

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PAULO ROBERTO RIBEIRO

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUOSA NÃO ALCOÓLICA  
EM CAMUNDONGOS FÊMEAS SUBMETIDAS OU NÃO À PRIVAÇÃO HORMONAL  
OVARIANA

PONTA GROSSA

2023

PAULO ROBERTO RIBEIRO

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA  
EM CAMUNDONGOS FÊMEAS SUBMETIDAS OU NÃO À PRIVAÇÃO HORMONAL  
OVARIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Aparecida Ribeiro

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dionízia Xavier Scomparin

PONTA GROSSA

2023

R484 Ribeiro, Paulo Roberto  
Efeitos da exposição ao herbicida à base de glifosato sobre o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos fêmeas submetidas ou não à privação hormonal ovariana / Paulo Roberto Ribeiro. Ponta Grossa, 2023.  
54 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Aparecida Ribeiro.  
Coorientadora: Profa. Dra. Dionízia Xavier Scomparin.

1. Glifosato. 2. Ovariectomia. 3. Privação hormonal ovariana. 4. DHGNA. I. Ribeiro, Rosane Aparecida. II. Scomparin, Dionízia Xavier. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 613.321

PAULO ROBERTO RIBEIRO

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS SUBMETIDAS OU NÃO À PRIVAÇÃO HORMONAL OVARIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, *Campus Uvaranas*, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Apresentada em 02 de agosto de 2023.

Comissão Examinadora:



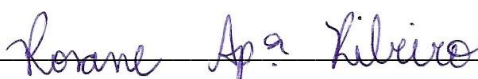
---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Marino Romano  
Universidade Estadual do Centro Oeste



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Bonfleur  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Aparecida Ribeiro  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, aos meus amados pais, meus irmãos Pedro e Duda e demais familiares que sempre me deram todo o suporte, acreditando, investindo na minha educação e pelo fortalecimento emocional, sem eles não estaria concluindo esta etapa.

Ao meu amigo e doutorando João Lucas, pelo incentivo, companheirismo, amizade e por acreditar em mim desde o início.

Aos alunos de iniciação científica, Daniel, Giovana, Luiza, Elisiene, Igor, Fernanda e Thalia, pela amizade e por colaborarem no decorrer de todo o processo experimental.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Aparecida Ribeiro, por acreditar em mim durante o mestrado, por ser exemplo de profissional, e por não medir esforços em estar sempre disponível para ensinar, e principalmente por toda a paciência. Sou muito grato por ter sido seu orientando.

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dionízia Xavier Scomparin por confiar no meu trabalho desde a iniciação científica e por toda disponibilidade em somar ideias e conhecimentos a esta pesquisa.

Ao Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus Cascavel*, e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Bonfleur pelo fornecimento dos camundongos C57Bl/6, os quais foram e são de grande importância no desenvolvimento desta e demais pesquisas que nosso grupo desenvolve.

Aos membros da banca avaliadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Marino Romano e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Bonfleur, por toda colaboração com nossa pesquisa.

Ao laboratório de Técnicas Histológicas e ao Biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa e seus técnicos, que foram cruciais para a conclusão dos processos experimentais.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo PROAP (código financiamento: 001), ao fomento fornecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo nº.: 409456/2021-7) e à Quibasa Química Básica Ltda, pelo fornecimento dos Kits colorimétricos utilizados neste estudo.

Por fim, dedico este trabalho para minha tia Helena (tia Nena), que sempre torceu e acreditou em mim, que estaria muito feliz e orgulhosa por esta conquista, mas

devido a sequelas do vírus COVID-19, não consegue compreender o quão importante foi e será seu exemplo de humildade, força e superação durante todo este tempo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

## RESUMO

O glifosato é um herbicida amplamente utilizado no mundo todo. Na última década tem aumentado o número de estudos que indicam que o herbicida à base de glifosato (HBG) pode contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas. O objetivo geral do estudo foi verificar se a exposição ao HBG contribui ao desenvolvimento de DHGNA em camundongos fêmeas, em idade reprodutiva, alimentadas com dieta normolipídica (DN) e observar se esta exposição agrava o desenvolvimento de DHGNA induzida por dieta hiperlipídica (DH). Foram utilizados camundongos fêmeas *C57Bl/6* em idade reprodutiva. Os grupos experimentais foram: Controle (CTL); CTL exposto a 0,5 mg/kg/dia de HBG (CTL0.5); CTL exposto a 50 mg/kg/dia de HBG (CTL50); Ovariectomizado (OVX), animais que foram operados para a indução da privação dos hormônios ovarianos; OVX exposto a 0,5 mg/kg/dia de HBG (OVX0.5); OVX exposto a 50 mg/kg/dia de HBG (OVX 50). Os animais foram expostos ou não ao HBG por 2 meses em dieta normolipídica e 2 meses em dieta hiperlipídica, sendo posteriormente realizado a avaliação da obesidade, teste de tolerância à insulina, dosagem bioquímica plasmática dos parâmetros nutricionais e de indicadores de lesão hepática, extração e análise de lipídeos do fígado, avaliação histopatológica da DHGNA e análise estatística por ANOVA de duas vias seguidas de Tukey. Os resultados não constataram influência da exposição ao HBG para o desenvolvimento de DHGNA, alteração da sensibilidade à insulina e de lesão hepática, porém houve um aumento da glicemia no estado alimentado em animais ovariectomizados de um grupo exposto ao HBG, o que gera um alerta para mais estudos e análises sobre a causalidade e possível surgimento de uma DCNT. Os resultados também mostraram que a DH com a privação de hormônios ovarianos ocasionou a diminuição de massa do tecido hepático, com aumento de deposição de colesterol no grupo exposto a maior dose de HBG, mas sem alteração histomorfológica em ambas as situações expostas os animais. Nossos dados abrem caminhos de que a atuação do HBG sobre o metabolismo seja ainda mais ampla e interfira em outros mecanismos ainda não esclarecidos pela literatura, e que possam estar contribuindo para a fisiopatologia de outras DCNTs além da DHGNA.

Palavras-chave: glifosato; ovariectomia; privação hormonal ovariana; doença hepática gordurosa não alcoólica.

## ABSTRACT

Glyphosate is a widely used herbicide worldwide. In the last decade, there has been an increase in the number of studies that indicate that glyphosate-based herbicides (GBH) can contribute to the development of chronic diseases. The overall objective of the study was to verify whether exposure to GBH contributes to the development of NAFLD in female mice of reproductive age fed a normolipidic (ND) diet and to observe whether this exposure aggravates the development of NAFLD induced by a high-fat (HD) diet. Female C57Bl/6 mice of reproductive age were used. The experimental groups were: Control (CTL); CTL exposed to 0.5 mg/kg/day of HBG (CTL0.5); CTL exposed to 50 mg/kg/day of GBH (CTL50); Ovariectomized (OVX), animals that were operated on to induce ovarian hormone deprivation; OVX exposed to 0.5 mg/kg/day of GBH (OVX0.5); OVX exposed to 50 mg/kg/day of GBH (OVX 50). The animals were exposed or not to GBH for two months on a normolipid diet and two months on a high-fat diet. Next, exams were performed, such as an evaluation of obesity, insulin tolerance test, plasma biochemical dosage of nutritional parameters and indicators of liver damage, extraction and analysis of liver lipids, histopathological evaluation of NAFLD and statistical analysis by two-way ANOVA followed by Tukey. The results found no influence of exposure to HBG on the development of NAFLD, changes in insulin sensitivity, and liver damage. However, there was an increase in blood glucose in the fed state in ovariectomized animals from a group exposed to GBH. It implies an alert for further studies and analyses on the causality and possible emergence of a chronic non-communicable diseases (CNCDs). The results also showed that DH with ovarian hormone deprivation caused a decrease in liver tissue mass, with an increase in cholesterol deposition in the group exposed to the highest dose of GBH but without histomorphological alteration in both situations where the animals were exposed. Our data open the way for the action of HBG on metabolism to be even broader and to interfere with other mechanisms not yet clarified in the literature, which may contribute to the pathophysiology of other CNCDs in addition to NAFLD.

Key words: glyphosate; ovariectomy; ovarian hormone deprivation; non-alcoholic fatty liver disease.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Peso corporal e peso da gordura abdominal total de camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG e alimentadas com DN.....	27
<b>Figura 2-</b> Peso corporal e peso da gordura abdominal total camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG e alimentadas com DH.....	28
<b>Figura 3-</b> Glicemia durante o teste de tolerância à insulina e constante de decaimento da glicemia de camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG e alimentadas com DN.....	32
<b>Figura 4-</b> Glicemia durante o teste de tolerância à insulina e constante de decaimento da glicemia de camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG e alimentadas com DH.....	33
<b>Figura 5-</b> Imagens representativas de secções histológicas do fígado de camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG e alimentadas com DN, peso do fígado, da concentração hepática de colesterol, de triglicerídeos e do estadiamento da DHGNA.....	35
<b>Figura 6-</b> Imagens representativas de secções histológicas do fígado de camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG e alimentadas com DH, peso do fígado, da concentração hepática de colesterol, de triglicerídeos e do estadiamento da DHGNA.....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Parâmetros bioquímicos nutricionais de camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG e alimentadas com DN.....	29
<b>Tabela 2-</b> Parâmetros bioquímicos nutricionais de camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG e alimentadas com DH.....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACO	Enzima acil-CoA oxidase
AG	Ácido graxo
ALT	Enzima alanina aminotransferase
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
AST	Enzima aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CTL	Controle
CTP	Enzima carnitina palmitoiltransferase
DCNTs	Doenças crônicas não transmissíveis
DEs	Desregulares endócrinos
DH	Dieta hiperlipídica
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DN	Dieta normolipídica
EPSPS	Enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
ER	Receptor de estrogênio
GF	Glifosato
HBG	Herbicida a base de glifosato
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
IP	Intraperitoneal
Kitt	Constante de decaimento da glicemia
MTTP	Proteína microsomal de transferência de triglicerídeos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
OVX	Ovariectomizado
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TyG	Índice de resistência à insulina
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1	Obesidade .....	11
1.2	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) .....	12
1.3	Agrotóxicos e o Glifosato .....	15
1.4	Herbicidas à Base do Glifosato, Obesidade e DHGNA .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1	Objetivo Geral .....	20
2.2	Objetivos específicos .....	20
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>21</b>
3.1	Animais .....	21
3.2	Indução da Privação dos Hormônios Ovarianos .....	21
3.3	Confirmação da Indução da Privação dos Hormônios Ovarianos .....	22
3.4	Grupos Experimentais .....	22
3.6	Avaliação dos Parâmetros Nutricionais Bioquímicos Plasmáticos e Indicadores de Lesão Hepática .....	24
3.7	Avaliação da Obesidade .....	24
3.8	Extração de lipídeos do fígado .....	25
3.9	Avaliação histopatológica da DHGNA .....	25
3.10	Análise Estatística .....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
4.1	Peso corporal e adiposidade abdominal .....	27
4.2	Parâmetros bioquímicos plasmáticos e de sensibilidade à insulina .....	29
4.3	Conteúdo de Lipídeos e Histopatologia Hepáticos .....	33
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
	<b>ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DA UEPG</b> .....	<b>52</b>
	<b>ANEXO B - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DA UNIOESTE</b> .....	<b>54</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade

A obesidade é caracterizada por acúmulo excessivo de gordura corporal que pode comprometer a saúde do indivíduo (WHO, 2020). A etiologia da obesidade envolve condições genéticas, ambientais, metabólicas, endócrinas, neurais e comportamentais. Nesse âmbito é importante destacar que apesar da doença estar relacionada com desequilíbrio no balanço energético, principalmente devido à maior ingestão de alimentos ultraprocessados contendo elevada concentração de carboidratos e gorduras, associada ao aumento do sedentarismo na população (Ahmadi et al., 2023; Harb et al., 2023), mais do que a relação entre a quantidade entre calorias ingeridas e gastas, atualmente se considera a qualidade da alimentação e os fatores que regulam o gasto energético. Neste âmbito há evidências crescentes de que a exposição dos indivíduos à agentes químicos naturais ou sintéticos, denominados desreguladores endócrinos (DEs), que ocorrem no ambiente e/ou alimentos, podem ser agentes obesógenos que aumentam a susceptibilidade do indivíduo ao ganho de peso, ao armazenamento de lipídeos e à prejuízos no metabolismo energético, contribuindo à obesidade (Mohajer et al., 2021).

O diagnóstico da obesidade pode ser realizado por vários parâmetros, porém muitos estudos epidemiológicos utilizam o índice de massa corporal (IMC). Este índice é obtido através da razão entre o peso corporal em kg e o quadrado da altura ( $\text{kg/m}^2$ ), assim, um indivíduo com  $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$  é considerado obeso. Conforme este critério, em 2016, 650 milhões de indivíduos adultos no mundo apresentavam obesidade (WHO, 2020). No Brasil, em 2021 foi observado que 22,4% dos brasileiros adultos eram obesos, sendo verificada a obesidade em 22,6% das mulheres e 22% dos homens (VIGITEL, 2022). A estimativa global é que em 2035, 24% da população mundial acima dos 5 anos de idade tenha obesidade (World Obesity Federation, 2023).

Esses dados epidemiológicos e estimativas futuras de avanço da incidência da doença são alarmantes, demonstrando que os países precisam manter vigilância alimentar e nutricional, e desenvolver estratégias educacionais que mantenham a população informada sobre os prejuízos orgânicos da obesidade, e que promovam

modos alimentares e de atividade saudáveis, para atenuar o alto impacto econômico com gastos em Saúde Pública e do alto IMC sobre produtividade econômica, devido à obesidade reduzir a produtividade no trabalho e causar aposentadoria prematura ou morte (World Obesity Federation, 2023). Tais impactos podem ainda ser mais agravados pelas comorbidades que a obesidade predispõe, como doenças cardiovasculares, respiratórias, motoras, *Diabetes mellitus*, doença hepática gordurosa não alcoólica, etc (Kivimäki et al., 2022). Esta última, é atualmente a doença hepática prevalente nos países ocidentais, e sua incidência na população mundial é de 32,4% (Riazi et al., 2022). Contudo sua ocorrência pode ser superior à 75% quando se analisa somente os indivíduos obesos (Quek et al., 2023).

## 1.2 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)

Com o avanço da obesidade a gordura passa a ser depositada em tecidos ectópicos, dentre os quais se destaca o fígado, o que conduz ao desenvolvimento da DHGNA que é conceituada como acúmulo de gordura hepática que acomete mais que 5% dos hepatócitos, em indivíduos sem histórico de consumo excessivo de álcool (Bessone; Razori; Roma, 2019; Chalasani et al., 2018).

Essa doença crônica consiste em um espectro de modificações histológicas hepáticas que se manifestam conforme a sua gravidade. Esse espectro inicia-se com a esteatose hepática simples que é determinada pelo aumento da deposição de lipídeos no fígado, a qual com a progressão pode induzir inflamação, degeneração hepatocelular e deposição de colágeno resultando na esteato-hepatite não alcoólica. Estes estágios da doença são potencialmente reversíveis. Contudo, havendo agravamento da lesão hepática e fibrose, a esteato-hepatite não alcoólica poderá resultar em cirrose hepática que é irreversível, e que também pode conduzir ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (Contos et al., 2004).

Diferentes teorias foram postuladas para explicar a fisiopatologia da DHGNA, como a teoria da patogênese de “dois insultos (*two-hit*)” ao fígado, e a teoria dos “múltiplos insultos (*multiple-hit pathogenesis*)”. A primeira teoria afirma que a esteatose hepática é resultado da resistência à insulina, o que tornaria os hepatócitos susceptíveis à ação de um segundo “golpe”, como estresse oxidativo, depleção de adenosina trifosfato (ATP) ou ataque de endotoxinas, resultando na inflamação do

fígado, fibrose, cirrose e hepatocarcinoma. A segunda teoria, e atualmente mais aceita, sugere o envolvimento de múltiplos fatores patogênicos, como resistência à insulina, hormônios liberados pelo tecido adiposo, fatores nutricionais, genéticos e epigenéticos, que ocorrem em paralelo ou em sequência, e aliados à predisposição do indivíduo podem causar diferentes estágios de gravidade da DHGNA (Lonardo et al., 2017).

Independente da teoria postulada é consenso nas evidências científicas de que os eventos que contribuem ao acúmulo de gordura no fígado e desenvolvimento da DHGNA, podem envolver uma ou mais alterações no metabolismo lipídico. Dentre essas modificações está o aumento do suprimento de ácidos graxos (AGs) da circulação para os hepatócitos provenientes da alimentação rica em lipídeos, ou da lipólise exacerbada no tecido adiposo, em resposta à resistência à insulina (Bashir et al., 2022; Bessone; Razori; Roma, 2019). No fígado, os AGs não utilizados, são reesterificados à triglicerídeos e armazenados em vacúolos nos hepatócitos (Duarte et al., 2014).

A deposição ectópica de gordura no fígado também pode ocorrer pelo aumento da via da lipogênese *de novo*. Esta é regularmente ativada quando há saturação da capacidade de armazenamento de glicogênio hepático. Nessa situação, a glicose é redirecionada à síntese *de novo* AG. Nesse processo a glicose é convertida à gliceraldeído-3-fosfato, fosfoenolpiruvato e piruvato por meio da enzima piruvato quinase hepática. A oxidação do piruvato produzido, gera acetil-CoA, e o excesso desse acetil-CoA é direcionado à síntese de AG e em última instância em triglicerídeo (Sanders; Griffin, 2016). É importante ressaltar que esse processo ocorre regularmente quando há maior oferta de nutrientes, como por exemplo, após a alimentação, a qual aumenta a glicemia e aporte de glicose ao fígado, sendo seu excesso direcionado à *novo* AG. Contudo, a resistência à insulina pode aumentar o aporte de glicose ao fígado contribuindo para a maior produção hepática *de novo* AGs (Smith et al., 2020).

Os triglicerídeos produzidos no fígado são prioritariamente exportados para a circulação pelas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Dentre as etapas envolvidas na síntese dessa lipoproteína, está a transferência de triglicerídeo para a apolipoproteína B, realizada pela proteína microsomal de transferência de triglicerídeo (MTTP). A VLDL madura pode então ser secretada pelo fígado. Portanto, prejuízos na expressão ou atividade da MTTP podem causar redução da exportação

hepática de VLDL, o que aumenta a deposição de triglicerídeos em vacúolos nos hepatócitos contribuindo para a instalação da DHGNA (Bessone; Razori; Roma, 2019).

Os AGs no fígado são oxidados na via da  $\beta$ -oxidação peroxissomal ou mitocondrial para a produção de ATP. Neste processo, os AGs são ativados pela acil-CoA-sintetase em acil-CoA no citosol e após transferidos às organelas. Na via peroxissomal são metabolizados principalmente AGs de cadeia longa com mais de 20 carbonos, sendo a enzima acil-CoA oxidase (ACO) responsável por catalisar os primeiros passos da oxidação dos AGs. A ACO ligada a flavina-adenina dinucleotídeo transfere elétrons derivados da desidrogenação do acil-CoA diretamente para o oxigênio molecular, gerando peróxido de hidrogênio, que é então degradado pela enzima catalase. Este processo também produz AGs de cadeia curta (6-8 carbonos) que são exportados para a mitocôndria para completa oxidação (Schrader et al., 2015).

Na  $\beta$ -oxidação mitocondrial, os acil-CoA formados são transportados através da membrana mitocondrial externa pela enzima carnitina palmitoiltransferase (CPT) - 1, que os converte em acil-carnitina. Em seguida, estes são transferidos para a matriz mitocondrial pela enzima CPT-2, que por sua vez realiza o processo inverso ao da CPT-1, formando novamente acil-CoA, que passa por ciclos de  $\beta$ -oxidação no qual nicotinamida adenina dinucleotídeo e flavina-adenina dinucleotídeo são formados, os quais transferem seus elétrons para a cadeia respiratória. Esses elétrons migram até o citocromo-C-oxidase e os prótons são expulsos a partir da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, criando um gradiente eletroquímico, cuja energia é utilizada pela ATP sintase para a fosforilação da adenosina difosfato à ATP. A  $\beta$ -oxidação ocorre predominantemente no estado de jejum, quando os valores de malonil-CoA estão baixos, pois este é um inibidor da CPT-1. Porém condições como excesso de energia ao hepatócito, podem resultar em aumento de malonil-CoA, envolvido na síntese de AGs, e em paralelo reduzir a  $\beta$ -oxidação, contribuindo ao acúmulo de AGs e triglicerídeos no fígado. Por outro lado, o aumento de suprimento de AGs ao fígado, e a sua maior utilização via  $\beta$ -oxidação, pode resultar em acúmulo hepático de espécies reativas de oxigênio que também contribuiriam à patogênese da DHGNA (Begrache et al., 2013; Bessone; Razori; Roma, 2019).

Enfim, apesar de serem supracitadas várias etapas do metabolismo lipídico que modificados contribuem para a DHGNA, sua fisiopatologia é complexa envolvendo



várias etapas do metabolismo intermediário e reguladores que podem ser modificados e conduzirem ao desenvolvimento da doença. O avanço científico tem demonstrando que os vários DEs, como fitoestrógenos, ftalatos, bifenilos, bisfenóis, plastificantes não-ftalatos, inseticidas, fungicidas e herbicidas podem prejudicar o metabolismo hepático, portanto serem obesógenos, modificando várias das etapas metabólicas supracitadas e conduzir ao desenvolvimento de DHGNA (Cano et al., 2021; Ford et al., 2017; Zhang et al., 2023).

### 1.3 Agrotóxicos e o Glifosato

De acordo com o 2º artigo da Lei nº.: 7.802, de 11 de julho de 1989, são considerados *“agrotóxicos e afins, os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”* (Brasil, 1989). Conforme a finalidade, os agrotóxicos podem ser pesticidas denominados inseticidas, fungicidas, herbicidas etc. O seu uso permitiu o aumento na produção agrícola, importante para alimentar a população em crescimento. Contudo o trecho da Lei supracitada pode-se levar a falsas interpretações, pois isenta os produtos químicos sintéticos usados para tais fins de qualquer prejuízo ao ambiente ou à saúde. Atualmente, as evidências científicas usando diferentes modelos experimentais indicam que muitos dos pesticidas utilizados na agricultura podem agir como DEs, e a exposição à concentrações geralmente aceitas por agências regulatórias podem predispor à doenças crônicas, dentre as quais, a obesidade (Jiang; Peng; Sun, 2022).

No Brasil, dentre os vários pesticidas empregados na agricultura, destacam-se os herbicidas à base de glifosato (GF) [N-(fosfometil) glicina] que representaram em 2019, 62% dos herbicidas utilizados no país (Merotto et al., 2022).

O GF constitui o ingrediente ativo de mais de 750 herbicidas de amplo espectro disponíveis comercialmente no mundo, incluindo vários que são usados contra ervas daninhas em plantações geneticamente modificadas. Além de ser utilizado em plantações da soja, os produtos que contêm GF são autorizados no Brasil a serem

administrados em culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citrus, coco, eucalipto, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagem, pera, pêsego, pinus, seringueira, soja, trigo e uva (ANVISA, 2019). Portanto, os consumidores podem estar expostos ao herbicida ou seus resíduos por diferentes produtos e não somente pela alimentação. Enfatiza-se que a exposição ao GF não se restringe à via oral, mas também às vias respiratórias e dérmicas, visto que este produto é contaminante de águas, solo e ar (Brovini et al., 2021; Londres, 2011).

O GF é herbicida não seletivo que inibe o crescimento das plantas através da interferência na produção de aminoácidos aromáticos essenciais por inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), responsável pela biossíntese do corismato, um intermediário da fenilalanina, tirosina e triptofano (Roisch; Lingens, 1974; Schönbrunn et al., 2001). Esta via biossintética ocorre somente em plantas, fungos, bactérias e alguns invertebrados, como vermes (BENTLEY, 1990), sendo portanto postulado que os demais animais invertebrados e os vertebrados estariam isentos das ações do herbicida. Porém, na última década tem aumentado o número de estudos que indicam que os herbicidas à base de GF (HBGs) podem contribuir ao desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas. Estudos usando a exposição subcrônica ou crônica de ratos ou camundongos aos HBGs, tanto em doses menores, quanto na dose de 50 mg de GF/kg/dia que se refere ao *Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis* (NOAEL) para o GF (ESFA, 2015), demonstraram prejuízos: no eixo hipotálamo-hipófise (HH)-gônadas (Romano et al., 2012; Ingaramo et al., 2019), eixo HH-tireoide (De Souza et al., 2017), eixo HH-adrenal (Pandey; Rudraiah, 2015), no fígado e rins (Mesnage et al., 2015). Porém, mesmo com as evidências experimentais supracitadas, e enfatizadas em revisão que demonstrou que o GF apresenta 8 das 10 características chaves (Muñoz; Bleak; Calaf, 2021) que podem auxiliar à identificação de perigos intrínsecos dos produtos químicos à saúde, e, portanto, designá-los a serem considerados DEs (La Merrill et al., 2020); o GF ainda não é oficialmente considerado um DE.

#### 1.4 Herbicidas à Base do Glifosato, Obesidade e DHGNA

Em relação à obesidade, foi observado em roedores que a exposição ao GF pode não desencadear a doença nos animais que estão diretamente expostos, mas

que o GF causa modificações epigenéticas que são transmitidas às gerações subsequentes, aumentando o risco de obesidade (Kubsad et al., 2019). Os efeitos obesogênicos da exposição em humanos dos HBGs ainda são contraditórios na literatura. Um estudo recente ao investigar se existe correlação entre a exposição aos HBGs e a ocorrência de obesidade em populações rurais no Rio Grande do Sul, observou apenas correlações fracas entre o uso dos HBGs nas lavouras e a prevalência de obesidade nas populações deste estado que eventualmente foram expostas aos aerossóis das pulverizações. Contudo, ao analisar outros estados brasileiros que produzem soja, verificou correlação significativa entre o uso agrícola do HBGs e a obesidade grave em adolescentes, sugerindo a possibilidade de ocorrência de obesogenicidade transgeracional decorrente da exposição ao herbicida (Bruchez, 2022).

Com relação à DHGNA, foi observado maior excreção urinária de GF e de seu metabólito primário, o ácido aminometilfosfônico (AMPA) em indivíduos que tinham esteatohepatite não alcoólica em relação aos que apresentavam somente esteatose hepática. Ainda, os valores de GF e AMPA urinários foram maiores em mulheres do que em homens que tinham esteatose não alcoólica (Mills; Caussy; Loomba, 2020).

Dados obtidos com a exposição ao GF isolado ou às formulações de HBGs têm demonstrado que o herbicida pode modificar o metabolismo lipídico hepático. Em ratos expostos por 35 dias à 50 e 500 mg de GF/kg/dia foi observado aumento da expressão gênica de proteínas envolvidas na lipogênese *de novo*, porém sem modificações histológicas que indicavam esteatose hepática (Tang et al., 2017). A exposição à 200 mg de GF/kg na ração ofertada à galos por 180 dias causou, elevação da concentração sérica e hepática do herbicida, bem como esteatose hepática, efeito associado à redução da  $\beta$ -oxidação, pois o grupo tratado com GF apresentou menor expressão gênica do PPAR- $\alpha$  (receptor ativado por proliferadores peroxissomais do tipo alfa) e CPT-1 (Lian et al., 2023). Em camundongos expostos à 250 ou 500 mg de HBG/kg/dia por 30 dias, não foi observada esteatose hepática, contudo o herbicida causou estresse oxidativo, inchaço e ruptura das cristas mitocondriais, modificações na expressão de proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa e no metabolismo da glicose, que contribuíram para a maior produção hepática de glicose via gliconeogênese e acúmulo de acetil-CoA e seu direcionamento para a lipogênese *de novo* (Qi et al., 2023). Em camundongos que receberam 200 mg de [ $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ]GF/kg por 7 dias foi observado aumento do herbicida no fígado, e também metabolismo

hepático do GF à AMPA e glioxilato. A maior concentração deste metabólito no fígado dos camundongos tratados com 200 mg de GF/kg por 7 dias interagiu com resíduos cisteína e reduziu a atividade da acetil-CoA aciltransferase-1b e a acetil-CoA aciltransferase-2, o que contribuiu para redução da  $\beta$ -oxidação peroxissomal e mitocondrial e acúmulo de gordura no hepatócito (Ford et al., 2017).

Apesar dessas evidências, ainda não foi demonstrado se o mecanismo pelo qual, o GF pode causar prejuízos no metabolismo hepático e predispor à DHGNA, envolve sua interação com receptores. Dentre os vários mecanismos que contribuem para a manutenção do metabolismo lipídico hepático, está a via de sinalização ativada pelos estrogênios (Palmisano; Zhu; Stafford, 2017). É possível que o herbicida possa desencadear ações desreguladoras sobre a sinalização estrogênica no fígado e assim, contribuir ao acúmulo de gordura neste tecido.

Os estrogênios agem nos tecidos-alvo desencadeando ações genômicas por interagirem com as isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  do receptor de estrogênio (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ). Após a interação do estrogênio aos ERs, estes dimerizam e no núcleo se ligam a regiões específicas do DNA denominadas elementos de resposta ao estrogênio (ERE), regulando assim a expressão gênica. Os estrogênios também desencadeiam ações não genômicas via interação com o ER de membrana plasmática acoplado a proteína G (GPER30), ou com receptores de outros hormônios (Arnal et al., 2017). O fígado expressa ambos tipos de receptores para estrogênio, contudo, o ER $\alpha$  tem demonstrado ser o principal receptor envolvido na regulação do metabolismo lipídico em condições que conduzem ao desenvolvimento da DHGNA, como por exemplo a privação de hormônios ovarianos que ocorre após a ovariectomia (Zhu et al., 2013). A ação protetora do ER $\alpha$  contra a esteatose hepática envolve a manutenção da exportação do triglicerídeo via VLDL e a  $\beta$ -oxidação (Palmisano et al., 2016; Zhu et al., 2013).

Em lagartos expostos por 3 semanas à 0.05 and 0.5  $\mu$ g de GF/kg/dia foram evidenciadas diferentes lesões hepáticas, porém redução e aumento, respectivamente, da expressão gênica do ER $\alpha$  (Verderame; Scudiero, 2019). O herbicida parece interferir de várias formas na ação estrogênica, visto ter sido reportado aumento da sensibilidade uterina ao estrogênio por induzir maior expressão dos receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Schimpf et al., 2018); e aumentar a proliferação de células tumorais via ativação do ER $\alpha$  tanto por interação ou não a este receptor (Mesnage et al., 2017; Muñoz et al., 2023; Schimpf et al., 2018). Porém, na linhagem de hepatócitos

humano, HepG2, a incubação com HBGs, mas não com GF, a partir de 0,1 ppm reduziu a atividade transcricional do ER $\alpha$  e ER $\beta$ , assim como a expressão gênica e a atividade da aromatase (Gasnier et al., 2009). Apesar desses dados conflitantes do GF e/ou dos HBGs sobre a expressão ou ativação da via estrogênica no fígado, eles são importantes porque evidenciam várias formas potenciais do herbicida poder agir como DE e poder prejudicar a via de sinalização do estrogênio, o que pode contribuir para demonstrar as diferentes formas do herbicida poder aumentar o risco ao desenvolvimento da DHGNA.

Nossa hipótese é de que a exposição ao HBG, nas doses de 0,5 ou 50 mg de HBG/kg/dia, ADI e NOAEL, respectivamente, em vigor (ANVISA, 2019; ESFA, 2015) em camundongos fêmeas em idade reprodutiva prejudique o metabolismo hepático conduzindo ao desenvolvimento da DHGNA. Tal efeito poderia ocorrer pelo HBG desregular as ações do estrogênio sobre o metabolismo lipídico no fígado. Desta forma, para evidenciar se as ações hepáticas do HBG sobre parâmetros bioquímicos e histopatológicos que caracterizam a DHGNA dependem da via estrogênica, o estudo utilizará também grupo experimental submetido à ovariectomia bilateral. Este modelo experimental por causar privação dos hormônios ovarianos, é ferramenta essencial para evidenciar se os mecanismos fisiopatológicos em diferentes doenças crônicas, incluindo a obesidade e DHGNA, são dependentes ou não da via de sinalização dos estrogênios (Camporez et al., 2013; Ding et al., 2013; Pinna et al., 2008; Zhu et al., 2013).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Verificar se a exposição ao herbicida à base de glifosato (HBG) contribui ao desenvolvimento de DHGNA em camundongos fêmeas, em idade reprodutiva, alimentadas com dieta normolipídica. Observar se a exposição ao HBG agrava o desenvolvimento de DHGNA induzida por dieta hiperlipídica. Além disso, evidenciar se os efeitos da exposição ao HBG são relacionados aos hormônios ovarianos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar os efeitos da exposição ao HBG sobre sensibilidade à insulina, parâmetros bioquímicos nutricionais e de lesão hepática quando camundongos fêmeas estão sob regime normolipídico ou hiperlipídico;
- Avaliar se a exposição ao HBG modifica a deposição de gordura hepática e a histomorfologia hepática e predispõe ao desenvolvimento de DHGNA, em fêmeas alimentadas com dieta normolipídica, ou quando são desafiadas com dieta hiperlipídica;
- Observar se os efeitos da exposição ao HBG sobre os parâmetros bioquímicos e morfológicos hepáticos dependem dos hormônios ovarianos.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas *C57Bl/6* de 90 dias de idade, obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Cascavel, PR) e mantidos no Núcleo Avançado de Estudos da Vida (NAEVI) UEPG *Campus* Uvaranas (Ponta Grossa, PR) sob condições padronizadas de temperatura ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade e luminosidade (luzes acesas das 7h às 19h). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEPG (Processo nº.: 0533578/2021; Anexo A) e pela CEUA da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Protocolo nº.: 18-21; Anexo B).

#### 3.2 Indução da Privação dos Hormônios Ovarianos

Para verificar se os potenciais efeitos da exposição ao HBG estavam relacionados aos hormônios ovarianos, um grupo de camundongos fêmeas foram submetidas à ovariectomia bilateral, para assim causar privação dos hormônios ovarianos. Para tanto, primeiramente, as fêmeas foram pesadas e receberam por via intraperitoneal (IP) 100 mg de cetamina/kg de peso corporal; (Buitrago et al., 2008)] e 10 mg de xilazina /kg de peso corporal (Buitrago et al., 2008). Constatada a sedação, as fêmeas foram posicionadas lateralmente e na região do flanco direito, entre a última costela e o quadril foi realizada a tricotomia dos pelos, pequena incisão da pele e divulsionamento do tecido subcutâneo e musculatura, para se obter acesso à cavidade abdominal. O ovário direito foi externalizado e imediatamente abaixo do oviduto e na extremidade do útero, foi passado fio absorvível formando sutura circundante que separou completamente o útero do oviduto e ovário. Imediatamente acima desta sutura, foi realizada incisão resultando na retirada do oviduto, ovário e tecido adiposo periovariano direitos. O útero foi cuidadosamente devolvido à cavidade abdominal e procedeu-se a sutura separada da musculatura e da pele. Todo este

procedimento foi realizado no lado esquerdo do camundongo para retirada do ovário esquerdo.

Para mimetizar as mesmas condições que as fêmeas ovariectomizadas foram submetidas, os mesmos procedimentos foram realizados do lado direito e esquerdo em outro grupo de fêmeas, porém após externalização dos ovários estes somente foram massageados e devolvidos à cavidade abdominal.

### 3.3 Confirmação da Indução da Privação dos Hormônios Ovarianos

Após 14 dias da ovariectomia bilateral, o esfregaço vaginal foi coletado, diariamente das fêmeas ovariectomizadas por 14 dias, com auxílio de conta-gotas contendo solução de 0,9% de NaCl e colocado em lâminas de vidro para visualização em microscópio óptico. Somente fêmeas ovariectomizadas que apresentaram citologia em anestro por 14 dias consecutivos foram consideradas em menopausa cirúrgica e portanto, em privação dos hormônios ovarianos.

### 3.4 Grupos Experimentais

Para avaliar se a exposição ao HBG contribui para o desenvolvimento de DHGNA em camundongos fêmeas em idade reprodutiva, e se os efeitos do herbicida estão relacionados aos hormônios ovarianos; os camundongos fêmeas, por 60 dias, foram alimentados com dieta normolipídica (DN) comercial (Nuvilab CR1; Quimtia, Colombo, PR, BRA) que provinha 3,68 kcal/g, dentre as quais 9,89 % das kCal eram provenientes de gordura. Assim, as fêmeas foram distribuídas nos seguintes grupos:

- **Controle (CTL)**: fêmeas que diariamente, por gavagem receberam, 0,2 mL de água destilada (veículo);
- **CTL submetido à exposição de 0,5 mg/kg/dia de HBG (CTL0.5)**: fêmeas que receberam diariamente, por gavagem, 0,2 mL de água destilada contendo 0,5 mg/kg de HBG [Roundup Original® Mais, Monsanto do Brasil (São José dos Campos, SP, BRA)]; contendo 577 g/L de sal de diamônio de N-



fosfometilglicina que corresponde a 480 g/L (48% m/v) do componente ativo glifosato (N-fosfometilglicina)];

- **CTL submetido à exposição de 50 mg/kg/dia de HBG (CTL50)**: fêmeas que receberam diariamente, por gavagem, 0,2 mL de água destilada contendo 50 mg/kg de HBG;
- **Ovariectomizado (OVX)**: fêmeas OVX que receberam diariamente, por gavagem, 0,2 mL de veículo;
- **OVX submetido à exposição de 0,5 mg/kg/dia de HBG (OVX0.5)**: fêmeas OVX que receberam diariamente, por gavagem, 0,2 mL de água destilada contendo 0,5 mg/kg de GBH;
- **OVX submetido à exposição de 50 mg/kg/dia de HBG (OVX 50)**: fêmeas OVX que receberam diariamente, por gavagem, 0,2 mL de água destilada contendo 50 mg/kg de GBH).

Para avaliar se a exposição ao HBG agravava o desenvolvimento de DHGNA induzido por dieta hiperlipídica em camundongos fêmeas, em idade reprodutiva, submetidas ou não à privação dos hormônios ovarianos, outro grupo de camundongos fêmeas **CTL**, **CTL0.5**, **CTL50**, **OVX**, **OVX0.5** e **OVX50** prosseguiram o período de exposição ou não ao HBG por 60 dias, totalizando, portanto, 4 meses de exposição, e nestes 2 últimos meses do período experimental foram alimentados com dieta hiperlipídica (DH).

A ração DH foi preparada a partir da DN comercial (Nuvilab CR1; Quimtia, Colombo, PR, BRA), sendo adicionado banha (Aurora, Chapecó, SC, BRA) e óleo de soja para aumentar o teor lipídico; e para correção do teor proteico, foi adicionada a proteína caseína (PragSoluções, Jaú, SP, BRA). Esta dieta fornecia no total 5,58 kcal/g, sendo 60% das kcal provenientes das gorduras.

### 3.5 Teste de Tolerância à Insulina

Na última semana do período experimental, tanto dos grupos experimentais alimentados com DN quanto com DH, os camundongos fêmeas após 2h de jejum, foram pesados, e na sequência foi verificada a glicemia (tempo 0), usando glicosímetro (G-TECH Free, Accumed-Glicomed, Duque de Caxias, RJ, BRA), com o sangue coletado por corte de 2 mm feito na ponta da cauda. Em seguida os

camundongos receberam uma injeção IP de 1 UI de insulina/kg de peso corporal e a glicemia foi novamente verificada aos 4, 8, 12, 16 e 20 minutos após a aplicação do hormônio. A taxa constante de redução da glicemia (Kitt) foi calculada a partir da fórmula  $0,693/t_{1/2} \times 100$ , sendo  $t_{1/2}$  o tempo necessário para reduzir metade da glicemia basal, e foi calculado pela inclinação da curva de decaimento da glicemia (Bonora et al., 1989), com o auxílio do programa Prism 9.0 (GraphPad Software, Boston, MA, EUA), os valores da glicemia obtidos durante o teste foram convertidos em Ln e após submetido à regressão linear, sendo o valor do “*Slope*” multiplicado por 100 (%/min).

### 3.6 Avaliação dos Parâmetros Nutricionais Bioquímicos Plasmáticos e Indicadores de Lesão Hepática

Na última semana do período experimental, tanto dos grupos experimentais alimentados com DN quanto com DH, procedeu-se a coleta de sangue dos diferentes grupos experimentais nos estados de 12h de jejum e alimentado. Para tanto, a coleta foi realizada com no mínimo de intervalo de 2 dias em cada fêmea para cada condição nutricional. O sangue foi obtido por pequeno corte na ponta da cauda, e após centrifugado à 3000 rpm por 15 minutos para obtenção do plasma, no qual usando kits colorimétricos da Quibasa-Bioclin (Belo Horizonte, MG, BRA) foram mensurados triglicerídeos (catálogo: K117), colesterol total (catálogo: K083), albumina (catálogo: K040), proteínas totais (catálogo: K031), e a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) (catálogo: K034) e alanina aminotransferase (ALT) (catálogo: K035), indicadoras de lesão hepática (Chen, 2022). Os valores de glicemia e trigliceridemia em jejum de cada camundongo fêmea foram usados para obtenção do índice de resistência à insulina TyG, através do cálculo:  $\text{Ln}[\text{triglicerídeos (mg/dL)} \times \text{glicemia (mg/dL)/2}]$  (Simental-Mendía; Rodríguez-Morán; Guerrero-Romero, 2008).

### 3.7 Avaliação da Obesidade

Após 60 ou 120 dias da exposição ou não ao HBG, no grupo alimentado com DN ou DH, respectivamente, os camundongos fêmeas foram submetidos à 12h de jejum e posteriormente pesados e em seguida, eutanasiados por decapitação. Subsequentemente, foi realizada laparotomia para dissecação e pesagem dos estoques de tecido adiposo branco abdominais, para avaliação da deposição de

gordura abdominal total. Além disso, o fígado também foi dissecado e pesado e armazenado à -80°C para posterior extração de gordura ou direcionado ao processamento histológico.

### 3.8 Extração de lipídeos do fígado

Um fragmento de aproximadamente 100 mg do fígado coletado de cada fêmea foi homogeneizado em solução composta de 2 partes de clorofórmio e uma parte de metanol (v/v), e posteriormente incubado *overnight* à temperatura ambiente. As amostras foram filtradas, evaporadas, e após o precipitado foi suspenso com álcool isopropílico para dosagem de triglicerídeos e colesterol total utilizando-se kits comerciais (catálogo: K117 e K083, Quibasa-Bioclin, Belo Horizonte, MG, BRA) (Folch; Lees; Sloane Stanley, 1957).

### 3.9 Avaliação histopatológica da DHGNA

Um fragmento do fígado de cada fêmea foi fixado em formol de Carson 10% por 48h. Após, o tecido foi desidratado em etanol, diafanizado em xilol e incluído em paraplast (Leica Biosystems, Richmond, Virginia, EUA). Secções de 5 µm de espessura foram obtidas, com espaçamento de 100 µm entre elas. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Para a análise histopatológica, 2 secções do fígado de cada fêmea foram registradas em magnificação de 1000x com auxílio de microscópio óptico (Olympus BX41TF, Olympus Optical do Brasil, São Paulo, SP, BRA) contendo câmera acoplada (Olympus DP72, Olympus Optical do Brasil, São Paulo, SP, BRA), sendo no total registrados 16 campos aleatórios para cada secção.

A análise da DHGNA foi realizada conforme descrito previamente por Liang et al. (2014). Para tanto, primeiramente, com o auxílio do programa livre *FIJI Image J* (<https://imagej.net/software/fiji/downloads>), foram contabilizados os hepatócitos de cada campo e após, foram contados manualmente os hepatócitos que apresentavam inclusões lipídicas, classificando as inclusões em microvesiculares, quando estas eram gotículas lipídicas citoplasmáticas pequenas sem deslocarem o núcleo do

hepatócito para a periferia; ou em macrovesiculares, quando haviam inclusões lipídicas citoplasmáticas grandes ou pequenas e que deslocavam o núcleo do hepatócito para a periferia. Subseqüentemente, o número de hepatócitos com inclusão microvesicular ou macrovesicular foi multiplicado por 100 e dividido pelo número de hepatócitos do campo analisado. Estes percentuais foram utilizados para o estadiamento da esteatose microvesicular e macrovesicular em: 0 (< 5% dos hepatócitos com esteatose), 1 (5–33% dos hepatócitos com esteatose), 2 (33–66% dos hepatócitos com esteatose) e 3 (> 66% dos hepatócitos com esteatose). Além disso, foram contabilizados em cada campo analisado os hepatócitos hipertróficos, cuja característica eram apresentar tamanho celular de mais de 1,5 vez o diâmetro normal dos demais hepatócitos do campo analisado. O percentual de hepatócitos hipertróficos foi utilizado para o estadiamento da hipertrofia em: 0 (< 5% dos hepatócitos com hipertrofia), 1 (5–33% dos hepatócitos com hipertrofia), 2 (33–66% dos hepatócitos com hipertrofia) e 3 (> 66% dos hepatócitos com hipertrofia). Para análise da inflamação foram fotografados, com magnificação de 200x, 5 campos aleatórios das duas secções histológicas cuja análise da esteatose e hipertrofia foram analisadas. Os aglomerados de 5 ou mais células inflamatórias foram manualmente contados, e a média dos focos inflamatórios obtidos nos 5 campos analisados por secção foi utilizada para o estadiamento da inflamação em: 0 (< 0,5 foco inflamatório), 1 (0,5–1,0 foco inflamatório), 2 (1,0–2,0 focos inflamatórios), 3 (> 2,0 focos inflamatórios). Por fim, o somatório dos estadiamentos obtidos para esteatose microvesicular, macrovesicular, hipertrofia e inflamação foi realizado para obtenção do estadiamento da DHGNA (Liang et al., 2014).

### 3.10 Análise Estatística

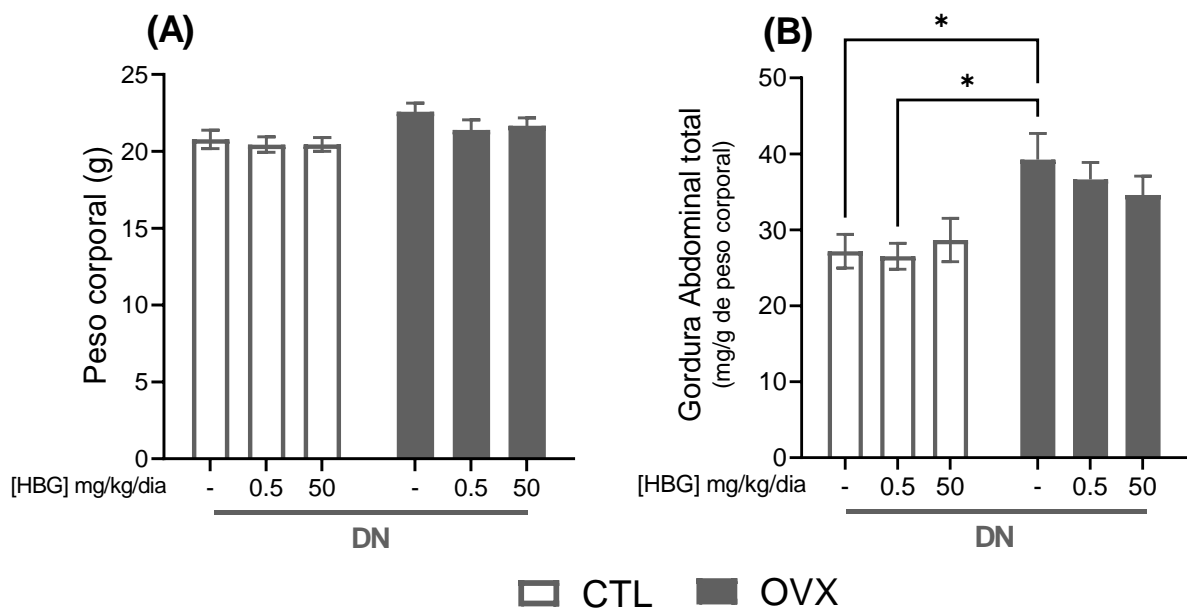
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e como o tratamento dos camundongos fêmeas era composto pelas variáveis independentes: hormonal (devido à privação ou não aos hormônios ovarianos) e HBG (exposição ou não ao herbicida), os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguidas de Tukey utilizando-se o programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Boston, MA, EUA).  $p < 0,05$  foi adotado como critério de significância.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Peso corporal e adiposidade abdominal

Na figura 1 estão representados o peso corporal e o conteúdo total de gordura abdominal obtidos ao final do período experimental de camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG e alimentadas com DN por 2 meses. A análise de variância de 2 vias, reportou efeito da restrição aos hormônios ovarianos sobre o peso corporal ( $p < 0,01$ ; Fig.: 1A) e gordura abdominal total ( $p < 0,0001$ ; Fig.: 1B). Contudo o pós-teste realizado somente reportou aumento do peso da gordura abdominal total das fêmeas OVX em relação às CTL ( $p < 0,05$ ) e CTL0.5 ( $p < 0,03$ ; Fig.: 1B).

**Figura 1** - Média  $\pm$  EPM do peso corporal (A) e do peso da gordura abdominal total (B) obtidos após 2 meses de exposição ou não ao HBG e à alimentação com dieta normolipídica (DN) de fêmeas CTL (n = 9), CTL0.5 (n = 9), CTL50 (n = 11), OVX (n = 7), OVX0.5 (n = 10) e OVX50 (n = 12). Dados analisados por ANOVA de 2 vias seguida de Tukey. \* indica diferença estatística das fêmeas OVX em relação às CTL e CTL0.5 ( $p < 0,05$ ).

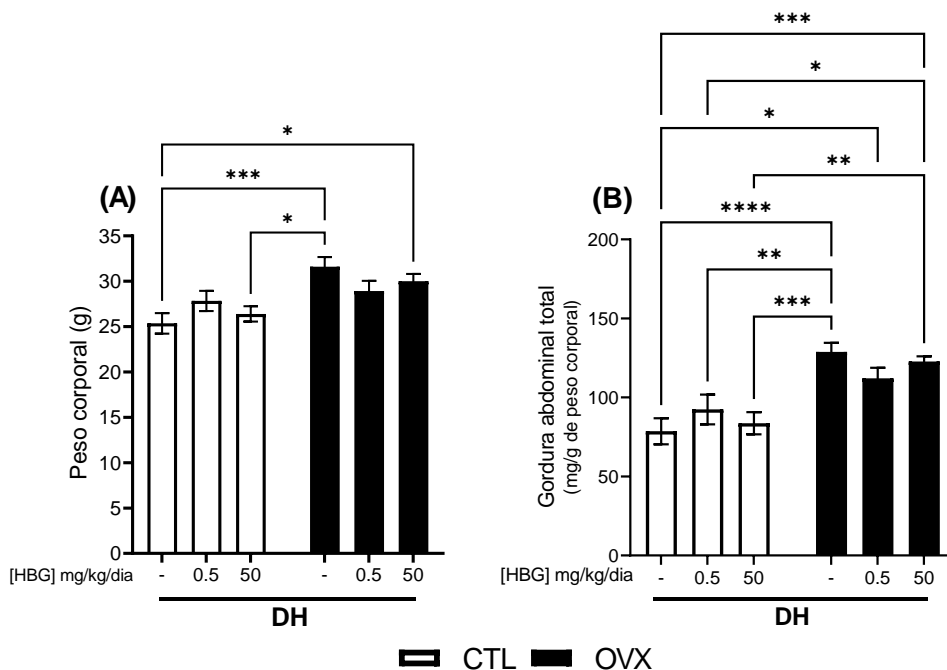


Fonte: O autor.

Na figura 2 podem ser observados o peso corporal final e o peso da gordura abdominal total em camundongos fêmeas CTL e OVX expostas ou não ao HBG por 4

meses e que nos últimos 2 meses do período experimental foram alimentadas com DH. Para ambos os parâmetros de avaliação da obesidade, a análise de variância de 2 vias, reportou somente efeito da restrição aos hormônios ovarianos ( $p < 0,0001$ ), sendo observado que a ingestão de DH resultou em maior peso corporal nas fêmeas OVX e OVX50, quando comparadas às CTL ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ ; Fig.: 2A); e maior adiposidade abdominal nos grupos com restrição hormonal ovariana, OVX, OVX0.5 e OVX50 (Fig.: 2B).

**Figura 2** - Média  $\pm$  EPM do peso corporal (A) e do peso da gordura abdominal total (B) obtidos após 4 meses de exposição ou não ao HBG e à alimentação com dieta hiperlipídica (DH) por 2 meses, em fêmeas CTL ( $n = 11$ ), CTL0.5 ( $n = 12$ ), CTL50 ( $n = 10$ ), OVX ( $n = 15$ ), OVX0.5 ( $n = 13$ ) e OVX50 ( $n = 12$ ). Dados analisados por ANOVA de 2 vias seguida de Tukey. As linhas sobre as barras indicam as diferenças estatísticas entre os grupos, sendo \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



Fonte: O autor.

#### 4.2 Parâmetros bioquímicos plasmáticos e de sensibilidade à insulina

Na Tabela 1 podem ser observados os parâmetros bioquímicos plasmáticos nutricionais e de indicadores de lesão hepática de camundongos fêmeas CTL e OVX, expostas ou não ao HBG, e alimentadas com DN por 2 meses. Somente para a glicemia no estado alimentado a ANOVA de 2 vias reportou efeito hormonal ( $p < 0.05$ ), da exposição ao HBG ( $p < 0.05$ ) e interação entre estes fatores ( $p < 0.01$ ). Contudo, a comparação múltipla demonstrou apenas que fêmeas OVX0.5 apresentaram maior glicemia de alimentado do que as fêmeas CTL ( $p < 0,01$ ) e OVX50 ( $p < 0,01$ ; Tab.: 1). A concentração de lipídeos ou proteínas plasmáticos, ou a atividade das enzimas AST e ALT, bem como o índice de resistência à insulina TyG, não apresentaram modificações pela restrição aos hormônios ovarianos ou pela exposição por 2 meses ao HBG (Tab.: 1).

**Tabela 1** - Parâmetros bioquímicos nutricionais em camundongos fêmeas CTL ou OVX expostas ou não ao HBG por 2 meses e alimentadas com dieta normolipídica (DN).

		CTL DN	CTL0.5 DN	CTL50 DN	OVX DN	OVX0.5 DN	OVX50 DN
<b>Glicemia</b> (mg/dL)	<i>Jejum</i>	87,7 ± 3,4	79,1 ± 3,7	83,1 ± 6,0	101,1 ± 4,4	93,3 ± 6,0	93,7 ± 7,1
	<i>Alimentado</i>	131,7 ± 6,2	152,3 ± 5,1	155,7 ± 5,2	162,8 ± 8	171,3 ± 8,2*	140,4 ± 5,5#
<b>Triglicerídeos</b> (mg/dL)	<i>Jejum</i>	44,4 ± 2,7	39,2 ± 3,5	42,5 ± 2,7	34,9 ± 1,3	41,8 ± 2,1	38,8 ± 3,0
	<i>Alimentado</i>	43,9 ± 3,6	63,8 ± 6,1	57,7 ± 5,7	48,4 ± 3,2	55,5 ± 4,8	50,3 ± 5,5
<b>Colesterol total</b> (mg/dL)	<i>Jejum</i>	100,3 ± 6,2	100,6 ± 7,5	112,7 ± 11,6	94,0 ± 3,1	92,3 ± 3,6	98,1 ± 5,0
	<i>Alimentado</i>	108,0 ± 8,6	106,2 ± 6,3	107,5 ± 5,4	98,4 ± 4,6	108,9 ± 6,6	96,4 ± 4,7
<b>AST</b> (U/mL)	<i>Jejum</i>	27,5 ± 3,4	20,5 ± 4,3	26,5 ± 3,8	36,8 ± 4,6	38,7 ± 5,1	38,1 ± 4,5
<b>ALT</b> (U/mL)	<i>Jejum</i>	15,3 ± 1,2	15,5 ± 1,2	18,3 ± 1,4	19,7 ± 2,7	14,5 ± 1,3	14,0 ± 1,1
<b>Albumina</b> (g/dL)	<i>Jejum</i>	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1

<b>Proteínas totais (g/dL)</b>	<i>Jejum</i>	3,9 ± 0,1	4,0 ± 0,1	4,4 ± 0,2	4,0 ± 0,1	4,1 ± 0,1	3,8 ± 0,1
<b>Índice TyG</b>	<i>Jejum</i>	7,7 ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,8 ± 0,1	7,8 ± 0,1	7,8 ± 0,1

Dados são médias ± EPM e foram analisados por ANOVA de 2 vias seguida de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*indica diferença estatística entre OVX0.5 e CTL; #indica que OVX0.5 é diferente do OVX50. Fonte: O autor.

Os parâmetros bioquímicos plasmáticos em fêmeas expostas ao HBG por 4 meses e que consumiram DH nos últimos 2 meses do período experimental, podem ser observados na Tabela 2. Foi observado somente efeito da restrição dos hormônios ovarianos sobre a glicemia de jejum ( $p < 0,0001$ ) e alimentado ( $p < 0,05$ ). Contudo, na comparação múltipla, foi verificado somente aumento da glicemia de jejum nos grupos OVX e OVX0.5 em relação ao CTL ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ; Tab.: 2). A exposição ao HBG apresentou efeito somente sobre a concentração de triglicerídeos e proteínas totais no jejum ( $p < 0,02$ ), porém pela comparação múltipla foi observado apenas redução na concentração de proteínas totais no grupo CTL50, quando comparado ao CTL ( $p < 0,05$ ; Tab.: 2). Não foram observadas modificações na colesterolemia, albuminemia, atividade plasmática das enzimas AST e ALT, e no índice de resistência à insulina, TyG, entre os grupos CTL e OVX que foram ou não expostos ao HBG por 4 meses e consumiram DH.

**Tabela 2** - Parâmetros bioquímicos nutricionais em fêmeas CTL ou OVX expostas ou não ao HBG por 4 meses e alimentadas com dieta hiperlipídica (DH) nos últimos 2 meses do período experimental.

		CTL DH	CTL0.5 DH	CTL50 DH	OVX DH	OVX0.5 DH	OVX50 DH
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	<i>Jejum</i>	110,3 ± 3,8	107,2 ± 5,2	106,7 ± 8,1	128,0 ± 4,3*	132,5 ± 8,5#	120,4 ± 7,5
	<i>Alimentado</i>	163,1 ± 4,8	172,6 ± 6,5	171,8 ± 9,7	179,1 ± 8,1	190,1 ± 8,3	178,7 ± 4,2
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	<i>Jejum</i>	63,8 ± 6,3	53,5 ± 5,3	52,0 ± 6,3	67,6 ± 7,6	49,4 ± 6,8	44,8 ± 4,8
	<i>Alimentado</i>	53,5 ± 5,9	62,8 ± 5,1	64,8 ± 6,4	67,1 ± 5,9	63,6 ± 7,4	63,2 ± 6,5
	<i>Jejum</i>	100,0 ± 5,9	96,5 ± 8,7	87,1 ± 7,5	104,8 ± 6,5	97,3 ± 3,2	104,7 ± 7,1

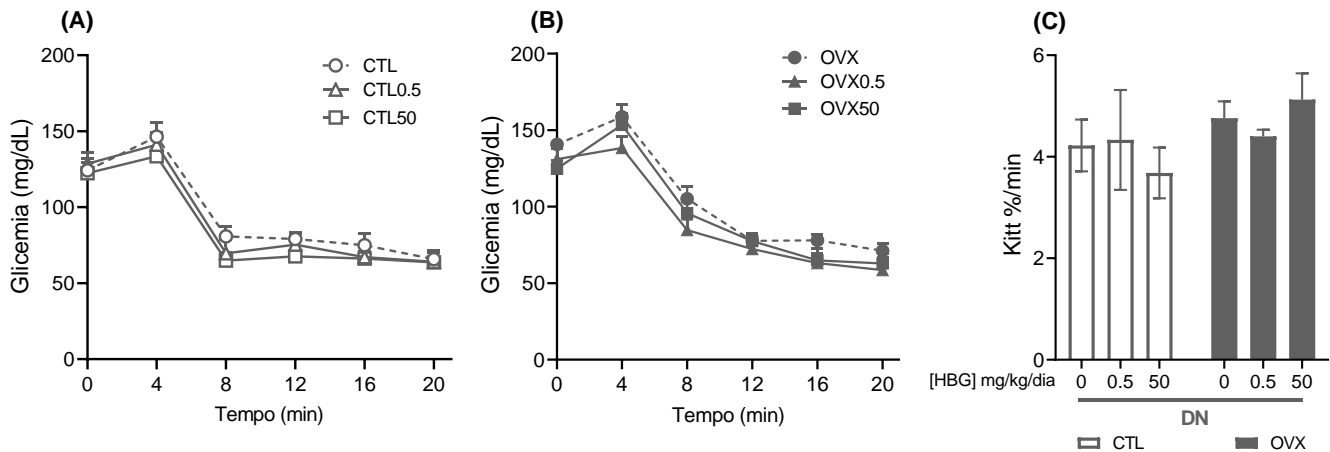


<b>Colesterol total</b> (mg/dL)	<i>Alimentado</i>	130,5 ± 5,8	114,8 ± 10,7	131,3 ± 10,7	133,4 ± 9,3	131,8 ± 3,9	129,7 ± 6,0
<b>AST</b> (U/mL)	<i>Jejum</i>	83,3 ± 9,5	74,7 ± 6,7	70,7 ± 4,9	67,8 ± 3,1	71,6 ± 6,9	61,5 ± 5,1
<b>ALT</b> (U/mL)	<i>Jejum</i>	18,3 ± 2,2	19,8 ± 2,2	19,8 ± 2,1	22,6 ± 2,2	25,3 ± 2,7	20,8 ± 2,3
<b>Albumina</b> (g/dL)	<i>Jejum</i>	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1
<b>Proteínas totais</b> (g/dL)	<i>Jejum</i>	4,6 ± 0,2	4,3 ± 0,2	3,7 ± 0,1 <sup>§</sup>	4,4 ± 0,2	4,4 ± 0,2	4,1 ± 0,2
<b>Índice TyG</b>	<i>Jejum</i>	8,0 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,2	8,2 ± 0,1	7,9 ± 0,2	7,7 ± 0,1

Dados são médias ± EPM e foram analisados por ANOVA de 2 vias seguida de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*indica diferença estatística entre OVX e CTL; #indica que OVX0.5 é diferente do CTL; §indica que OVX50 é diferente do CTL. Fonte: O autor.

Nas Figuras 3A e 3B podem ser observados os valores da glicemia durante o teste de tolerância à insulina de camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG e alimentadas com DN por 2 meses. A glicemia basal não diferiu entre os grupos estudados. Após a administração de insulina, a glicemia apresentou redução a partir dos 8 minutos do teste, não sendo observadas modificações induzidas pela restrição dos hormônios ovarianos ou pela exposição ao HBG nos valores de glicose plasmática entre os grupos estudados (Fig.: 3A e 3B). A constante de decaimento da glicemia, Kitt, também apresentou valores similares entre fêmeas CTL e OVX expostas ou não ao HBG (Fig.: 3C).

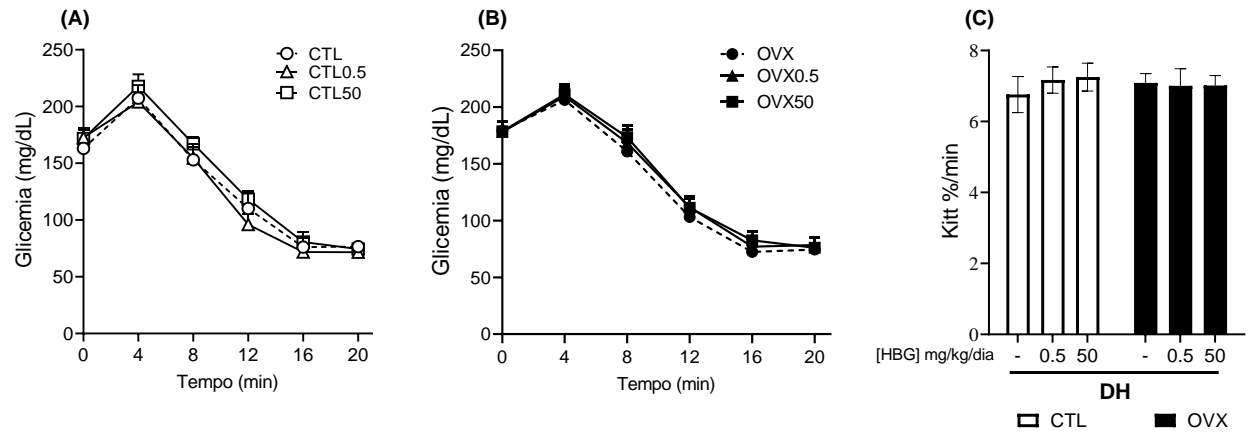
**Figura 3** - Média  $\pm$  EPM da glicemia durante o teste de tolerância à insulina (A e B) e da constante de decaimento da glicemia (C) em camundongos fêmeas CTL (n = 7), CTL0.5 (n = 7), CTL50 (n = 6), OVX (n = 6), OVX0.5 (n = 5) e OVX50 (n = 5) submetidas à 2 meses de exposição ou não ao HBG e à alimentação com dieta normolipídica (DN). Dados analisados por ANOVA de 2 vias seguida do pós-teste Tukey.



Fonte: O autor.

O teste de tolerância à insulina realizado na última semana do período experimental em fêmeas CTL e OVX expostas ou não ao HBG por 4 meses e alimentadas com DH por 2 meses, está representado na Figura 4. Não foram observadas diferenças entre os grupos estudados na concentração plasmática de glicose antes ou após a administração de insulina (Fig.: 4A e 4B), bem como nos valores de Kitt (Fig.: 4C).

**Figura 4** - Média  $\pm$  EPM da glicemia durante o teste de tolerância à insulina (A e B) e da constante de decaimento da glicemia (C) em camundongos fêmeas CTL (n = 7), CTL0.5 (n = 8), CTL50 (n = 9), OVX (n = 10), OVX0.5 (n = 8) e OVX50 (n = 9) submetidas à 4 meses de exposição ou não ao HBG e à alimentação com dieta hiperlipídica (DH) nos 2 últimos meses do período experimental. Dados analisados por ANOVA de 2 vias seguida do pós-teste Tukey.



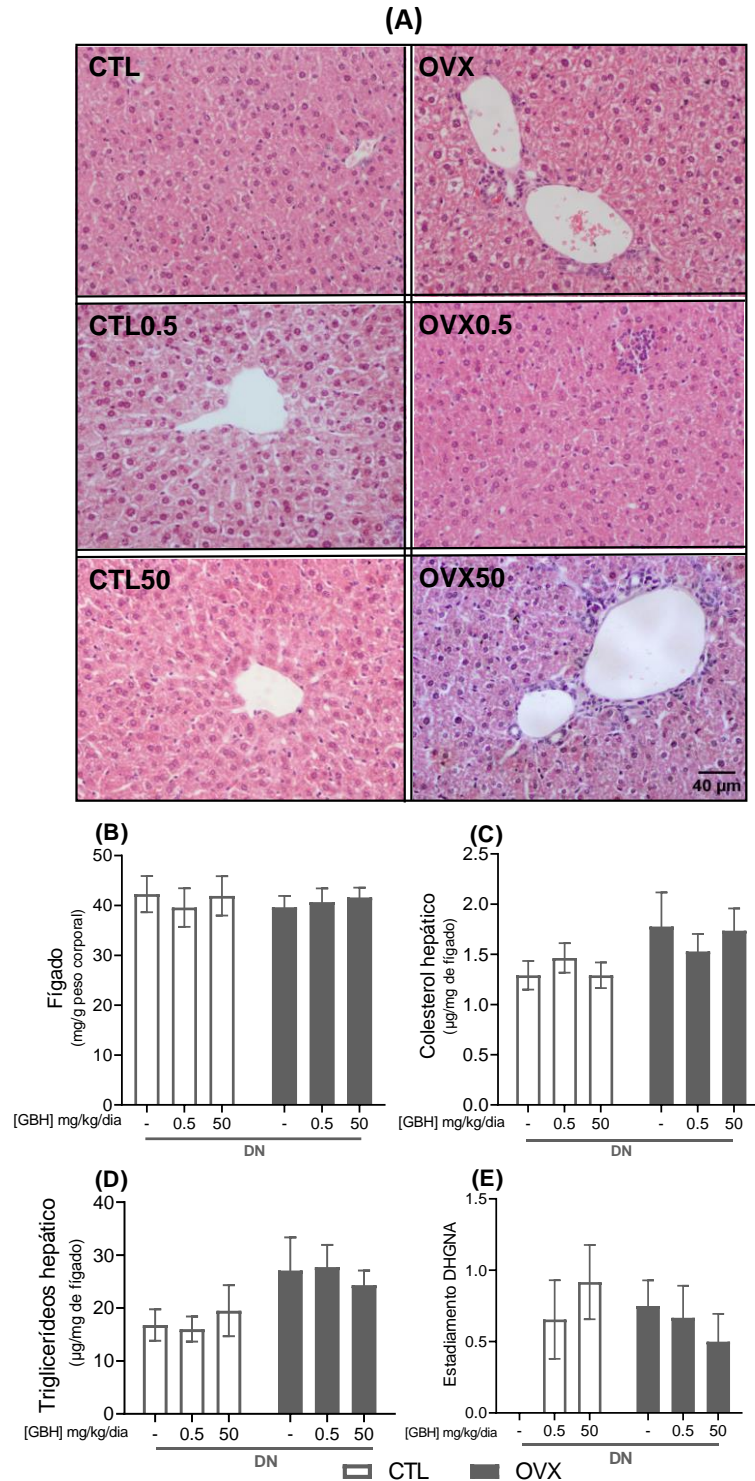
Fonte: O autor.

#### 4.3 Conteúdo de Lipídeos e Histopatologia Hepáticos

A Figura 5 apresenta a avaliação bioquímica e histopatológica da deposição de gordura em camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG e alimentadas com DN por 2 meses. O peso do fígado não foi modificado pela restrição hormonal e/ou exposição ao HBG (Fig.: 5B). Foi observado somente efeito da restrição hormonal sobre o conteúdo de triglicerídeos ( $p < 0,02$ ) e colesterol ( $p < 0,05$ ), contudo na comparação múltipla não foram obtidas diferenças estatísticas entre os grupos CTL e OVX (Fig.: 5B e 5C). Ao nível microscópico, foi observado nas secções histológicas de todos os grupos experimentais que os hepatócitos estavam distribuídos em linhas e apresentando núcleo central. Com relação às características histopatológicas da DHGNA, foram observados escassos hepatócitos com inclusões macrovesiculares ou que estavam hipertróficos, ou focos de infiltrados inflamatórios, assim, o estadiamento para estas características patológicas da doença foi zero para todos os grupos. Apesar de não ter sido observada diferença estatística é importante ressaltar que no grupo OVX, 75% das secções histológicas do fígado tinham hepatócitos com

inclusões lipídicas do tipo esteatose microvesicular com estadiamento 1 ou leve (Fig.: 5A) e 25% apresentaram estadiamento 0, o que resultou em estadiamento para esteatose microvesicular de  $0,75 \pm 0,18$ , sendo os mesmos valores obtidos para o estadiamento da DHGNA (Fig.: 5E). Nos grupos expostos ao HBG, independente da restrição aos hormônios ovarianos, o percentual de secções com hepatócitos contendo ou não inclusões microvesiculares também apresentou variação (CTL0.5 estadiamento 0 = 54%, 1 = 9% e 2 = 36%; CTL50 estadiamento 0 = 43%, 1 = 41% e 2 = 16%; OVX0.5 estadiamento 0 = 50% e 1 = 50%; e OVX50 estadiamento 0 = 59%, 1 = 33% e 2 = 8%), o que contribuiu para o estadiamento da DHGNA (Fig.: 5E).

**Figura 5** - (A) Imagens representativas de secções histológicas do fígado de camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG e alimentadas com DN por 2 meses. Coloração: HE. Barra de escala = 40  $\mu$ m. Média  $\pm$  EPM do peso do fígado (B), da concentração hepática de colesterol (C) e de triglicerídeos (D), e do estadiamento da DHGNA (E) de camundongos fêmeas CTL (n = 3-7), CTL0.5 (n = 6-8), CTL50 (n = 6-11), OVX (n = 6), OVX0.5 (n = 6-9) e OVX50 (n = 6-11). Dados analisados por ANOVA de 2 vias seguida do pós-teste Tukey.

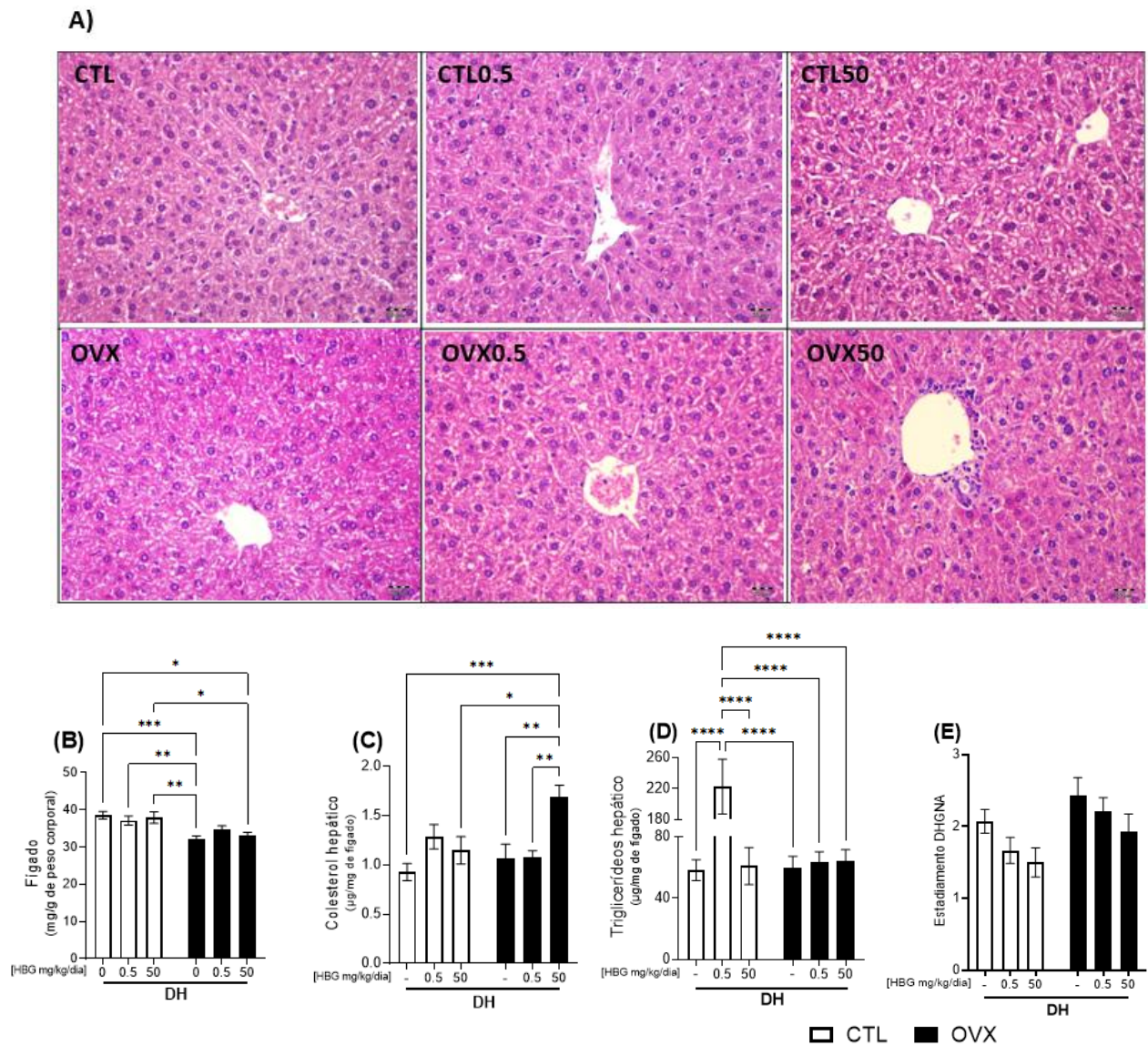


Fonte: O autor.

A avaliação bioquímica e histopatológica da deposição de gordura em camundongos fêmeas expostas ou não ao HBG por 4 meses, e alimentadas com DH nos últimos 2 meses do período experimental, pode ser visualizada na Figura 6. Fêmeas submetidas à restrição dos hormônios ovarianos apresentaram menor peso do fígado, comparadas às fêmeas CTL ( $p < 0.0001$ ; Fig.: 6B). A ANOVA de duas vias identificou apenas efeito da exposição ao HBG ( $p < 0,005$ ) e interação ( $p < 0,02$ ) sobre o conteúdo de colesterol hepático, sendo observado aumento nas fêmeas OVX50, em relação aos demais grupos OVX e aos CTLs (Fig.: 6C). Com relação ao conteúdo hepático de triglicérides foi observado efeito hormonal ( $p < 0,0001$ ), da exposição ao HBG ( $p < 0,0001$ ) e interação entre os fatores ( $p < 0,01$ ), sendo observado aumento de triglicérides hepático nas fêmeas CTL0.5, em relação aos demais grupos CTL e aos submetidos à restrição dos hormônios ovarianos (Fig.: 6D).

A análise histopatológica evidenciou escassos hepatócitos com inclusões macrovesiculares ou que estavam hipertróficos, ou focos de infiltrados inflamatórios, assim, o estadiamento para estas características patológicas da doença foi aproximadamente zero para todos os grupos. A ANOVA indicou efeito da restrição aos hormônios ovarianos ( $p < 0,05$ ) e da exposição ( $p < 0,02$ ) sobre o estadiamento da DHGNA, contudo não foram obtidas diferenças estatísticas entre os grupos na comparação múltipla (Fig.: 6 E).

**Figura 6** - (A) Imagens representativas de seções histológicas do fígado de camundongos fêmeas submetidas à 4 meses de exposição ou não ao HBG e à alimentação com dieta hiperlipídica (DH) nos 2 últimos meses do período experimental. Coloração: HE. Barra de escala = 40  $\mu$ m. Média  $\pm$  EPM do peso do fígado (B), da concentração hepática de colesterol (C) e de triglicerídeos (D) e do estadiamento da DHGNA (E) de camundongos fêmeas CTL (n = 7), CTL0.5 (n = 9), CTL50 (n = 7), OVX (n = 7), OVX0.5 (n = 7) e OVX50 (n = 7). Dados analisados por ANOVA de 2 vias seguida do pós-teste Tukey.



Fonte: O autor.

## 5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo demonstramos que quando houve restrição de hormônios ovarianos em camundongos fêmeas, os animais apresentaram um aumento da gordura abdominal total quando alimentados com DN, por dois meses. Esta diminuição dos níveis hormonais, permite a ocorrência de alterações metabólicas, regulação do metabolismo de lipídios, açúcares, e sua falta pode afetar negativamente o metabolismo energético, corroborando com estudos, que demonstram que a baixa taxa hormonal deste período predispõe ao ganho de peso e aumento da adiposidade, direcionando à perda de massa magra e o aumento da distribuição de gordura corporal, caracterizado pela diminuição da lipase lipoproteica, direcionando o acúmulo de tecido adiposo em depósitos centrais (Gold, 2011, Blümel et al., 2014 e Meirelles, 2014).

Contudo, nos animais submetidos a DH, descrito anteriormente (LI J et al., 2020), observou por meio de um modelo experimental, o aumento de adiposidade em 4 linhagens de camundongos, sendo uma delas a mesma utilizada nesta pesquisa, quando submetidos a uma dieta rica em gordura apresentam perfil lipídico, nível de glicose e principais citocinas inflamatórias alterados. Assim nosso estudo identificou que para ambos os parâmetros de avaliação da obesidade em animais tratados com DH por 2 meses, houve um efeito da restrição aos hormônios ovarianos, destacando um aumento do peso corporal total e uma maior adiposidade abdominal. No estudo de Leeners *et al.*, 2017, mostra um importante papel dos hormônios ovarianos, mais especificamente estrógenos, nas causas da obesidade em mulheres e a relação da adiposidade. A diminuição do estrogênio após a menopausa aumenta os estoques de tecido adiposo visceral e diminuem os percentuais de massa magra corporal, ainda que não dimensionado seu efeito. Outros dois autores (Kanaley et al., 2001; Franklin et al., 2009) demonstraram em seus estudos por meio de ressonâncias magnéticas feitas em mulheres americanas, tanto o tecido adiposo abdominal quanto o visceral aumentou no período caracterizado pela diminuição dos hormônios ovarianos, tendo como destaque um aumento visceral de depósito de gordura. Além, de outros estudos que se utilizaram do método de absorciometria de raios X de dupla energia (DEXA) para detectar regiões específicas com acúmulo de gordura e densidade mineral óssea, que tem o propósito de diferenciar depósitos de gordura



subcutânea e intra- abdominal (Kaul et al .,2012), que por sua vez identificou novamente uma relação entre o período de diminuição da taxa hormonal ovariana como aumento do depósito visceral de gordura (Svendsen et al .,1995; Trémollières et al .,1996; Gambacciani et al .,1999; Lovejoy et al .,2008).

O tecido adiposo, além de servir como reserva energética, produz uma variedade de citocinas inflamatórias, como é o caso da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Guzik et al., 2006). Com a diminuição da taxa hormonal, o excesso de peso pode ser determinante quanto ao evento e resistência à insulina, além de contribuir para o aumento da leptina e da resistina, bem como redução da adiponectina e da grelina, contribuindo para o aumento de riscos cardiovasculares (Chu et al., 2006). Deste modo, identificamos que o parâmetro bioquímico da glicemia dos animais no estado alimentado, submetidos a DN por 2 meses, foi maior no que diz respeito a privação hormonal quando comparados com animais CTL, apontado em outras pesquisas onde na transição da fase reprodutiva, onde há a privação hormonal, a mulher apresenta aumento do risco para ocorrência de DCNTs, em especial as relacionadas à prejuízos no metabolismo da glicose e de lipídeos (Chen; Madak-Erdogan, 2018; Distefano, 2020; Sloprien et al., 2018; Suzuki; Abdelmalek, 2009). As modificações no metabolismo intermediário observadas em mulheres na pós-menopausa em relação as que estão na pré-menopausa ou em idade reprodutiva, são observadas em mulheres com restrição de hormônios ovarianos (MATSUO et al., 2016; WAKATSUKI; SAGARA, 1995) e adequadamente reproduzidas em roedores fêmeas submetidas a ovariectomia bilateral, assim como o modelo experimental usado em nosso estudo. ROGERS *et al.* (2009) também relatou em seu estudo que o aumento da adiposidade e ganho de peso em fêmeas *C57Bl/6J* que foram ovariectomizadas ocorreu sem alteração na ingestão alimentar. Dentre essas alterações metabólicas supracitadas, outras pesquisas destacam que a pós-menopausa aumenta a lipogênese hepática e esteatose (De Oliveira et al., 2016; Gutierrez-Grobe et al., 2010; Liao et al., 2015; Pallier; Aubert; Lemonnier, 1980; Ryu et al., 2015).

Com relação a prejuízos na homeostase da glicose em ratas que consumiram por 2 meses DH, foi identificado um aumento na glicemia de jejum nas fêmeas OVX e OVX0,5 como esperado (Yonezawa et al., 2012; Pae et al., 2018), porém não foi observado alterações na colesterolemia, albuminemia, atividade plasmática das

enzimas AST e ALT, e no TyG, o que difere do estudo feito com a exposição de ratos Wistar ao HBG nas concentrações de 4,87, 48,7 ou 487 mg/kg a cada 2 dias, durante 75 dias, onde demonstrou que o uso prolongado destas doses de glifosato aumentaram liberação das enzimas hepáticas AST e ALT no soro destes animais, o que indicou um quadro de lesão hepática irreversível (Benedetti et al., 2004). Efeitos semelhantes foram evidenciados em doses de 269,9 mg/kg e 134,95 mg/kg de HBG a cada 2 dias, durante 2 semanas, o tratamento dos animais induziu o extravasamento das enzimas intracelulares hepáticas ALT e AST (El-Shenawy, 2009). Sugerimos que essa alteração não foi identificada em nossa pesquisa pela dose empregada de HBG.

Quanto aos valores da glicemia durante o teste de tolerância a insulina dos animais expostos ou não ao HBG submetidos tanto a DN e DH, evidenciou que os valores da concentração plasmática de glicose antes ou após a administração da insulina não apresentou diferenças entre os grupos estudados, divergindo como por exemplo em uma pesquisa que identificou que quando, ratos machos albinos Wistar receberam durante 16 semanas 50 mg, 100 mg e 250 mg/kg peso de GP via oral, foi observado um impacto no desenvolvimento da resistência à insulina, onde após a administração da insulina via oral, o maior aumento no nível sérico de insulina foi observado após 30 minutos e persistiu alto por mais de uma hora, demonstrando alterações na função da insulina (Prasad et al., 2022). Outros resultados de pesquisas recentes *in vivo* mostraram que a exposição ao GP causou hiperglicemia, dislipidemia, aumento da hemoglobina glicada (HbA1c), função hepática, perfil da função renal e marcadores de estresse oxidativo de forma dose-dependente, além da hemoglobina e as enzimas antioxidantes foram significativamente reduzidas em animais induzidos com GP, indicando que sua toxicidade está ligada à indução de resistência à insulina. (Jayaraman et al; 2023)

As alterações fisiológicas desencadeadas pela privação hormonal ovariana, tornam as mulheres mais favoráveis a alterações no metabolismo energético induzindo, por exemplo, aumento do armazenamento de lipídeos nos hepatócitos no fígado (Pedram et al., 2013 e Della Torre et al., 2016). Quando essas alterações são associadas à alimentação hiperlipídica e hipercalórica, pode acelerar a deposição ectópica de gordura, gerando maior risco para desenvolver DCNTs, como a DHGNA (Almeida et al., 2008; Martins et al., 2013; Chung et al., 2015; Chen, 2018). Em nosso estudo, não foi observado com relação ao conteúdo de lipídeos hepáticos, para os animais com ou sem restrição hormonal ovariana, que receberam DN por dois meses

e foram expostos ou não ao HBG, um aumento do peso do fígado, nem sobre o conteúdo de triglicerídeos e colesterol hepáticos. Já nos animais expostos ou não ao HBG por 4 meses e alimentados com DH por 2 meses, apresentaram menor peso do fígado quando submetidos a restrição hormonal ovariana, este resultado difere do encontrado por Pandey e colaboradores (2019), onde a tendência do peso do fígado foi em aumentar de maneira dose-dependente (0, 5, 10, 25, 50, 100 e 250 mg/kg de peso corporal de GP). Foi observado também o efeito da exposição ao HBG e interação entre os grupos, sobre o conteúdo de colesterol hepático, por sua vez aumentado em camundongos fêmeas OVX expostos a dose máxima considerada neste estudo de 50 mg/kg de HBG, além de ser observado o efeito hormonal, da exposição ao HBG e interação entre eles o conteúdo de triglicerídeos hepático aumentado nas fêmeas CTL0,5 em relação aos demais grupos experimentais, esses resultados são próximos aos descritos previamente por Sock et al. (2013), os quais relataram que ratas Sprague-Dawley OVX submetidas à HFD, por 6 semanas, quando comparadas às fêmeas OVX, que receberam dieta normolipídica, apresentaram maior acúmulo de TG e colesterol no fígado. Nesse estudo, a esteatose hepática foi associada à redução da expressão hepática de genes que participam da oxidação de lipídeos, como aCPT-1 e o Co-ativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo.

A cada nova pesquisa realizada envolvendo agentes químicos naturais ou sintéticos, denominados DE, que atuam no ambiente e/ou alimentos, e entram em contato com os indivíduos, podem ser potenciais agentes obesogênicos que aumentam a vulnerabilidade ao ganho de peso, depósito de lipídios e metabolismo energético deficiente, porém efeitos orgânicos da exposição em humanos dos herbicidas contendo GP são mais difíceis de serem demonstrados, mas a ciência vem avançando neste aspecto e há evidências de que o GP e seus metabólitos estão presentes em crianças e adultos de regiões urbanas sendo detectado no sangue e urina (Aris; Leblanc, 2011; Fagan et al., 2020; Gillezeau et al., 2019); e que o GP contribui para processos que rompem a homeostase e agravam as DCNTs. Por exemplo, Leino *et al.* (2021) por bioinformática analisou e classificou a enzima EPSPS, e os resultados demonstraram que 54% das espécies de bactérias que compõem o microbioma intestinal de humanos são sensíveis ao GP. Entre pacientes com esteatohepatite não alcoólica, o agravamento da fibrose hepática foi observado em pacientes que tinham maior excreção urinária de GP, seu metabólito primário ácido

aminometilfosfônico (AMPA) e outros resíduos dos herbicidas que contêm GP (Mills; Caussy; Loomba, 2020).

A histologia do fígado apresentou para os grupos alimentados com DN e expostos ou não ao HBG, condições e características que pouco representavam o estadiamento que caracteriza a DHGNA, no entanto 75% das seções histológicas do grupo OVX apresentavam inclusão do tipo microvesicular que pode ser correlacionada com insuficiência hepática devido a graves defeitos de b-oxidação mitocondrial causados pela exposição a toxinas (Fromenty et al.,1997; Galli et al.,1978), enquanto que frequentemente, a esteatose macrovesicular está relacionada à progressão para fibrose ou cirrose do fígado, o que não foi identificado de maneira significativa nos grupos com privação hormonal ovariana expostos ou não ao HBG, tratados com DN e DH, foram escassas as evidências histopatológicas que caracterizam o estadiamento para a DHGNA, mas há estudos que mostram evidências da exposição do HBG pode alterar a histologia do tecido hepático onde apresenta inclusões micro e macrovesículas em doses maiores de 100 e 250 mg/kg de peso corporal/d de HBG caracterizando uma esteatose hepática (Pandey et al.,2019). Quando agravada a esteatose hepática e enfim instalada a condição de DHGNA a função hepática diminui, tornando-se uma grande preocupação (Perumpail et al.,2017; Allen et al., 2018). Estudos de alterações metabólicas e alterações das proteínas encontraram sinais da disfunção do fígado além da deposição de gordura hepática em adultos (Ford et al., 2017) e em ratas grávidas (Bonvallot et al., 2018). Outros pesquisadores também identificaram o desenvolvimento de esteatose hepática em ratas com exposição prolongada ao HBG (Mesnage et al., 2017).

Apesar de diversos estudos utilizando roedores demonstrarem que a exposição aos herbicidas que contêm glifosato, tanto na vida intrauterina, pós-natal ou na idade adulta, podem acarretar prejuízos morfofuncionais aos sistemas reguladores e executores que garantem a homeostase orgânica, o que direcionariam à manifestação e progressão de DCNTs (De Souza et al., 2017; Ingaramo et al., 2019; Kubsad et al., 2019; Mesnage et al., 2015, 2017; Pandey; Rudraiah, 2015; Romano et al., 2012), porém em nosso estudo não foi identificado nenhuma alteração morfofuncional no fígado de forma significativa com relação as doses de HBG administradas durante o tratamento.

## 6 CONCLUSÃO

Nosso estudo não constatou influência da exposição ao HBG para o desenvolvimento de DHGNA em camundongos fêmeas, em idade reprodutiva, alimentadas com dieta normolipídica. Da mesma forma, a pesquisa não evidenciou que a exposição ao HBG agrave o desenvolvimento de DHGNA induzida por dieta hiperlipídica.

Em nosso trabalho não verificamos efeito da exposição ao HBG sobre sensibilidade à insulina e de lesão hepática quando camundongos fêmeas estão sob regime normolipídico ou hiperlipídico. Porém, em relação aos parâmetros bioquímicos nutricionais evidenciamos aumento da glicemia no estado alimentado em animais ovariectomizados de um grupo exposto ao HBG, tanto em dieta normal quanto hiperlipídica, condição que gera um alerta para mais estudos e análises sobre a causalidade e possível surgimento de uma DCNT.

A dieta hiperlipídica associada com a privação de hormônios ovarianos induzida pela ovariectomia ocasionou a diminuição de massa do tecido hepático, com aumento de deposição de colesterol no grupo exposto a maior dose de HBG, mas sem alteração histomorfológica em ambas as situações expostas os animais.

Os efeitos da exposição ao HBG não foram relacionados aos hormônios ovarianos. Este trabalho corrobora com algumas pesquisas e com outras não, assim, expõe a necessidade de novos estudos com o glifosato para buscar esclarecer melhor o quanto este herbicida pode afetar a saúde humana. A não observação de alterações desencadeadas pelo HBG não descarta a influência do glifosato no desenvolvimento da DHGNA e de DCNTs.

Nossos dados abrem caminhos de que a atuação do HBG sobre o metabolismo seja ainda mais ampla e interfira em outros mecanismos ainda não esclarecidos pela literatura, e que possam estar contribuindo para a fisiopatologia de outras DCNTs além da DHGNA. Considerando que estas e outras pesquisas sirvam como alerta para que as agências regulatórias revejam os riscos e níveis de exposição do emprego e utilização deste produto químico.

## REFERÊNCIAS

- ABESO - **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. – 4.ed.** - São Paulo, SP. Disponível em <https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2019/12/Diretrizes-Download-Diretrizes-Brasileiras-de-Obesidade-2016.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2023.
- AHMADI, M. N.; INAN-EROGLU, E.; MISHRA, G. D.; SALIS, A.; STAMATAKIS, E. Associations of changes in physical activity and diet with incident obesity and changes in adiposity: Longitudinal findings from the UK Biobank. **Preventive Medicine**, v. 168, p. 107435, 2023.
- ALLEN, A. M.; THERNEAU, T. M.; LARSON, J. J.; COWARD, A.; SOMERS, V. K.; KAMATH, P. S. Nonalcoholic fatty liver disease incidence and impact on metabolic burden and death: A 20 year-community study. **Hepatology**, v. 67, n. 5, 1726-1736, 2018.
- ANVISA. **Nota técnica No 23/2018/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA.** Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/agrotoxicos/notas-tecnicas/nota-tecnica-23-de-2018-glifosato.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2023.
- ARIS, A.; LEBLANC, S. Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 4, p. 528–533, 2011.
- ARNAL, J. F. *et al.* Membrane and nuclear estrogen receptor alpha actions: From tissue specificity to medical implications. **Physiological Reviews**, v. 97, p. 1045–1087, 2017.
- BASHIR, A.; DUSEJA, A.; DE, A.; MEHTA, M.; TIWARI, P.. Non-alcoholic fatty liver disease development: A multifactorial pathogenic phenomena. **Liver Research**, v. 6, p. 72–83, 2022.
- BEGRICHE, K.; MASSART, J.; ROBIN, M. A.; BONNET, F.; FROMENTY, B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 58, n. 4, p. 1197–1521, 2013.
- BENEDETTI, A. L.; VITURI, C. L.; TRENTIN, A. G.; DOMINGUES, M. C.; SILVA, M. A. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb®. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 2, p. 227-232, 2004.
- BENTLEY, R. The Shikimate Pathway - A Metabolic Tree with Many Branches. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 5, p. 307–384, 1990.
- BESSONE, F.; RAZORI, M. V.; ROMA, M. G. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. **Cell Mol Life Sci**, v. 76, p. 99–128, 2019.
- BONORA, E. *et al.* Estimates of In Vivo Insulin Action in Man: Comparison of Insulin Tolerance Tests with Euglycemic and Hyperglycemic Glucose Clamp Studies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 68, n. 2, p. 374–378, 1989.
- BONVALLOT N.; CANLET C.; BLAS-Y-ESTRADA, F.; GAUTIER, R.; TREMBLAY-FRANCO, M.; CHEVOLLEAU, S.; CORDIER, S.; CRAVEDI, J. P. Metabolome

disruption of pregnant rats and their offspring resulting from repeated exposure to a pesticide mixture representative of environmental contamination in Brittany. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. e0198448, 2018.

BRASIL. **LEI No 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989**. Disponível em:

[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l7802.htm#:~:text=Fica%20proibido%20o%20fracionamento%20ou,nos%20estabelecimentos%20produtores%20dos%20mesmos](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm#:~:text=Fica%20proibido%20o%20fracionamento%20ou,nos%20estabelecimentos%20produtores%20dos%20mesmos). Acesso em: 06 dez. 2023.

BROVINI, E. M.; DEUS, B. C. T.; VILAS-BOAS, J. A.; QUADRA, R. G.; CARVALHO, L.; MENDONÇA, R. F.; PEREIRA, R. O.; CARDOSO, S. J. Three-best-selling pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of the Total Environment**, v. 771, p. 144754, 2021.

BRUCHEZ, A. **Glifosato Ambiental e Obesidade Nas Populações**. 2022. Tese (Doutorado em Agronegócios) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022.

BUITRAGO, S.; MARTIN, T. E.; TETENS-WOODRING, J.; BELICHAVILLANUEVA, A.; WILDING, G. E. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 11-1, 2008.

CAMPOREZ, J. P. G. *et al.* Cellular Mechanism by Which Estradiol Protects Female Ovariectomized Mice From High-Fat Diet Induced Hepatic and Muscle Insulin Resistance. **Endocrinology**, v. 154, p. 1021–1028, 2013.

CANO, R. *et al.* Role of Endocrine-Disrupting Chemicals in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: **A Comprehensive Review**. *Int J Mol Sci*, v. 22, n. 9, p. 4807, 2021.

CHANG, C. J.; WU, C. H.; YAO, W. J.; YANG, Y. C.; WU, J. S.; LU, F. H. Relationships of age, menopause and central obesity on cardiovascular disease risk factors in Chinese women. **International Journal of Obesity**, v. 24, p. 1699–1704, 2000.

CHU, M. C.; Cosper, P.; Orio, F.; Carmina, E.; Lobo, R. A. Insulin resistance in postmenopausal women with metabolic syndrome and the measurements of adiponectin, leptin, resistin, and ghrelin. **Am J Obstet Gynecol.**, v.194, p.100-104, 2006.

CONTOS, M. J.; CHOUDHURY, J.; MILLS, A. S.; SANYAL, A. J. The histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. **Clin Liver Dis**, v. 8, n. 3, p. 481–500, 2004.

DE OLIVEIRA, M. C.; GILGLIONI, E. H.; DE BOER, B. A.; RUNGE, J. H.; DE WAART, D. R.; SALGUEIRO, C. L.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; OUDE ELFERINK, R. P. J.; GAEMERS, I. C. Bile acid receptor agonists INT747 and INT777 decrease oestrogen deficiency-related postmenopausal obesity and hepatic steatosis in mice. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 11, p. 2054–2062, 2016.

DE SOUZA, J. S. *et al.* Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. **Toxicology**, v. 377, p. 25–37, 2017.

- DING, F.; YAO, J.; ZHAO, L.; MAO, Z.; CHEN, S.; BRINTON, R. D. Ovariectomy Induces a Shift in Fuel Availability and Metabolism in the Hippocampus of the Female Transgenic Model of Familial Alzheimer's. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59825, 2013.
- DUARTE, J. A. G.; CARVALHO, F.; PEARSON, M.; HORTON, J. D.; BROWNING, J. D.; JONES, J. G.; BURGESS, S. C. A high-fat diet suppresses de novo lipogenesis and desaturation but not elongation and triglyceride synthesis in mice. **J Lipid Res**, v. 55, n. 12, p. 2541–2553, 2014.
- EL-SHENAWY, N. S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 28, n. 3, p. 379-85, 2009.
- ESFA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. **EFSA Journal**, v. 13, n. 11, p. 4302, 2015.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497, 1957.
- FORD, B.; BATEMAN, L. A.; GUTIERREZ-PALOMINOS, L.; PARK, R.; NOMURA, D. K. Mapping Proteome-wide Targets of Glyphosate in Mice. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 2, p. 133-140, 2017.
- FRANKLIN, R. M.; PLOUTZ-SNYDER, L.; KANALEY, J. A. Longitudinal changes in abdominal fat distribution with menopause. **Metabolism**, v. 58, n. 3, p. 311-315, 2009.
- FROMENTY, B., BERSON, A., PESSAYRE, D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. **J Hepatol.**, v. 26, p. 13-22, 1997.
- GALLI SJ, WEINTRAUB HP, PROPPE KH. Malignant fibrous histiocytoma and pleomorphic sarcoma in association with medullary bone infarcts. **Cancer**, v. 41, n. 2, p. 607-619, 1978.
- GAMBACCIANI M, CIAPONI M, CAPPAGLI B, BENUSSI C, DE SIMONE L, GENAZZANI AR. Climacteric modifications in body weight and fat tissue distribution. **Climacteric**, v. 2, n.1, p.37-44, 1999.
- GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M. C.; SÉRALINI, G. E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, p. 184–191, 2009.
- GUTIERREZ-GROBE, Y.; PONCIANO-RODRÍGUEZ, G.; RAMOS, M. H.; URIBE, M.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease inpremenopausal, posmenopausal and polycystic ovary syndrome women. The role of estrogens. **Annals of Hepatology**, v. 9, n. 4, p. 402–409, 2010.
- GUZIK, T. J.; Mangalat, D.; Korbut, R. Adipocytokines – novel link between inflammation and vascular function? **J Physiol Pharmacol.**, v. 57, p. 505-528, 2006.
- HARB, A. A.; SHECHTER, A.; KOCH, P. A.; ST-ONGE, M. P. Ultra-processed foods and the development of obesity in adults. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 619–627, 2023.



INGARAMO, P. I.; GUERRERO-SCHIMPF, M.; MILESI, M. M.; LUQUE, E. H.; VARAYOUD, J. Acute uterine effects and long-term reproductive alterations in postnatally exposed female rats to a mixture of commercial formulations of endosulfan and glyphosate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110832, 2019.

JAYARAMAN; S. *et al.* Glyphosate potentiates insulin resistance in skeletal muscle through the modulation of IRS-1/PI3K/Akt mediated mechanisms: An in vivo and in silico analysis. **Int J Biol Macromol.**, v. 242, p. 124917, 2023.

Blümel, J. E.; Lavín, P.; Vallejo, M. S.; Sarrá, S. Menopausa ou climatério, apenas uma discussão semântica ou tem implicações clínicas? **Climatério**, v. 17, n. 3, 235-241, 2014.

JIANG, F.; PENG, Y.; SUN, Q. Pesticides exposure induced obesity and its associated diseases: recent progress and challenges. **Journal of Future Foods**, v. 2, n. 2, p. 119–124, 2022.

KANALEY, J. A.; SAMES, C.; SWISHER, L.; SWICK, A. G.; PLOUTZ-SNYDER, L. L.; STEPPAN, C. M.; SAGENDORF, K. S.; FEIGLIN, D.; JAYNES, E. B.; MEYER, R. A.; WEINSTOCK, R. S. Abdominal fat distribution in pre- and postmenopausal women: The impact of physical activity, age, and menopausal status. **Metabolism**, v. 50, n. 8, 976-82, 2001.

KAUL, S.; ROTHNEY, M. P.; PETERS, D. M.; WACKER, W. K.; DAVIS, C. E.; SHAPIRO, M. D.; ERGUN, D. L. Dual-energy X-ray absorptiometry for quantification of visceral fat. **Obesity**, v. 20, n. 6, p. 1313-1318, 2012.

KIVIMÄKI, M. *et al.* Body-mass index and risk of obesity-related complex multimorbidity: an observational multicohort study. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 10, n. 4, p. 253–263, 2022.

KUBSAD, D.; NILSSON, E. E.; KING, S. E.; SADLER-RIGGLEMAN, I.; BECK, D.; SKINNER, M. K. Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations: Generational Toxicology. **Scientific Reports**, v. 9, p. 6372, 2019.

LA MERRILL, M. A. *et al.* Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, p. 45–57, 2020.

LEENERS, B.; GEARY, N.; TOBLER, P. N.; ASARIAN, L. Ovarian hormones and obesity. **Hum Reprod Update**, v. 23, n. 3, p. 300-321, 2017.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LEINO, L.; TALL, T.; HELANDER, M.; SALONIEMI, I.; SAIKKONEN, K.; RUUSKANEN, S.; PUIGBÒ, P. Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. **Journal of Hazardous Materials**, v. 408, p. 124556, 2021.

LI, J.; WU, H.; LIU, Y.; YANG, L. High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. **Exp Anim.**, v. 69, n. 3, p. 326-335, 2020.

- LIAN, C. Y.; WEI, S.; LI, Z. F.; ZHANG, S. H.; WANG, Z. Y.; WANG, L. Glyphosate-induced autophagy inhibition results in hepatic steatosis via mediating epigenetic reprogramming of PPAR $\alpha$  in roosters. **Environmental Pollution**, v. 324, n. 1, p. 121394, 2023.
- LIANG, W.; Menke, A. L.; Driessen, A.; Koek, G. H.; Lindeman, J. H.; Stoop, R.; Havekes, L. M.; Kleemann, R.; Van Den Hoek, A. M. Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e115922, 2014.
- LIAO, C. C.; CHIU, Y. S.; CHIU, W. C.; TUNG, Y. T.; CHUANG, H. L.; WU, J. H.; HUANG, C. C. Proteomics analysis to identify and characterize the molecular signatures of hepatic steatosis in ovariectomized rats as a model of postmenopausal status. **Nutrients**, v. 7, n. 10, p. 8752–8766, 2015.
- LONARDO, A.; NASCIMBENI, F.; MAURANTONIO, M.; MARRAZZO, A.; RINALDI, L.; ADINOLFI, L. E. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. **World J Gastroenterol**, v. 23, n. 36, p. 6571–6592, 2017.
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1. ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.
- LOVEJOY, J. C.; CHAMPAGNE, C. M.; DE JONGE, L.; XIE, H.; SMITH, S. R. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. **Int J Obes**, v. 32, n. 6, p. 949-58, 2008.
- MEIRELLES, R. M. R. Menopause and metabolic syndrome. **Brazilian Archives Of Endocrinology & Metabology**, v; 58, n. 2, p. 91–96, 2014.
- MEROTTO, A.; GAZZIERO, D. L. P.; OLIVEIRA, M. C.; SCURSONI, J.; GARCIA, M. A.; FIGUEROA, R.; TURRA, G. M. Herbicide use history and perspective in South America. **Advances in Weed Science**, v. 40, n. 1, p. e020220050, 2022.
- MESNAGE, R.; ARNO, M.; COSTANZO, M.; MALATESTA, M.; SÉRALINI, G. E.; ANTONIOU, M. N. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 14, p. 70, 2015.
- MESNAGE, R.; PHEDONOS, A.; BISERNI, M.; ARNO, M.; BALU, S.; CORTON, J. C.; UGARTE, R.; ANTONIOU, M. N. Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 30–42, 2017.
- 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**, v. 18, n. 3, p. 741–743, 2020.
- MOHAJER, N.; DU, C. Y.; CHECKCINCO, C.; BLUMBERG, B. Obesogens: How They Are Identified and Molecular Mechanisms Underlying Their Action. **Front Endocrinol**, v. 12, p. 780888, 2021.
- MUÑOZ, J. P.; ARAYA-OSORIO, R.; MERA-ADASME, R.; CALAF, G. M. Glyphosate mimics 17 $\beta$ -estradiol effects promoting estrogen receptor alpha activity in breast cancer cells. **Chemosphere**, v. 313, p. 137201, 2023.

- MUÑOZ, J. P.; BLEAK, T. C.; CALAF, G. M. Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. **Chemosphere**, v. 270, p. 128619, 2021.
- CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J. E.; CHARLTON, M.; CUSI, K.; RINELLA, M.; HARRISON, S.A.; BRUNT, E. M.; SANYAL, A. J.. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, p. 328–357, 2018.
- OLIVEIRA, C. A. R. *et al.* Combined oral contraceptive in female mice causes hyperinsulinemia due to  $\beta$ -cell hypersecretion and reduction in insulin clearance. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 190, p. 54–63, 2019.
- PALMISANO, B. T.; LE, T. D.; ZHU, L.; LEE, Y. K.; STAFFORD, J. M. Cholesteryl ester transfer protein alters liver and plasma triglyceride metabolism through two liver networks in female mice. **J Lip Res**, v. 57, p. 1541–1551, 2016.
- PALMISANO, B. T.; ZHU, L.; STAFFORD, J. M. Estrogens in the Regulation of Liver Lipid Metabolism. **Adv Exp Med Biol**, v. 1043, p. 227–256, 2017.
- PANDEY, A.; DHABADE, P.; KUMARASAMY, A. Inflammatory Effects of Subacute Exposure of Roundup in Rat Liver and Adipose Tissue. **Dose-Response**, v. 17, n. 2, p. 1559325819843380, 2019.
- PANDEY, A.; RUDRAIAH, M. Analysis of endocrine disruption effect of Roundup® in adrenal gland of male rats. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1075–1085, 2015.
- PERUMPAIL, B. J.; KHAN, M. A.; YOO, E. R.; CHOLANKERIL, G.; KIM, D.; AHMED, A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol.**, v. 23, n. 47, p. 8263-8276, 2017.
- PINNA, C.; CIGNARELLA, A.; SANVITO, P.; PELOSI, V.; BOLEGO, C. Prolonged Ovarian Hormone Deprivation Impairs the Protective Vascular Actions of Estrogen Receptor  $\alpha$ Agonists. **Hypertension**, v. 51, p. 1210–1217, 2008.
- PRASAD, M.; GATASHEH, M.K.; ALSHUNIABER, M.A.; KRISHNAMOORTHY, R.; RAJAGOPAL, P.; KRISHNAMOORTHY, K.; PERIYASAMY, V.; VEERARAGHAVAN, V.P.; JAYARAMAN, S. Impact of Glyphosate on the Development of Insulin Resistance in Experimental Diabetic Rats: Role of NF $\kappa$ B Signalling Pathways. **Antioxidants**, v. 11, p. 2436, 2022.
- PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 12, p. 715–726, 2011.
- QI, L.; DONG, Y. M.; CHAO, H.; ZHAO, P.; MA, S. L.; LI, G. Glyphosate based-herbicide disrupts energy metabolism and activates inflammatory response through oxidative stress in mice liver. **Chemosphere**, v. 315, p. 137751, 2023.
- QUEK, J. *et al.* Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in the overweight and obese population: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 20–30, 2023.
- RIAZI, K. *et al.* The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 9, p. 851–861, 2022.

ROGERS, P.; WEBB, G. P. Estimation of body fat in normal and obese mice. **British Journal of Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 83–86, 1980.

ROISCH, U.; LINGENS, F. Effect of the Herbicide N-Phosphonomethylglycine on the Biosynthesis of Aromatic Amino Acids. **Angewandte Chemie International**, v. 13, n. 6, p. 400, 1974.

ROMANO, M. A. et al. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 663–673, 2012.

RYU, S. et al. Menopausal stages and non-alcoholic fatty liver disease in middle-aged women. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 190, p. 65–70, 2015.

SANDERS, F. W. B.; GRIFFIN, J. L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v. 91, n. 2, p. 452–468, 2016.

SCHIMPF, M. G.; MILESI, M. M.; LUQUE, E. H.; VARAYOUD, J. Glyphosate-based herbicide enhances the uterine sensitivity to estradiol in rats. **J Endocrinol**, v. 239, p. 197–213, 2018.

SCHÖNBRUNN, E.; ESCHENBURG, S.; SHUTTLEWORTH, W. A.; SCHLOSS, J. V.; AMRHEIN, N.; JEREMY, N. S.; EVANS, W. K. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 4, p. 1376–1380, 2001.

SCHRADER, M.; COSTELLO, J.; GODINHO, L. F.; ISLINGER, M. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. **J Inherit Metab Dis**, v. 38, n. 4, p. 681–702, 2015.

SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; RODRÍGUEZ-MORÁN, M.; GUERRERO-ROMERO, F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 6, p. 299–304, 2008.

SMITH, G. I. *et al.* Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Invest**, v. 130, n. 3, p. 1453–1460, 2020.

SOCK, E. N. *et al.* Ovariectomy stimulates hepatic fat and cholesterol accumulation in high-fat diet-fed rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 04, p. 283-290, 2013.

SVENDSEN, O. L.; HASSAGER, C.; CHRISTIANSEN, C. Age- and menopause-associated variations in body composition and fat distribution in healthy women as measured by dual-energy X-ray absorptiometry. **Metabolism**, v. 44, n. 3, p. 369-373, 1995.

TANG, J.; HU, P.; LI, Y.; WIN-SHWE, T. T.; LI, C. Ion imbalance is involved in the mechanisms of liver oxidative damage in rats exposed to glyphosate. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 1083, 2017.

TRÉMOLLIÈRES, F. A.; POUILLES, J. M.; RIBOT, C. A. Relative influence of age and menopause on total and regional body composition changes in postmenopausal women. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 175, n. 6, p. 1594-600, 1996.

VERDERAME, M.; SCUDIERO, R. How Glyphosate Impairs Liver Condition in the Field Lizard *Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmaltz, 1810): Histological and Molecular Evidence. **BioMed Research International**, p. 4746283, 2019.

VIGITEL. **VIGITEL BRASIL 2022**. Brasília, DF. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/v/vigitel>. Acesso em: 05 jan. 2023.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **Obesity and overweight. 2020**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> Acesso em: 12 jan. 2023.

WORLD OBESITY FEDERATION. **World Obesity Atlas 2023**. London. Disponível em: <http://www.worldobesity.org>. Acesso em: 12 jan. 2023.

YOUNOSSI, Z. M.; MARCHESINI, G.; PINTO-CORTEZ, H.; PETTA, S. Epidemiologia da doença hepática gordurosa não alcoólica e da esteatohepatite não alcoólica: atletas para o transplante hepático. **Transplante**, v. 103, n. 1, p 22-27, 2019.

ZHANG, W. *et al.* Characterizing the obesogenic and fatty liver-inducing effects of Acetyl tributyl citrate (ATBC) plasticizer using both in vivo and in vitro models. **Journal of Hazardous Materials**, v. 445, p. 130548, 2023.

ZHU, L.; BROWN, W. C.; CAI, Q.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; MCGUINNESS, O.P.; STAFFORD, J. M. Estrogen Treatment After Ovariectomy Protects Against Fatty Liver and May Improve Pathway-Selective Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 62, n. 2, p. 424–434, 2013.

# ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DA UEPG

21/06/2021

SEI/UEPG - 0533578 - Carta



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

## CARTA

### PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### *CARTA DE APROVAÇÃO*

Processo/ Process CEUA: 0533578/2021

Protocolo UEPG: 20.000044532-3

**Título:** Efeitos da exposição ao herbicida à base de glifosato sobre a adiposidade, homeostase da glicose e de lipídeos, e morfologia de órgãos do sistema endócrino, reprodutivo, renal e do trato gastrointestinal em camundongos fêmeas ovariectomizadas

Effects of glyphosate-based herbicide exposure on adiposity, glucose and lipid homeostasis and morphology of the endocrine glands, reproductive organs, kidney and gastrointestinal tract in ovariectomized female mice

**Interessada:** Rosane Aparecida Ribeiro

**e-mail:** raribeiro@uepg.br

**Data de Entrada:** 09/02/2021

**Resultado:** Aprovado

#### Considerações

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), estabelecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 86 animais da espécie *Mus musculus* (camundongos), linhagem: C57B1/6, fêmeas, idade: 30 dias e peso aproximado de 10 a 15 g, no início do experimento, para a execução desse projeto.

21/06/2021

SEI/UEPG - 0533578 - Carta

Ponta Grossa, 20 de junho de 2021

Profa. Dra. Luciana da Silva Leal Karolewski  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG



Documento assinado eletronicamente por **Luciana da Silva Leal Karolewski, Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais/PROPESP**, em 20/06/2021, às 16:08, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador 0533578 e o código CRC 61838670.

20.000044532-3

0533578v7

## ANEXO B - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DA UNIOESTE



### Autorização

O Protocolo nº18-21 intitulado "Efeitos da exposição ao herbicida à base de glifosato sobre a adiposidade, homeostase da glicose e de lipídeos, e morfologia de órgãos do sistema endócrino, reprodutivo, renal e do trato gastrointestinal em camundongos fêmeas ovariectomizadas", 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 09/07/2021. 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	01/07/2021 - 30/07/2024
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> (Camundongo C57Bl/6)
N. de animais	192
Peso/Idade	Obtenção: 10-15g /30 dias Grupos experimentais: 20-25 g/80-100 dias
Sexo	Feminino
Origem	Biotério Central da UNIOESTE

Cascavel, 14/07/2021.

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