raspando as células com DPBS frio seguido da adição de tampão de lise contendo inibidores de protease. A concentração de proteína foi determinada usando o ensaio de Bradford. Os extratos totais de proteína foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpos específicos contra BiP, eIF2 α e PRDX3. Anti- α -tubulina foi usado como controle interno.

4.3.6 Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada usando análise de variância de uma via (ANOVA),

seguida pelo teste pós-hoc de Tukey para múltiplas comparações. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism versão 9.4 (GraphPad Software©).

5. ARTIGOS

5.1 Glyphosate exposure during pregnancy and lactation changes body parameters, glucose homeostasis and liver histopathology in adult offspring male mice fed on a high fat diet

Publicado na revista na revisa Cuadernos de Educación y Desarrollo

DOI: 10.55905/cuadv17n3-019

5.2 Pubertal Atrazine Exposure Promotes Adipocyte Hypertrophy and Hepatic Steatosis in Adult Mice on a High-Fat Diet

Artigo submetido para revista Toxicology Reports

5.3 Comparative effects of glyphosate-based herbicide and glyphosate alone on oxidative stress and transcriptome in HepG2 cells

Artigo submetido a revista Science of the total Environment

6. CONCLUSÕES GERAIS

Nossas análises demonstraram os efeitos dos herbicidas à base de glifosato e atrazina sobre o metabolismo, a análise conjunta dos dados demonstra que os HBG e HBA exibem potencial para agir como desreguladores endócrinos e obesógenos, respectivamente. Nossos resultados revelam a complexidade dos efeitos decorrentes da exposição a essas substâncias, especialmente em períodos críticos do desenvolvimento, como a prenhez, lactação e puberdade, e ressaltam a importância de pesquisas para compreender os diferentes efeitos entre machos e fêmeas. Essa complexidade reforça a necessidade de pesquisas mais aprofundadas que considerem essas particularidades, a fim de melhor compreender os mecanismos envolvidos e os potenciais impactos a longo prazo. Adicionalmente, fornecemos evidências de que a formulação comercial à base de glifosato apresenta maior toxicidade em comparação com o princípio ativo isolado. Esses dados se alinham com um crescente corpo de evidências na literatura, que apontam para o mesmo sentido, e pressionam as agências reguladoras a revisarem as leis de confidencialidade destas formulações. É crucial que todos os ingredientes destas misturas sejam testados em estudos de toxicidade abrangentes, a fim de garantir a segurança da população e do meio ambiente. Assim, esperamos que este estudo contribua para o avanço do conhecimento sobre os riscos associados à exposição a herbicidas, e que sirva de alerta para a necessidade de um uso mais seguro e controlado de pesticidas na agricultura e em outros setores.

7. REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, L. P. *et al.* Effects of glyphosate exposure on human health: Insights from epidemiological and in vitro studies. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 705, p. 135808, 2020.
- AIT BALI, Y.; BA-MHAMED, S.; BENNIS, M. Behavioral and Immunohistochemical Study of the Effects of Subchronic and Chronic Exposure to Glyphosate in Mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 11, p. 146, 2017.
- ALAVANJA, M. C. R. Pesticides Use and Exposure Extensive Worldwide. [s. l.], 2010.
- ALMEIDA, D. L. *et al.* Environmental monitoring and the developmental origins of health and disease. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 608–615, 2019.
- ALONSO, L. L. *et al.* Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 645, p. 89–96, 2018.
- ALVES-BEZERRA, M.; COHEN, D. E. Triglyceride Metabolism in the Liver. In: TERJUNG, R. (org.). **Comprehensive Physiology**. 1. ed. [S. l.]: Wiley, 2017. p. 1–22. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c170012>. Acesso em: 29 jan. 2025.
- AYOOLA, S. O. Histopathological Effects of Glyphosate on Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). **Environ. Sci.**, [s. l.], 2008.
- BARKER, D. INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES. **The Lancet**, [s. l.], v. 327, n. 8489, p. 1077–1081, 1986.
- BARKER, D. J. P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 261, n. 5, p. 412–417, 2007.
- BENEDETTI, A. L. *et al.* The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 153, n. 2, p. 227–232, 2004.

BEURET, C. J.; ZIRULNIK, F.; GIMÉNEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. **Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 501–504, 2005.

BIANCO-MIOTTO, T. *et al.* Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 513–519, 2017.

BONVALLOT, N. *et al.* Metabolome disruption of pregnant rats and their offspring resulting from repeated exposure to a pesticide mixture representative of environmental contamination in Brittany. **PloS One**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. e0198448, 2018.

BROVINI, E. M. *et al.* Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 771, p. 144754, 2021.

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism: Clinical and Experimental**, [s. l.], v. 65, n. 8, p. 1038–1048, 2016.

CHAN, Y.-C. *et al.* Cardiovascular effects of herbicides and formulated adjuvants on isolated rat aorta and heart. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 595–603, 2007.

CHŁOPECKA, M. *et al.* Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses - in vitro study. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 113, p. 25–30, 2014.

COOK, L. E. *et al.* Exposure to atrazine during puberty reduces sperm viability, increases weight gain and alters the expression of key metabolic genes in the liver of male mice. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 920, 2019.

DALLEGRAVE, E. *et al.* Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 81, n. 9, p. 665–673, 2007.

DARBRE, P. D. Overview of air pollution and endocrine disorders. **International Journal of General Medicine**, [s. l.], v. 11, p. 191–207, 2018.

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

DAVOREN, M. J.; SCHIESTL, R. H. Glyphosate-based herbicides and cancer risk: a post-IARC decision review of potential mechanisms, policy and avenues of research. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 39, n. 10, p. 1207–1215, 2018.

DE GUSMÃO CORREIA, M. L. *et al.* Developmental origins of health and disease: experimental and human evidence of fetal programming for metabolic syndrome. **Journal of Human Hypertension**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 405–419, 2012.

DE MOURA, F. R. *et al.* Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 56, p. 241–248, 2017.

DE OLIVEIRA, J. C. *et al.* Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 216, n. 2, p. 195–206, 2013.

DEFARGE, N. *et al.* Co-Formulants in Glyphosate-Based Herbicides Disrupt Aromatase Activity in Human Cells below Toxic Levels. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 264, 2016.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 319–325, 2008.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life Sciences**, [s. l.], v. 152, p. 244–248, 2016.

EBERLE, C.; AMENT, C. Diabetic and metabolic programming: mechanisms altering the intrauterine milieu. **ISRN pediatrics**, [s. l.], v. 2012, p. 975685, 2012.

FAO. Pesticides use and trade, 1990–2022. [s. l.], 2024. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd1486en>. Acesso em: 11 dez. 2024.

FLESSA, C.-M. *et al.* Genetic and Diet-Induced Animal Models for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Research. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 24, p. 15791, 2022.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 305, n. 5691, p. 1733–1736, 2004.

HAN, H.-S. *et al.* Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. **Experimental & Molecular Medicine**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. e218–e218, 2016.

HARPER, A. P.; FINGER, B. J.; GREEN, M. P. Chronic Atrazine Exposure Beginning Prenatally Impacts Liver Function and Sperm Concentration With Multi-Generational Consequences in Mice. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 11, p. 580124, 2020.

HEEREN, J.; SCHEJA, L. Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. **Molecular Metabolism**, [s. l.], v. 50, p. 101238, 2021.

HEINDEL, J. J. History of the Obesogen Field: Looking Back to Look Forward. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 10, p. 14, 2019.

HEINDEL, J. J. *et al.* Obesogens: a unifying theory for the global rise in obesity. **International Journal of Obesity (2005)**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 449–460, 2024.

HOFFMAN, D. J. *et al.* Developmental origins of metabolic diseases. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 101, n. 3, p. 739–795, 2021.

HOFFMAN, F. *et al.* Maternal nutritional restriction during late gestation impairs development of the reproductive organs in both male and female lambs. **Theriogenology**, [s. l.], v. 108, p. 331–338, 2018.

HOLTRUP, B. *et al.* Puberty is an important developmental period for the establishment of adipose tissue mass and metabolic homeostasis. **Adipocyte**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 224–233, 2017.

IBÁÑEZ, C. A. *et al.* A High Fat Diet during Adolescence in Male Rats Negatively Programs Reproductive and Metabolic Function Which Is Partially Ameliorated by Exercise. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 8, p. 807, 2017.

IPSEN, D. H.; LYKKESFELDT, J.; TVEDEN-NYBORG, P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 75, n. 18, p. 3313–3327, 2018.

JASPER, R. *et al.* Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. **Interdisciplinary Toxicology**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 133–140, 2012.

JIN, Y. *et al.* Exposure of mice to atrazine and its metabolite diaminochlorotriazine elicits oxidative stress and endocrine disruption. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 782–790, 2014.

JONES, J. G. Hepatic glucose and lipid metabolism. **Diabetologia**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 1098–1103, 2016.

KLEINER, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 1313–1321, 2005.

LA MERRILL, M. *et al.* Perinatal exposure of mice to the pesticide DDT impairs energy expenditure and metabolism in adult female offspring. **PloS One**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. e103337, 2014.

LACROIX, R.; KURRASCH, D. M. Glyphosate Toxicity: In Vivo, In Vitro, and Epidemiological Evidence. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, [s. l.], p. kfad018, 2023.

LIM, S. *et al.* Chronic Exposure to the Herbicide, Atrazine, Causes Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. e5186, 2009.

LOZANO, V. L. *et al.* Sex-dependent impact of Roundup on the rat gut microbiome. **Toxicology Reports**, [s. l.], v. 5, p. 96–107, 2017.

MEFTAUL, I. Md. *et al.* Controversies over human health and ecological impacts of glyphosate: Is it to be banned in modern agriculture?. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 263, p. 114372, 2020.

MESNAGE, R. *et al.* Comparative Toxicogenomics of Glyphosate and Roundup Herbicides by Mammalian Stem Cell-Based Genotoxicity Assays and Molecular Profiling in Sprague-Dawley Rats. **Toxicological Sciences**, [s. l.], v. 186, n. 1, p. 83–101, 2021.

MESNAGE, R. *et al.* Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, p. 179691, 2014.

MESNAGE, R. *et al.* The surfactant co-formulant POEA in the glyphosate-based herbicide RangerPro but not glyphosate alone causes necrosis in Caco-2 and HepG2 human cell lines and ER stress in the ToxTracker assay. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, [s. l.], v. 168, p. 113380, 2022.

MESNAGE, R. *et al.* Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, [s. l.], v. 14, p. 70, 2015.

MESNAGE, R.; ANTONIOU, M. N. Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. **Frontiers in Public Health**, [s. l.], v. 5, p. 361, 2018.

MESNAGE, R.; BENBROOK, C.; ANTONIOU, M. N. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 128, p. 137–145, 2019.

MILLS, P. J.; CAUSSY, C.; LOOMBA, R. Glyphosate Excretion is Associated With Steatohepatitis and Advanced Liver Fibrosis in Patients With Fatty Liver Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 741–743, 2020.

MNIF, W. *et al.* Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 2265–2303, 2011.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 549–599, 2017.

MUÑOZ, J. P.; BLEAK, T. C.; CALAF, G. M. Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. **Chemosphere**, [s. l.], v. 270, p. 128619, 2021.

NEIVA, T. de J. C. *et al.* In vitro effect of the herbicide glyphosate on human blood platelet aggregation and coagulation. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 32, p. 291–294, 2010.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Non-alcoholic fatty liver disease. **BMC Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 45, 2017.

NEWBOLD, R. R. Developmental exposure to endocrine-disrupting chemicals programs for reproductive tract alterations and obesity later in life¹²³⁴. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 94, n. 6 Suppl, p. 1939S-1942S, 2011.

OBEN, J. A. *et al.* Maternal obesity programmes offspring development of non-alcoholic fatty pancreas disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 394, n. 1, p. 24–28, 2010.

PADMANABHAN, V.; CARDOSO, R. C.; PUTTABYATAPPA, M. Developmental Programming, a Pathway to Disease. **Endocrinology**, [s. l.], v. 157, n. 4, p. 1328–1340, 2016.

PAK, V. V. *et al.* Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 642-653.e6, 2020.

PANDEY, A.; DHABADE, P.; KUMARASAMY, A. Inflammatory Effects of Subacute Exposure of Roundup in Rat Liver and Adipose Tissue. **Dose-Response: A Publication of International Hormesis Society**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 1559325819843380, 2019.

PANZA, S. B. *et al.* Perinatal exposure to low doses of glyphosate-based herbicide combined with a high-fat diet in adulthood causes changes in the jejunums of mice. **Life Sciences**, [s. l.], v. 275, p. 119350, 2021.

PECHIAMMAL, K.; VASANTHI, J. Toxicological effects of glyphosate on histopathological parameters of fresh water fish, *Cirrhinus mrigala*. **International Journal of Applied Research**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 873–877, 2017.

PEILLEX, C.; PELLETIER, M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. **Journal of Immunotoxicology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 163–174, 2020.

PENKLER, M. *et al.* DOHaD in science and society: emergent opportunities and novel responsibilities. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 268–273, 2019.

PINOS, H. *et al.* Relationship between Prenatal or Postnatal Exposure to Pesticides and Obesity: A Systematic Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 18, n. 13, p. 7170, 2021.

REGNIER, S. M. *et al.* Diet-dependence of metabolic perturbations mediated by the endocrine disruptor tolylfluand. **Endocrine Connections**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 159–168, 2017.

REN, X. *et al.* Effects of chronic glyphosate exposure to pregnant mice on hepatic lipid metabolism in offspring. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 254, p. 112906, 2019.

REN, X.-M.; KUO, Y.; BLUMBERG, B. Agrochemicals and obesity. **Molecular and cellular endocrinology**, [s. l.], v. 515, p. 110926, 2020.

RINELLA, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. **JAMA**, [s. l.], v. 313, n. 22, p. 2263–2273, 2015.

ROMANO, R. M. *et al.* Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 84, n. 4, p. 309–317, 2010.

ROMUALDO, G. R. *et al.* Effects of glyphosate exposure on western diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 104, p. 104286, 2023.

ROSOLEN, A. P. F. *et al.* Pubertal glyphosate-based herbicide exposure aggravates high-fat diet-induced obesity in female mice. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 31, n. 10, p. 15872–15884, 2024.

RUBINO, F. *et al.* Definition and diagnostic criteria of clinical obesity. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, [s. l.], v. 0, n. 0, 2025. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/landia/article/PIIS2213-8587\(24\)00316-4/abstract](https://www.thelancet.com/journals/landia/article/PIIS2213-8587(24)00316-4/abstract). Acesso em: 30 jan. 2025.

RUI, L. Energy Metabolism in the Liver. In: TERJUNG, R. (org.). **Comprehensive Physiology**. 1. ed. [S. l.]: Wiley, 2014. p. 177–197. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c130024>. Acesso em: 29 jan. 2025.

SCHNEIER, A. T.; CITTI, C. C.; DIETERICH, D. T. Management and diagnosis of fatty liver disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 671–683, 2015.

SÉRALINI, G.-E. *et al.* Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Environmental Sciences Europe**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 14, 2014.

SILVEIRA, P. P. *et al.* Developmental origins of health and disease (DOHaD). **Jornal de Pediatria**, [s. l.], v. 83, n. 6, p. 494–504, 2007.

SINGH, S. *et al.* Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 211–237, 2018.

SINHORIN, V. D. G. *et al.* Metabolic and behavior changes in surubim acutely exposed to a glyphosate-based herbicide. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 659–667, 2014.

SUZUKI, K. The developing world of DOHaD. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 266–269, 2018.

TELEKEN, J. L. *et al.* Glyphosate-based herbicide exposure during pregnancy and lactation malprograms the male reproductive morphofunction in F1 offspring. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 146–153, 2020.

VAN BRUGGEN, A. H. C. *et al.* Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **The Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 616–617, p. 255–268, 2018.

VANDENBERG, L. N. *et al.* Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides?. **Journal of Epidemiology and Community Health**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 613–618, 2017.

VANDENBERG, L. N.; NAJMI, A.; MOGUS, J. P. Agrochemicals with estrogenic endocrine disrupting properties: Lessons Learned?. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 518, p. 110860, 2020.

VEIGA-LOPEZ, A. *et al.* Obesogenic Endocrine Disrupting Chemicals: Identifying Knowledge Gaps. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 607–625, 2018.

VEISSI, M. *et al.* Co-exposure to endocrine disruptors: effect of bisphenol A and soy extract on glucose homeostasis and related metabolic disorders in male mice. **Endocrine Regulations**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 76–84, 2018.

WANG, Xiaojing *et al.* Oxidative Stress and Metabolism: A Mechanistic Insight for Glyphosate Toxicology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 617–639, 2022.

WERNER, M.; BERNDT, C.; MANSFIELD, B. The Glyphosate Assemblage: Herbicides, Uneven Development, and Chemical Geographies of Ubiquity. **Annals of the American Association of Geographers**, [s. l.], v. 112, n. 1, p. 19–35, 2022.

WILLIAMS, Gary M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 117–165, 2000.

ZHAO, H. *et al.* Endocrine toxicity of atrazine and its underlying mechanisms. **Toxicology**, [s. l.], v. null, p. 153846, 2024.

ANEXO

**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

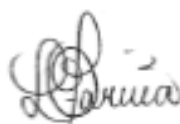
Prof. Dr. Dirceu Baumgartner
Coordenador Suplente do CEUA
Portaria nº 3730/2016 - GRE

Autorização

O Protocolo nº 14-21 intitulado "Efeitos da exposição peripuberal ao herbicida Atrazina sobre a homeostase glicêmica e lipídica em camundongos obesos pela dieta hiperlipídica", sob a responsabilidade de Maria Lúcia Bonfleur que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 11/08/2021. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2021 - 31/12/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /Camundongos/ Linhagem C57Bl/6
N. de animais	160
Peso/Idade	20 g
Sexo	80 Machos + 80 Fêmeas
Origem	Biotério Central da UNIOESTE.

Cascavel, 30/08/2021.



Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 3126/2018-GRE