

Alessandra Hellbrugge

EXPOSIÇÃO MATERNA AO HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO  
E SUA RELAÇÃO COM A MICROBIOTA, HISTOMORFOLOGIA  
INTESTINAL E ESTADO REDOX NO DUODENO E CÓLON DA  
PROLE

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ariane Zamoner  
Pacheco de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo  
Benedetti Parisotto

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Hellbrugge, Alessandra

Exposição materna ao herbicida a base de glifosato e sua relação com a microbiota, histomorfologia intestinal e estado redox no duodeno e cólon da prole / Alessandra Hellbrugge ; orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza, coorientador, Eduardo Benedetti Parisotto, 2019. 137 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

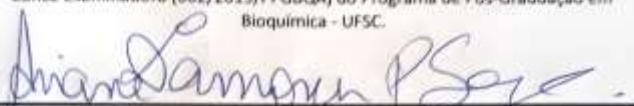
1. Bioquímica. 2. Agrotóxico. 3. Glifosato. 4. Microbiota. 5. Estresse oxidativo. I. Zamoner Pacheco de Souza, Ariane. II. Benedetti Parisotto, Eduardo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

**"Exposição materna ao herbicida a base de glifosato e sua relação com a microbiota, histomorfologia intestinal e estado redox no duodeno e cólon da prole"**

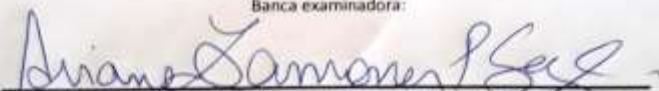
Por

**Alessandra Hellbrugge**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (002/2019/PPGBQA) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

  
\_\_\_\_\_  
Prof.(a) Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)

  
\_\_\_\_\_  
Dr.(a) Maria Luiza Bazzo (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
\_\_\_\_\_  
Dr.(a) Rozangela Curi Pedrosa (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2019.

Dedico esta dissertação a Ariane Zamoner Pacheco de Souza por sua forma humanizada de orientar e aos meus amados pais Gerda Bergmann Hellbrugge e Engelbert Hellbrugge pela vida, amor e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Ariane Zamoner Pacheco de Souza pela confiança e abertura para realização deste trabalho, por sua dedicação, forte caráter e contribuição para minha formação profissional e pessoal durante este período. A você, meu sincero carinho e gratidão.

À minha família, meus pais Gerda e Engelbert pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos e todo amor, atenção, carinho e dedicação para me ver em minha melhor versão. Ao meu irmão e minha cunhada, Christopher e Gabriela, por me ensinarem a ter objetividade sem deixar de acreditar no amor que nos faz ter o foco. A minha sobrinha, Luisa, que durante este período fez renascer para mim o sentido da vida.

Ao Fabio Henrique Ornellas, por todos os anos de dedicação, seu amor a ciência e pela vida, que contribuíram significativamente para que eu pudesse trilhar o meu caminho.

A todos amigos que me acompanharam e suportaram nesta jornada, que se fazem presentes em todos os momentos com carinho e acolhimento únicos. Sem vocês a jornada não seria possível.

A Juliana Tonietto Domingues por me mostrar um novo jeito de ver e viver a vida, além de todo suporte e organização nos experimentos.

Ao Eduardo Benedetti Parisotto, meu coorientador, por todo auxílio, companheirismo e contribuição para manutenção do bom humor.

Aos pesquisadores Prof<sup>o</sup> Carlos Zarate Blades e Carmen Simioni pela colaboração no desenvolvimento desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular (LaBioSignal), atuais e antigos, Patrícia A. Cesconetto, Katuska Marins, Bárbara Rhan, Carolinne Sayury, Nicolas Gabriel, Vitória C. Hayduck, Carla E. H. Rieg, por todo suporte, trocas de experiências e ensinamentos.

Agradeço, ainda, a todos aqui não mencionados e que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PGBQA) por ter oportunizado a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPESC pelo apoio financeiro.



“A verdade é aquilo que resiste aos testes da experiência.” (Albert Einstein)





## RESUMO

O uso intensivo de agrotóxicos tem levado à contaminação dos alimentos e da água. Dentre esses, os herbicidas a base de glifosato (HBG) são os mais utilizados no Brasil e no mundo. No presente estudo, investigou-se as mudanças na microbiota intestinal, bem como alterações bioquímicas e histomorfológicas no duodeno e cólon final de ratos imaturos após exposição materna ao HBG. Para tanto, ratas fêmeas prenhas (linhagem Wistar) foram expostas a 1% da formulação comercial Roundup® (equivalente a 0,36% de glifosato) na água de beber a partir do 5º dia gestacional e o tratamento prosseguiu até os filhotes completarem 15 dias de idade. O grupo controle recebeu água durante o mesmo período. Os resultados mostraram aumento no conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de peroxidação lipídica tanto em duodeno como em cólon dos filhotes expostos ao HBG durante a gestação e lactação. Em homogeneizado de duodeno e porção final cólon observou-se alterações na atividade de enzimas do sistema de defesas antioxidantes, compatível com desequilíbrio no estado redox desses tecidos. Além disso, observou-se aumento no conteúdo de TNF- $\alpha$  na porção final do cólon dos animais expostos, sugerindo a implicação de processo inflamatório na toxicidade do herbicida. Ademais, a microbiota intestinal destes animais foi significativamente alterada, com aumento no conteúdo relativo de Firmicutes e *Bacteroidetes fragilis*, além do conteúdo fecal apresentar-se acidificado. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão e varredura indicaram alterações ultraestruturais em mitocôndrias, diminuição na produção de muco, maior espaçamento de vilosidades e, conseqüente translocação bacteriana em preparações intestinais de animais expostos. Poucos são os estudos avaliando efeitos do HBG no intestino; no entanto, os resultados corroboram dados já descritos na literatura científica quanto ao HBG induzir estresse oxidativo e inflamação em outros tecidos. Os resultados de alteração na microbiota corroboram os estudos publicados recentemente com outros modelos experimentais de exposição ao HBG, sendo o presente estudo o primeiro a demonstrar as alterações ultraestruturais no intestino ocasionadas pela exposição indireta ao HBG, assim como a conseqüente translocação bacteriana. Os resultados reforçam a necessidade de investigar os efeitos induzidos pela exposição ao HBG e seus impactos fisiopatológicos.

**Palavras-chave:** Agrotóxicos. Glifosato. Microbiota. Estresse Oxidativo.



## ABSTRACT

The intensive use of pesticides has led to the contamination of food and water. Glyphosate-based herbicides (HBG) are the widely used herbicide in Brazil and worldwide. In the present study, we investigated the changes in the intestinal microbiota as well as biochemical and histomorphological changes in the duodenum and final colon of immature rats after maternal exposure to HBG. For this, pregnant female rats (Wistar line) were exposed to 1% of Roundup® formulation (equivalent to 0.36% glyphosate) in drinking water from the 5th gestational day and treatment continued until the pups completed 15 days-old. The control group received only water during the same period. The results showed an increase in the content of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation in both duodenum and colon of HBG exposed pups. In the homogenates of duodenum and colon, we observed changes in the enzymatic activity of the antioxidant defense system, compatible with redox imbalance in these tissues. In addition, an increase in the TNF- $\alpha$  levels was observed in the colon of the exposed animals, suggesting the implication of an inflammatory process in the toxicity of the herbicide. In addition, the intestinal microbiota of these animals was significantly altered, with increase in the relative content of Firmicutes and *Bacteroidetes fragilis*. In addition, the fecal content has been acidified. Transmission and scanning electron microscopy images indicated ultrastructural changes in mitochondria, decreased mucus production, increased villus spacing, and consequent bacterial translocation in intestinal preparations of exposed animals. There are few studies evaluating the effects of HBG in the gut. However, the results corroborate data already described in the scientific literature regarding HBG to induce oxidative stress and inflammation in other tissues. The results of alteration in the microbiota are in agreement with recently published studies with other experimental models of HBG exposure. However, the present study is the first one demonstrating ultrastructural changes in the intestine caused by the indirect exposure to HBG, as well as the consequent bacterial translocation. The results reinforce the need to investigate the effects induced by exposure to HBG and its pathophysiological impacts.

**Keywords:** Pesticide. Glyphosate. Microbiota. Oxidative stress.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem representativa da Hipótese do presente estudo. ....	26
Figura 2- Consumo de agrotóxicos e afins do ano de 2000 a 2014 no Brasil. ....	31
Figura 3- Distribuição das amostras analisadas pelo PARA, segundo a presença ou a ausência de resíduos de agrotóxicos e o tipo de irregularidade. ....	32
Figura 4 – Fórmula estrutural do Glifosato. ....	34
Figura 5- Imagem representativa da via do ácido chiquímico e ação do herbicida glifosato. ....	34
Figura 6- Desenho esquemático do intestino delgado. ....	37
Figura 7 - Desenho esquemático do cólon. ....	39
Figura 8- Proporção entre artigos relacionados à resistência a antibióticos, uso de glifosato nos EUA e uso global de glifosato, do ano de 1960 a 2016. ....	52
Figura 9- Associação entre aumento no uso de glifosato e casos de morte por infecções intestinais nos EUA, entre 1990 e 2010. ....	52
Figura 10- Imagem demonstrativa da realização das medidas de diâmetro (A) e altura da vilosidade (B) em cólon (A) e duodeno (B)...	62
Figura 11- Efeitos da exposição gestacional ao HBG na concentração de espécies reativas de oxigênio (A) e nitrogênio (B), e de peroxidação lipídica (C), no duodeno de ratos imaturos. ....	68
Figura 12- Efeitos da exposição gestacional e lactacional ao HBG na atividade das enzimas: (A) superóxido dismutase (SOD) e (B) catalase (CAT) em duodeno de ratos imaturos. ....	70
Figura 13- Efeitos da exposição materna ao HBG na atividade das enzimas (A) Glutaciona Peroxidase (GPx) e (B) Glutaciona Radutase (GR), no conteúdo de (C) Glutaciona reduzida (GSH) e na atividade de Glutaciona S Transferase (GST) em duodeno de ratos imaturos. ....	71
Figura 14- Efeitos da exposição materna ao HBG na atividade da enzima (A) Tiorredoxina Redutase (TRxR) no duodeno de ratos imaturos. ....	73
Figura 15- Efeitos da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação na medida da (A) altura das vilosidades e (B) diâmetro do duodeno, realizadas em imagens de ML, objetiva de 10X, do duodeno de ratos imaturos. ....	74
Figura 16- Imagens de ML de fatias de duodeno de um animal (A) Controle e (B) Tratado, em objetiva de 10X. ....	75

Figura 17- Preparações histológicas representativas de duodeno de rato imaturo (A) controle e (B) exposto ao HBG durante período gestacional e lactacional.....	76
Figura 18- Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão de preparações histológicas de duodeno de ratos imaturos.....	77
Figura 19- Imagens representativas do duodeno de ratos imaturos expostos ou não ao HBG durante a gestação e lactação obtidas por microscopia eletrônica de varredura. ....	78
Figura 20- Efeitos da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação sobre parâmetros associados ao estado redox em porções do cólon final da prole. ....	79
Figura 21- da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação na atividade das enzimas: (A) superóxido dismutase (SOD) e (B) catalase (CAT) em cólon de ratos imaturos. ....	81
Figura 22- Efeito da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação na atividade das enzimas (A) Glutaciona Peroxidase (GPx) e (B) Glutaciona Redutase (GR), no conteúdo de (C) Glutaciona reduzida (GSH) e na atividade da enzima (D) Glutaciona S Transferase (GST) em cólon final de ratos imaturos. ....	82
Figura 23- Efeito da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação na atividade da enzima Tiorredoxina Redutase (TRxR) no cólon final de ratos imaturos.....	83
Figura 24- Imagens representativas de um corte histológico do cólon final de rato imaturo (A) controle e (B) exposto ao HBG durante período gestacional e lactacional obtida por microscopia de luz. ....	85
Figura 25- Efeitos da exposição materna ao HBG no diâmetro do cólon (A) e no número de células caliciformes (B). ....	86
Figura 26- Micrografias eletrônicas de transmissão de células do cólon de ratos de 15 dias.....	88
Figura 27- Micrografias de microscopia eletrônica de varredura mostrando as alterações induzidas pela exposição materna ao HBG na ultraestrutura do cólon final de ratos de 15 dias.....	89
Figura 28- Efeitos da exposição materna ao HBG no conteúdo de TNF- $\alpha$ e IL-6 e na atividade MPO no duodeno de ratos imaturos. ....	91
Figura 29- Efeitos da exposição materna ao HBG nas concentrações de TNF- $\alpha$ , e Il-6 e na atividade da MPO no cólon de ratos imaturos. ....	92
Figura 30- Efeitos da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação na expressão quantitativa de <i>Eubacteria</i> , em amostras de fezes de animais imaturos. ....	93

Figura 31- Efeitos da exposição materna ao HBG na expressão de (A) <i>Bacteroides fragilis</i> e (B) Firmicutes, (C) <i>Bacteroidetes</i> e (D) <i>Enterobacteriaceae</i> em amostras de fezes de animais imaturos. ....	94
Figura 32- Efeitos da exposição materna ao HBG na relação da expressão de Firmicutes/ <i>Bacteroidetes</i> , em amostras de fezes de animais imaturos.....	95
Figura 33- Efeitos da exposição materna ao HBG no pH fecal de ratos imaturos. ....	96
Figura 34- Resumo dos efeitos da exposição materna ao HBG no duodeno, cólon final e microbiota de ratos imaturos.....	107





## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Ranking de vendas de agrotóxicos, em toneladas de ingrediente ativo, no ano de 2014, no Brasil. ....	33
Tabela 2- Listagem dos primers e sua respectiva temperatura de anelamento. ....	63



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•OH - Radical hidroxil  
 $^1\text{O}_2$  - Oxigênio singlete  
AGCC - Ácido graxo de cadeia curta  
AMPA - Ácido aminometilfosfônico  
ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária  
ATP - Trifosfato de adenosina  
BSA - Albumina de soro bovino  
Caco - Cacodilato  
CAT - Catalase  
CIM - Concentração inibitória mínima  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
DTNB - Ácido 2-nitrobenzoico  
DTPA - Ácido 2-etilenotriaminopentacético  
DUOX - Dual oxidase  
EPSPS - Enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase  
ERN - Espécies reativas de nitrogênio  
ERO - Espécies reativas de oxigênio  
G6PD - Glicose-6-fosfato desidrogenase  
GALT - Tecido linfoide associado a mucosa  
GGT -  $\gamma$ -glutamil transferase  
GPx - Glutaciona peroxidase  
GR - Glutaciona redutase  
GSH - Glutaciona reduzida  
GSSG - Glutaciona oxidada  
GST - Glutaciona S-transferase  
GTA - Glutaraldeido  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  - Peróxido de hidrogênio  
HBG - Herbicida à base de glifosato  
HCl - Ácido Clorídrico  
HE - Hematoxilina/Eosina  
IA - Ingrediente ativo  
IARC - Agencia Internacional de Pesquisa sobre o Câncer  
IgA - Imunoglobulina A  
IL-1 $\beta$  - Interleucina -1 $\beta$   
IL-6 - Interleucina - 6  
LCME - Laboratório central de microscopia eletrônica  
LMR - Limite máximo de resíduos  
LPS - Lipopolissacarídeos  
MDA - Malondialdeído

MET - Microscopia eletrônica de transmissão  
MEV - Microscopia eletrônica de varredura  
ML - Microscopia de luz  
NADPH - Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida  
NLR - Receptor do tipo NOD  
NO - Óxido nítrico  
NOX - Oxido nítrico oxidase  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Radical ânion superóxido  
OMS - Organização mundial da saúde  
ONO<sub>2</sub><sup>-</sup> - Peroxinitrito  
PAMP's - Padrões moleculares associados a patógeno  
PARA - Programa de Análise de Agrotóxicos em Alimentos  
PAS - Ácido Periódico de Schiff  
PMN - Polimorfonucleares  
POEA - Polioxietilenoamino  
PRR - Receptor de reconhecimento padrão  
Prx - Peroxirredoxina  
qPCR - Reação em cadeia de polimerase em tempo real  
RER - Retículo endoplasmático rugoso  
RL - Radical livre  
SNED - sistema neuroendócrino difuso  
SOD - Superóxido dismutase  
TBA - Ácido tiobarbitúrico  
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
t-BuOOH - Tert-butilhidroperóxido  
TCA - Ácido tricloroacético  
TLR - Receptor do tipo Toll  
TNB - Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
Trx - Tiorredoxina  
TRxR - Tiorredoxina redutase  
XDH - Xantina desidrogenase  
XO - Xantina oxidase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>31</b>
3.1	AGROTÓXICOS .....	31
3.2	O GLIFOSATO .....	33
3.3	INTESTINO .....	36
3.4	ESTRESSE OXIDATIVO .....	40
<b>3.4.1</b>	<b>Produção de espécies reativas</b> .....	<b>40</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Sistema antioxidante</b> .....	<b>42</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Antioxidantes enzimáticos</b> .....	<b>43</b>
3.4.3.1	Superóxido dismutase (SOD) .....	43
3.4.3.2	Catalase (CAT) .....	43
3.4.3.3	Glutationa peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) .....	43
3.4.3.4	Tiorredoxina (Trx), tiorredoxina redutase (TRxR) e tiorredoxina peroxidase .....	45
<b>3.4.4</b>	<b>Sistema antioxidante não enzimático</b> .....	<b>45</b>
3.5	MICROBIOTA .....	46
<b>3.5.1</b>	<b>Microbiota e interação intestinal</b> .....	<b>48</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Regulação da homeostase intestinal</b> .....	<b>49</b>
3.6	MICROBIOTA E GLIFOSATO .....	51
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>55</b>
4.1	ANIMAIS .....	55
4.2	TRATAMENTO COM ROUNDUP® .....	55
4.3	ESTRESSE OXIDATIVO .....	55
4.4	SUPEROXIDO DISMUTASE (SOD): .....	56
4.5	CATALASE (CAT): .....	56
4.6	GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) .....	56

4.7	GLUTATIONA REDUTASE (GR) .....	57
4.8	GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST).....	57
4.9	TIORREDOXINA REDUTASE (TRxR) .....	57
4.10	DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E NITROGÊNIO (ERNs): .....	58
4.11	DANO OXIDATIVO - PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	58
4.12	CONTEÚDO DE GSH: .....	59
4.13	INFLAMAÇÃO .....	59
<b>4.13.1</b>	<b>Citocinas pró-inflamatórias (TNF-<math>\alpha</math> e IL-6).....</b>	<b>59</b>
<b>4.13.2</b>	<b>Atividade de mieloperoxidase (MPO) .....</b>	<b>59</b>
4.14	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA 60	
4.15	ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAIS ..	60
<b>4.15.1</b>	<b>Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV).....</b>	<b>60</b>
<b>4.15.2</b>	<b>Microscopia de luz .....</b>	<b>61</b>
4.16	ANÁLISE DA MICROBIOTA .....	62
4.17	EXTRAÇÃO DE DNA DAS FEZES .....	62
4.18	REAÇÃO DE qPCR .....	64
4.19	pH FECAL.....	65
4.20	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	65
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
5.1	RESULTADOS PARTE 1 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO HBG DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HISTOMORFOLÓGICOS NO DUODENO DE RATOS IMATUROS .....	67
<b>5.1.1</b>	<b>Efeitos da exposição ao HBG sobre parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo .....</b>	<b>67</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Efeitos da exposição ao HBG sobre parâmetros histomorfológicos do duodeno.....</b>	<b>73</b>

5.1.2.1	Análise da histomorfologia e morfométrica de cortes de duodeno de animais expostos ou não HBG através de microscopia de luz	73
5.1.2.2	Análise das características microestruturais do duodeno de ratos imaturos expostos ao HBG durante a gestação e lactação por MET	77
5.1.2.3	Análise das características microestruturais do duodeno de ratos imaturos expostos ao HBG durante a gestação e lactação por MEV	78
5.2	RESULTADOS PARTE 2 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO NO CÓLON FINAL DE RATOS IMATUROS.....	79
<b>5.2.1</b>	<b>Efeitos da exposição ao HBG sobre parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo em cólon final de ratos imaturos</b>	<b>79</b>
5.2.1.1	Alterações histológicas no cólon da prole após exposição materna ao HBG.....	84
5.2.1.2	Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão dos efeitos da exposição materna ao HBG no cólon de ratos imaturos	86
5.2.1.3	Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura dos efeitos da exposição materna ao HBG no cólon de ratos imaturos.	87
5.3	RESULTADOS PARTE 3 – ALTERAÇÕES NOS PARÂMETROS DE INFLAMAÇÃO E MICROBIOTA DE RATOS IMATUROS APÓS EXPOSIÇÃO MATERNA AO HBG.....	90
<b>5.3.1</b>	<b>Efeitos da exposição materna ao HBG sobre parâmetros inflamatórios.....</b>	<b>90</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Alterações na microbiota intestinal da prole após a exposição materna ao HBG.....</b>	<b>93</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Efeito da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação no pH fecal da prole aos 15 dias de idade.....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>97</b>
6.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>109</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>111</b>





## 1 INTRODUÇÃO

O cenário mundial de produção de alimentos mudou consideravelmente nas últimas décadas, em especial após a chamada “Revolução Verde”. A partir de 1996, sementes geneticamente modificadas resistentes ao herbicida glifosato começaram a ser utilizadas, o que intensificou o consumo desse herbicida nos cultivos, em especial de soja. Estudo financiado pela multinacional Monsanto, revisando os efeitos do glifosato demonstrados em modelos *in vivo* e *in vitro*, sugeriam que esse herbicida não causava danos a humanos e outros mamíferos (Williams *et al.*, 2000; 2016). Entretanto, a partir dessa afirmação, inúmeros pesquisadores de diferentes locais do mundo têm se dedicado a estudar os efeitos da exposição a herbicidas a base de glifosato em modelos animais. Os estudos sugerem que a exposição a herbicidas à base de glifosato, que figuram entre os agrotóxicos mais utilizados em todo o mundo, está associada a uma série de condições patológicas, incluindo aumento da incidência de autismo, doença celíaca, depressão, diversas formas de câncer, entre outras (Hsiao *et al.*, 2013; Samsel e Seneff, 2013; Guyton *et al.*, 2015; Ait Bali *et al.*, 2017).

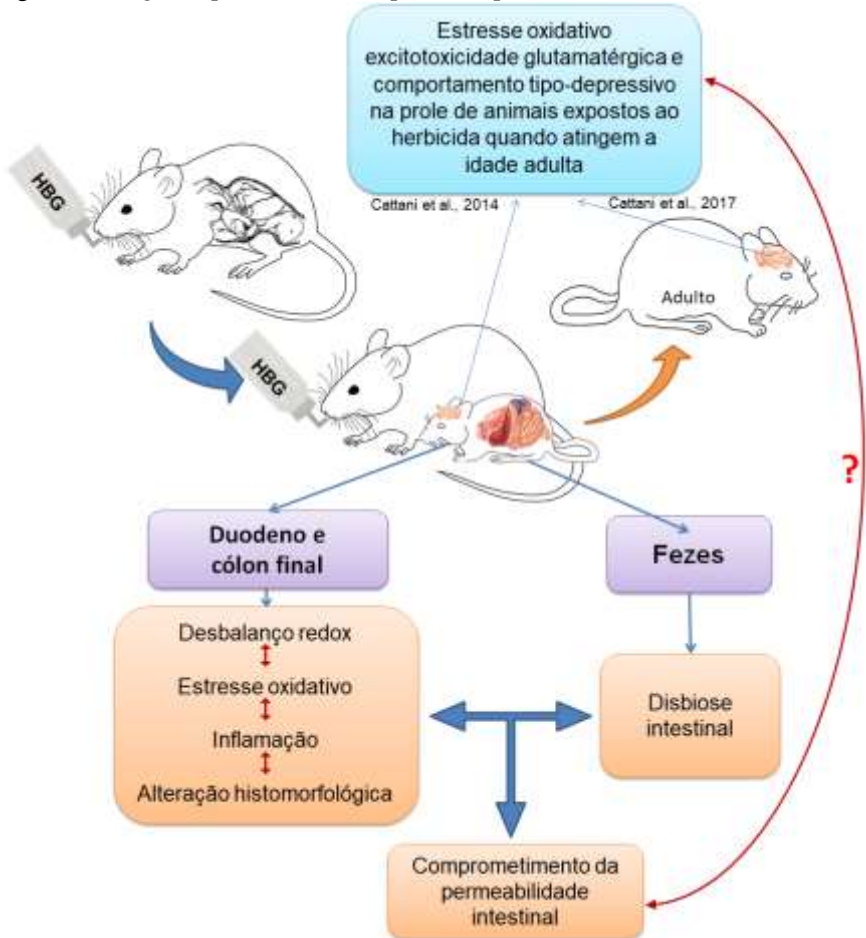
Nesse cenário, o grupo de pesquisa coordenado pela Profa Dra Ariane Zamoner Pacheco de Souza vem estudando os efeitos da exposição materna ao glifosato durante o desenvolvimento da prole. Resultados prévios do grupo demonstraram que essa exposição está associada ao desbalanço no estado redox, excitotoxicidade glutamatérgica e comportamento tipo-depressivo na prole de animais expostos ao herbicida quando atingem a idade adulta (Cattani *et al.*, 2014; 2017).

O glifosato também foi apontado como sendo capaz de induzir resistência a agentes antimicrobianos em algumas cepas bacterianas e como um agente capaz de interferir na microbiota (Shehata *et al.*, 2013; Van Bruggen *et al.*, 2018). Considerando-se os inúmeros estudos que apontam para o papel da disbiose intestinal para transtornos psiquiátricos e doenças metabólicas (Baotherman *et al.*, 2016; Cenit *et al.*, 2017), a investigação dos efeitos do glifosato sobre o trato gastrointestinal e a microbiota dos animais expostos ao glifosato parece relevante.

Considerando-se os dados prévios do grupo mostrando que a exposição materna ao glifosato durante a gestação e lactação afeta o neodesenvolvimento da prole com potencial desenvolvimento de transtorno depressivo (Cattani *et al.*, 2017), hipotetizamos que os efeitos neurais dessa exposição estão associados a disbiose intestinal e

desbalanço no estado redox, com conseqüente indução de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, inflamação e dano ao tecido intestinal (Figura 1).

Figura 1- Imagem representativa da hipótese do presente estudo.



A exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação induz excitotoxicidade glutamatérgica e estresse oxidativo no hipocampo da prole nas fases imatura e adulta do desenvolvimento. Esses efeitos são associados ao comportamento tipo-depressivo dos filhotes ao atingirem a idade adulta (Cattani et al., 2017). Desse modo, esses efeitos também podem ser potencialmente associados a alterações na microbiota intestinal, com conseqüente dano

oxidativo, inflamação e comprometimento da permeabilidade do intestino. (HBG, Herbicida a base de glifosato). Fonte: Proprio Autor.

Para comprovar essa hipótese, no presente estudo foram analisados diferentes parâmetros bioquímicos e inflamatórios em amostras de fezes, bem como porções de duodeno e cólon final da prole de ratas expostas ao herbicida durante a gestação e lactação. Além disso, preparações histológicas desses tecidos foram analisadas por microscopia de luz, bem como por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV). Análises por PCR em tempo real foram utilizadas para quantificar alguns grupos de bactérias predominantes no intestino.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi investigar as mudanças na microbiota e alterações bioquímicas e histomorfológicas no intestino de ratos imaturos após exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação induz estresse oxidativo (EO) no duodeno e cólon final na prole aos 15 dias de idade por meio da determinação dos seguintes parâmetros: atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), tioredoxina reductase (TRxR) concentração de glutathione reduzida (GSH), avaliação da peroxidação de lipídios (substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, TBARS) e determinação de EROs e ERNs
- Estudar os efeitos do HBG na microbiota de ratos de 15 dias de idade, após exposição materna;
- Avaliar as alterações no pH fecal de ratos de 15 dias de idade, após exposição materna ao HBG;
- Determinar atividade da mieloperoxidase (MPO), após exposição materna ao HBG, no intestino delgado e cólon de ratos de 15 dias de idade;
- Quantificar as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 no duodeno e cólon de ratos imaturos após exposição materna ao HBG;
- Verificar possíveis alterações histológicas ocasionadas pela exposição materna ao HBG no intestino delgado e cólon de ratos imaturos por microscopia de luz e microscopia eletrônica (ME) de transmissão (MET) e de varredura (MEV).



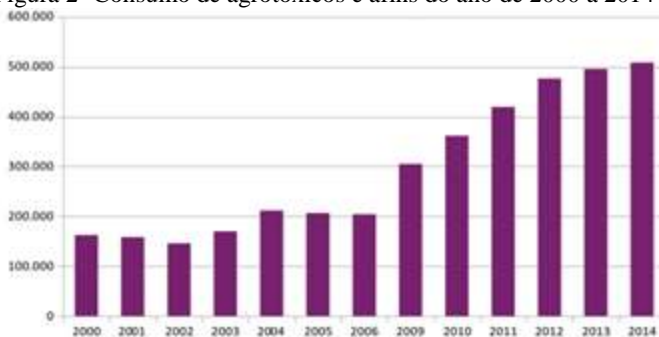
### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 AGROTÓXICOS

O termo agrotóxico engloba os conceitos de defensivo agrícola e pesticida, que são substâncias químicas utilizadas para minimizar perdas na produção agrícola, por meio da redução da ação danosa de insetos, doenças e ervas daninhas nas lavouras (Ecobichon, 2000; Anvisa, 2012). Neste sentido, a diminuição no uso de agrotóxicos parece estar distante devido à constante necessidade no aumento da produtividade, fato reforçado pelos mais de 1000 tipos diferentes de pesticidas utilizados em todo o mundo, segundo informações da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Who, 2018).

O crescente uso dos agrotóxicos em nível nacional e mundial foi divulgado no 2º Seminário sobre Mercado de Agrotóxicos e Regulação, realizado em Brasília (DF), em 2012, onde os dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná (UFPR), mostraram um crescimento no mercado mundial de agrotóxicos de 93%, contra 190% no mercado nacional, entre os anos de 2000 a 2011 (Anvisa, 2012). Destaca-se que o Brasil é, desde 2008, o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, sendo que em 2015 já era responsável pelo consumo de cerca de 20% de todo agrotóxico produzido mundialmente e teve um crescimento no consumo por ingrediente ativo de, aproximadamente, 2,5 vezes nos últimos 14 anos, (Anvisa, 2012), como visto na Figura 2.

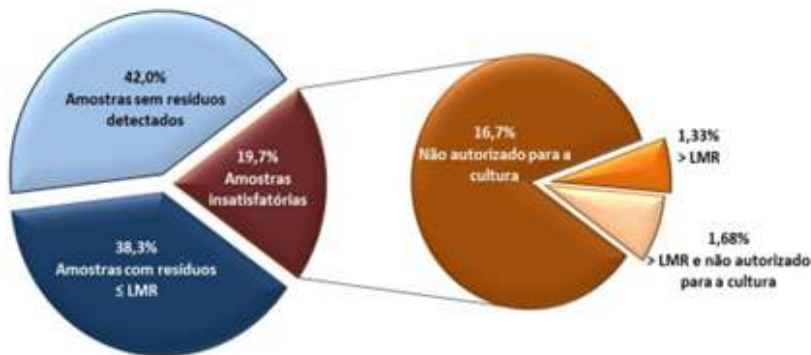
Figura 2- Consumo de agrotóxicos e afins do ano de 2000 a 2014 no Brasil.



Crescimento no consumo de agrotóxicos, por tonelada de ingrediente ativo entre os anos de 2000 a 2014, com crescimento de, aproximadamente 2,5 vezes nos 14 anos descritos. Fonte: IBAMA (2016).

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) realizado pela ANVISA, teve seu início no ano de 2001, e desde então já analisou mais de 30.000 amostras de 25 tipos de alimentos de origem vegetal. No seu último relatório, de 2015, apontou que 58% das amostras de alimentos analisados apresentaram resíduos de agrotóxicos, sendo que, 19,7% destes apresentavam-se impróprios para o consumo, por apresentarem resíduos acima dos valores permitidos para a cultura, ou ainda, resíduos de agrotóxicos não permitidos para à cultura, conforme descrito na Figura 3.

Figura 3- Distribuição das amostras analisadas pelo PARA, segundo a presença ou a ausência de resíduos de agrotóxicos e o tipo de irregularidade.



LMR: Limite máximo de resíduos. Fonte: ANVISA, 2015.

Segundo a OMS, os indivíduos com maior risco de apresentar problemas de saúde devido ao contato com pesticidas, seriam os indivíduos com exposição ocupacional, principalmente nas áreas rurais como aplicadores e manipuladores (WHO, 2018). No entanto, a exposição humana aos agrotóxicos vai além, e pode ser atribuída ao consumo de alimentos oriundos da produção agropecuária e água contaminada (Ecobichom, 2000). Ademais, levando em consideração a capacidade de permanecerem como resíduos remanescentes nos alimentos, a ingestão de alimentos contendo agrotóxicos é considerada uma das principais vias de exposição humana a esses compostos (Mello, 1999).

Os pesticidas podem ser classificados de acordo com sua funcionalidade como herbicidas, fungicidas e inseticidas. Sendo os herbicidas, substâncias com objetivo de eliminar plantas, e em sua



maioria são específicos para determinadas ervas daninhas. Esses são o grupo de agrotóxicos mais utilizados em todo o mundo e representam 40% dentre todos pesticidas utilizados a nível mundial (Science, 2013) e destes, o glifosato apresenta-se como o herbicida mais utilizado no Brasil e no mundo.

Destaca-se, conforme a Tabela 1, que mesmo somando-se os valores em toneladas dos demais ingredientes ativos mais vendidos em 2014 (da 2<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> posição), a soma ainda é inferior aos montantes de glifosato comercializado no mesmo ano, no Brasil.

Tabela 1- Ranking de vendas de agrotóxicos, em toneladas de ingrediente ativo, no ano de 2014, no Brasil.

<b>Ingrediente Ativo</b>	<b>Venda (tonelada de IA)</b>	<b>Ranking</b>
<b>Glifosato e seus sais</b>	194.877,84	1º
<b>2,4-D</b>	36.513,55	2º
<b>Acefato</b>	26.190,52	3º
<b>Óleo mineral</b>	25.632,86	4º
<b>Clorpirifós</b>	16.452,77	5º
<b>Óleo vegetal</b>	16.126,71	6º
<b>Atrazina</b>	13.911,37	7º
<b>Mancozebe</b>	12.273,86	8º
<b>Metomil</b>	9.801,11	9º
<b>Diuron</b>	8.579,52	10º

IA: Ingrediente ativo. Fonte: IBAMA, 2016.

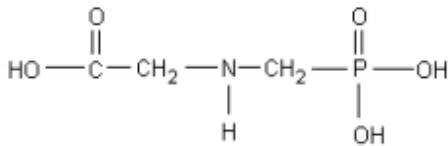
### 3.20 GLIFOSATO

O glifosato (N-(fosfonometil) glicina) pertencente ao grupo de pesticidas organofosforados, um herbicida não seletivo, de ação sistêmica, pós-emergente e de amplo espectro.

Um composto análogo ao aminoácido glicina, com fórmula molecular  $C_3H_8NO_5P$  (MW = 38 169,1 g/mol) e fórmula estrutural demonstrada na Figura 4 (MONSANTO, 2015). Este composto age sobre a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), exemplificada na Figura 5, inibindo a via do chiquimato, que sintetiza os aminoácidos aromáticos essenciais, fenilalanina, triptofano e tirosina, os quais são precursores de outros produtos, como lignina, alcaloides, flavonoides e ácidos benzoicos (Amarante Junior *et al.*, 2002). Esta via é encontrada em plantas, bem como fungos e bactérias, mas não em insetos, aves, peixes, mamíferos (Anadon *et al.*, 2009), sendo esta uma

das alegações para seu presumível baixo risco à saúde humana, e continuidade de sua utilização nas lavouras. Contudo, resultados de pesquisas realizadas com glifosato e/ou suas formulações e seus efeitos sobre a saúde humana, tem gerado controvérsias no meio científico (Williams *et al.*, 2000; De Liz Oliveira Cavalli *et al.*, 2013; Kier e Kirkland, 2013; Cattani *et al.*, 2014; Cattani *et al.*, 2017).

Figura 4 – Fórmula estrutural do Glifosato.



Fonte: Monsanto, 2015.

Figura 5- Imagem representativa da via do ácido chiquímico e ação do herbicida glifosato.



Fonte: Adaptado pelo autor de ILSI (2010).

As formulações comerciais, geralmente, contêm o princípio ativo na forma de sal de isopropilamina de glifosato, além de apresentarem substâncias surfactantes, que atuam de forma a estabilizar e melhorar a penetração e ação sobre as plantas, sendo o polioxietilamina (POEA) o principal deles (ANVISA, 2015).

Estudos apontaram os potenciais efeitos teratogênicos da exposição ao herbicida, onde ratas Wistar gestantes foram tratadas com diferentes dosagens de glifosato na água de beber até o 15º dia de gestação. No 21º de gravidez foi realizada cesárea nessas ratas e observou-se 57,3% da ninhada tratada com as dosagens mais elevadas (1000mg/kg de peso), apresentando alterações esqueléticas (Dallegrave *et al.*, 2003; **Carneiro** *et al.*, 2012).

Demais estudos reforçam a capacidade do organismo de retenção do herbicida, onde foram encontrados resíduos de glifosato tanto no soro materno e fetal (Kongtip *et al.*, 2017), como no leite materno (Bus, 2015). Em recém-nascidos, onde o leite materno apresenta-se como alimentação exclusiva até o 6º mês de vida e, sabendo que estes apresentam o sistema imunológico em formação, a ingestão de leite contaminado pode prejudicar a saúde dos mesmos (Carneiro *et al.*, 2012).

Estudos têm demonstrado também que a exposição a formulações comerciais a base de glifosato resulta em estresse oxidativo (Gehin *et al.*, 2006; El-Shenawy, 2009; Larsen *et al.*, 2012; De Liz Oliveira Cavalli *et al.*, 2013; Cattani *et al.*, 2017; Milic *et al.*, 2018) alteração no ciclo celular (Marc *et al.*, 2002; 2003; 2004), na cadeia transportadora de elétrons (Peixoto, 2005; Pereira *et al.*, 2018), genotoxicidade (Lueken *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2005; Gasnier *et al.*, 2009; Clair, Mesnage, *et al.*, 2012; Milic *et al.*, 2018), dano hepático (Benedetti *et al.*, 2004; Caglar e Kolankaya, 2008; El-Shenawy, 2009; Larsen *et al.*, 2014; Mesnage *et al.*, 2015), desregulação endócrina (Walsh *et al.*, 2000; Richard *et al.*, 2005; Benachour *et al.*, 2007; Clair, Mesnage, *et al.*, 2012; De Liz Oliveira Cavalli *et al.*, 2013) além de alterações no microbioma (Mao *et al.*, 2018), levando a alterações biológicas. Ademais, alguns estudos mostram correlação com doenças neurodegenerativas (Anadon *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011), excitotoxicidade glutamatérgica (Cattani *et al.*, 2014), alterações no comportamento (Cattani *et al.*, 2014; Ait Bali *et al.*, 2017; Cattani *et al.*, 2017), além de, fator de risco para o linfoma Não-Hodgkin (Schinasí e Leon, 2014) e autismo (Nevison, 2014; Samsel e Seneff, 2015; Argou-Cardozo e Zeidan-Chulia, 2018; Good, 2018).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), vinculada OMS, em 2017 manteve a classificação do herbicida glifosato no Grupo 2A, ou seja, como provavelmente cancerígeno para os seres humanos. E apesar da evidência limitada de carcinogenicidade em humanos, existem indícios de que o glifosato pode causar câncer em animais de laboratório, o que gerou discussões com relação a esta classificação (Portier *et al.*, 2016).

Além dos resíduos de glifosato encontrados em alimentos e na água de beber, resíduos também foram encontrados na urina da população urbana americana e europeia (Niemann *et al.*, 2015; Connolly *et al.*, 2018), sugerindo que tal exposição vai além do ambiente rural (Bai e Ogbourne, 2016).

É sabido que uma parte dos agrotóxicos possui a capacidade de se armazenar no organismo humano. Neste sentido, Brewster e colaboradores (1991) quantificaram, através da administração de glifosato radioativo, a absorção e distribuição glifosato nos diferentes tecidos de ratos, e observou que mais da metade do conteúdo administrado (51%) foi eliminado nas fezes, enquanto 34% do conteúdo absorvido, após 2 horas, foi encontrado no intestino delgado e 1,5% no cólon destes animais. Esses dados corroboram a necessidade de se estudar e compreender os impactos da exposição ao glifosato sobre o intestino e as fezes dos indivíduos expostos.

### 3.3INTESTINO

O intestino é um dos primeiros órgãos a entrar em contato com substâncias presentes na água e/ou alimentos ingeridos, incluindo, portanto, agrotóxicos e toxinas presentes nos mesmo. Este órgão é responsável pela absorção de nutrientes e de grande parte das vitaminas e minerais, além de absorção e reabsorção de água e eletrólitos (Rao e Wang, 2010).

O alimento ingerido, após mastigação, passa por diversas transformações no estômago e recebe o nome de quimo ácido, o qual é liberado em pequenas porções para o intestino delgado, onde ocorre a maior parte da digestão e absorção. Posteriormente a este processo, os resíduos alimentares liquefeitos passam para o intestino grosso onde ocorre o fim da digestão e reabsorção de água (Gartner, 2010).

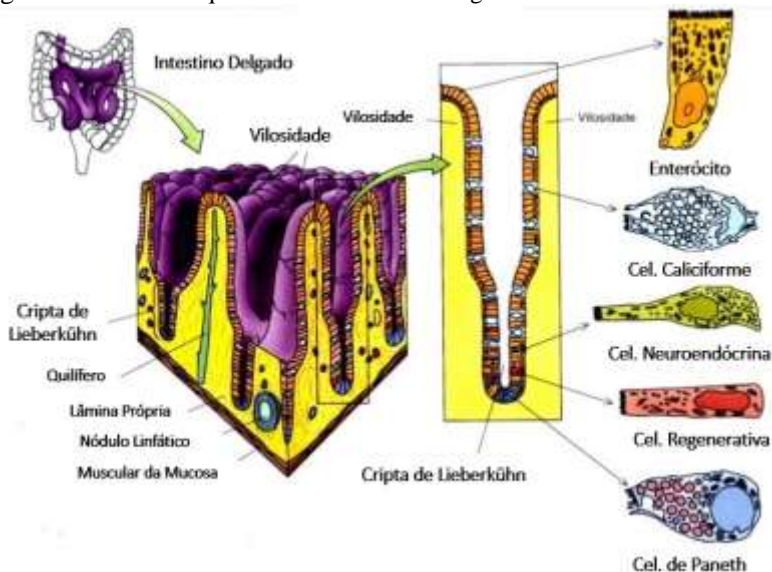
Estruturalmente, tanto o intestino delgado quanto o grosso possuem quatro camadas concêntricas distintas, sendo a camada serosa a mais externa em contato com a região intraperitoneal, seguida pela

camada muscular, submucosa até a mucosa, a mais interna (Gartner, 2017).

A camada muscular subdivide-se em duas camadas de músculo liso, a camada circular interna e a camada longitudinal externa, com plexos vasculares e nervosos entre elas. Sua função é o revolvimento e propulsão dos conteúdos luminais pelo trato digestório. Já a submucosa, constitui-se de tecido conjuntivo frouxo, com papel de sustentar fisicamente a mucosa, além de fornecer o suprimento nervoso, vascular e linfático. Circundando o lúmen intestinal, está a camada mucosa, com funções secretoras e absorptivas, possuindo, portanto, glândulas e componentes do sistema circulatório, além de uma fina camada de músculo liso responsável pela motilidade intestinal (Rao e Wang, 2010; Gartner, 2017).

O intestino delgado, em sua extensão, é subdividido histológica e anatomicamente em três regiões, o duodeno, jejuno e ílio, que apresentam evaginações da mucosa, chamadas de vilosidades e, as chamadas criptas, que são a região na base. A lâmina própria é revestida de epitélio simples cilíndrico e, a vilosidade tem por objetivo aumentar a superfície de contato com o alimento ingerido (Rao e Wang, 2010).

Figura 6- Desenho esquemático do intestino delgado.



Fonte: Adaptado pelo autor a partir de Universidade de Michigan (2018).

Como visto na Figura 6, a mucosa da vilosidade possui três tipos celulares, as células caliciformes, responsáveis pela produção de mucinogênio para hidratação e proteção física da mucosa, os enterócitos, que são células responsáveis pela absorção de nutrientes, e as células do sistema neuro-endócrino difuso (SNED) que liberam diversos hormônios. Os enterócitos possuem, ainda, uma importante maquinaria que aumenta em 20 vezes a superfície de absorção, que são os microvilos. Estes são recobertos por glicocálix, onde se encontram diversas enzimas para digestão de proteínas, gorduras e carboidratos antes da absorção (Gartner, 2017).

Nas criptas se localizam as glândulas de Lieberkühn, que em sua base, estão presentes células de Paneth que contem grandes grânulos de secreção contendo lisozimas com ação bactericida. Nas criptas, ao longo de todo o intestino, também estão presentes células fonte (células tronco intestinais) que podem se diferenciar em qualquer célula necessária na cripta ou vilosidade (Gartner, 2010).

O que diferencia histologicamente o duodeno das demais regiões do intestino delgado é a presença de glândulas específicas na submucosa, as glândulas de Brunner. Estas liberam urogastrona, um polipeptídeo responsável pela sinalização que inibe a secreção de ácido clorídrico (HCl) pelas células parietais no estômago, e uma secreção alcalina com íons bicarbonato, com intuito de elevar o pH do quimo ácido que está chegando a esta primeira porção do intestino (Yu *et al.*, 2012; Gartner, 2017).

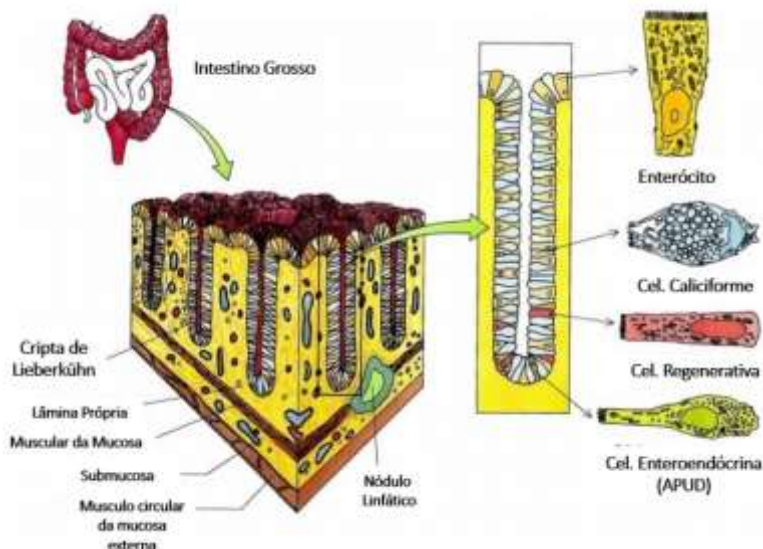
O intestino grosso é subdividido em ceco e cólon (ascendente, transversal, descendente e sigmoide), além do reto, canal anal e apêndice. As primeiras porções, ainda, possuem atividades de absorção de aminoácidos, lipídeos e carboidratos remanescentes do intestino delgado, no entanto, esta região é principalmente responsável pela absorção de água, eletrólitos e vitaminas e minerais, além de compactação das fezes para excreção. Neste sentido, esta região não apresenta mais vilosidades, como visto no esquema da Figura 7, apenas criptas na lâmina própria, com revestimento epitelial composto por enterócitos, células caliciformes, células regenerativas e poucas células SNED (Gartner, 2017).

Importante citar que esta região não possui mais as células de Paneth, com liberação de lisozimas antimicrobianas. Assim, é importante a produção de uma camada de muco para proteção física desta mucosa, e isto, justifica o aumento do número de células caliciformes nesta região, quando comparado ao intestino delgado.

Ao longo de todo intestino, além da barreira epitelial e do muco, o organismo possui outros mecanismos de defesa, que em conjunto com o sistema imunológico, agem principalmente contra patógenos. Sendo eles os peptídeos antimicrobianos, liberados a partir da ativação de receptores de reconhecimento padrão (PRR), imunoglobulinas A (IgA) e células fagocíticas como macrófagos (Yu *et al.*, 2012).

Ainda neste sentido, o tecido linfóide associado a mucosa (GALT) constituído por linfócitos intraepiteliais, células linfóides da lâmina própria, placas de Peyer e linfonodo mesentérico, representa 50% da imunidade corporal. As placas de Peyer, são agregados linfóides especializados, presentes no íleo e de forma transiente em todo o intestino grosso, e é a gênese para a imunidade da mucosa, pois processa antígenos intraluminais e estimula linfócitos T e B. Linfócitos sensibilizados na placa de Peyer, proliferam dentro do linfonodo mesentérico e migram, via ducto torácico, para a lâmina própria em diversos sítios da mucosa, onde será produzida IgA secretória (Janeway, 2006).

Figura 7 - Desenho esquemático do cólon.



Fonte: Adaptado pelo autor a partir de Universidade de Michigan, (2018).

Além disso, junções específicas entre os enterócitos garantem a integridade da barreira epitelial, como os desmossomos, junções aderentes e junções comunicantes. Estas últimas, proteínas integrais claudinas e ocludinas que, além de manter as células unidas, são responsáveis pela permeabilidade intestinal necessária. Além disso, já é sabido que bactérias comensais metabolizam fibras e amidos resistentes da dieta, a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como butirato, propionato e acetato que servem como substrato energético para enterócitos, favorecendo a manutenção na homeostase e integridade intestinal (Barczynska *et al.*, 2018). Assim sendo, fatores como inflamação intestinal, estresse oxidativo, microorganismos e componentes da dieta são os que mais interferem na integridade e permeabilidade desta barreira (Ulluwishewa *et al.*, 2011; Suzuki, 2013).

### 3.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) e/ou a diminuição das defesas antioxidantes pode causar um desbalanço oxidativo, denominado de estresse oxidativo (EO) e nitroativo, respectivamente. Essa condição pode causar efeitos deletérios e assim, ocasionar dano a estruturas celulares (proteínas, lipídios e DNA) e, ainda, induzir apoptose e gerar alterações ultraestruturais. Por outro lado, quando a produção de ERO é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que pode controlar e restabelecer o equilíbrio. Os componentes celulares não são protegidos totalmente por antioxidantes endógenos, e é bem estabelecido que antioxidantes obtidos da dieta são indispensáveis para a defesa apropriada contra a oxidação e, portanto, têm importante papel na manutenção da saúde (Halliwell e Gutteridge, 2015). Dentre os mecanismos de defesa antioxidante celular frente ao estresse oxidativo, tem-se os antioxidantes não-enzimáticos, por exemplo,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), vitamina C, e glutatona reduzida (GSH), e os antioxidantes enzimáticos como a enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona-transferase (GST) e a glutatona peroxidase (GPx) (Halliwell e Gutteridge, 2015).

#### 3.4.1 Produção de espécies reativas

A produção de EROs e ERNs é decorrente do metabolismo normal da maioria das células e desempenha diversos papéis fisiológicos como fosforilação de proteínas, ativação de fatores de transcrição,



apoptose e diferenciação celular. A maioria das células são capazes de produzir espécies reativas em determinadas circunstâncias, sendo a maioria produzida por células fagocíticas como macrófagos, polimorfonucleares (PMNs), células endoteliais e epiteliais, como os enterócitos (Aviello e Knaus, 2017).

Pode-se definir espécie reativa, de forma abrangente, como um átomo ou molécula com um ou mais elétrons desemparelhados, com capacidade de existir de forma independentemente (Halliwell e Gutteridge, 2015). As principais espécies produzidas são o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e radical hidroxil ( $\bullet OH$ ), peroxinitrito ( $ONO_2^-$ ), além de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), sendo a mitocôndria a organela responsável pela produção da maior parte destas espécies reativas no organismo.

A produção de  $O_2^{\bullet-}$  ocorre, prioritariamente, nos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, ou através de ciclo ou lipo-oxigenases e processos inflamatórios celulares. Ainda, diversas enzimas podem ter como produto final tais substâncias, sendo as NADPH oxidases (família das NOX oxidases) e xantino oxidases (XO), as principais a serem citadas (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Destaca-se que as NADPH oxidases são um conjunto enzimático montado após a ativação de fagócitos por micróbios ou produtos microbianos como lipopolissacarídeos (LPS) ou mediadores pró-inflamatórios, mecanismo chamado de “*burst oxidativo*”. Quando quiescentes, esses componentes enzimáticos estão presentes apenas no citosol e membrana interna das organelas, e quando ativado, o complexo é formado e se funde com a membrana plasmática, liberando  $O_2^{\bullet-}$  no meio extracelular ou em vesículas para fagocitose. Este complexo enzimático é, portanto, primordial para macrófagos e PMNs (Alfadda e Sallam, 2012).

O intestino, assim como o fígado, é rico em xantino oxidoreduases (XOR), que catalisam as reações para produção de ácido úrico. Essas, existem em duas formas interconversíveis, a xantina desidrogenase (XDH) e a Xantino Oxidase (XO), sendo que, o que as diferencia é o substrato preferencial de cada uma, onde a XO tem preferência pelo oxigênio molecular e o converte em  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  (Zhu *et al.*, 2012).

Em determinadas circunstâncias, como ambientes com alto estresse oxidativo e/ou inflamatório, as óxido nítrico sintases (NOs), também, podem gerar  $O_2^{\bullet-}$  e óxido nítrico ( $NO\bullet$ ). Assim também ocorre através da ativação das mieloperoxidases (MPO) presentes em fagócitos, que podem catalisar  $H_2O_2$  a ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e outras espécies

oxidantes, utilizando NO•. Neste caso, reduzindo a bioatividade do NO e induzindo EO (Garrett *et al.*, 2010).

Ainda, reações de difusão controlada entre O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> e NO, formam o ONO<sub>2</sub><sup>-</sup>, o qual possui alto poder oxidativo e de dano, através de nitração dos tecidos. Sob condições pró-inflamatórias, pode ocorrer um aumento de até 1000 vezes na produção de O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> e NO•, o que eleva drasticamente a produção de peroxinitrito (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Tanto O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tendem a ser pouco reativos em meios biológicos, contudo, na presença de metais de transição como o ferro (Fe<sup>2+</sup>) e cobre (Cu<sup>+</sup>), podem sofrer oxidações através das reações de Fenton e Haber-Weiss, produzindo •OH. Este, por sua vez, é o radical com maior potencial danoso e deletério, seja por sua alta reatividade e/ou meia-vida curta, uma vez que nenhum organismo possui enzimas com a capacidade de metabolizá-lo, dispondo apenas de defesa antioxidante através de sequestradores específicos como o caso da GSH. Assim, o •OH pode reagir com diversas estruturas como proteínas e lipídeos com consequente dano a enzimas e membranas celulares, sendo que, quando há oxidação de ácidos graxos de membranas temos o fenômeno chamado de lipoperoxidação (Halliwell e Gutteridge, 2015).

### 3.4.2 Sistema antioxidante

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que regenera ou previne a oxidação de um substrato oxidável, em baixa concentração (Halliwell e Gutteridge, 2015). Desta forma, o organismo dispõe de mecanismos que inibem e/ou eliminam espécies reativas, impedindo a formação (prevenção), ou sua ação (pelos sistemas de *scavengers*), ou por sistema de reparo e reconstrução de estruturas que possam ter sido danificadas.

Todos os organismos eucariontes possuem sistema enzimático antioxidante como proteção contra danos oxidativos. O controle da atividade dessas enzimas é determinante para a sobrevivência no ambiente aeróbico (Alfadda e Sallam, 2012).

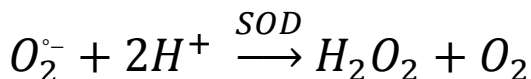
Na primeira linha de ação antioxidante, de forma resumida, estão as enzimas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD, que catalisam a reação de conversão dos radicais O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente, a enzima CAT, de forma mais específica, assim como a GPx, realizam a conversão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. Na reação catalisada pela GPx, ocorre consumo de GSH, que, no entanto, pode ser novamente convertida à sua forma reduzida pela ação da glutathion redutase (GR), às custas de NADPH. O NADPH é oriundo principalmente da via das pentoses-fosfato, na reação

catalisada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Halliwell e Gutteridge, 2015).

### 3.4.3 Antioxidantes enzimáticos

#### 3.4.3.1 Superóxido dismutase (SOD)

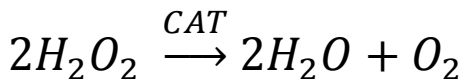
A SOD é uma metaloenzima presente em todos os tecidos, responsável pela dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  a  $O_2$  e  $H_2O_2$ , conforme a equação:



Existem diferentes tipos de SOD nos organismos, de acordo com os distintos cofatores metálicos que cada uma apresenta. As principais são, àquelas ligadas ao cobre (Cu-SOD) e/ou ao zinco (Zn-SOD), que estão presentes principalmente no citoplasma, enquanto que as que apresentam manganês em seu sítio ativo (Mn-SOD) se encontram nas mitocôndrias, e podem ter sua expressão aumentada com a elevação da concentração de ERO's (Sanchez *et al.*, 2012; Halliwell e Gutteridge, 2015). A dieta deficiente nesses metais pode levar a diminuição de sua atividade enzimática (Halliwell e Gutteridge, 2015).

#### 3.4.3.2 Catalase (CAT)

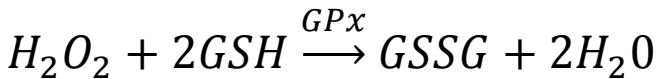
A CAT é uma hemoproteína tetramérica, responsável pelo controle das concentrações de  $H_2O_2$ , realizando a redução dessa ERO, de forma específica, a  $H_2O$  e  $O_2$  (Sanchez *et al.*, 2012), conforme a equação:



Desta forma, a catalase, também, exerce função antioxidante ao diminuir o risco de formação de  $\bullet OH$  a partir do  $H_2O_2$  via reação de Fenton (Arner *et al.*, 1999). É encontrada em células vegetais, animais e em bactérias, e se localiza nos peroxissomos e mitocôndria, com exceção nos eritrócitos, onde encontra-se no citosol.

#### 3.4.3.3 Glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR)

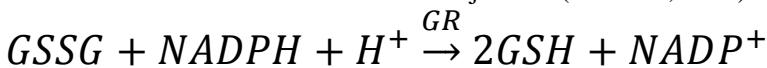
As GPx são um grupo de enzimas selênio-dependentes, por possuírem um átomo de selênio (Se) ligado a uma cisteína (selenocisteína) no seu sítio ativo. Estas enzimas trabalham em conjunção com o GSH, que está presente em altas concentrações nas células. Sua atividade, também, baseia-se em reduzir o  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , exemplificado na reação a baixo. Assim, a GPx compete com CAT para utilizar  $H_2O_2$  como substrato, sendo a GPx mais significativa na proteção contra os baixos níveis de estresse oxidativo (Valko *et al.*, 2006).



Outros peróxidos orgânicos também podem ser reduzidos por estas enzimas em seus correspondentes álcoois, onde o grupo sulfidril (-SH) da GSH atua como doador de elétrons e é oxidado para a forma glutathiona oxidada (GSSG) (Nordberg e Arner, 2001).

Diferentes isoformas da GPx são encontradas em mamíferos, e dependendo do tecido onde se encontra sua atividade pode sofrer alterações. A GPx1 encontra-se no citosol e mitocôndria, a GPx2 é mais específica do trato gastrointestinal, a GPx3 mais presente nos rins, a GPx4 está presente no citosol e membrana da maioria dos tecidos e é específica para os hidroperóxidos derivados de fosfolipídios e, a GPx5 identificada recentemente é expressa especificamente no epidídimo de ratos e é independente de selênio (Sanchez *et al.*, 2012).

Como visto, a atividade da GPx leva à oxidação da GSH em GSSG. Para manter o estado redox intracelular, é necessário evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, através da enzima GR, que regenera a GSH, ao reduzir GSSG às custas de NADPH (vide reação a baixo). Para tal, a distribuição celular da GR é a mesma da GPx (Sánchez, 2012). Estes equivalentes redutores (NADPH) para regeneração de GSSG em GSH são fornecidos pela enzima G6PD da via das pentoses. Logo, caso o fornecimento de NADPH seja prejudicado, a função antioxidante da GSH também será afetada, acarretando sérios danos ao metabolismo celular. Neste sentido, a G6PD também pode ser considerada uma enzima antioxidante co-adjuvante (Trevisan, 2008).



#### 3.4.3.4 Tiorredoxina (Trx), tiorredoxina redutase (TRxR) e tiorredoxina peroxidase

As tiorredoxinas (Trx) são pequenas proteínas com dois resíduos de cisteína capazes de sofrer oxirreduções reversíveis, encarregadas de reduzir os grupos -SH oxidados das proteínas. O controle redox de grupos -SH é essencial para regulação de diversas enzimas e/ou fatores de transcrição do DNA, influenciando, portanto, a função de diversas proteínas e sinalizações celulares. Esta proteína irá atuar doando equivalentes redutores a diversas enzimas como ribonucleotídeo redutase, metionina sulfóxido redutase e a tiorredoxina peroxidase (peroxirredoxina - Prx). A peroxirredoxina encontra-se na mitocôndria e também pode detoxificar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando-se da Trx (Arner *et al.*, 1999).

A tiorredoxina redutase (TRxR), é altamente expressa na lâmina própria intestinal, e regenera a Trx, as custas de NADPH. Esta enzima possui uma similaridade estrutural com a GR, e contém um átomo de Se e um grupo flavina em sua subunidade. Neste sentido, deficiências na disponibilidade de selênio podem ser determinantes para atividade da TRxR (Sanchez *et al.*, 2012).

#### 3.4.4 Sistema antioxidante não enzimático

Os antioxidantes não-enzimáticos podem ser produzidos no organismo, sendo a GSH o principal deles, e é encontrado em todos os organismos aeróbios. A GSH é um tiol celular de baixa massa molecular, com elevada concentração, aproximadamente 1 mM a 10 mM, nos diversos tecidos (Huber *et al.*, 2008; Halliwell e Gutteridge, 2015). Constitui-se de um tripeptídeo de ácido glutâmico, cisteína e glicina, sintetizado nas hemácias pelas enzimas  $\gamma$ -glutamilcisteína-sintetase, e glutatona sintetase com consumo de energia sob a forma de ATP (Huber *et al.*, 2008).

A GSH apresenta um radical -SH na cisteína, o qual é um aceptor de elétrons e mantém os grupos SH da célula na forma reduzida (Huber *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2015). Para regeneração de GSH na célula, existem enzimas como as glicolíticas hexoquinase e G6PD, além da gama glutamiltransferase (GGT), uma enzima de membrada (Ko *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2015).

Haja visto sua funcionalidade como antioxidante generalista de primeira linha de ação, a GSH exerce, também, um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos, processos catalisados

principalmente pela glutathione S-transferase (GST). Esta enzima catalisa o ataque nucleofílico da GSH a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofilico (Huber *et al.*, 2008).

No intestino, conforme citado, os mecanismos de defesa antioxidantes têm por finalidade manter a homeostase, integridade da barreira intestinal e, em conjunto com sistema imunológico, manter a simbiose entre bactérias intestinais e hospedeiro (Weiss e Hennet, 2017).

### 3.5 MICROBIOTA

O trato gastrointestinal possui uma colonização de bactérias, denominada microbiota, que muda de forma quantitativa e qualitativa ao longo do mesmo. A composição da microbiota intestinal é inoculada inicialmente no útero materno e durante o parto, passa por alterações significativas no primeiro ano de vida e sofre interferências ao longo da vida de acordo com a dieta, estilo de vida, utilização de fármacos, poluentes ambientais, além de localização geográfica do indivíduo (Yatsunenکو *et al.*, 2012; Goodrich *et al.*, 2014).

O termo microbiota, ou microbioma, referem-se aos microorganismos que residem sobre ou dentro de outros organismos, interagindo entre eles e/ou com o hospedeiro. Estas interações podem ser consideradas como simbióticas ou patogênicas (Barczynska *et al.*, 2018). Desequilíbrios entre simbioses e patógenos, tanto na quantidade quanto na diversidade, caracterizam a disbiose (Hooks e O'malley, 2017). Disbiose intestinal é caracterizada por redução na diversidade de bactérias dessa região, somada a alterações teciduais e/ou sistêmicas com sinalizações inflamatórias, e na interação metabólica entre bactérias e o hospedeiro (Barko *et al.*, 2018).

Estudo de revisão aponta, que a quantidade de bactérias no corpo humano pode chegar a ser a mesma do número de células deste indivíduo, sendo sua maioria, encontrada no intestino (Sender *et al.*, 2016). Como resultado, sabe-se que esse microbioma pode apresentar diversas influências no contexto de saúde e/ou doença. Em humanos, a maioria das bactérias intestinais pertencem ao filo Firmicutes e Bacteroidetes e em menor quantidade Actinobacteria e Proteobacteria (Beasley *et al.*, 2015; Sender *et al.*, 2016).

A quantidade e diversidade dessa microbiota diferencia-se ao longo do intestino de acordo com o pH, assim sendo, a composição da microbiota do intestino delgado, particularmente do duodeno, é a mais semelhante à do estômago (Beasley *et al.*, 2015), sendo colonizado com

uma diversidade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e parasitas, sendo os gêneros bacterianos *Lactobacillus* e *Enterococcus* predominantes neste local (Brooks *et al.*, 2018). O cólon é o local com a maior presença de microrganismos existentes no intestino, devido às condições apropriadas para ocorrer a fermentação e, assim sendo, favorecer sua proliferação e sobrevivência (Beasley *et al.*, 2015).

Como citado anteriormente, a composição da microbiota inicia sua formação durante período intra-uterino, a maior variabilidade microbiana intraindividual ocorre até o terceiro ano de vida, e alterações negativas caracterizando disbiose durante este período, tem alta influência no desenvolvimento do organismo, principalmente do sistema imunológico do bebê. Neste sentido, fatores como dieta, uso de antibióticos ou outros fatores ambientais como contato com toxinas e poluentes, tanto materna quanto infantil, podem influenciar neste desfecho (Cahenzli *et al.*, 2013; Riiser, 2015).

Já está claro que a microbiota intestinal converte diversas substâncias da dieta em metabolitos, que tem a capacidade de interagir de diferentes formas com o hospedeiro, através de sinais sistêmicos. No entanto, de acordo com as pesquisas, até o momento, é cedo para afirmar como cada metabólito pode interagir, de forma positiva ou negativa, no desfecho final quanto a saúde ou doença do indivíduo. Uma vez que não estão totalmente elucidados todos os possíveis metabolitos produzidos por cada bactéria ou conjunto de microbiota, de acordo com os substratos ingeridos, ou até a mescla de diferentes componentes da dieta (De Filippo *et al.*, 2010; Le Chatelier *et al.*, 2013; Heiman e Greenway, 2016).

Um dos produtos da interação entre nutrientes ingeridos e a microbiota intestinal, são os AGCC, que influenciam no metabolismo energético, apetite e regulação do sistema imunológico do hospedeiro (Fukuda *et al.*, 2011). Ainda neste sentido, tanto componentes ingeridos da dieta quanto alterações na composição da microbiota podem influenciar a produção de AGCC e, por consequência, influenciar o pH intestinal, principalmente colônico, que por sua vez, podem modular a microbiota residente (Den Besten *et al.*, 2013).

Os pesquisadores vêm buscando, a passos largos, com ajuda de modelos animais *germ-free* e técnicas de sequenciamento gênico da microbiota, elucidar sua relação com os diversos estados de saúde, em variadas populações ou situações, ou ainda, como este conjunto de bactérias se comporta de acordo com o estilo de vida e/ou substâncias que o hospedeiro entra em contato (Wu *et al.*, 2015).

Contudo, já é sabido que a saúde em geral, assim como inúmeras respostas fisiológicas e a própria homeostase intestinal do indivíduo é, essencialmente, dependente de uma adequada microbiota (Kayama e Takeda, 2016), e que essa exerce funções como digestão de alimentos (Spanogiannopoulos *et al.*, 2014), síntese de vitaminas e ácidos graxos, além do papel substancial no metabolismo e estoque energético, modulação imunológica, crescimento, desenvolvimento neurológico e, ainda, modulação do comportamento (Diaz Heijtz *et al.*, 2011; Yatsunenkeno *et al.*, 2012; Hsiao *et al.*, 2013; Yano *et al.*, 2015; Charbonneau *et al.*, 2016).

Assim sendo, alterações na microbiota já foram relacionadas às doenças inflamatórias intestinais (Chang e Lin, 2016), síndrome metabólica, obesidade e diabetes (Baothman *et al.*, 2016), doenças cardiovasculares (Yamashita *et al.*, 2016; Yamashita, 2017), câncer (Gagnière *et al.*, 2016), Alzheimer (Hu *et al.*, 2016), alterações na produção de hormônios da tireoide (Zhou *et al.*, 2014), e doenças psiquiátricas (Cenit *et al.*, 2017), incluindo o autismo (Sealey *et al.*, 2016).

### **3.5.1 Microbiota e interação intestinal**

Conforme citado, as diversas formas que microbiota intestinal pode interagir com o hospedeiro não estão completamente elucidadas. No entanto, a ativação do sistema imunológico, estresse oxidativo e inflamação desencadeados por disbiose e, aumento de permeabilidade intestinal, estão amplamente descritas na literatura científica (Kamada *et al.*, 2013; Maes *et al.*, 2013; Parekh *et al.*, 2015).

A microbiota comensal apresenta uma integração com as células epiteliais e do sistema imunológico, pela qual células epiteliais, e células dendríticas, possuem receptores, principalmente do tipo Toll-like (do inglês *toll-like like receptors* -TLR), capazes de identificar informações sobre a microbiota e estimular respostas mediadas por citocinas e quimiocinas, com intuito de manter a homeostase intestinal (Garrett *et al.*, 2010). Assim, a mucosa intestinal responde aos patógenos com respostas inflamatórias e, a bactérias comensais com sinais de tolerância imunológica (Circu e Aw, 2012; Aviello e Knaus, 2017).

Importante citar que o aumento na permeabilidade intestinal e a lesão de células intestinais são fator de perda da barreira da mucosa, com consequente translocação bacteriana, gerando alteração nos mecanismos de resposta celular ao ativar as vias de EO e produção de



mediadores inflamatórios (Neurath, 2014). Neste contexto, o desbalanço oxidativo pode comprometer os mecanismos de resposta antimicrobianas, prolongar a ativação imunológica e alterar as respostas imunes inatas e adaptativas, como ativação de fatores de transcrição, inflamação e/ou autofagia. Estes mecanismos além de prolongar a inflamação local, podem desencadear complicações crônicas como fibroses e neoplasias, além de estarem relacionadas a doenças inflamatórias intestinais ou sistêmicas como aterosclerose e obesidade (Neurath, 2014; Parekh *et al.*, 2015).

### 3.5.2 Regulação da homeostase intestinal

Na lâmina própria intestinal estão presentes diversas células imunes que auxiliam a resposta inata e adquirida e a manutenção da homeostase intestinal relacionada à microbiota. Dentre estas células, observam-se neutrófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, células dendríticas e as células linfoides inatas (Kurashima *et al.*, 2013).

A infiltração de leucócitos do tipo PMN (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) na mucosa e nas criptas epiteliais causam danos à barreira do epitélio intestinal por dano oxidativo e/ou proteólise, e sinalização através de mediadores inflamatórios. Dessa forma, a presença de PMN tem sido correlacionada com danos à mucosa vistos em pacientes com doença inflamatória intestinal, e utilizados como marcadores desta doença (Neurath, 2014).

Macrófagos e células dendríticas ativadas, secretam citocinas, como por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6), induzindo a diferenciação de células T, culminando no desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa (Kolios *et al.*, 1998; Holtmann *et al.*, 2001).

A regulação da homeostase intestinal envolve interleucinas e receptores de reconhecimento padrão (PRR's) como TLR e receptores do tipo NOD (*NOD like receptor's* – NLR's), além de regulação via estado redox, mediado por NADPH oxidases (NOX). Essas, subdivididas em dual oxidases 2 (DUOX 2), a isoenzima predominante no intestino, e NOX1 em células epiteliais, além de NOX2 presentes em macrófagos (Perez *et al.*, 2017).

Os PRR's, quando ativados por padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular pattern* - PAMP's), acionam o sistema imune inato e cascatas de sinalização via MAPK e NF- $\kappa$ B que, quando ocorrem em baixos níveis de ativação, promovem a homeostase intestinal (Lee *et al.*, 2006; Jones e Neish, 2011).

Considerado o fator gênico de regulação da inflamação, o NF- $\kappa$ B, em estados basais, garante reposição contínua do epitélio e manutenção da integridade da barreira através de ativação de ERO (Cliffe *et al.*, 2005). Baixas concentrações de NF- $\kappa$ B, representam redução da expressão de peptídeos antimicrobianos e aumento de apoptose de enterócitos, resultando em ruptura de barreira e possível translocação bacteriana (Nenci *et al.*, 2007).

A formação de ERO no intestino, em tecidos não fagocitários, possui importante papel nas vias de proliferação, diferenciação e crescimento de células epiteliais. As DUOX2 possuem um domínio homólogo a peroxidases que, quando ativadas, geram H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma Ca<sup>2+</sup> dependente. Enquanto que, NOX2 são responsáveis pela produção de superóxido. Uma alteração ou super-estimulação destas enzimas pode, portanto, ocasionar dano a estruturas, como ocorre durante a inflamação crônica. Como observado em pacientes com doença de Crohn, nos quais a expressão de DUOX2 encontra-se aumentada (Szanto *et al.*, 2005; Csillag *et al.*, 2007).

Estudos apontam que a ativação das DUOX2 através da microbiota pode ocorrer por diferentes vias no epitélio do intestino delgado e cólon, sendo que no cólon, parece ser ativada via p38 MAPK, enquanto no ílio essa ativação é mediado pelo NF- $\kappa$ B (Wu *et al.*, 2015).

NOX1 também contribui para a imunidade inata através de TLR ativados via IFN-gama, LPS e flagelina. No entanto, a DUOX2 parece ser a principal responsável pela regulação redox do sistema imunológico inato no intestino (Wu *et al.*, 2015).

A produção de ERO pode variar de acordo com diferentes tipos microbianos, sendo os *Lactobacillus* os maiores indutores. Este gênero de bactérias gram-positivas ativa rapidamente a produção fisiológica de ERO via NOX1 em porções finais do intestino delgado e cólon, induzindo proliferação celular (Neish, 2013). Ainda, em estudo no qual houve monocolonização de camundongos com bactérias filamentosas segmentadas (do inglês *Segmented Filamentous Bacteria* – SFB), houve superexpressão da DUOX2 tanto no ílio quanto no cólon (Grasberger *et al.*, 2015). Por outro lado, em outro estudo, camundongos *Germ-free*, apresentaram ausência na produção de ERO e, conseqüente, supressão de crescimento epitelial (Perez *et al.*, 2017).

A produção aumentada de ERO por macrófagos, tem por finalidade aumentar a capacidade de controlar bactérias patogênicas e invasões microbianas (Cheng e Lambeth, 2004).

Devido a esta capacidade de interação das bactérias, principalmente simbióticas, a produzir ERO como biossinalizador

celular, acredita-se que esta seja uma forma de evolução ancestral da conexão entre células do hospedeiro e micróbios, ressaltando a importância das bactérias na manutenção da homeostase intestinal.

### 3.6 MICROBIOTA E GLIFOSATO

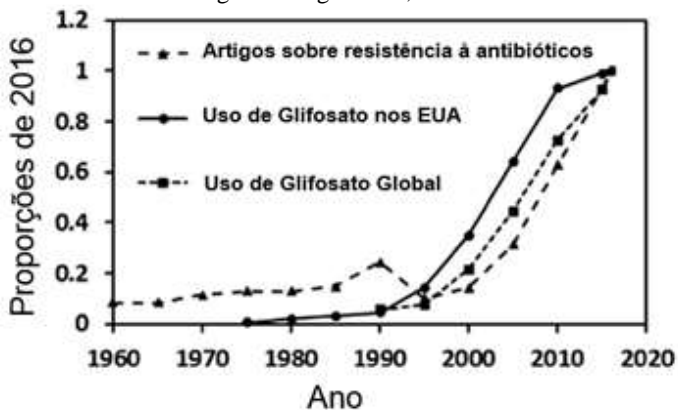
Considerando-se que mecanismo de ação do glifosato está associado a inibição da enzima EPSPS, presente em algumas bactérias, sugere-se que a microbiota possa sofrer influência através do contato do hospedeiro com o herbicida. Estudos demonstram inibição no crescimento de grupos bacterianos, como de *Lactobacillus* ssp. (Clair, Linn, *et al.*, 2012), e de *L. delbrueckii* (Wang e Sugiyama, 1984; Parente e Hill, 1992) por glifosato. Além disso, estudos *in vitro* já demonstram alterações na microbiota de suínos e ruminantes após a incubação com glifosato (Shehata *et al.*, 2013; Ackermann *et al.*, 2015).

As alterações ocasionadas pelo glifosato em microorganismos podem afetar negativamente outros mecanismos de homeostase no hospedeiro. Por exemplo, quando se observa que o glifosato afeta as bactérias produtoras de ácido láctico, como já descrito por Clair e seus colaboradores (2012) e Krüger e seus colaboradores (2013), as quais são bactérias responsáveis pela produção de antibióticos que controlam bactérias patogênicas como *Clostridium botulinum*.

Ao analisar os efeitos do herbicida no desenvolvimento de determinadas bactérias, assim como o oposto, uma aparente resistência de determinadas bactérias ao glifosato, já descritos na literatura, uma recente revisão realizada por Van Bruggen e seus colaboradores (2018), aponta uma possível correlação entre este fator, levando em consideração o crescente aumento na resistência a antibióticos observados nos últimos anos e o uso do herbicida no contexto mundial bem como nos EUA (Figura 8).

Isto exposto, a intensificação no uso deste herbicida, assim como seu potencial em desencadear desequilíbrios fisiológicos culminando em diversas doenças, tem despertado atenção e a necessidade de entender os mecanismos envolvidos neste processo (Van Bruggen *et al.*, 2018).

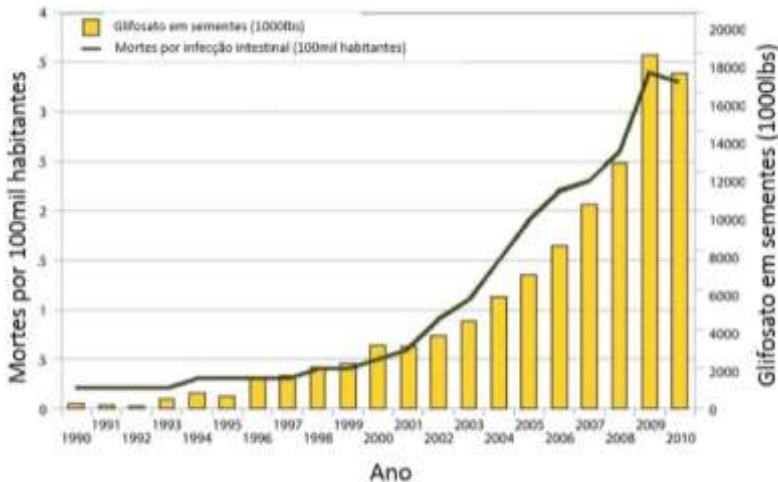
Figura 8- Proporção entre artigos relacionados à resistência a antibióticos, uso de glifosato nos EUA e uso global de glifosato, do ano de 1960 a 2016.



Fonte: Adaptado pelo autor de Van Bruggen e colaboradores (2018).

Neste mesmo sentido, ao saber da importância da homeostase da microbiota para manter a integridade da barreira intestinal, assim como proteção contra infecções por patógenos, tem sido sugerida uma associação positiva entre o aumento no uso de glifosato e morte por doenças intestinais nos EUA (Samsel e Seneff, 2013) (Figura 9).

Figura 9- Associação entre aumento no uso de glifosato e casos de morte por infecções intestinais nos EUA, entre 1990 e 2010.



Fonte: Adaptado pelo autor de Samsel e Seneff (2013).

Somado as informações expostas, os potenciais prejuízos à saúde intestinal advindos do estresse oxidativo e inflamação crônica, assim como as inúmeras doenças atualmente associadas à disbiose intestinal, pretende-se com este estudo investigar a influência da exposição materna ao herbicida HBG na microbiota intestinal, estado redox, inflamação, além de alterações na histomorfologia do intestino de ratos imaturos.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS

Ratas fêmeas prenhas (linhagem Wistar) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, foram mantidas em gaiolas plásticas e expostas a um ciclo claro/escuro 12/12h em sala climatizada com temperatura em 21°C, com ração e água *ad libitum*. Todos os animais foram monitorados e mantidos conforme as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Universidade (CEUA/UFSC#8510150517). As fêmeas gestantes foram colocadas em caixas individuais, e padronizadas o tamanho da ninhada em 8 filhotes por rata. O dia do parto foi definido como dia 1 de vida dos filhotes, e o dia 15, o dia da eutanásia dos mesmos.

### 4.2 TRATAMENTO COM ROUNDUP®

Ratas fêmeas prenhas foram expostas a 1% de Roundup® (equivale a 0,36% de glifosato) na água de beber (Darwich *et al.*, 2001; Beuret *et al.*, 2005; Cattani *et al.*, 2014) a partir do 5º dia gestacional e o tratamento prosseguiu até os filhotes completarem 15 dias de idade, que corresponde ao período imaturo de desenvolvimento. Os animais controles receberam água durante o mesmo período. A concentração escolhida para a exposição *in vivo* foi apoiada na dosagem na qual não foram observados efeitos adversos para a toxicidade materna ao glifosato, que foi de 1000 mg/Kg de massa corporal/dia (Williams *et al.*, 2000). No dia do experimento, os filhotes foram eutanasiados por decapitação e coletadas porções do duodeno e colón distal. Os intestinos foram removidos, extraídas as fezes da porção final do cólon e, depois cortados e homogeneizados em tampões específicos dependendo da análise bioquímica a ser executada. Uma fração de cada tecido foi separada para realização de cortes histológicos.

### 4.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Para avaliação de estresse oxidativo foram determinadas as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR, GST e TRxR, além de um marcador de dano oxidativo a lipídios (TBARS) em porções do duodeno e colón final, homogeneizadas em tampão fosfato

de potássio 20 mM, pH 7,4, 0,1% triton X-100, 150 mM de NaCl. Uma alíquota de cada amostra foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry *et al.* (1951).

#### 4.4 SUPEROXIDO DISMUTASE (SOD):

O teste de atividade da SOD se baseia na oxidação da adrenalina que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, o qual é mensurado em 480 nm. O método foi realizado segundo descrito por (Misra e Fridovich, 1972) e modificado por (Boveris *et al.*, 1983), pelo qual uma alíquota da amostra, de 5 a 40  $\mu\text{L}$ , foram acrescentados 200 $\mu\text{L}$  de tampão glicina 50 mM, pH 10.2, seguido pela realização de uma leitura pontual utilizando leitora de microplacas. Após, foi adicionado uma solução com adrenalina 60 mM (pH em torno de 2.0, gelo e frasco âmbar), seguido pelo monitoramento da reação por 10 minutos. A adição da adrenalina retarda a oxidação e consequentemente a produção de adenocromo através da enzima SOD. Curvas de 3 ou 4 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD (USOD/mL) foram expressos em termos de atividade da enzima, pela qual uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo.

#### 4.5 CATALASE (CAT):

A atividade da CAT foi determinada através do método baseado na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato 50 mM pH 7,0. Adicionou-se 2 mL desta solução em cada poço da microplaca, com 20 $\mu\text{L}$  do homogeneizado das amostras de duodeno e porção final do cólon, em seguida realizou-se leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 30 segundos (Aebi, 1984). Os valores foram expressos em  $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ .

#### 4.6 GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

A reação para determinação enzimática da GPx é baseada na velocidade de oxidação do NADPH, que é proporcional à atividade de GPx na amostra. Na reação, ocorre redução de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, que é catalisada pela GPx, e consequente regeneração de GSH através da enzima GR, com oxidação de NADPH em 340 nm (Flohe e Gunzler,



1984). Para a realização da técnica, foi preparado um meio de reação contendo 25 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) a 5 mM, 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH, e 5 U de GR, no momento do ensaio. Em seguida, foram adicionados 10  $\mu$ L de t-BuOOH e 10  $\mu$ L do homogeneizado de porções do duodeno e cólon final, em 1 mL de um meio de reação na microplaca. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ .

#### 4.7 GLUTATIONA REDUTASE (GR)

A atividade enzimática de GR foi também mensurada em 340 nm, de acordo com a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de GSH, a partir da GSSG, pela ação desta enzima presente na amostra. Segundo o método de (Carlberg e Mannervik, 1985) um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de glutationa oxidada e DPTA 5 mM foi adicionado na microplaca (200  $\mu$ L), com a adição de 5  $\mu$ L da amostra de homogeneizadas de duodeno e porção final do cólon, deu início à reação que foi monitorada durante 3 minutos, gerando uma curva descendente. Os valores da atividade desta enzima foram também expressos em  $\mu\text{mol. g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ .

#### 4.8 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

A atividade da GST foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Habig e colaboradores (1974). A reação baseia-se na capacidade da GST em conjugar GSH no substrato, formando uma substância mensurável em 340 nm, monitorada durante 3 minutos. A amostra foi adicionada a um meio contendo 5  $\mu$ L de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) (substrato), 5  $\mu$ L de GSH 0,1 M e 250  $\mu$ L de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ .

#### 4.9 TIORREDOXINA REDUTASE (TRxR)

A TRxR foi determinada pelo método descrito por Arnér e colaboradores (1999), em que o DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico), é utilizado como substrato na reação. O TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico), de cor amarela, possui absorbância máxima em 412 nm, e é resultado da reação catalisada pela TrxR com consumo de NADPH. 36 $\mu$ L da amostra foi adicionada ao meio contendo 160 $\mu$ L de

tampão fosfato 100 mM pH 7,0, EDTA 10 mM, DTNB 5 mM e 0,2 mg/mL de BSA (soro albumina bovina) e foi feita leitura pontual. Em seguida, foi adicionado 4  $\mu$ L NADPH e feita leitura cinética por 5 minutos no espectrofotômetro a 412 nm. A atividade da TrxR foi determinada pelo aumento da absorbância após a adição de NADPH.

#### 4.10 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) E NITROGÊNIO (ERNs):

A formação de EROs foi medida utilizando a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA), enquanto para formação de ERNs foi utilizada dihidrorodamina (DHR), permeáveis as células. Esterases celulares hidrolisam a sonda para o não fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF), que é retido nas células, na presença de EROs e peroxidases celulares, H<sub>2</sub>DCF é transformada no 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), substância altamente fluorescente. Na presença de ERNs e peroxidases celulares, DHR 123 é convertido no fluoróforo Rhodamina - 123 (Halliwell e Whiteman, 2004). Porções do duodeno e cólon final foram homogeneizadas em solução contendo fosfato de sódio 20 mM e KCl 140 mM, pH 7,4, e posteriormente centrifugadas (960 x g por 10 min a 4°C). Em placa de fundo escuro de 96 poços, foram adicionados 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>DCFDA ou DHR 123 1 mM (preparado em DMSO e protegido da luz), e 90  $\mu$ L de sobrenadante das amostras, seguido de uma incubação no escuro a 37°C por 30 min. Os produtos foram detectados em comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias, sendo os valores corrigidos pela concentração de proteína de cada amostra.

#### 4.11 DANO OXIDATIVO - PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para avaliar o dano oxidativo a compostos lipídicos foi utilizado método de (Bird e Draper, 1984) realizado no homogeneizado através da detecção de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o produto majoritário, malondialdeído (MDA). O método consiste na precipitação do homogenizado (100  $\mu$ L) com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 12%, seguido da incubação em 900  $\mu$ L de tampão tris-HCl 60 mM 7,4 e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 min. a 100 °C. Posteriormente, o material foi resfriado em banho de gelo, centrifugado (5.000 x g por 5 min), e a mensuração

do cromóforo rosa foi detectada 535 nm. Os valores foram expressos em nmol MDA.g<sup>-1</sup>.

#### 4.12 CONTEÚDO DE GSH:

Os níveis de GSH foram medidos em porções do duodeno e cólon final, homogeneizados em ácido tricloroacético 12% (1:10, P:V), e usado o sobrenadante após centrifugação. As análises foram feitas em duplicata, segundo o método descrito por (Beutler *et al.*, 1963), que baseia-se na reação da GSH com DTNB (5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) formando um ânion conjugado, TNB (ácido tionitrobenzóico) de cor amarelada. Foi utilizada uma alíquota de 50 µL das amostras, acrescentada em 950 µL de Tampão Fosfato 0,2 M pH 8,0, seguida da adição de 100 µL de DTNB 2,5 mM. A máxima formação de TNB, foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em gráficos como conteúdo de GSH em mmol/µg proteína.

#### 4.13 INFLAMAÇÃO

Para determinar marcadores de inflamação, foram dosadas as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 e a atividade de mieloperoxidase (MPO) em porções do duodeno e cólon final.

##### 4.13.1 Citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ e IL-6)

Para análise das concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-6, foram utilizados *kits* comerciais disponíveis (BD Biosciences®) com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina. As concentrações das citocinas foram mensuradas utilizando a técnica de ELISA tipo sanduíche, realizados de acordo com as instruções do fabricante, e os valores realizadas por meio da medida colorimétrica em 450 nm, em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). As concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-6 foram expressos em pg/mg de proteína (Pedran *et al.*, 2015).

##### 4.13.2 Atividade de mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO foi mensurada segundo o método descrito por Rao e colaboradores (1993). Primeiramente, 20 µL da amostra foi transferida para placas contendo 150 µL de meio de reação (0,167

mg.mL<sup>-1</sup> de odianisidina 2HCl, 0,0005% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O destilada e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM). Após 30 min de incubação em temperatura ambiente a reação foi interrompida com a adição de 30 µL de azida sódica 1%. Após incubação de 10 min à temperatura ambiente, a densidade óptica foi medida em 450 nm em placas de Elisa e comparadas com uma curva padrão de atividades conhecidas de MPO (0,7 a 140 mU.mL<sup>-1</sup>).

#### 4.14 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

Os resultados bioquímicos foram normatizados de acordo com o conteúdo de proteínas obtidas nas amostras. A concentração de proteínas foi avaliada pelo método de Lowry e colaboradores (1951) e uma curva padrão de albumina de soro bovino (Sigma®) foi utilizada para calcular a concentração de proteína nas amostras.

#### 4.15 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAIIS

Para análise morfométrica e contagem de células caliciformes em porções de duodeno e cólon final, foram montadas lâminas para microscopia de luz (ML), com coloração de Hematoxilina/Eosina e Acido Periodico de Schiff (PAS)/Alcian Blue, respectivamente.

Para demais análises ultraestruturais foram realizadas imagens com metodologias de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de Varredura (MEV).

##### **4.15.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV)**

Para análise ultraestrutural das amostras, após a eutanásia, porções do duodeno e cólon final foram imersas em solução fixadora constituída de glutaraldeído (GTA) 2,5% e tampão cacodilato de sódio (Caco) 0,1 M (pH 7,2) por 24 horas, seguidos de três lavagens com o mesmo tampão.

Para a MET, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, durante 2 horas a temperatura ambiente. Foram realizadas 3 lavagens, de 10 minutos cada, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Após as lavagens, as amostras foram desidratadas em uma série acetônica crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), 15 minutos em cada etapa. A última série de acetona 100% foi trocada duas vezes. O material foi então infiltrado com resina Spurr em séries graduais de acetona-resina Spurr durante três dias, seguido de duas infiltrações em resina pura por 12 horas, e

polimerizado em estufa a 70°C por 24 horas. Foram realizadas secções ultrafinas em ultramicrotomo Leica acoplado à navalha de diamante, e contrastadas por 10 minutos com acetato de uranila 1% e posteriormente por 10 minutos com citrato de chumbo 1%, de acordo com Reynolds (1963). As amostras foram observadas e fotografadas em MET, marca Jeol, modelo JEM 1011 do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC.

Para MEV, após a fixação e lavagem seguiu para a desidratação com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), sendo 15 minutos em cada etapa, sendo submetidas ao ponto crítico de CO<sub>2</sub>. Após secas foram aderidas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla-face e cobertas com 20 nm de ouro, em metalizador marca Baltec, modelo CED 030. Posteriormente as amostras puderam ser observadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Jeol, modelo JSM-6390LV, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC.

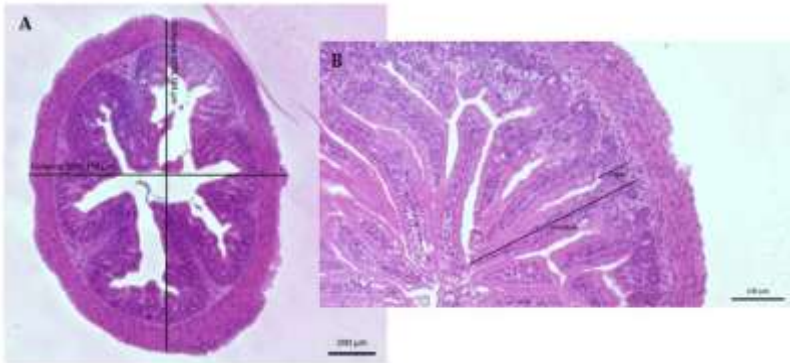
#### **4.15.2 Microscopia de luz**

Porções dos órgãos com cortes transversais do duodeno e cólon final, de 4 animais do grupo controle e 4 animais do grupo tratado, foram imersos em solução fixadora contendo paraformaldeído 4% e tampão fosfato de sódio 0,1M, pH7,2, por 12 horas. Posteriormente processados com uma sequência de lavagens com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, e em seguida, desidratados em etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), durante 15 minutos cada. A pré-infiltração e a infiltração foram feitas com historesina glicolmetacrilato, e finalmente emblocados na mesma resina com adição do endurecedor. Para obtenção das lâminas, os blocos foram cortados em micrótomo, com 4 nm de espessura e dispostos 4 cortes por lâmina. Para coloração das amostras foram utilizadas as técnicas de HE, e PAS/Alcian Blue, segundo métodos descritos por (Junqueira e Junqueira, 1983) e Lindén e colaboradores (2008), respectivamente.

Foram realizadas capturas de imagens com equipamento digitalizador de imagens Axio Scan e analisadas com sistema Zeiss Blue, na objetiva de 10X para as medidas morfométricas das lâminas coradas em HE e, 40x para contagem de células caliciformes em lâminas coradas com PAS/Alcian Blue. Para medida da luz intestinal, tanto do duodeno e cólon distal, foram realizadas medidas do diâmetro vertical e horizontal externo, com posterior obtenção da sua média aritmética, de

cada corte (Figura 10A). As medidas das vilosidades do duodeno foram realizadas considerando todas as vilosidades integras de 3 regiões diferentes por corte, sendo a vilosidade correspondente a distância desde o ápice da vilosidade até o término da camada serosa, descontando o tamanho da cripta (Figura 10B). A contagem de células caliciformes foi realizada estipulando uma área de 150  $\mu\text{m}$  X 150 $\mu\text{m}$ , de 3 regiões aleatórias de cada corte.

Figura 10- Imagem demonstrativa da realização das medidas de diâmetro (A) e altura da vilosidade (B) em cólon (A) e duodeno (B).



Fotografias de (A) cólon de rato de 15 dias em objetiva de 10X com demonstração das medidas para aferição de diâmetro, (B) fotografia de fatia de duodeno de rato de 15 dias em objetiva de 20X para demonstração das medidas de altura da vilosidade. Fonte: do autor

#### 4.16 ANÁLISE DA MICROBIOTA

Para avaliação da microbiota as fezes foram coletadas da porção final do cólon de 7 animais na hora da eutanásia, e acondicionadas em freezer, à  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de DNA e realização da reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR), utilizando *primers* específicos para diversos componentes bacterianos da microbiota comensal.

Os primers utilizados foram Eubactéria, *Bacteroides fragilis*, Firmicutes, Bacteroidetes e Enterobacteriaceae e seguem na Tabela 2.

#### 4.17 EXTRAÇÃO DE DNA DAS FEZES

O DNA total das fezes foi extraído utilizando o QIAamp DNA Stool kit (QIAGEN, Biotecnologia Brasil Ltda., Brasil). O Kit permite uma rápida purificação de DNA genômico bacteriano de alta qualidade a partir de amostras de fezes frescas ou congeladas, com Buffer's específicos fornecidos no *Kit*. O procedimento compreende 3 estágios: Lise de amostras de fezes em tampão ASL, adsorção de impurezas para a matriz InhibitEX e purificação do DNA nas colunas de rotação do QIAamp.

Tabela 2- Listagem dos primers e sua respectiva temperatura de anelamento.

	<i>Primer</i>	<i>T</i> °C
<b>Eubacteria</b> (Amann et al., 1990)	UNIeu340-F- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	63°C
	UNIeu514-R- ATTACCGCGGCTGCTGGC	
<b>Bacteroides fragilis</b> (Dore et al., 1998)	Bact285-F- GGTTCTGAGAGGAGGTCCC	61°C
	UNI338Bf-R- GCTGCCTCCCGTAGGAGT	
<b>Firmicutes</b> (Mirpuri et al., 2014)	Firm-F- GAGYATGTGGTTTAATTCTGAAGCA	63°C
	Firm-R- AGCTGACGACAACCATGCAC	
<b>Bacteroidetes</b> (Mirpuri et al., 2014)	Bctes-F- GGTTCTGAGAGGAGGTCCC	63°C
	Bctes-R- GCTGCCTCCCGTAGGAGT	
<b>Enterobacteriaceae</b> (Mirpuri et al., 2014)	Entero-F- GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	60°C
	Entero-R- GCCTCAAGGGCACAACCTCCAAG	

Resumidamente, cada amostra fecal foi pesada em microtubo de 2 mL e adicionado 1,4 mL do tampão de Lise (ASL). A amostra foi então homogeneizada por 3 minutos e agitado por 1 minuto no vórtex, o

homogeneizado foi aquecido em banho seco por 5 minutos à 95°C, seguido de vórtex e centrifugação por 1 minuto para precipitação de *pellet*. Em um novo microtubo foram pipetados 1,2ml do sobrenadante e adicionado tablete InhibitEx, seguido de vórtex e centrifugação por 3 minutos (14mil rpm). O sobrenadante foi mais uma vez centrifugado por 3 minutos e 200µl destes foram adicionados à 15µl de proteinase K com 200µl de Buffer AL, agitado em vórtex e levado ao banho aquecido à 70°C por 10 minutos. 200 µl de etanol 100% foram adicionados ao lisado e transferidos para a coluna de centrifugação QIAamp, onde o DNA é retido após seguidas centrifugações com 500µl de Buffer AW1 e Buffer AW2 (a cada centrifugação o filtrado foi descartado), finalizando a extração ao transferir a coluna para um novo microtubo, adicionado 50µl de água para PCR, seguido de centrifugação por 1 minuto e armazenamento do filtrado à -20°C para posterior utilização na reação de PCR.

#### 4.18 REAÇÃO DE qPCR

O procedimento foi utilizado em triplicata, com 1µl de cada primer específicos para o gene 16S rRNA referenciados na Tabela 3, 1µl de cDNA de amostra, 2µl de água e 5µl de RT SYBR Green ROX (qPCR Mastermix - Quiagen), somando se um volume final de 10µl para reação realizada em Termociclador de PCR em Tempo Real HT7900 com software de análise de dados SDS 2.4. Para controle negativo foi utilizado água ao invés de cDNA. O protocolo seguido foi de pré-aquecimento à 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15s e temperatura de acordo com cada primer (Tabela 2) por 45s, seguido de curva de Melting à 95°C por 15s, 60°C por 15s e novamente 95°C por 15s.

Para validar a especificidade da sequencia de DNA amplificada com a utilização do RT SYBER Green e a eficiência da amplificação, foi realizada PCR convencional e eletroforese em gel de agarose com obtenção de bandas referentes ao tamanho do fragmento de DNA esperado (500pb) para a amostra DNA bacteriano avaliado, e na qPCR encontradas curva de dissociação única com a referida temperatura de *melting*, conforme Tabela 2, para cada primer, respectivamente (Oliveira, 2010).

O cálculo da quantificação relativa de cada alvo bacteriano, foi realizada através do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  e considerado o peso das fezes de cada animal. Onde  $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{amostra} - \Delta CT_{referência}$ . Nesta equação  $\Delta CT_{amostra}$  é o valor de CT de cada amostra normalizada e



$\Delta$ CT referência é o valor de CT para o controle normalizado conforme descrito em Horai e colaboradores (2015).

#### 4.19 pH FECAL

Amostras de fezes foram coletadas da porção final do cólon na hora da eutanásia, diluídos 1:1 com água milliQ, vortexadas e centrifugadas por 6 minutos e transferidas para tubos onde o pH foi mensurado (pHmetro PHS-3E - precisão de 0,01 pH) de forma aleatória após calibração.

#### 4.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste “t” de Student ou ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni, quando necessário, utilizando-se o programa Software Prisma 5.0. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.



## 5 RESULTADOS

O modelo experimental utilizado neste trabalho foi de exposição materna ao HBG durante os períodos gestacional e lactacional, com o intuito de avaliar as alterações bioquímicas e histomorfológicas induzidas no duodeno e cólon da prole aos 15 dias de idade, além de possíveis alterações na microbiota intestinal. A apresentação dos resultados foi organizada em 3 partes de acordo com a porção do intestino que estava sendo investigada e as fezes:

(1) Efeitos da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação sobre parâmetros bioquímicos e histomorfológicos no duodeno de ratos imaturos;

() Efeitos da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação sobre parâmetros bioquímicos e histomorfológicos na porção final do cólon de ratos imaturos;

(3) Efeitos da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação sobre parâmetros de inflamação e microbiota de ratos imaturos.

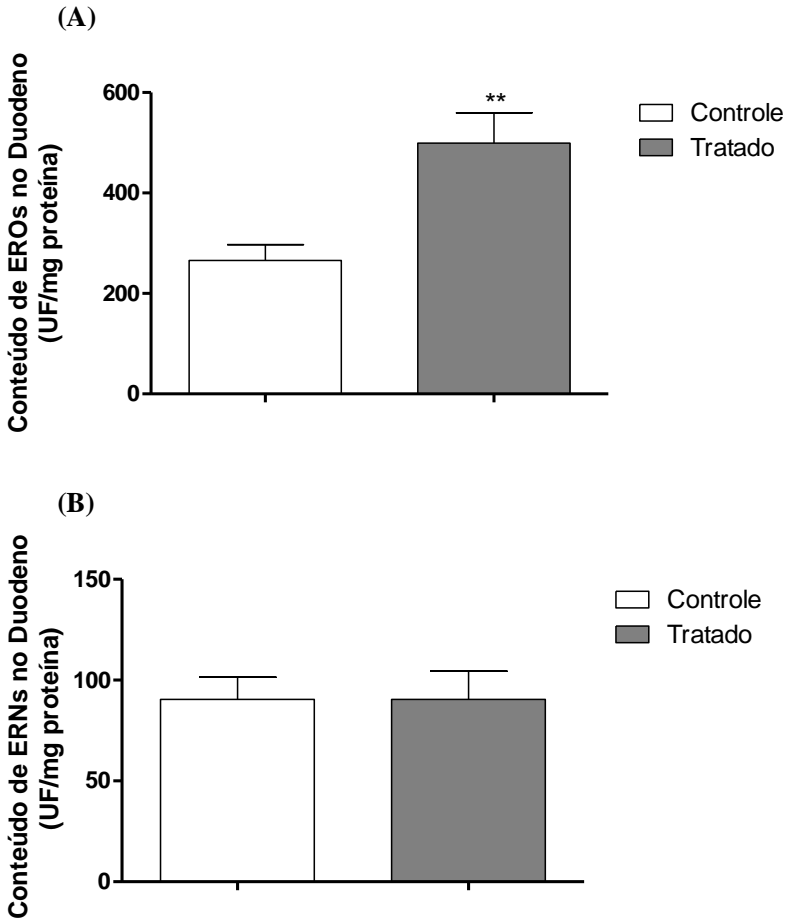
### 5.1 RESULTADOS PARTE 1 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO HBG DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HISTOMORFOLÓGICOS NO DUODENO DE RATOS IMATUROS

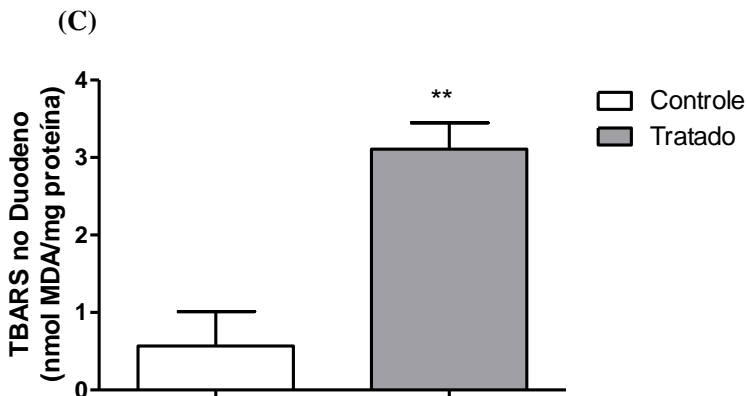
#### 5.1.1 Efeitos da exposição ao HBG sobre parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo

O estresse oxidativo no intestino de ratos expostos indiretamente ao HBG foi avaliado por meio da quantificação da peroxidação lipídica e do conteúdo de ERO e ERN, utilizando a técnica de TBARS e as sondas fluorescentes H<sub>2</sub>DCFDA e DHR, respectivamente.

Os resultados mostraram aumento na produção de ERO sem alterar a produção de ERN no duodeno dos filhotes expostos ao HBG (Figura 11A e 11B). Corroborando o aumento na produção de ERO, observou-se aumento na peroxidação lipídica em homogeneizado de duodeno desses animais (Figura 11C).

Figura 11- Efeitos da exposição gestacional ao HBG na concentração de espécies reativas de oxigênio (A) e nitrogênio (B), e de peroxidação lipídica (C), no duodeno de ratos imaturos.





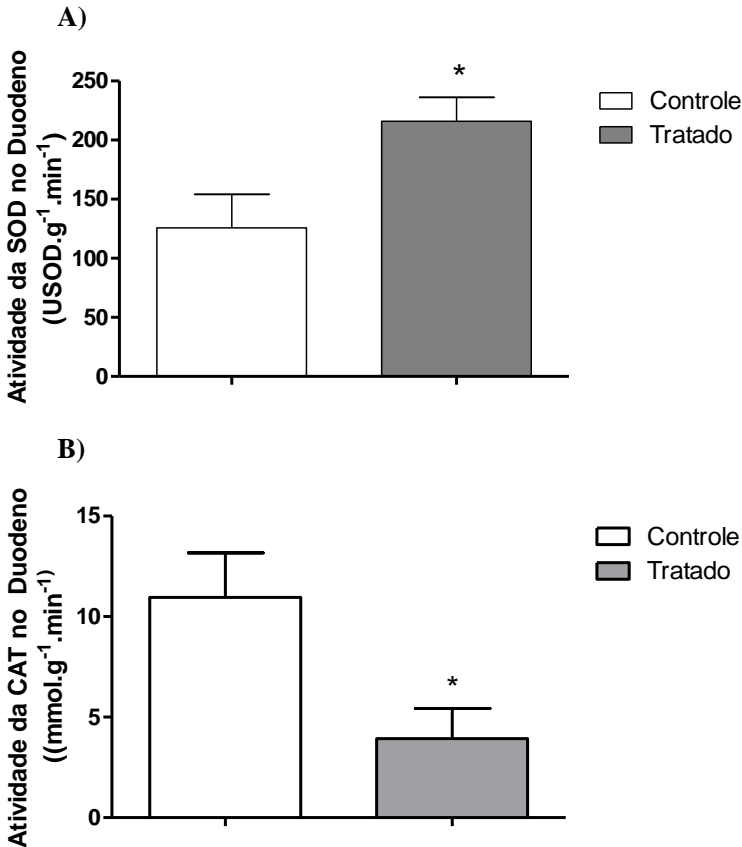
A concentração de EROs foi determinada pela oxidação do H<sub>2</sub>DCF a DCF, e a formação de ERNs através da oxidação de DHR 123 que é convertido ao fluoroforo Rhodamina - 123. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. \*\*  $p < 0,01$ .

Uma vez estabelecido aumento de ERO e dano oxidativo aos lipídeos no duodeno dos filhotes após exposição materna ao herbicida HBG, foram avaliadas as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas nesse tecido.

A SOD é a enzima que protege a célula do efeito do O<sub>2</sub><sup>-</sup> ao catalisar a reação que produz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, esse por sua vez é tóxico para a célula, mas pode ser eliminado a partir da reação catalisada via enzima CAT à H<sub>2</sub>O. Ainda, este composto pode ser detoxificado através dos outros dois ciclos independentes, um que envolve GPx e GR, com utilização de GSH e gasto de NADPH, e outro envolvendo Prx/Trx,

Os resultados indicam que a exposição ao pesticida no duodeno gerou aumento na atividade da enzima SOD, enquanto observou-se uma diminuição na atividade da CAT, conforme Figura 12 (A e B, respectivamente).

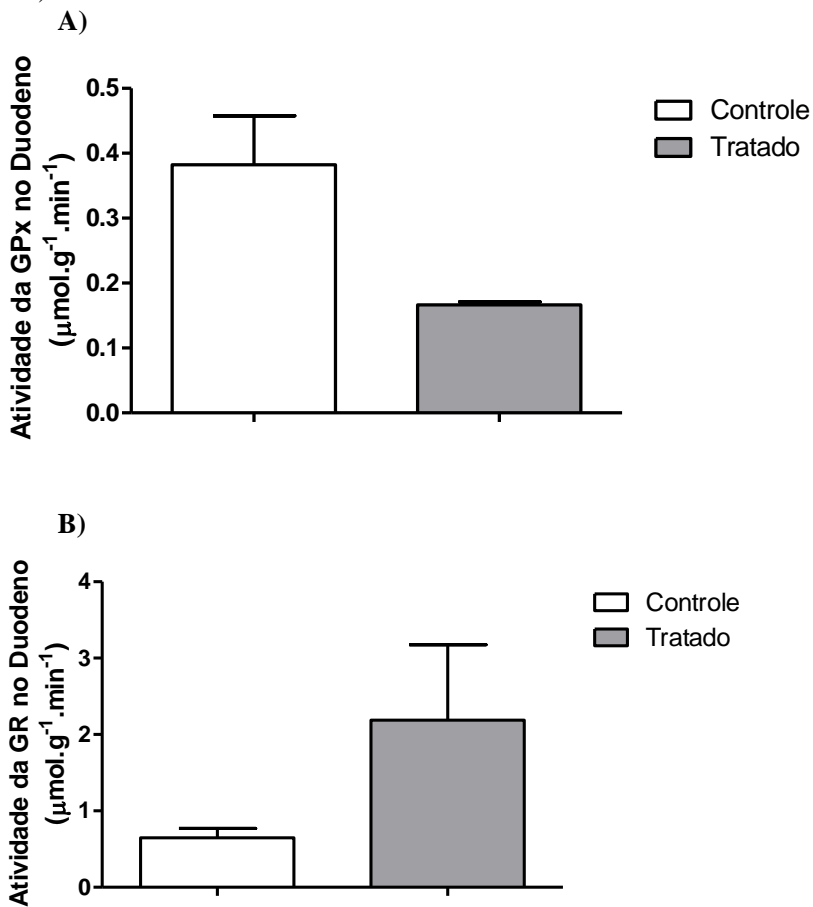
Figura 12- Efeitos da exposição gestacional e lactacional ao HBG na atividade das enzimas: (A) superóxido dismutase (SOD) e (B) catalase (CAT) em duodeno de ratos imaturos.

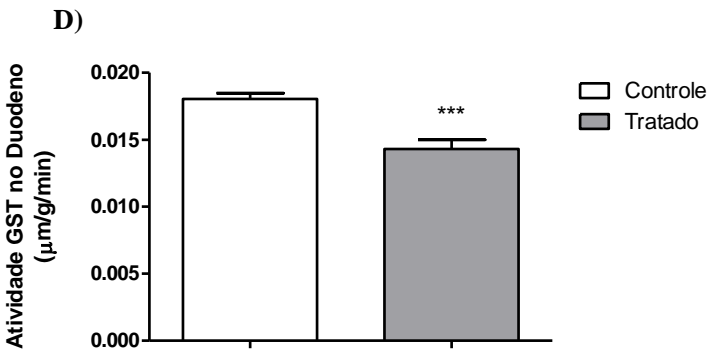
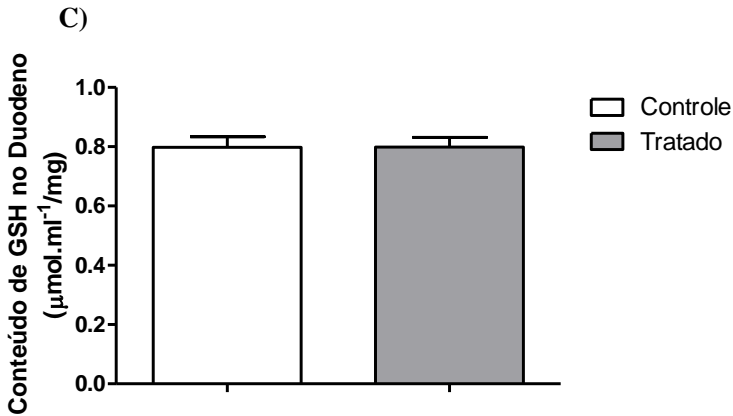


Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. \*  $p < 0,05$ .

A detoxificação do  $H_2O_2$  pode ser realizada pela CAT bem como pela via ciclo da GPx e GR, com consumo de GSH. A GPx converte  $H_2O_2$  em  $H_2O$  às custas da oxidação da GSH em sua forma oxidada (GSSG) e a GR, por sua vez, regenera GSSG a GSH às custas da oxidação de NADPH. A exposição ao HBG durante a gestação e lactação não alterou a atividade da GPx e de GR no duodeno da prole, assim como o conteúdo de GSH, quando comparado ao grupo controle.

Figura 13- Efeitos da exposição materna ao HBG na atividade das enzimas (A) Glutaciona Peroxidase (GPx) e (B) Glutaciona Radutase (GR), no conteúdo de (C) Glutaciona reduzida (GSH) e na atividade de Glutaciona S Transferase (GST) em duodeno de ratos imaturos.





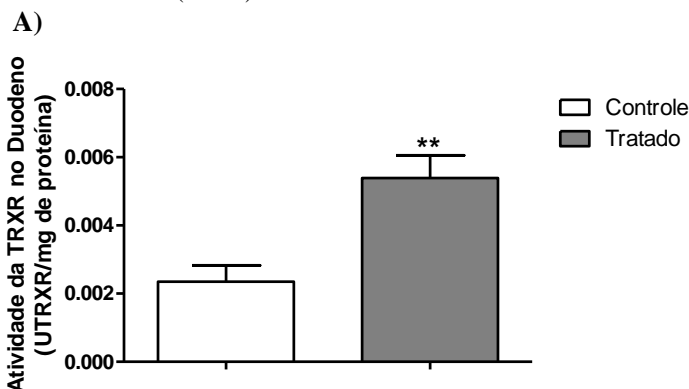
Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. \*  $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$ .

Outra forma de detoxificação de compostos xenobioticos é através da conjugação destes com GSH através da enzima GST. Como representado na Figura 13D a atividade da mesma apresenta-se diminuída no grupo tratado, quando comparado ao controle.

Assim como a GR, a tioredoxina redutase (TRxR) está envolvida no processo antioxidante participando do sistema Prx/Trx, que também pode detoxificar peróxidos. A Prx atua convertendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , as custas de Trx, enquanto a TRxR restaura os níveis desta, as custas de NADPH. Como apresentado na Figura 13, a atividade da TRxR está aumentada nos animais expostos ao HBG.



Figura 14- Efeitos da exposição materna ao HBG na atividade da enzima (A) Tiorredoxina Redutase (TRxR) no duodeno de ratos imaturos.



Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. \*  $p < 0,05$ .

### 5.1.2 Efeitos da exposição ao HBG sobre parâmetros histomorfológicos do duodeno

Considerando-se que desbalanço no estado redox pode induzir estresse oxidativo e estar associado a dano mitocondrial e comprometimento estrutural e funcional de órgãos e tecidos, o presente estudo investigou as possíveis alterações histomorfológicas ocasionadas no duodeno dos filhotes após exposição materna ao HBG durante a gestação e aleitamento. Para tanto, foram realizadas preparações histológicas e análise por microscopia de luz, MET e MEV.

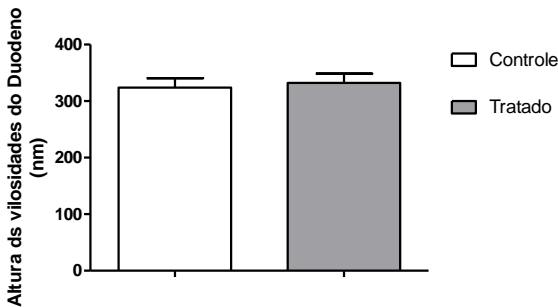
#### 5.1.2.1 Análise da histomorfologia e morfométrica de cortes de duodeno de animais expostos ou não HBG através de microscopia de luz

Inicialmente foram realizadas análises morfométricas por meio de medidas de altura das vilosidades e diâmetro do duodeno em preparações histológicas de amostras de duodeno coradas com hematoxilina-eosina de animais controles e expostos ao HBG. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nas análises realizadas (Figura 15). No entanto, conforme pode-se observar nas imagens comparativas de um corte histológico do duodeno de um animal controle e outro de um animal do grupo tratado com HBG,

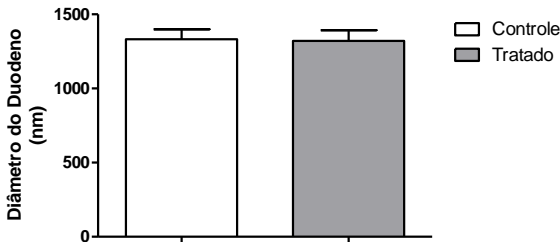
observa-se maior espaçamento entre as vilosidades (Figura 15). Na Figura 16 é possível observar as vilosidades do duodeno, com a lâmina própria contendo células caliciformes, enterócitos e presença de linfócitos intraepiteliais, além da cripta de Lieberkühn com suas glândulas, na base das vilosidades.

Figura 15- Efeitos da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação na medida da (A) altura das vilosidades e (B) diâmetro do duodeno, realizadas em imagens de ML, objetiva de 10X, do duodeno de ratos imaturos.

A)

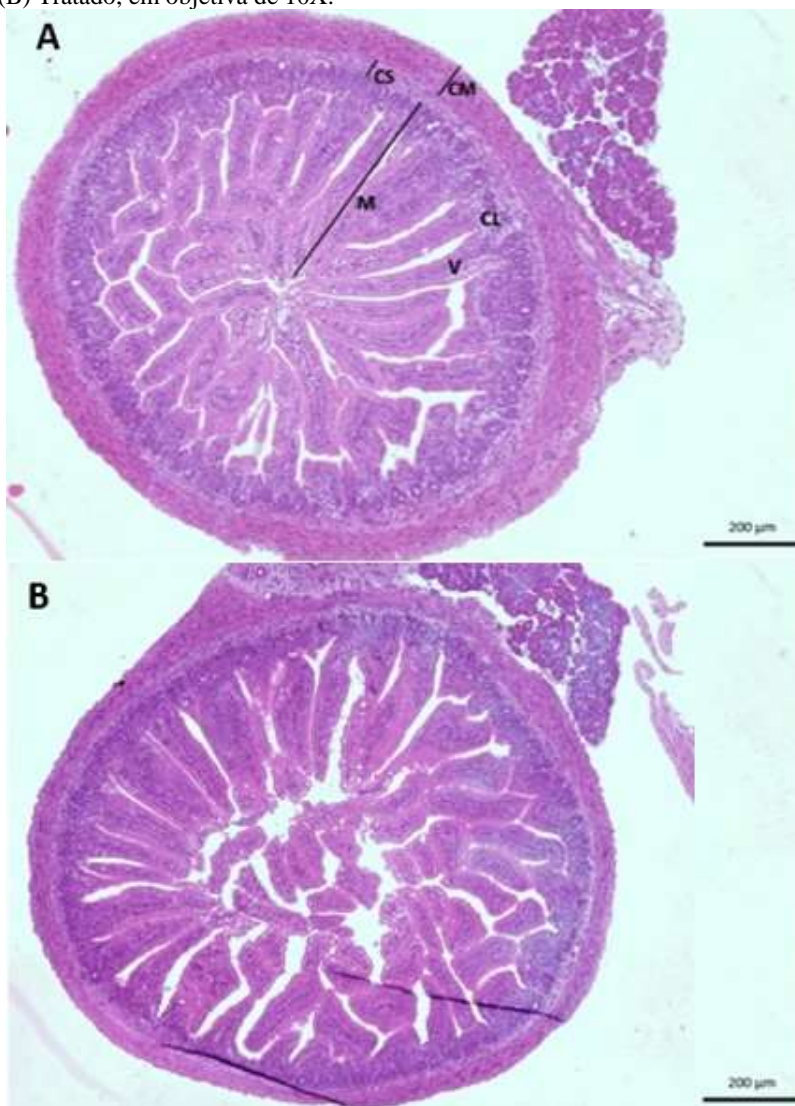


B)



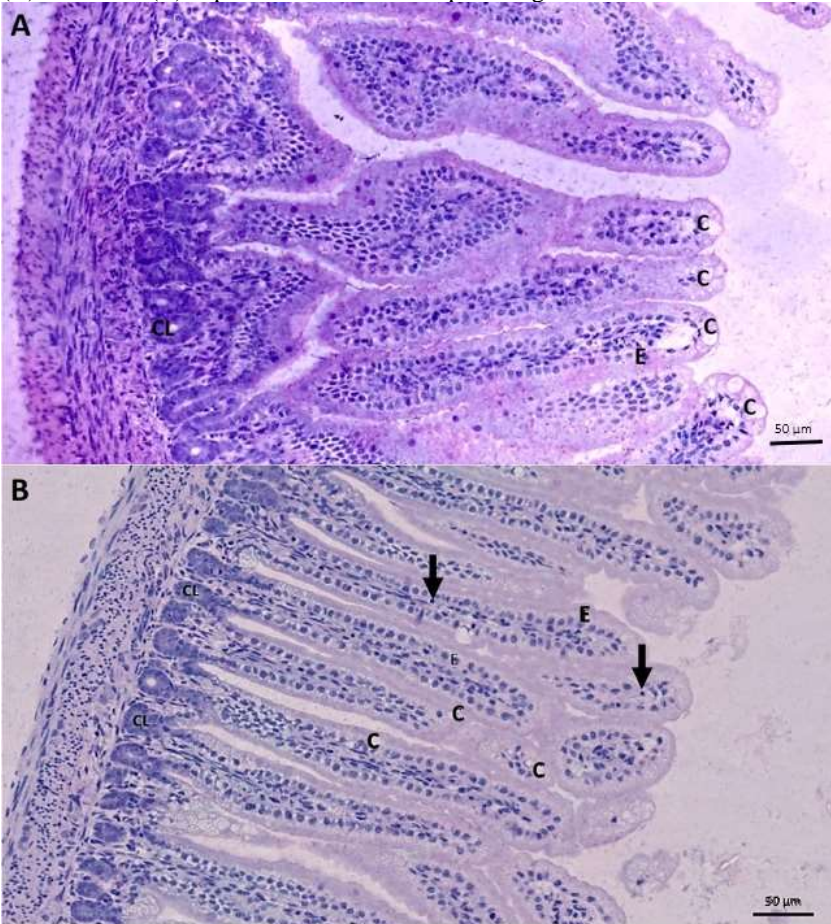
Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 04 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student.

Figura 16- Imagens de ML de fatias de duodeno de um animal (A) Controle e (B) Tratado, em objetiva de 10X.



Imagens de lâminas de fatias de duodeno de ratos imaturos controle (A) e tratados (B) em aumento de objetiva de 10X, coradas com HE. CM: Camada Muscular. CS: Camada Submucosa. M: Camada Mucosa. CL: Cripta de Lieberkühn. V: Vilosidade.

Figura 17- Preparações histológicas representativas de duodeno de rato imaturo (A) controle e (B) exposto ao HBG durante período gestacional e lactacional.

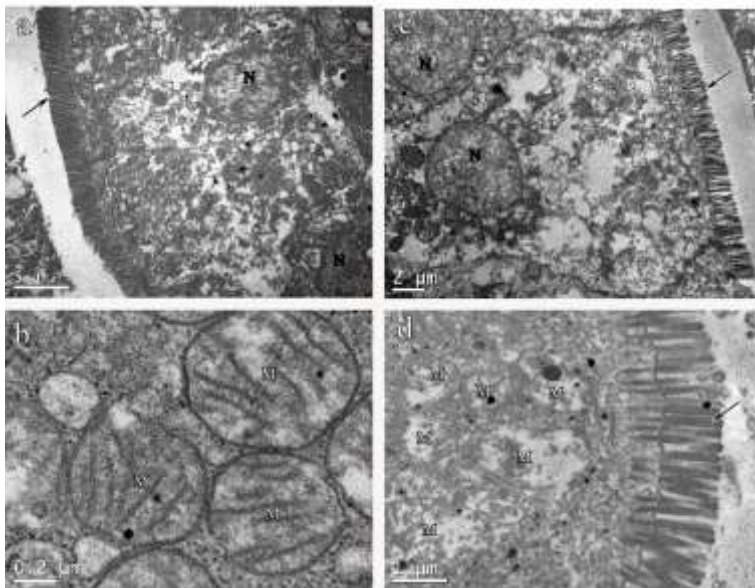


Cortes transversais de duodeno analisado em microscopia de luz. (A)Animal controle. (B) Animal tratado. Coloração: HE, objetiva: 40X. Duodeno de rato de 15 dias do grupo tratado com herbicida a base de glifosato durante o período gestacional e lactacional. Células caliciformes (C), enterócitos (E), Cripta de Lieberkühn (CL) e presença de linfócitos intraepiteliais (seta).

### 5.1.2.2 Análise das características microestruturais do duodeno de ratos imaturos expostos ao HBG durante a gestação e lactação por MET

Foram realizadas análises de imagens obtidas por MET de duodeno de animais controles e expostos ao HBG. No grupo controle observou-se que integridade do epitélio do duodeno com enterócitos íntegros com abundância de microvilosidades na região apical (Figura 18a). O citoplasma dessas células apresentou grande quantidade de vesículas eletrônicas transparentes de diferentes tamanhos e mitocôndrias com tamanho e formato similares, com cristas mitocondriais bem definidas (Figura 18a e 18b). Além disso, observou-se microvilosidades com maior espaçamento entre elas no grupo tratado (Figura 18c). Observou-se ainda, alterações no tamanho das mitocôndrias, desorganização das cristas mitocondriais e algumas com ruptura de membrana e *swelling* mitocondrial (Figura 18d).

Figura 18- Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão de preparações histológicas de duodeno de ratos imaturos.



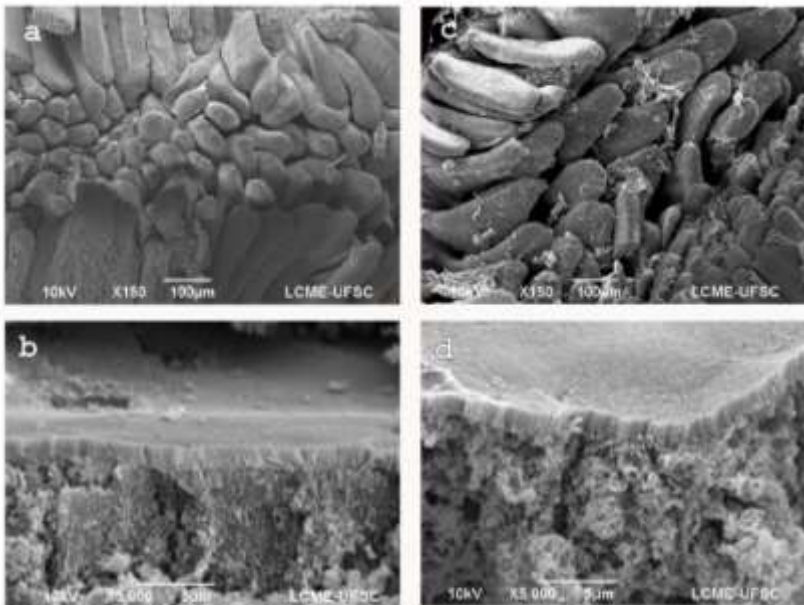
Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de células do duodeno. Células do epitélio do duodeno dos animais do grupo controle (Figura a, b), enterócitos com abundantes microvilosidades na região apical (Figura a). Citoplasma com grande quantidade de vesículas eletrônicas transparentes de diferentes tamanhos e

mitocôndrias com tamanho e formato similares com cristas mitocondriais bem definidas (Figura a e b). Células do duodeno do grupo tratado (Figura c e d), microvilosidades com maior espaçamento (Figura c, seta), mitocôndrias (M) com alterações no tamanho, desorganização das cristas mitocondriais e algumas com ruptura de membrana, indicando *swelling* mitocondrial (Figura d). Nucleo (N)

### 5.1.2.3 Análise das características microestruturais do duodeno de ratos imaturos expostos ao HBG durante a gestação e lactação por MEV

A análise das imagens obtidas por MEV do duodeno de animais controle, demonstrou que no grupo controle as vilosidades estavam justapostas, em formato de “dedo” (Figura 19a) e o conjunto de microvilosidades era abundante e integro (Figura 19b). Por outro lado, as imagens de animais do grupo tratado apresentaram vilosidades mais espaçadas e desorganizadas (Figura 19c e d, respectivamente) quando comparadas às imagens obtidas do grupo controle.

Figura 19- Imagens representativas do duodeno de ratos imaturos expostos ou não ao HBG durante a gestação e lactação obtidas por microscopia eletrônica de varredura.



Microscopias eletrônicas de varredura do duodeno de ratos imaturos. Imagens obtidas do duodeno de animais controle (Figuras a, b) apresentaram vilosidades justapostas em formato de “dedo (Figura a) e conjunto de microvilosidades abundante e íntegra (Figura b). Imagens de animais do grupo tratado (Figuras c, d) apresentaram vilosidades mais espaçadas e desorganizadas, no entanto sem alteração aparente nas microvilosidades (Figura c e d, respectivamente).

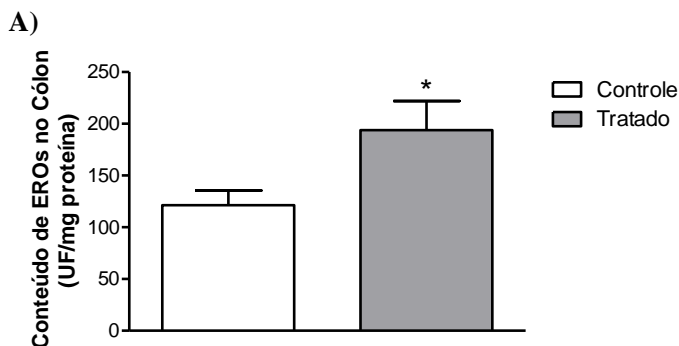
## 5.2 RESULTADOS PARTE 2 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO NO CÓLON FINAL DE RATOS IMATUROS

### 5.2.1 Efeitos da exposição ao HBG sobre parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo em cólon final de ratos imaturos

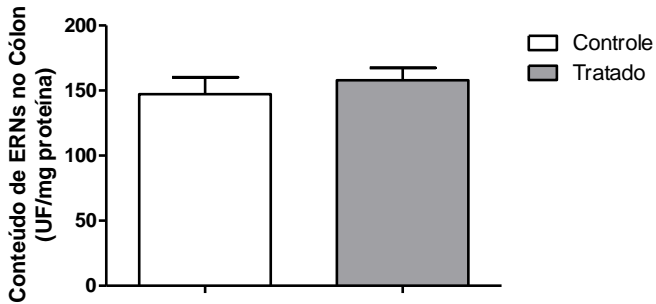
Os efeitos da exposição materna ao HBG sobre o cólon da prole foram avaliados utilizando-se os mesmos parâmetros analisados no duodeno dos animais.

Para verificar o estado redox no cólon final dos filhotes, foram avaliadas a peroxidação lipídica, bem como a formação de ERO e ERN. Os resultados evidenciam aumento significativo na geração de EROs no cólon final dos animais tratados, quando comparado ao grupo controle, sem alteração na produção de ERNs. Corroborando esses dados, observou-se aumento na peroxidação lipídica em cólon dos animais tratados (Figura 19).

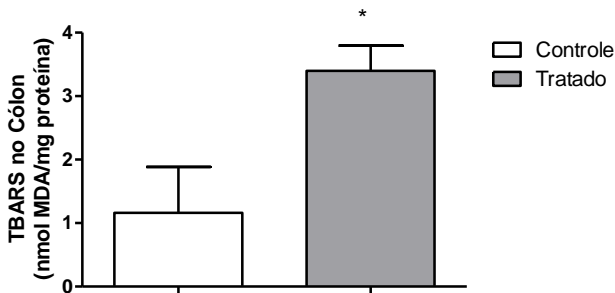
Figura 20- Efeitos da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação sobre parâmetros associados ao estado redox em porções do cólon final da prole.



B)



C)



Foram avaliados os seguintes parâmetros em homogeneizados de tecido: concentração de espécies reativas de oxigênio (A) e nitrogênio (B) e peroxidação lipídica (C) no cólon final de ratos imaturos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. \*  $p < 0,05$ .

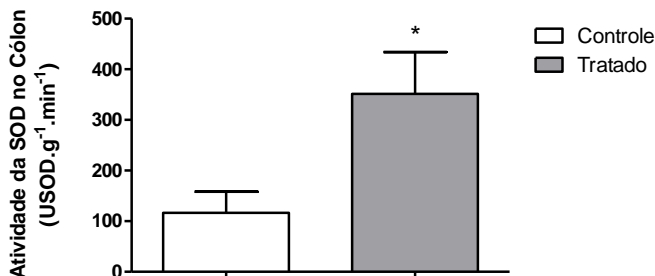
Uma vez estabelecido o aumento na produção de ERO e aumento na peroxidação de lipídeos no cólon final da prole após exposição materna ao HBG, avaliou-se os efeitos dessa exposição sobre as defesas antioxidantes enzimáticas e o conteúdo de GSH nesse tecido.

Os resultados mostraram que a exposição materna ao HBG provoca o aumento na atividade da SOD e diminuição significativa na atividade da CAT no cólon dos filhotes expostos (Figura 20).

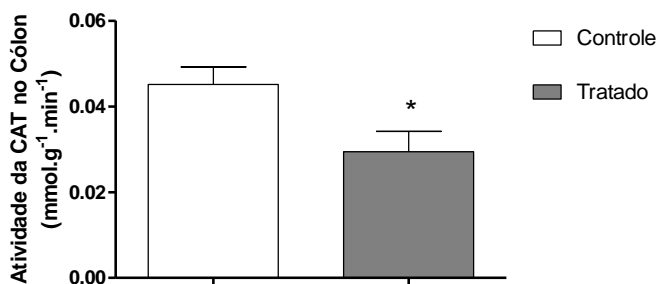


Figura 21- da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação na atividade das enzimas: (A) superóxido dismutase (SOD) e (B) catalase (CAT) em cólon de ratos imaturos.

A)



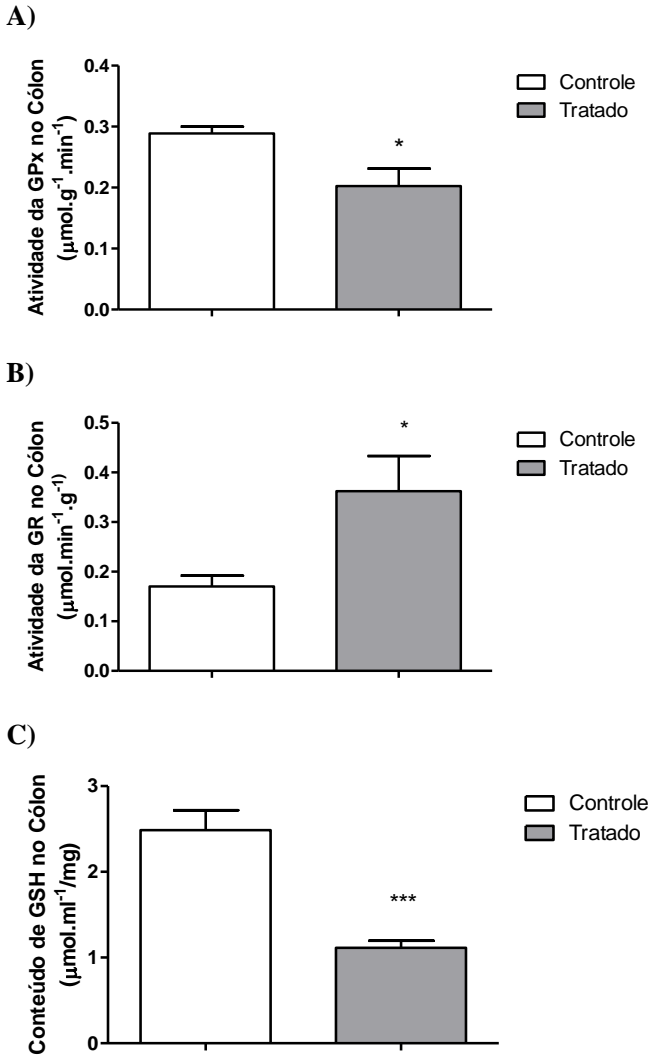
B)



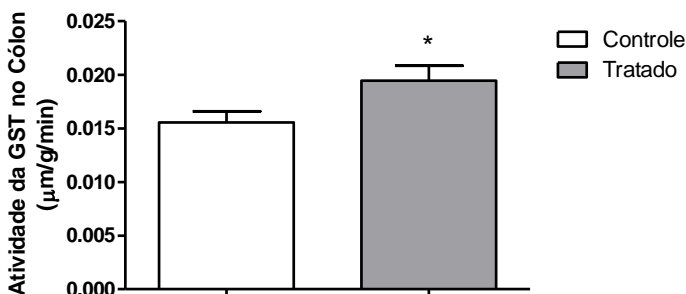
Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. \*  $p < 0,05$ .

Os resultados também mostraram que a exposição materna ao HBG diminui a atividade da GPx e aumenta a atividade de GR em homogeneizado de cólon de ratos imaturos. Esses resultados estão associados a depleção de GSH, ao qual também pode estar associada ao aumento na atividade da enzima GST (Figura 21).

Figura 22- Efeito da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação na atividade das enzimas (A) Glutationa Peroxidase (GPx) e (B) Glutationa Redutase (GR), no conteúdo de (C) Glutationa reduzida (GSH) e na atividade da enzima (D) Glutationa S Transferase (GST) em cólon final de ratos imaturos



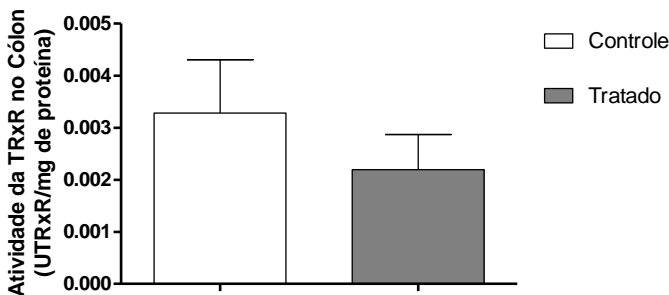
D)



Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Ainda, com objetivo de avaliar formas de detoxificação do peróxido de hidrogênio, foi avaliada a atividade da TRxR que restaura o poder oxidativo de Trx no sistema de detoxificação Prx/TrxE. A exposição ao HBG não alterou a atividade da TRxR no cólon dos filhotes (Figura 23).

Figura 23- Efeito da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação na atividade da enzima Tiorredoxina Redutase (TRxR) no cólon final de ratos imaturos.



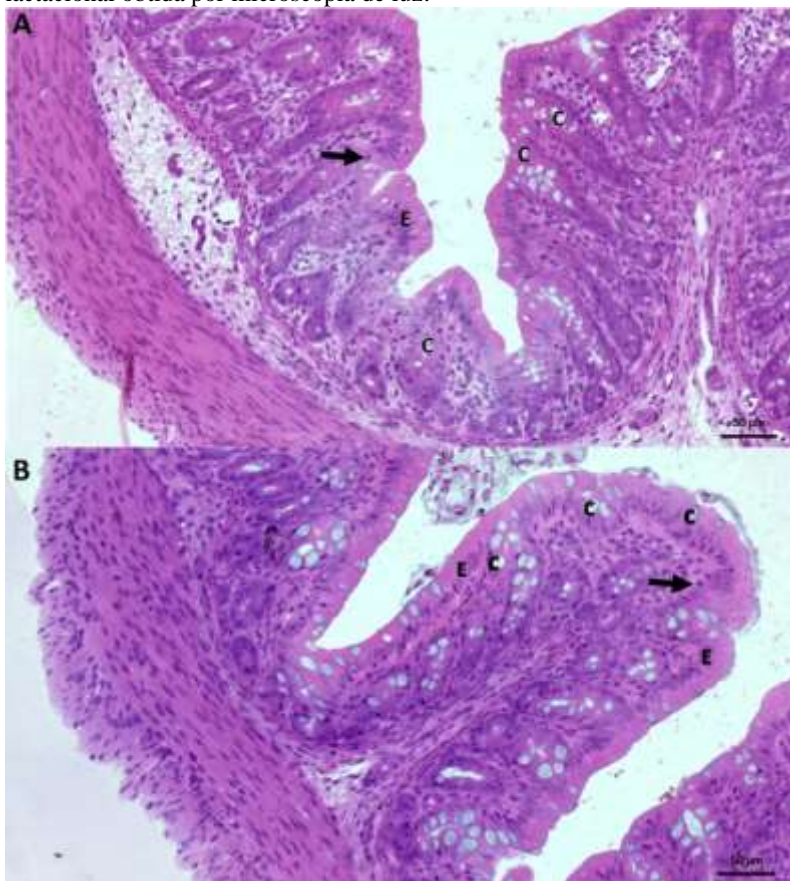
Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. \*  $p < 0,05$ .

#### 5.2.1.1 Alterações histológicas no cólon da prole após exposição materna ao HBG

Preparações histológicas de cólon dos filhotes após exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação foram analisadas por microscopia de luz no intuito de avaliar possíveis alterações estruturais nesse tecido. Foram realizadas medidas de diâmetro do tecido, bem como contagem de células caliciformes em microfotografias de cortes histológicos corados com a técnica de PAS/Alcian Blue.

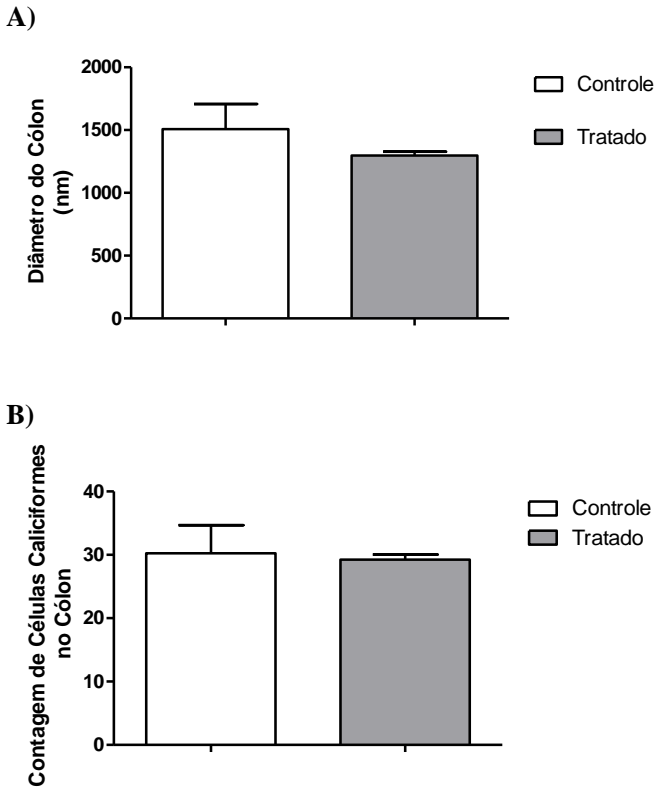
A Figura 24 mostra uma cripta do cólon com presença das células caliciformes, enterócitos e presença de linfócitos intraepiteliais. Os resultados mostraram que a exposição materna ao HBG não altera significativamente o diâmetro do cólon nem a contagem de células caliciformes (Figura 25).

Figura 24- Imagens representativas de um corte histológico do cólon final de rato imaturo (A) controle e (B) exposto ao HBG durante período gestacional e lactacional obtida por microscopia de luz.



Coloração HE, objetiva de 40X. Cripta do cólon de rato de 15 dias (A) grupo controle e (B) do grupo tratado com herbicida a base de glifosato durante o período gestacional e lactacional. Células caliciformes (C), enterócitos (E) e presença de linfócitos intraepiteliais (seta).

Figura 25- Efeitos da exposição materna ao HBG no diâmetro do cólon (A) e no número de células caliciformes (B).



As análises foram realizadas em micrografias obtidas em microscópio de luz com a objetiva de 10X. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 04 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student.

#### 5.2.1.2 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão dos efeitos da exposição materna ao HBG no cólon de ratos imaturos

A análise ultraestrutural do cólon final de ratos imaturos através de imagens obtidas por MET mostrou integridade das células do epitélio colônico nos animais do grupo controle, com conjunto abundante de microvilosidades na região apical (Figura 26a), citoplasma apresenta núcleo localizado na região basal e presença de mitocôndrias, vesículas e ribossomos principalmente na região apical. As mitocôndrias são

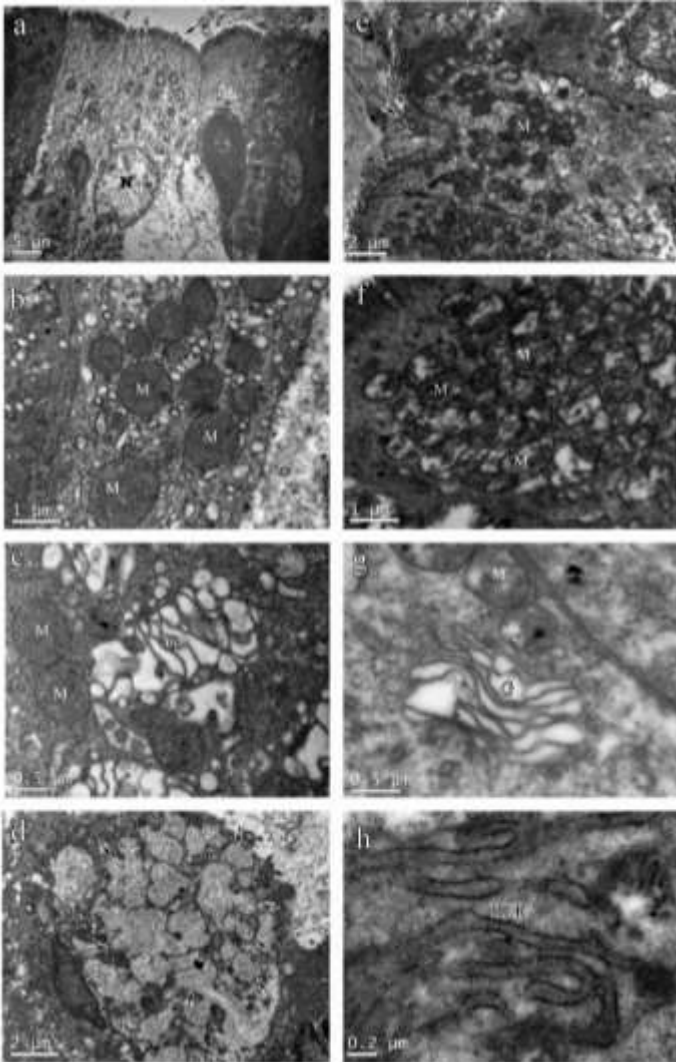
visualizadas com conteúdo homogêneo e cristas com formação definida (Figura 26b). O aparelho de Golgi apresentou cisternas hipertróficas, em ampla atividade, liberando vesículas (Figura 26c). Ainda, observou-se diversas células caliciformes bem marcantes, com vacúolos de elétrondensidade moderada, ricas em muco (Figura 26d).

A análise das eletromicrografias das células do cólon de animais do grupo tratado (Figura 26e, f) demonstrou maior número de mitocôndrias no citoplasma, quando comparadas as imagens do grupo controle. Essas mitocôndrias se apresentavam dilatadas com presença de regiões eletron-transparentes e poucas cristas mitocondriais em seu interior (Figura 26f). O aparelho de Golgi apresentava-se com poucas cisternas e presença de poucas vesículas (Figura 26g). Ainda, foram observadas cisternas de retículo endoplasmático granular (Figura 26h).

#### 5.2.1.3 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura dos efeitos da exposição materna ao HBG no cólon de ratos imaturos

A análise das imagens de porções do cólon final de animais controles obtidas por MEV, demonstraram integridade do epitélio, com uma aparência “aveludada”, com grande quantidade de muco já secretado e vesículas com abundante conteúdo de mucinas sendo secretadas (Figuras 27a, b e c). As micrografias obtidas do cólon de animais tratados apresentaram diminuição quantidade de muco (Figura 27d), com aparência de “ressecamento de epitélio” e vesículas com menor quantidade de muco em seu interior (Figura 27e). Salienta-se também que foi observada a translocação bacteriana no grupo tratado (Figura 27f).

Figura 26- Micrografias eletrônicas de transmissão de células do cólon de ratos de 15 dias.

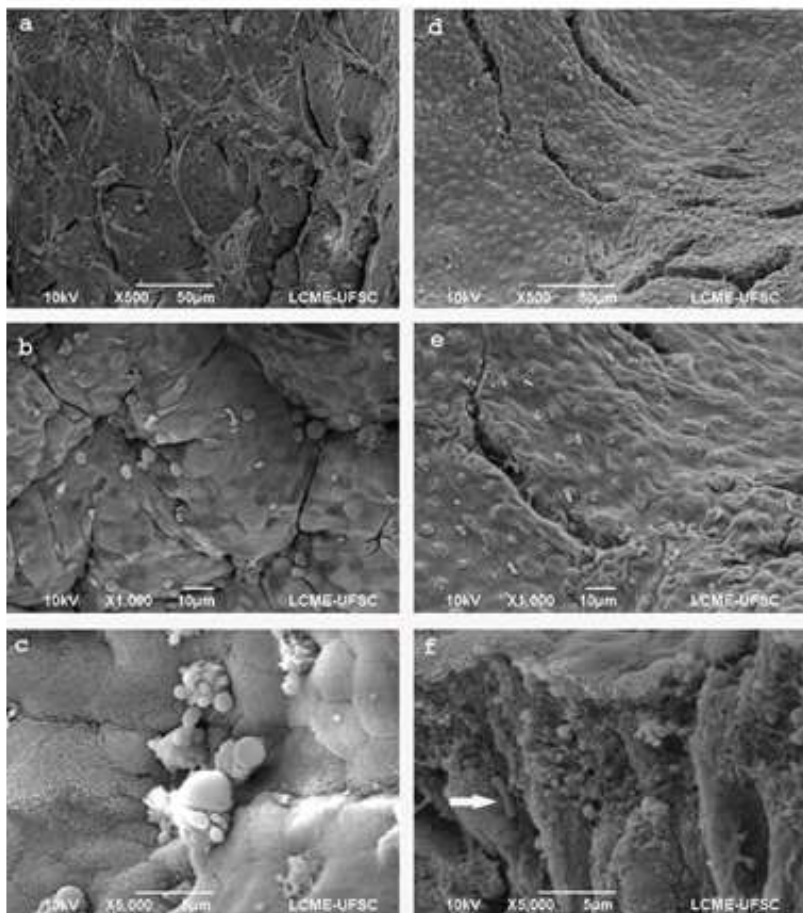


Micrografia eletrônica de transmissão de células do cólon. Figura a-d. Grupo controle. Figura a. Visão geral das células do epitélio com microvilosidades (setas) e citoplasma com núcleo (N) basal e mitocôndrias (M) na região apical. Figura b. Mitocôndrias com conteúdo homogêneo. Figura c. Detalhe do Aparelho de Golgi (G) com cisternas hipertróficas. Figura d. Visão de uma



célula caliciforme com vesículas de muco (setas). Figuras e-f. Grupo tratado. Figuras e-f. Visão geral das células do epitélio com microvilosidades (setas) e citoplasma com grande quantidade de mitocôndrias com poucas cristas e matriz com presença de regiões eletrôn-transparente. Figura g. Detalhe do Aparelho de Golgi com cisternas mais justapostas. Figura h. Detalhe do retículo endoplasmático rugoso (RER).

Figura 27- Micrografias de microscopia eletrônica de varredura mostrando as alterações induzidas pela exposição materna ao HBG na ultraestrutura do cólon final de ratos de 15 dias.



Imagens de animais controle (a, b, c) com epitélio íntegro e aparência aveludada com grande quantidade de muco (Figura a), vesículas com abundante conteúdo de mucinas sendo secretadas (Figuras b e c). Imagens do órgão de animais

tratados durante gestação e amamentação com herbicida a base de glifosato (d, e, f), com reduzida quantidade de muco (Figura d), aparência de ressecamento de epitélio e vesículas com menor quantidade de muco (Figura e), e translocação bacteriana (Figura f, seta).

### 5.3 RESULTADOS PARTE 3 – ALTERAÇÕES NOS PARÂMETROS DE INFLAMAÇÃO E MICROBIOTA DE RATOS IMATUROS APÓS EXPOSIÇÃO MATERNA AO HBG

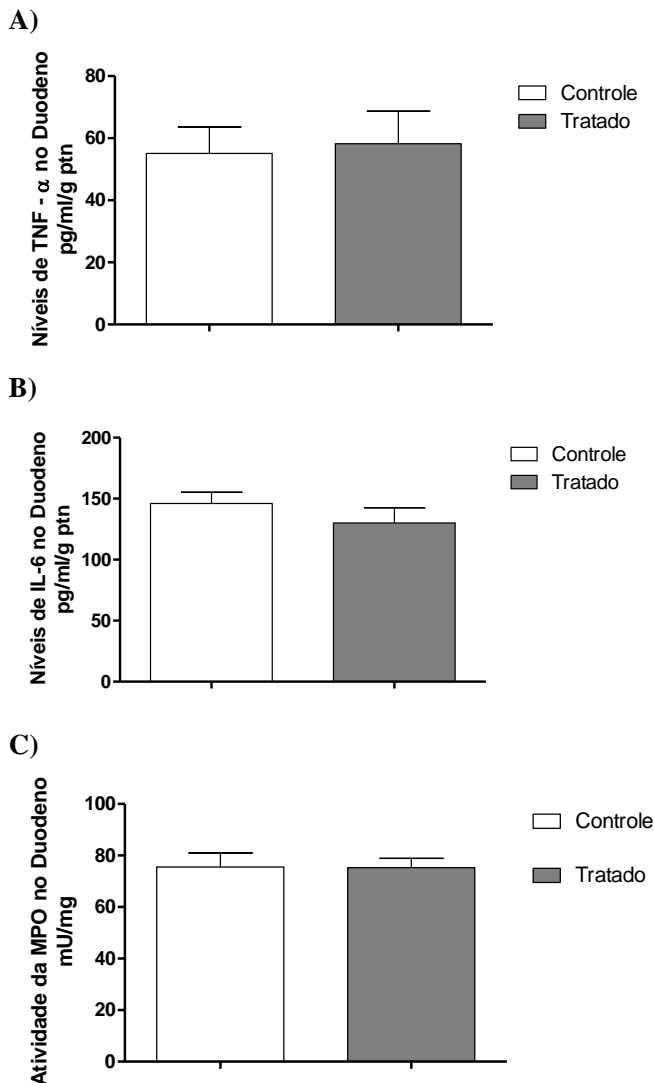
#### 5.3.1 Efeitos da exposição materna ao HBG sobre parâmetros inflamatórios

O desbalanço no estado redox e as alterações histomorfológicas observadas no intestino dos animais expostos ao herbicida podem estar associados a alterações nos mecanismos de resposta imunológica e inflamação devido ao comprometimento dos mecanismos de resposta antimicrobiana. Dessa forma, foram determinados o conteúdo de TNF- $\alpha$  e IL-6, bem como a atividade da MPO como marcadores inflamatórios em homogeneizado de intestino dos filhotes expostos ao HBG.

Os resultados mostraram que a exposição materna ao HBG não foi capaz de alterar o conteúdo de TNF- $\alpha$  e IL-6, bem como a atividade da MPO em homogeneizado de duodeno dos filhotes imaturos (Figura 28).

No cólon final dos animais expostos ao HBG durante a gestação e lactação, as concentrações de TNF- $\alpha$  apresentaram-se aumentadas (Figura 29A), enquanto a atividade da MPO e o conteúdo de IL-6 não apresentaram alterações, quando comparadas ao grupo controle (Figura 29 B e C, respectivamente).

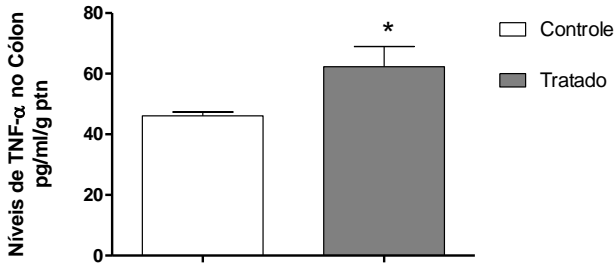
Figura 28- Efeitos da exposição materna ao HBG no conteúdo de TNF- $\alpha$  e IL-6 e na atividade MPO no duodeno de ratos imaturos.



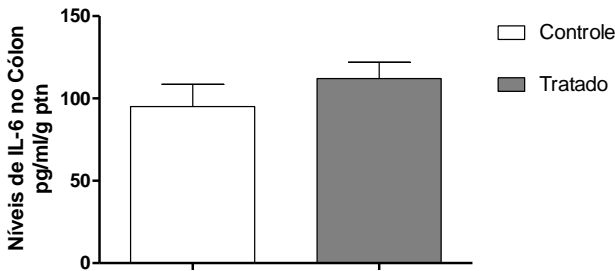
O imunoconteúdo de TNF- $\alpha$  (A) e IL-6 (B) foi determinado pela técnica de ELISA e a atividade da MPO (C) foi mensurada por método colorimétrico no duodeno de ratos imaturos, conforme especificado na metodologia. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student

Figura 29- Efeitos da exposição materna ao HBG nas concentrações de TNF- $\alpha$ , e Il-6 e na atividade da MPO no cólon de ratos imaturos.

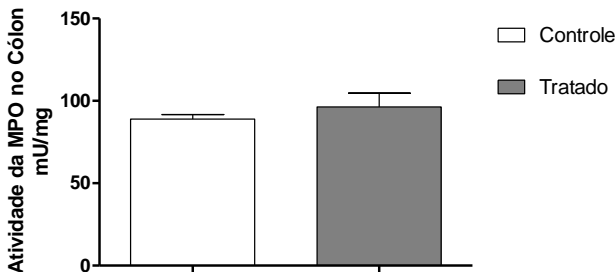
A)



B)



C)

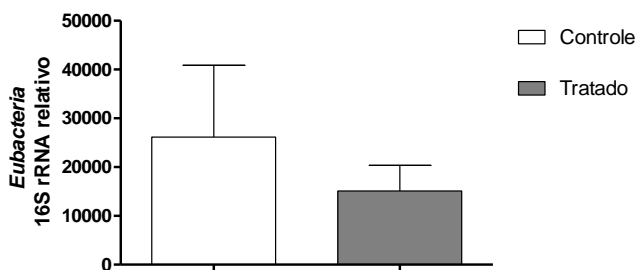


O imunocnteuído de TNF- $\alpha$  (A) e Il-6 (B) foi determinado pela técnica de ELISA e a atividade da MPO (C) foi mensurada por método colorimétrico em cólon de ratos imaturos, conforme especificado na metodologia. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student: \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 5.3.2 Alterações na microbiota intestinal da prole após a exposição materna ao HBG

A exposição materna ao HBG acarretou em desbalanço no estado redox e ativação e alterações ultraestruturais no intestino da prole, que estavam associadas a ativação de vias próinflamatórias. Esses eventos podem estar relacionados, de alguma forma, a alterações nos mecanismos de reposta antimicrobianas as quais podem afetar a composição de bactérias intestinais. Além disso, especula-se uma possível ação direta do herbicida na via do ácido chiquímico presente em determinadas bactérias residentes no intestino. Desse modo, buscou-se investigar as possíveis alterações na microbiota dos animais expostos.

Figura 30- Efeitos da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação na expressão quantitativa de *Eubacteria*, em amostras de fezes de animais imaturos.



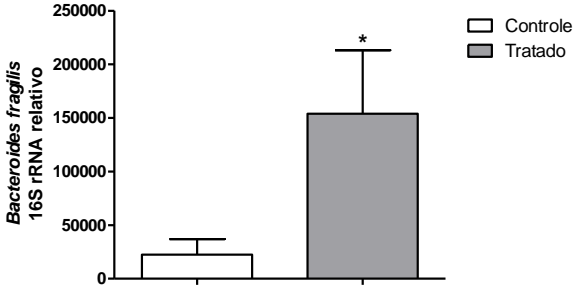
Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 07 animais em cada grupo. Dados correspondem a detecção relativa do gene 16S de cada alvo em relação à gramas de fezes. Análise estatística: teste *t* de Student.

A análise de alguns grupos de bactérias constituintes da microbiota intestinal como *Eubacteria*, *B. fragilis*, Firmicutes, Bacteroidetes e Enterobacteriaceae foi realizada pela técnica de qPCR utilizando-se primers específicos. Os resultados indicaram que não houve alteração quantitativa na população de bactérias, como pode ser observado na Figura 30, de acordo com os dados quantitativos de *Eubacteria*. No entanto, a composição qualitativa foi alterada com aumento no número de *B. fragilis* e Firmicutes no grupo tratado com pesticida quando comparado ao grupo controle (Figura 31A e 31B, respectivamente). Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos na avaliação com os demais primers investigados,

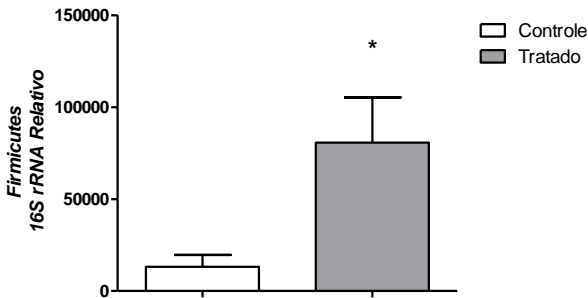
Bacteroidetes e Enterobacteriaceae (Figura 31C e D, respectivamente), ou na razão Firmicutes/Bacteroidetes (Figura 32).

Figura 31- Efeitos da exposição materna ao HBG na expressão de (A) *Bacteroides fragilis* e (B) Firmicutes, (C) Bacteroidetes e (D) Enterobacteriaceae em amostras de fezes de animais imaturos.

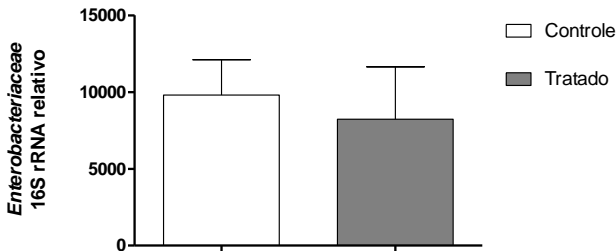
A)

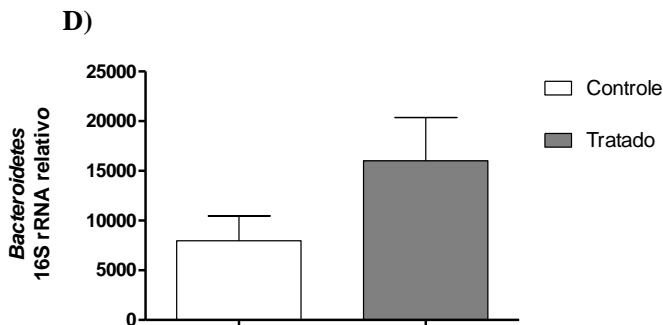


B)



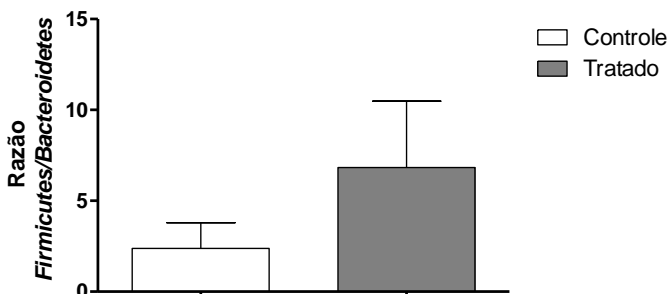
C)





Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 07 animais em cada grupo. Dados correspondem a detecção relativa do gene 16S de cada alvo em relação à gramas de fezes. Análise estatística: teste *t* de Student. \*  $p < 0,05$ .

Figura 32- Efeitos da exposição materna ao HBG na relação da expressão de Firmicutes/*Bacteroidetes*, em amostras de fezes de animais imaturos.

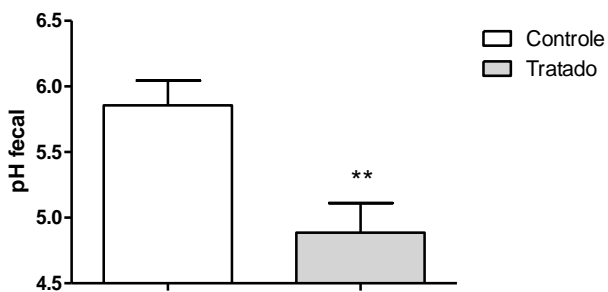


Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 07 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student.

### 5.3.3 Efeito da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação no pH fecal da prole aos 15 dias de idade

Considerando-se que alterações na composição da microbiota podem afetar a composição de substâncias oriundas da fermentação presentes no intestino e que estas podem afetar o pH da região, buscou-se investigar se a exposição materna ao HBG era capaz de interferir no pH fecal da prole. Como pode ser observado na Figura 33, os animais do grupo tratado com o herbicida apresentaram uma significativa acidificação do conteúdo fecal quando comparado ao grupo controle.

Figura 33- Efeitos da exposição materna ao HBG no pH fecal de ratos imaturos.



Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: teste *t* de Student. \*\*  $p < 0,01$ .



## 6 DISCUSSÃO

Dados prévios do grupo de pesquisa demonstraram que a exposição materna ao HBG está associada a dano oxidativo e excitotoxicidade glutamatérgica em hipocampo da prole. Sugere-se que esses eventos estão relacionados ao comportamento tipo-depressivo quando os filhotes atingem a idade adulta (Cattani *et al.*, 2014; 2017). Tem sido sugerido que alterações na microbiota e disbiose intestinal são associados a transtornos psiquiátricos, doença celíaca e outras patologias (Baothman *et al.*, 2016; Chang e Lin, 2016; Cenit *et al.*, 2017; Hooks e O'malley, 2017). Nesse contexto, no presente estudo utilizou-se um modelo experimental de exposição materna ao HBG durante os períodos gestacional e lactacional, já descrito e padronizado na literatura, no intuito de identificar se essa exposição acarretaria em dano oxidativo e alterações histomorfológicas no intestino da prole, que poderiam estar associadas a alterações na microbiota intestinal.

Os resultados mostraram que a exposição materna ao HBG provoca estresse oxidativo e alterações ultraestruturais no intestino da prole. Dentre essas alterações destaca-se o maior espaçamento das vilosidades e microvilosidades, “swelling” mitocondrial e diminuição na produção de muco, com conseqüente translocação bacteriana no cólon final destes animais. Esses eventos podem estar associados, pelo menos em parte, com alterações na microbiota, culminando em inflamação e dano tecidual.

Pesquisas já descrevem a indução de estresse oxidativo, com produção aumentada de radicais livres e alterações nas defesas antioxidantes como mecanismo das alterações biológicas ocasionadas por diferentes agrotóxicos (Abdollahi *et al.*, 2004; Jablonska-Trypuc *et al.*, 2017). Com relação ao HBG, (Peixoto, 2005) já relatou que o Roundup® afeta a cadeia transportadora de elétrons ao nível dos complexos I e III. Desta maneira, herbicidas contendo glifosato podem estar envolvidas no aumento da produção do  $O_2^{\cdot-}$  e, desencadear EO e distúrbios nas respostas antioxidantes (Romero *et al.*, 2011). A indução de estresse oxidativo ocasionada pelo glifosato também já foi demonstrada no sistema nervoso central e no sistema reprodutor pelo nosso grupo de pesquisa (Cattani *et al.*, 2014, 2017; (De Liz Oliveira Cavalli *et al.*, 2013), ao passo que, são escassos os estudos que descrevem os possíveis efeitos da exposição ao HBG no intestino.

É sabido que as EROs são substâncias altamente reativas e quando em altas concentrações no organismo provocam danos a estruturas biológicas e induzem lesões a células e tecidos (Poli *et al.*,

2004; Zhu *et al.*, 2012). Nesse contexto, o intestino dos filhotes de 15 dias de idade expostos ao HBG durante a gestação e lactação apresentou aumento na produção de EROs e, conseqüente aumento na oxidação de compostos lipídicos, representados pelo aumento da quantificação de DCF e no conteúdo de TBARS, respectivamente.

O dano a estruturas ocorre não somente pelo aumento na produção de EROs, mas também, devido a uma falha nos mecanismos de defesa antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2015). Assim, no presente trabalho, entende-se que o aumento de EROs ocasionado pelo contato com o herbicida, e o conseqüente aumento na peroxidação lipídica, estão associados a um desbalanço nessas defesas, uma vez que foi observado o aumento na atividade da SOD, a qual catalisa a produção de  $H_2O_2$  a partir de  $O_2^{\bullet-}$ . Conseqüentemente, sugere-se que há um acúmulo de  $H_2O_2$ , pela diminuição na atividade de CAT, tanto no duodeno quanto no cólon, e de GPx no cólon. Enzimas essas, que realizariam a detoxificação deste composto à  $H_2O$ , caracterizando assim, que o HBG induz estresse oxidativo no intestino de ratos imaturos nesse modelo experimental.

A hipótese de que o aumento de ERO deriva de peróxidos de hidrogênio, corrobora os dados encontrados por Bailey e colaboradores (2018), onde a exposição crônica de *Caenorhabditis elegans* a diferentes concentrações de uma formulação contendo glifosato gerou inibição da função mitocondrial, e conseqüente aumento na produção de  $H_2O_2$ , mas não de  $O_2^{\bullet-}$  ou OH $\cdot$ .

Em contrapartida ao observado no presente estudo, Larsen e colaboradores (2012) avaliaram o efeito do glifosato em ratos Wistar adultos expostos ao glifosato através da água de beber, durante 30 e 90 dias, nas concentrações de 0,7 mg/L e 7 mg/L, e não observaram alterações na peroxidação lipídica no intestino destes animais em nenhuma das concentrações ou tempos de exposição, enquanto obtiveram um aumento na atividade da enzima GPx em ambas concentrações no período de 90 dias de exposição destes animais. Curiosamente, o mesmo estudo avaliou os efeitos no fígado e rins, os quais apresentaram diminuição de TBARS. Por outro lado, nosso grupo demonstrou que a exposição materna ao HBG resulta em peroxidação lipídica no fígado da prole de 15 dias de idade (Rieg, 2016).

A diminuição na atividade da GPx, observada no cólon dos filhotes expostos ao HBG pode ser justificada pela diminuição da disponibilidade de GSH, também observada neste tecido. Por conseqüente, foi possível identificar um aumento na atividade de GR,

possivelmente como um mecanismo compensatório para restaurar o conteúdo da GSH, um importante antioxidante não enzimático.

No duodeno dos filhotes de 15 dias expostos ao HBG, a diminuição na atividade da CAT, a qual é uma enzima chave para detoxificação de  $H_2O_2$ , parece ser compensada através do sistema Prx/Trx, uma vez que é observado um aumento na atividade de TRxR. Esse sistema realiza a proteção contra  $H_2O_2$  através da reação de oxidação de Trx, catalisada por Prx, ou diretamente via Trx, enquanto a TRxR é a única enzima responsável por reduzir Trx, novamente, com elétrons vindos de NADPH (Das, 2004). Segundo revisão realizada por Burke-Gaffney e colaboradores (2005), a Trx pode, ainda, realizar a redução de GPx e induzir Mn-SOD, enzima esta que também apresenta sua atividade aumentada nos animais expostos ao HBG.

Frente a necessidade de realizar a detoxificação de compostos xenobióticos, o organismo possui a enzima GST, que catalisa a conjugação destes compostos químicos, ou seus metabólitos, com substratos endógenos, como a GSH para eliminação (Halliwell e Gutteridge, 2015). Estudos já demonstram que alguns pesticidas têm a capacidade de aumentar a atividade da GST *in vivo*, ao conjugar a GSH a essas substâncias (Banerjee *et al.*, 1999). Assim, consumindo GSH como forma de desintoxicação destes compostos químicos (Agrawal *et al.*, 1991; Kehrer, 1993; Almeida *et al.*, 1997). Assim, o aumento na atividade de GST pode estar associado a diminuição no conteúdo de GSH no cólon dos animais imaturos expostos ao HBG. Em contrapartida, no duodeno, onde a GSH não apresentou alteração em seu conteúdo, a GST teve sua atividade diminuída.

Os dados de aumento da atividade da GST no cólon dos animais expostos ao HBG corroboram os dados apresentados por Bailey e colaboradores (2018) onde, além de observar o aumento na atividade de GST em *Caenorhabditis elegans* expostos a formulação contendo glifosato, este aumento foi fortemente correlacionado ao aumento de  $H_2O_2$ . Essa informação reforça a sugestão do presente estudo de que houve um acúmulo de  $H_2O_2$  e que, portanto, a GST pode ter sua atividade aumentada em resposta a esse estímulo.

Cabe salientar que a classificação atual para o glifosato pela IARC (2017), é de possivelmente carcinogênico, sendo o estresse oxidativo descrito como mecanismo primordial para tal desfecho. Nesse cenário, a indução de estresse oxidativo observada no intestino, bem como no fígado (Rieg, 2016) e hipocampo (Cattani *et al.*, 2014; 2017) da prole após exposição materna ao HBG se torna de grande relevância

para identificar os demais mecanismos envolvidos no desequilíbrio bioquímico e fisiológico desencadado pelo herbicida no organismo.

O estudo dos impactos de compostos toxicantes sobre o sistema digestório é particularmente relevante considerando-se que o intestino, principalmente o duodeno, desempenha um papel relevante como via de entrada de compostos toxicantes presentes em alimentos ou água contaminada. Nesse contexto, o intestino delgado é constantemente exposto a poluentes ambientais; no entanto, apresenta alta resistência a estes compostos e danos ocasionados por eles e, em contrapartida, o cólon apresenta alta susceptibilidade, haja visto os diversos tipos de câncer induzidos por compostos químicos neste órgão (Potten *et al.*, 1992).

As bases bioquímicas para as diferenças de suscetibilidade a agentes tóxicos das diferentes porções do intestino ainda não estão totalmente elucidadas. Contudo, Guo e colaboradores (2002) sugerem que a GST, por seu papel na detoxificação de xenobiontes, poderia exercer um papel crucial nas diferentes respostas a esses compostos. Os pesquisadores avaliaram a composição de isoenzimas de GST no intestino delgado e cólon de ratas fêmeas adultas e verificaram que o intestino delgado é mais bem “equipado” contra os efeitos tóxicos de xenobióticos eletrofílicos do que o cólon. Estes dados são confirmados pelo estudo de Coles e colaboradores (2002), onde avaliaram o conteúdo desta enzima ao longo do trato gastrointestinal de humanos, e observaram que a expressão desta enzima é 70 vezes menor no cólon do que no intestino delgado o que seria uma justificativa para sua maior susceptibilidade a danos a macromoléculas e desenvolvimento de câncer.

Pensando em desfechos fisiológicos e, corroborando o fato descrito, Martin e colaboradores (2018) em seu estudo descreveram uma associação positiva entre o consumo de pesticidas e o desenvolvimento de câncer de cólon no Brasil. Esses dados corroboram os efeitos observados no presente estudo. Nesse sentido, o desbalanço no estado redox e as alterações nos sistemas de defesa antioxidantes observadas no cólon dos filhotes expostos ao HBG sugerem a indução de estresse oxidativo e a vulnerabilidade desses tecidos ao dano pelo herbicida glifosato. Destaca-se ainda que a exposição ao herbicida ocasionou respostas opostas sobre a atividade da enzima GST em duodeno e cólon da prole. Os mecanismos envolvidos nesses efeitos não são conhecidos.

Sabe-se que a produção de ERO e o acúmulo de  $H_2O_2$  levam ao estresse oxidativo, o que pode ocasionar um desbalanço na produção de citocinas e desencadear processos inflamatórios e, conseqüentemente

gerar alterações fisiopatológicas (Al-Harbi *et al.*, 2015). No entanto, poucos são os estudos que avaliaram o efeito de herbicidas, incluindo glifosato, em marcadores inflamatórios intestinais. O presente estudo investigou os efeitos da exposição materna ao HBG na concentração de citocinas pró-inflamatórias no intestino de ratos imaturos. Os resultados mostraram aumento na concentração do TNF- $\alpha$  no cólon desses animais. Esses dados sugerem um potencial efeito pró-inflamatório associado a exposição ao glifosato.

Os efeitos da exposição ao glifosato sobre as concentrações de TNF- $\alpha$  foram investigados por Ma e Li (2015). Os pesquisadores expuseram carpas a diferentes concentrações de glifosato na água e observaram resultados contraditórios com relação aos níveis de TNF- $\alpha$  nos diferentes tecidos avaliados. Os resultados mostraram aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$  aumentados no fígado, baço e rins das carpas quando expostas às oncentrações mais altas do herbicida; por outro lado, a exposição a concentrações mais baixas levou a diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  nos rins dos peixes (1/5 da LC<sub>50</sub>).

Corroborando os dados obtidos no presente estudo no cólon dos filhotes, Ghasemi-Niri e colaboradores (2016) demonstraram que o phosolane, um composto organofosforado, acarretou em aumento na peroxidação lipídica, estresse oxidativo e aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  no cólon de ratos adultos. Entretanto, os pesquisadores demonstraram que a atividade da MPO e os níveis de IL-6 também estavam aumentados pela exposição ao organofosforado, enquanto no presente estudo o HBG não alterou significativamente estes marcadores. No estudo de Ghasemi-Niri e colaboradores (2016), o composto foi administrado por gavagem em diferentes dosagens (40, 20, 12 e 6mg/kg) durante 1 mês, e paralelamente, o grupo também avaliou o possível efeito do ácido elágico, um composto fenólico presente em diversas frutas e verduras, na proteção contra os resultados de estresse oxidativo, dano tecidual e inflamação e, demonstrou que o composto alterou todos os parâmetros e marcadores de toxicidade e estresse oxidativo induzidos por phosolane em todas as dosagens investigadas, sendo discutido que o mecanismo pelo qual exerce este efeito pode ir além do papel antioxidante.

Outro estudo que corrobora os resultados observados no presente estudo foi realizado com camundongos tratados com diferentes dosagens de fungicida Imazalil, que também constatou aumento na expressão de TNF- $\alpha$  no cólon dos animais tratados, além de infiltração de células inflamatórias neste tecido, observadas em imagens de

microscopia de luz, e alterações na microbiota destes animais (Jin *et al.*, 2016).

Alem do que foi exposto, Sun e colaboradores (2018), ao expor ratos adultos, via injeções intragástricas com Phoxin, outro composto organofosforado, demonstraram aumento na secreção e expressão de TNF- $\alpha$  no jejuno e íleo dos animais, acompanhado de diminuição da expressão de ocludina e claudina, proteínas responsáveis pela manutenção das junções comunicantes intestinais e alterações na microbiota fecal. O TNF é uma das citocinas envolvidas na sinalização para endocitose da ocludina, uma proteína responsável pela manutenção das junções oclusivas do intestino. Assim, altos níveis de TNF estão relacionados com diminuição da permeabilidade intestinal (Al-Sadi *et al.*, 2008).

Alterações na integridade da barreira intestinal, seja de junções comunicantes e/ou estrutura de microvilosidades e diminuição na produção e espessura do muco, predispõem a translocação bacteriana e, conseqüentemente, geram exacerbação do estresse oxidativo e inflamação (Al-Sadi *et al.*, 2008). O presente estudo é o primeiro a demonstrar, através de imagens de MEV e MET, que a exposição ao HBG durante os períodos gestacional e lactacional foi capaz de diminuir a quantidade de muco e alterar a ultraestrutura de microvilosidades do duodeno e culminar em translocação bacteriana no cólon.

Estudos a respeito das possíveis alterações histológicas e ultraestruturais do intestino, ocasionadas por glifosato são encontradas apenas em modelos *in vitro*. O primeiro estudo demonstrou a biodisponibilidade do glifosato em linhagens de células intestinais imortalizadas (Caco-2 e IEC-18) e observou efeitos como diminuição na resistência elétrica transmembrana, aumento na permeabilidade paracelular, o que favorece a entrada de glifosato nas células, além de gerar desorganização no citoesqueleto de actina (Vasiluk *et al.*, 2005). Por outro lado, Chłopecka e colaboradores (2014; 2017) demonstraram alteração da motilidade de porções de jejuno, em um modelo *in vitro*, ocasionadas tanto por HBG, quanto por POEA e a mistura de POEA e glifosato. Esses estudos sustentam o conceito de maior tempo de exposição ao glifosato no intestino, fazendo com que este, quando ingerido, se mantenha mais tempo em contato com as células epiteliais e com a microbiota presente, favorecendo maiores alterações.

Os efeitos no intestino, ocasionados por outros agrotóxicos, corroboram os encontrados no presente estudo com relação a infiltração de linfócitos. Tal qual o estudo realizado com sapos (*bufotes variabilis*) expostos agudamente ao inseticida Carbaryl, em diferentes doses, que

analisou tecidos do trato gastrointestinal e encontrou vilosidades edemaciadas, necrose de células epiteliais destas vilosidades além de infiltração de células inflamatórias (Cakici, 2016). Outro estudo, realizado por Jin e colaboradores (2016), também observou aumento na infiltração de células inflamatórias no cólon de camundongos machos expostos ao fungicida Imazalil.

O estresse oxidativo, inflamação e a predisposição à translocação bacteriana vem sendo discutidos como causa ou consequência de alterações na composição da microbiota intestinal (Slyepchenko *et al.*, 2016; Vrakas *et al.*, 2017). Ainda, outro fator que tem ganhado atenção especial nos últimos anos é a influência da mitocôndria na modulação da qualidade e diversidade da microbiota, por seu papel durante a inflamação e modulação de respostas imunes. Tanto a microbiota comensal, quanto a patogênica, produz substâncias que atuam na atividade da mitocôndria, podendo resultar em produção de EROs (Marciano e Vajro, 2017).

Ressalta-se aqui que, somado aos resultados relacionados ao desbalanço redox ocasionado pela exposição indireta ao HBG, segundo imagens de MET do presente estudo, foi possível observar aumento no número e na morfologia mitocondrial, com aparente alteração nas cristas mitocondriais, aumento da espessura e ruptura de membrana, indicando *swelling* mitocondrial. Os dados do presente estudo corroboram os dados já encontrados na literatura, onde foram analisadas imagens de microscopia eletrônica de hepatócitos de peixes expostos a formulação comercial contendo glifosato (Szarek *et al.*, 2000). Em contrapartida, em outro estudo, *in vitro*, quando *swelling* mitocondrial foi analisado espectrofotometricamente em mitocôndrias de fígado de ratos isoladas e expostas a uma formulação comercial contendo glifosato ou glifosato isolado, não foi observado alteração significativa neste marcador (Peixoto, 2005).

O Programa Nacional de Toxicologia reportou que 55% dos resíduos de glifosato são eliminados nas fezes (Chan e Mahler, 1992). Dessa forma, pode-se hipotetizar que após exposição ao glifosato, a microbiota intestinal (presente nas fezes) estará em contato com o herbicida, substância esta que inibe a via do Chiquimato presente em bactérias e essencial para produção de aminoácidos aromáticos. Consequentemente, essas bactérias poderão ser afetadas pela exposição ao glifosato. Corroborando essa hipótese, a análise da microbiota por qPCR demonstrou que a exposição materna ao HBG foi capaz de alterar a composição da microbiota fecal de ratos imaturos, com aumento no

conteúdo de Firmicutes e *B. fragilis*, quando comparados às fezes dos animais controles.

As bactérias do filo Firmicutes representam a maioria da microbiota intestinal, compreendendo mais de 250 gêneros como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Mycoplasma*, e *Clostridium*, e tem a capacidade de produzir ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido butírico. Bacteroidetes são o segundo filo presente em maior quantidade, com aproximadamente 20 gêneros, incluindo *Bacteroides* que são capazes de produzir hidrogênio. O resultante da interação de cada grupo bacteriano, pertencente a microbiota intestinal, com o hospedeiro ainda não está totalmente elucidado, ainda assim, alterações na composição da mesma já são correlacionadas com diversas doenças (Slyepchenko *et al.*, 2016; Vrakas *et al.*, 2017).

O aumento no conteúdo de Firmicutes já é descrito em crianças com sobrepeso e obesas (Barczynska *et al.*, 2018), e está associado a doenças metabólicas (Lai *et al.*, 2018). Por outro lado, pacientes com doenças intestinais como colite ulcerativa (Zamani *et al.*, 2017), doença inflamatória intestinal (Rashidan *et al.*, 2018) e doença celíaca (Sanchez *et al.*, 2012) apresentam aumento no conteúdo de *B. fragilis*.

A investigação quanto aos efeitos do glifosato na microbiota de roedores é recente, sendo o primeiro estudo conduzido em animais em laboratório foi publicado em 2018 por Nielsen e colaboradores (2018). Os pesquisadores trataram ratos Sprague-Dawley adultos com glifosato ou uma formulação comercial contendo glifosato, por gavagem, durante duas semanas e avaliaram também a concentração inibitória mínima (CIM) de glifosato para diferentes culturas bacterianas, além do efeito neste parâmetro ao adicionar aminoácidos aromáticos a estas culturas. O estudo não obteve êxito em demonstrar alterações na microbiota intestinal destes animais, seja entre os grupos ou antes e após a exposição ao herbicida. Contudo, observaram que a CIM de glifosato era significativamente aumentada com a adição de aminoácidos aromáticos ao meio de cultura, apontando a disponibilidade destes aminoácidos no intestino como a justificativa para o limitado efeito do glifosato na microbiota animal.

É importante citar que uma limitação deste primeiro estudo foi o curto tempo de exposição, enquanto o estudo subsequente, de Lozano e colaboradores (2018), avaliou os efeitos de uma formulação comercial contendo glifosato administrada na água de beber, em diferentes concentrações (0,1 ppb, 400 ppm e 5000 ppm), para ratos Sprague-Dawley adultos por um período de 2 anos. Nesse, foram conduzidas análises de sequenciamento do gene rRNA 16S nas fezes, assim como



métodos de cultura bacteriana para avaliar o efeito direto do glifosato no desenvolvimento de bactérias específicas. O estudo demonstrou que as alterações na microbiota fecal ocasionadas pelo herbicida são dependentes do gênero, com aumento na família de *Bacteroidetes* e diminuição em *Lactobacillaceae*, além de alteração na razão entre Firmicutes e *Bacteroidetes* nas fêmeas. Ainda sobre o efeito do herbicida nas culturas de cepas bacterianas das fezes dos animais controles, constatou-se que cada cepa bacteriana pode ter respostas distintas em seu crescimento quando expostas ao herbicida, confirmando resultados quanto ao efeito antibiótico do glifosato já demonstrados anteriormente *in vitro* (Staub *et al.*, 2012; Shehata *et al.*, 2013). Ademais, houve um crescimento acentuado de *E.coli* quando a cultura foi exposta a doses mais altas de glifosato, e que essa, detectada através de teste qPCR, não expressa o gene para enzima EPSPS.

Esses resultados, portanto, já reconhecem a possibilidade de diferentes efeitos do HBG na microbiota, como os apresentados no presente estudo, seja em sua diversidade ou composição, assim como os diferentes mecanismos pelos quais pode afetar a composição das bactérias e até gerar meios de resistência destas a antibióticos como citado por Good (2018).

Ainda, os efeitos e correlações entre estas alterações e os desfechos fisiológicos advindos da exposição ao HBG ainda não estão totalmente esclarecidos na literatura científica. Estudo recente encontrou resultados similares ao do nosso grupo de pesquisa (Cattani *et al.*, 2017) quanto a indução de um comportamento tipo depressivo, ao expor camundongos a diferentes dosagens de HBG, de forma aguda e crônica (Ait Bali *et al.*, 2017). Por outro lado, os pesquisadores demonstraram diminuição no conteúdo de *Corynebacterium*, Firmicutes, *Bacteroidetes* e *Lactobacillus* nas fezes dos camundongos expostos, contrariando os dados encontrados no nosso estudo, onde houve aumento significativo no conteúdo Firmicutes nas fezes de ratos imaturos expostos ao HBG durante gestação e lactação.

Nessa perspectiva, poderia se justificar as diferenças nos resultados, uma vez que, ratos e camundongos apresentam uma prevalência na composição de bactérias mais distinta (Flemer *et al.*, 2017), e cabe salientar que ratos se apresentam como bom modelo experimental para avaliação da microbiota por apresentarem maior similaridade com a de humanos (Wos-Oxley *et al.*, 2012; Flemer *et al.*, 2017).

Mao e colaboradores (2018), estudaram os efeitos do HBG sobre a microbiota da prole utilizando um modelo experimental de

exposição ao herbicida em ratas Sprague-Dawley gestantes na água de beber até o desmame, posteriormente, a prole continuou recebendo o tratamento *ad libitum* na água até 125 dias de idade. As fezes foram coletadas e analisadas em diferentes períodos do protocolo, contudo, diferenças significativas na microbiota só foram observadas nos animais com 31 dias de idade, tanto nos grupos expostos ao glifosato ou HBG, e apresentaram aumento significativo no gênero *Prevotella* (Filo Bacteroidetes) e gênero *Mucispirillum* (Filo Deferribacteres) e diminuição na prevalência do gênero *Lactobacillus* (Filo Firmicutes) e do gênero *Aggregatibacter* (Filo Proteobacteria).

Os efeitos da exposição ao glifosato ou HBG na microbiota de diferentes espécies de animais, bem como os encontrados em estudos com abelhas (Motta *et al.*, 2018), tartarugas marinhas (Kittle *et al.*, 2018), porcos (Shehata *et al.*, 2013) e ruminantes (Ackermann *et al.*, 2015) enfatizam a necessidade desta investigação, assim como seu potencial risco para saúde dos seres vivos e do ecossistema.

Considerando-se o uso cada vez maior de agrotóxicos, justificado pela necessidade de se aumentar a produção de alimentos para uma população em crescente expansão, os poluentes ambientais têm se tornado um perigo para a saúde cada vez mais comum nas últimas décadas. Recentemente, vários estudos demonstraram a profunda relação entre a microbiota intestinal e nossa saúde.

A microbiota intestinal é muito sensível aos efeitos de compostos toxicantes variados, fármacos (em especial os antibióticos), estado nutricional, dieta e poluentes ambientais. No presente estudo apresentamos os efeitos da exposição materna ao HBG no intestino e na microbiota intestinal da prole. Esses eventos podem estar associados a efeitos subsequentes na saúde dos indivíduos. No futuro, mais estudos devem enviar esforços na compreensão da relação entre poluição ambiental, microbiota intestinal e saúde humana.

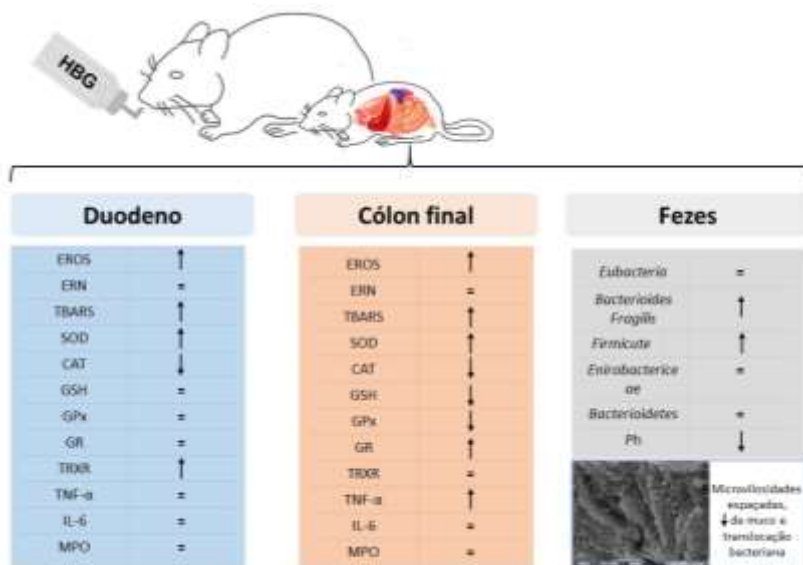
## 6.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que a exposição materna ao HBG induz estresse oxidativo tanto no duodeno como no cólon final da prole. Corroborando o desbalanço redox no intestino da prole, os resultados evidenciaram acúmulo de EROs, peroxidação lipídica e depleção de GSH em intestino de ratos expostos. Esses efeitos foram acompanhados de alterações na atividade de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPx, GR e GST, bem como ativação de mediadores inflamatórios. Em conjunto, o estresse oxidativo e inflamação

provocaram alterações ultraestruturais no duodeno e cólon final da prole, desencadeando translocação bacteriana. Além disso, os resultados do presente trabalho aumentam o escopo de pesquisas que comprovam os efeitos deletérios que a exposição ao HBG gera na composição da microbiota e pH fecal de animais de laboratório.

A Figura 34 sumariza os efeitos da exposição materna ao HBG durante a gestação e lactação sobre o duodeno, cólon final e fezes da prole.

Figura 34- Resumo dos efeitos da exposição materna ao HBG no duodeno, cólon final e microbiota de ratos imaturos.



↑: aumento; ↓: diminuição; =: sem alteração. Fonte: O autor.

A exposição materna ao HBG ocasionou uma perturbação na composição do microbioma intestinal, o que pode acarretar em alterações nos perfis dos metabólitos produzidos pela microbiota. Considerando-se que o sistema imune é, geralmente, o primeiro alvo de influência da microbiota e seus metabólitos, podemos especular que a exposição ao HBG pode influenciar o metabolismo energético, o sistema endócrino, o sistema nervoso, o sistema digestório e assim por diante.



## 7 CONCLUSÃO

O presente trabalho concluiu que a exposição ao HBG durante os períodos gestacional e lactacional induz alterações na microbiota, estresse oxidativo, inflamação e alterações ultraestruturais na barreira intestinal, no duodeno e cólon final de ratos imaturos.

Levando em consideração os dados já discutidos, e a recente literatura científica relacionada as consequências fisiopatológicas da disbiose, reafirma-se a hipótese que as alterações no sistema nervoso central já descritas com o mesmo modelo experimental, relacionados a estresse oxidativo e excitotoxicidade glutamatérgica, assim como comportamento tipo depressivo na idade adulta desta prole, podem estar associadas a desbalanço da microbiota intestinal ocasionada pela exposição ao glifosato demonstrada agora.

A partir dos dados destes dados, enfatiza-se a importância e a necessidade de considerar a microbiota intestinal como um indicador toxicológico para a poluição ambiental. No futuro, mais estudos devem buscar compreender o mecanismo da disbiose da microbiota intestinal induzida pela poluição ambiental e sua influência a longo prazo na saúde.

Atualmente, estudos estão focados na relação causal entre a microbiota e os sintomas associados à microbiota. Talvez o melhor entendimento do microbioma intestinal, e seu papel nos processos saúde-doença, possa fornecer um novo alvo para intervenção profilática ou terapêutica frente os efeitos potencialmente nocivos do glifosato.

O modelo experimental utilizado proporciona um melhor entendimento sobre os efeitos do HBG em um período importante do desenvolvimento do organismo, e ajuda a prever possíveis futuras complicações fisiológicas. A continuidade nas pesquisas, utilizando-se do mesmo modelo, investigando os efeitos nos diversos órgãos e sistemas, pode trazer um conhecimento mais amplo e um entendimento holístico quanto aos efeitos do HBG, e proporcionar bases científicas para desenvolvimento de estratégias para prevenção e tratamento dos efeitos deletérios ocasionados pelo herbicida na saúde da população.



## REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Med Sci Monit**, v. 10, n. 6, p. Ra141-7, Jun 2004. ISSN 1234-1010 (Print)1234-1010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ACKERMANN, W. et al. The influence of glyphosate on the microbiota and production of botulinum neurotoxin during ruminal fermentation. **Curr Microbiol**, v. 70, n. 3, p. 374-82, Mar 2015. ISSN 0343-8651. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-014-0732-3> >.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

AGRAWAL, D.; SULTANA, P.; GUPTA, G. S. Oxidative damage and changes in the glutathione redox system in erythrocytes from rats treated with hexachlorocyclohexane. **Food Chem Toxicol**, v. 29, n. 7, p. 459-62, Jul 1991. ISSN 0278-6915 (Print)0278-6915. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

AIT BALI, Y.; BA-MHAMED, S.; BENNIS, M. Behavioral and Immunohistochemical Study of the Effects of Subchronic and Chronic Exposure to Glyphosate in Mice. **Front Behav Neurosci**, v. 11, 2017. ISSN 1662-5153 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00146> >.

AL-HARBI, N. O. et al. Oxidative airway inflammation leads to systemic and vascular oxidative stress in a murine model of allergic asthma. **Int Immunopharmacol**, v. 26, n. 1, p. 237-45, May 2015. ISSN 1567-5769. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.032> >.

AL-SADI, R. et al. Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. **J Immunol**, v. 180, n. 8, p. 5653-61, Apr 15 2008. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 936486, 2012. ISSN 1110-7243. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/936486> >.

ALMEIDA, M. G. et al. Pro- and anti-oxidant parameters in rat liver after short-term exposure to hexachlorobenzene. **Hum Exp Toxicol**, v. 16, n. 5, p. 257-61, May 1997. ISSN 0960-3271 (Print)0960-3271. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/096032719701600504> >.

AMANN, R. I. et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 6, p. 1919-25, Jun 1990. ISSN 0099-2240 (Print)0099-2240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

AMARANTE JUNIOR, O. P. D. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, p. 589-593, 2002. ISSN 0100-4042. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000400014&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000400014&nrm=iso) >.

ANADON, A. et al. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicol Lett**, v. 190, n. 1, p. 91-5, Oct 8 2009. ISSN 0378-4274. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.008> >.

ANVISA. Seminário Anvisa: Mercado e regulação de agrotóxicos., 2012.

\_\_\_\_\_. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), relatório de atividades de 2013 e 2015.** 2015

ARGOU-CARDOZO, I.; ZEIDAN-CHULIA, F. Clostridium Bacteria and Autism Spectrum Conditions: A Systematic Review and Hypothetical Contribution of Environmental Glyphosate Levels. **Med Sci (Basel)**, v. 6, n. 2, Apr 4 2018. ISSN 2076-3271. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/medsci6020029> >.



ARNER, E. S.; ZHONG, L.; HOLMGREN, A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods Enzymol**, v. 300, p. 226-39, 1999. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

AVIELLO, G.; KNAUS, U. G. ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue Or Sabotage? **Br J Pharmacol**, v. 174, n. 12, p. 1704-1718, Jun 2017. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13428> >.

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 23, n. 19, p. 18988-9001, Oct 2016. ISSN 0944-1344. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7425-3> >.

BAILEY, D. C. et al. Chronic exposure to a glyphosate-containing pesticide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in *Caenorhabditis elegans*. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 57, p. 46-52, Jan 2018. ISSN 1382-6689. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.11.005> >.

BANERJEE, B. D. et al. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. **Toxicol Lett**, v. 107, n. 1-3, p. 33-47, Jun 30 1999. ISSN 0378-4274 (Print)0378-4274. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BAOTHMAN, O. A. et al. The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. In: (Ed.). **Lipids Health Dis**, v.15, 2016. ISBN 1476-511X (Electronic).

BARCZYNSKA, R. et al. Bacterial Microbiota and Fatty Acids in the Faeces of Overweight and Obese Children. **Pol J Microbiol**, v. 67, n. 3, p. 339-345, 2018. ISSN 1733-1331 (Print)1733-1331. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.21307/pjm-2018-041> >.

BARKO, P. et al. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. In: (Ed.). **J Vet Intern Med**, v.32, 2018. p.9-25. ISBN 0891-6640 (Print)1939-1676 (Electronic).

BEASLEY, D. E. et al. The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome. In: (Ed.). **PLoS One**, v.10, 2015. ISBN 1932-6203 (Electronic).

BENACHOUR, N. et al. Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 53, n. 1, p. 126-33, Jul 2007. ISSN 0090-4341 (Print)0090-4341. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-006-0154-8> >.

BENEDETTI, A. L. et al. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. **Toxicol Lett**, v. 153, n. 2, p. 227-32, Nov 2 2004. ISSN 0378-4274 (Print)0378-4274. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.008> >.

BEURET, C. J.; ZIRULNIK, F.; GIMENEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. **Reprod Toxicol**, v. 19, n. 4, p. 501-4, Mar-Apr 2005. ISSN 0890-6238 (Print)0890-6238. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.09.009> >.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med**, v. 61, p. 882-8, May 1963. ISSN 0022-2143 (Print)0022-2143. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 299-305, 1984. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BOVERIS, A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 227, n. 2, p. 534-41, Dec 1983. ISSN 0003-9861 (Print)0003-9861. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BREWSTER, D. W.; WARREN, J.; HOPKINS, W. E. Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: Tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 43-51, 1991/07/01/1991. ISSN 0272-0590. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/027205909190237X> >.

BROOKS, A. W. et al. Gut microbiota diversity across ethnicities in the United States. **PLOS Biology**, v. 16, n. 12, p. e2006842, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006842> >.

BURKE-GAFFNEY, A.; CALLISTER, M. E.; NAKAMURA, H. Thioredoxin: friend or foe in human disease? **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, n. 8, p. 398-404, Aug 2005. ISSN 0165-6147 (Print)0165-6147. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2005.06.005> >.

BUS, J. S. Analysis of Moms Across America report suggesting bioaccumulation of glyphosate in U.S. mother's breast milk: Implausibility based on inconsistency with available body of glyphosate animal toxicokinetic, human biomonitoring, and physico-chemical data. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 73, n. 3, p. 758-64, Dec 2015. ISSN 0273-2300. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.10.022> >.

CAGLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 25, n. 1, p. 57-62, Jan 2008. ISSN 1382-6689 (Print)1382-6689. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2007.08.011> >.

CAHENZLI, J. et al. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. **Cell Host Microbe**, v. 14, n. 5, p. 559-70, Nov 13 2013. ISSN 1931-3128. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.10.004> >.

CAKICI, O. Histopathological study of toxic effects of carbaryl on digestive tract of *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). **Environ Sci Pollut**

**Res Int**, v. 23, n. 13, p. 13432-7, Jul 2016. ISSN 0944-1344. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-6529-0> >.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-90, 1985. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

**CARNEIRO, F. F.** et al. **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** ABRASCO. Rio de Janeiro. 2012

CATTANI, D. et al. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, p. 67-80, Jul 15 2017. ISSN 0300-483x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.001> >.

\_\_\_\_\_. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320, p. 34-45, Jun 5 2014. ISSN 0300-483x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.001> >.

CENIT, M. C.; SANZ, Y.; CODOÑER-FRANCH, P. Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. **World J Gastroenterol**, v. 23, n. 30, p. 5486-98, Aug 14 2017. ISSN 1007-9327 (Print)2219-2840 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i30.5486> >.

CHAN, P.; MAHLER, J. NTP technical report on the toxicity studies of Glyphosate (CAS No. 1071-83-6) Administered In Dosed Feed To F344/N Rats And B6C3F1 Mice. **Toxic Rep Ser**, v. 16, p. 1-d3, Jul 1992. ISSN 1521-4621 (Print)1521-4621. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHANG, C.; LIN, H. Dysbiosis in gastrointestinal disorders. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 30, n. 1, p. 3-15, Feb 2016. ISSN 1521-6918. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.001> >.

CHARBONNEAU, M. R. et al. Sialylated Milk Oligosaccharides Promote Microbiota-Dependent Growth in Models of Infant Undernutrition. **Cell**, v. 164, n. 5, p. 859-71, Feb 25 2016. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.024> >.

CHENG, G.; LAMBETH, J. D. NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. **J Biol Chem**, v. 279, n. 6, p. 4737-42, Feb 6 2004. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M305968200> >.

CHLOPECKA, M. et al. Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses - in vitro study. **Pestic Biochem Physiol**, v. 113, p. 25-30, Jul 2014. ISSN 0048-3575. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.06.005> >.

\_\_\_\_\_. The effect of glyphosate-based herbicide Roundup and its co-formulant, POEA, on the motoric activity of rat intestine - In vitro study. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 49, p. 156-162, Jan 2017. ISSN 1382-6689. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.12.010> >.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Intestinal redox biology and oxidative stress. **Semin Cell Dev Biol**, v. 23, n. 7, p. 729-37, Sep 2012. ISSN 1084-9521. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.03.014> >.

CLAIR, E. et al. Effects of Roundup((R)) and glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Curr Microbiol**, v. 64, n. 5, p. 486-91, May 2012. ISSN 0343-8651. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-012-0098-3> >.

\_\_\_\_\_. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. **Toxicol In Vitro**, v. 26, n. 2, p. 269-79, Mar 2012. ISSN 0887-2333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2011.12.009> >.

CLIFFE, L. J. et al. Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. **Science**, v. 308, n. 5727, p. 1463-5, Jun 3

2005. ISSN 0036-8075. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1108661> >.

CONNOLLY, A. et al. Glyphosate in Irish adults - A pilot study in 2017. **Environ Res**, v. 165, p. 235-236, Aug 2018. ISSN 0013-9351. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2018.04.025> >.

CSILLAG, C. et al. Expression of the genes dual oxidase 2, lipocalin 2 and regenerating islet-derived 1 alpha in Crohn's disease. **Scand J Gastroenterol**, v. 42, n. 4, p. 454-63, Apr 2007. ISSN 0036-5521 (Print)0036-5521. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1080/00365520600976266> >.

DALLEGRAVE, E. et al. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicol Lett**, v. 142, n. 1-2, p. 45-52, Apr 30 2003. ISSN 0378-4274 (Print)0378-4274. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/> >.

DARUICH, J.; ZIRULNIK, F.; GIMENEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. **Environ Res**, v. 85, n. 3, p. 226-31, Mar 2001. ISSN 0013-9351 (Print)0013-9351. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1006/enrs.2000.4229> >.

DAS, K. C. Thioredoxin system in premature and newborn biology. **Antioxid Redox Signal**, v. 6, n. 1, p. 177-84, Feb 2004. ISSN 1523-0864 (Print)1523-0864. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1089/152308604771978480> >.

DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 33, p. 14691-6, Aug 17 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1005963107> >.

DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V. L. et al. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 335-346, Dec 2013. ISSN 0891-5849. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.043> >.

DEN BESTEN, G. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **J Lipid Res**, v. 54, n. 9, p. 2325-40, Sep 2013. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R036012> >.

DIAZ HEIJTZ, R. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 7, p. 3047-52, Feb 15 2011. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1010529108> >.

DORE, J. et al. Design and evaluation of a 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe for specific detection and quantitation of human faecal Bacteroides populations. **Syst Appl Microbiol**, v. 21, n. 1, p. 65-71, Mar 1998. ISSN 0723-2020 (Print)0723-2020. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020\(98\)80009-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020(98)80009-x) >.

ECOBICHON, D. J. Our changing perspectives on benefits and risks of pesticides: a historical overview. **Neurotoxicology**, v. 21, n. 1-2, p. 211-8, Feb-Apr 2000. ISSN 0161-813X (Print)0161-813x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

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, Nov 2009. ISSN 1382-6689. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2009.06.001> >.

FLEMER, B. et al. Fecal microbiota variation across the lifespan of the healthy laboratory rat. **Gut Microbes**, v. 8, n. 5, p. 428-439, Sep 3 2017. ISSN 1949-0976. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2017.1334033> >.

FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-21, 1984. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FUKUDA, S. et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. **Nature**, v. 469, p. 543,

01/26/online 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nature09646> >.

GAGNIÈRE, J. et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 2, p. 501-18, Jan 14 2016. ISSN 1007-9327 (Print)2219-2840 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.501> >.

GARRETT, W. S.; GORDON, J. I.; GLIMCHER, L. H. Homeostasis and Inflammation in the Intestine. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 859-70, Mar 19 2010. ISSN 0092-8674 (Print)1097-4172 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.023> >.

GARTNER, L. **Tratado de Histologia em cores**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2010. Disponível em: < [https://books.google.com/books/about/Tratado\\_de\\_Histologia.html?id=RHTFLK\\_JxCYC](https://books.google.com/books/about/Tratado_de_Histologia.html?id=RHTFLK_JxCYC) >.

\_\_\_\_\_. **Tratado de Histologia**. 4. 2017. Disponível em: < [https://books.google.com/books/about/Tratado\\_de\\_Histologia.html?id=RHTFLK\\_JxCYC](https://books.google.com/books/about/Tratado_de_Histologia.html?id=RHTFLK_JxCYC) >.

GASNIER, C. et al. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184-91, Aug 21 2009. ISSN 0300-483x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.06.006> >.

GEHIN, A.; GUYON, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 22, n. 1, p. 27-34, Jul 2006. ISSN 1382-6689 (Print)1382-6689. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2005.11.003> >.

GHASEMI-NIRI, S. F. et al. Phosalone-induced inflammation and oxidative stress in the colon: Evaluation and treatment. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 21, p. 4999-5011, Jun 7 2016. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i21.4999> >.



GOOD, P. Evidence the U.S. autism epidemic initiated by acetaminophen (Tylenol) is aggravated by oral antibiotic amoxicillin/clavulanate (Augmentin) and now exponentially by herbicide glyphosate (Roundup). **Clin Nutr ESPEN**, v. 23, p. 171-183, Feb 2018. ISSN 2405-4577. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.10.005> >.

GOODRICH, J. K. et al. Human genetics shape the gut microbiome. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 789-99, Nov 6 2014. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053> >.

GRASBERGER, H. et al. Increased Expression of DUOX2 Is an Epithelial Response to Mucosal Dysbiosis Required for Immune Homeostasis in Mouse Intestine. **Gastroenterology**, v. 149, n. 7, p. 1849-59, Dec 2015. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.062> >.

GUO, J. et al. Differential expression of glutathione S-transferase isoenzymes in murine small intestine and colon. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 131, n. 3, p. 443-52, Mar 2002. ISSN 1096-4959 (Print)1096-4959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GUYTON, K. Z. et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **Lancet Oncol**, v. 16, n. 5, p. 490-1, May 2015. ISSN 1470-2045. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(15\)70134-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(15)70134-8) >.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, n. 22, p. 7130-9, Nov 25 1974. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5. Oxford: Clarendon Press, 2015.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 231-55, May 2004.

ISSN 0007-1188 (Print)0007-1188. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776> >.

HEIMAN, M. L.; GREENWAY, F. L. A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. In: (Ed.). **Mol Metab**, v.5, 2016. p.317-20. ISBN 2212-8778 (Electronic).

HOLTMANN, M. H.; GALLE, P. R.; NEURATH, M. F. Immunotherapeutic approaches to inflammatory bowel diseases. **Expert Opin Biol Ther**, v. 1, n. 3, p. 455-66, May 2001. ISSN 1471-2598 (Print)1471-2598. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1517/14712598.1.3.455> >.

HOOKS, K. B.; O'MALLEY, M. A. Dysbiosis and Its Discontents. **MBio**, v. 8, n. 5, Oct 10 2017. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01492-17> >.

HORAI, R. et al. Microbiota-dependent activation of an autoreactive T cell receptor provokes autoimmunity in an immunologically privileged site. **Immunity**, v. 43, n. 2, p. 343-53, Aug 18 2015. ISSN 1074-7613 (Print)1097-4180 (Electronic). Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.014> >.

HSIAO, E. Y. et al. The microbiota modulates gut physiology and behavioral abnormalities associated with autism. **Cell**, v. 155, n. 7, p. 1451-63, Dec 19 2013. ISSN 0092-8674 (Print)1097-4172 (Electronic). Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024> >.

HU, X.; WANG, T.; JIN, F. Alzheimer's disease and gut microbiota. **Sci China Life Sci**, v. 59, n. 10, p. 1006-1023, Oct 2016. ISSN 1674-7305. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11427-016-5083-9> >.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. D. Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008. ISSN 0100-4042. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422008000500046&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000500046&nrm=iso) >.

IBAMA, I. B. D. M. A.-. **Relatório de Comercialização de Agrotóxicos.** 2016

ILSI. **Um exame da segurança ambiental da proteína CP4 EPSPS.** CENTRO DE AVALIAÇÃO DE RISCOS AMBIENTAIS, F. D. P. D. I. Washington - EUA 2010.

JABLONSKA-TRYPUC, A. et al. The impact of pesticides on oxidative stress level in human organism and their activity as an endocrine disruptor. **J Environ Sci Health B**, v. 52, n. 7, p. 483-494, Jul 3 2017. ISSN 0360-1234. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2017.1303322> >.

JANEWAY, C. **Imunobiologia - Sistema Imune na Saúde e na Doença.** 2006. 824.

JIN, C. et al. Oral imazalil exposure induces gut microbiota dysbiosis and colonic inflammation in mice. **Chemosphere**, v. 160, p. 349-58, Oct 2016. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.105> >.

JONES, R. M.; NEISH, A. S. Recognition of bacterial pathogens and mucosal immunity. **Cell Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 670-6, May 2011. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01579.x> >.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** São Paulo: Ed. Santos, 1983.

KAMADA, N. et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 5, p. 321-35, May 2013. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri3430> >.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. Functions of innate immune cells and commensal bacteria in gut homeostasis. **J Biochem**, v. 159, n. 2, p. 141-9,

Feb 2016. ISSN 0021-924x. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvv119>>.

KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit Rev Toxicol**, v. 23, n. 1, p. 21-48, 1993. ISSN 1040-8444 (Print)1040-8444. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.3109/10408449309104073>>.

KIER, L. D.; KIRKLAND, D. J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. **Crit Rev Toxicol**, v. 43, n. 4, p. 283-315, Apr 2013. ISSN 1040-8444. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.3109/10408444.2013.770820>>.

KITTLE, R. P. et al. Effects of glyphosate herbicide on the gastrointestinal microflora of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) Linnaeus. **Mar Pollut Bull**, v. 127, p. 170-174, Feb 2018. ISSN 0025-326x. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.11.030>>.

KO, C. H. et al. Oxidative Challenge and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity of Preterm and Term Neonatal Red Blood Cells. **Neonatology**, v. 96, n. 2, p. 96-101, 2009. ISSN 1661-7800. Disponível em: <  
<https://www.karger.com/DOI/10.1159/000205720>>.

KOLIOS, G.; PETOUMENOS, C.; NAKOS, A. Mediators of inflammation: production and implication in inflammatory bowel disease. **Hepatogastroenterology**, v. 45, n. 23, p. 1601-9, Sep-Oct 1998. ISSN 0172-6390 (Print)0172-6390. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/>>.

KONGTIP, P. et al. Glyphosate and Paraquat in Maternal and Fetal Serums in Thai Women. <http://dx.doi.org/10.1080/1059924X.2017.1319315>, 19 Apr 2017 2017. Disponível em: <  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1059924X.2017.1319315>>.

KRUGER, M. et al. Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. **Anaerobe**, v. 20, p. 74-8, Apr 2013. ISSN 1075-9964. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.01.005>>.

KURASHIMA, Y.; GOTO, Y.; KIYONO, H. Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 12, p. 3108-15, Dec 2013. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201343782> >.

LAI, K. P. et al. Dietary Exposure to the Environmental Chemical, PFOS on the Diversity of Gut Microbiota, Associated With the Development of Metabolic Syndrome. **Front Microbiol**, v. 9, p. 2552, 2018. ISSN 1664-302X (Print)1664-302x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02552> >.

LARSEN, K. et al. Effects of Sublethal Exposure to a Glyphosate-Based Herbicide Formulation on Metabolic Activities of Different Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Rats. **Int J Toxicol**, v. 33, n. 4, p. 307-318, Jul 2014. ISSN 1091-5818. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/1091581814540481> >.

\_\_\_\_\_. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 34, n. 3, p. 811-8, Nov 2012. ISSN 1382-6689. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.005> >.

LE CHATELIER, E. et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 541-6, Aug 29 2013. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature12506> >.

LEE, J. et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 1327-36, Dec 2006. ISSN 1465-7392 (Print)1465-7392. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1500> >.

LINDEN, S. K.; FLORIN, T. H.; MCGUCKIN, M. A. Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. **PLoS One**, v. 3, n. 12, p. e3952, 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003952> >.

LOPEZ, M. et al. **Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato.** 2005. 335-345.

LOZANO, V. L. et al. Sex-dependent impact of Roundup on the rat gut microbiome. **Toxicol Rep**, v. 5, p. 96-107, 2018. ISSN 2214-7500. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.005> >.

LUEKEN, A. et al. Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. **Toxicol Lett**, v. 147, n. 1, p. 35-43, Feb 28 2004. ISSN 0378-4274 (Print)0378-4274. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MA, J.; LI, X. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. **Chemosphere**, v. 128, p. 293-8, Jun 2015. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.017> >.

MAES, M. et al. In depression, bacterial translocation may drive inflammatory responses, oxidative and nitrosative stress (O&NS), and autoimmune responses directed against O&NS-damaged neopeptides. **Acta Psychiatr Scand**, v. 127, n. 5, p. 344-54, May 2013. ISSN 0001-690x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0447.2012.01908.x> >.

MAO, Q. et al. The Ramazzini Institute 13-week pilot study on glyphosate and Roundup administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats: effects on the microbiome. **Environ Health**, v. 17, n. 1, p. 50, May 29 2018. ISSN 1476-069x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12940-018-0394-x> >.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BELLE, R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. **Biol Cell**, v. 96, n. 3, p. 245-9, Apr 2004. ISSN 0248-4900 (Print)0248-4900. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biolcel.2003.11.010> >.

MARC, J. et al. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chem Res Toxicol**, v. 15, n. 3, p. 326-31, Mar 2002. ISSN 0893-228X (Print)0893-228x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. **Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level.** 2003. 8-12.

MARCIANO, F.; VAJRO, P. Chapter 8 - Oxidative Stress and Gut Microbiota\*\*Conflict of interest: None. In: GRACIA-SANCHO, J. e SALVADÓ, J. (Ed.). **Gastrointestinal Tissue:** Academic Press, 2017. p.113-123. ISBN 978-0-12-805377-5.

MARTIN, F. et al. **Increased exposure to pesticides and colon cancer: Early evidence in Brazil.** 2018.

MELLO, J. L. D. **Avaliação da contaminação por HCH e DDT, dos leites de vaca e humano, provenientes da cidade dos meninos, Duque de Caxias-RJ.** 1999. (Master). Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

MESNAGE, R. et al. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. **Environ Health**, v. 14, p. 70, Aug 25 2015. ISSN 1476-069x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12940-015-0056-1> >.

MICHIGAN, U. D. **Michigan Histology - A secondlook series** 2018.

MILIC, M. et al. Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 69, n. 2, p. 154-168, Jun 1 2018. ISSN 0004-1254. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3114> >.

MIRPURI, J. et al. Proteobacteria-specific IgA regulates maturation of the intestinal microbiota. **Gut Microbes**, v. 5, n. 1, p. 28-39, Jan-Feb 2014. ISSN 1949-0976. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.26489> >.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J**

**Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, May 25 1972. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MOTTA, E. V. S.; RAYMANN, K.; MORAN, N. A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. 2018-10-09 2018. Disponível em: < <https://www.pnas.org/content/115/41/10305> >.

NEISH, A. S. Redox signaling mediated by the gut microbiota. **Free Radic Res**, v. 47, n. 11, p. 950-7, Nov 2013. ISSN 1029-2470. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2013.833331> >.

NENCI, A. et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. **Nature**, v. 446, n. 7135, p. 557-61, Mar 29 2007. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature05698> >.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 5, p. 329-42, May 2014. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri3661> >.

NEVISON, C. D. A comparison of temporal trends in United States autism prevalence to trends in suspected environmental factors. **Environ Health**, v. 13, p. 73, Sep 5 2014. ISSN 1476-069x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1476-069x-13-73> >.

NIELSEN, L. N. et al. Glyphosate has limited short-term effects on commensal bacterial community composition in the gut environment due to sufficient aromatic amino acid levels. **Environ Pollut**, v. 233, p. 364-376, Feb 2018. ISSN 0269-7491. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.016> >.

NIEMANN, L. et al. A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure of operators and consumers. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 10, n. 1, p. 3-12, March 01 2015. ISSN 1661-5867. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00003-014-0927-3> >.



NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287-312, Dec 1 2001. ISSN 0891-5849 (Print)0891-5849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

OLIVEIRA, T. M. D. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. Departamento de Biologia, Universidade Aveiro, Porto.

PAREKH, P. J.; BALART, L. A.; JOHNSON, D. A. The Influence of the Gut Microbiome on Obesity, Metabolic Syndrome and Gastrointestinal Disease. **Clin Transl Gastroenterol**, v. 6, p. e91, Jun 18 2015. ISSN 2155-384X (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ctg.2015.16> >.

PARENTE, E.; HILL, C. Characterization of Enterocin 1146, a Bacteriocin from *Enterococcus faecium* Inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 7, p. 497-502, 1992. Disponível em: < <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-55.7.497> >.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p. 1115-22, Dec 2005. ISSN 0045-6535 (Print)0045-6535. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.044> >.

PEREIRA, A. G. et al. Low-concentration exposure to glyphosate-based herbicide modulates the complexes of the mitochondrial respiratory chain and induces mitochondrial hyperpolarization in the Danio rerio brain. **Chemosphere**, v. 209, p. 353-362, Oct 2018. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.075> >.

PEREZ, S. et al. Redox signaling in the gastrointestinal tract. **Free Radic Biol Med**, v. 104, p. 75-103, Mar 2017. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.048> >.

POLI, G. et al. Oxidative stress and cell signalling. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 9, p. 1163-82, May 2004. ISSN 0929-8673 (Print)0929-8673. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PORTIER, C. J. et al. Differences in the carcinogenic evaluation of glyphosate between the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the European Food Safety Authority (EFSA). **J Epidemiol Community Health**, v. 70, n. 8, p. 741-5, Aug 2016. ISSN 0143-005x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1136/jech-2015-207005> >.


POTTEN, C. S. et al. A possible explanation for the differential cancer incidence in the intestine, based on distribution of the cytotoxic effects of carcinogens in the murine large bowel. **Carcinogenesis**, v. 13, n. 12, p. 2305-12, Dec 1992. ISSN 0143-3334 (Print)0143-3334. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RAO, J. N.; WANG, J.-Y. Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth. 2010 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >.

RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723-41, Dec 1993. ISSN 0360-3997 (Print)0360-3997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RASHIDAN, M. et al. Detection of B. fragilis group and diversity of bft enterotoxin and antibiotic resistance markers cepA, cfiA and nim among intestinal Bacteroides fragilis strains in patients with inflammatory bowel disease. **Anaerobe**, v. 50, p. 93-100, Apr 2018. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.02.005> >.

RICHARD, S. et al. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 6, p. 716-20, Jun 2005. ISSN 0091-6765 (Print)0091-6765. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.7728> >.

RIEG, C. E. H. **Consequências da exposição materna  formulação comercial contendo glifosato nos parâmetros bioquímicos e morfológicos em fígado e sangue periférico de ratos imaturos**. 2016. Dissertação (Mestrado) (Master). Programa de Pós Graduação em Farmacia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.

RIISER, A. The human microbiome, asthma, and allergy. In: (Ed.). **Allergy Asthma Clin Immunol**, v.11, 2015. ISBN 1710-1484 (Print)1710-1492 (Electronic).

ROMERO, D. M.; RIOS DE MOLINA, M. C.; JUAREZ, A. B. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 74, n. 4, p. 741-7, May 2011. ISSN 0147-6513. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.10.034> >.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. In: (Ed.). **Interdisc Toxicol**, v.6, 2013. p.159-84. ISBN 1337-6853 (Print)1337-9569 (Electronic).

\_\_\_\_\_. Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. In: (Ed.). **Surg Neurol Int**, v.6, 2015. ISBN 2229-5097 (Print)2152-7806 (Electronic).

SANCHEZ, E.; LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Discerning the role of *Bacteroides fragilis* in celiac disease pathogenesis. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 18, p. 6507-15, Sep 2012. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00563-12> >.

SCHINASI, L.; LEON, M. E. Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 4, p. 4449-527, Apr 23 2014. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph110404449> >.

SCIENCE. Infographic: pesticide planet. In: (Ed.). **Science**. United States, v.341, 2013. p.730-1. ISBN 1095-9203 (Electronic)0036-8075 (Linking).

SEALEY, L. A. et al. Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. **Environ Int**, v. 88, p. 288-298, Mar 2016. ISSN 0160-4120. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.021> >.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS Biol**, v. 14, n. 8, p. e1002533, Aug 2016. ISSN 1544-9173. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533> >.

SHEHATA, A. A. et al. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. **Curr Microbiol**, v. 66, n. 4, p. 350-8, Apr 2013. ISSN 0343-8651. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-012-0277-2> >.

SLYEPCHENKO, A. et al. Intestinal Dysbiosis, Gut Hyperpermeability and Bacterial Translocation: Missing Links Between Depression, Obesity and Type 2 Diabetes. **Curr Pharm Des**, v. 22, n. 40, p. 6087-6106, 2016. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SPANOGIANNPOULOS, P. et al. A rifamycin inactivating phosphotransferase family shared by environmental and pathogenic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 19, p. 7102-7107, 2014. Disponível em: < <https://www.pnas.org/content/pnas/111/19/7102.full.pdf> >.

STAUB, J. M. et al. Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an E. coli membrane efflux transporter. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 39, n. 4, p. 641-7, Apr 2012. ISSN 1367-5435. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-011-1057-x> >.

SUN, Y. et al. Vitamin E alleviates phoxim-induced toxic effects on intestinal oxidative stress, barrier function, and morphological changes in rats. **Environ Sci Pollut Res Int**, Jul 12 2018. ISSN 0944-1344. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-2666-y> >.

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 4, p. 631-59, Feb 2013. ISSN 1420-682x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x> >.

SZANTO, I. et al. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. **J Pathol**, v. 207,

n. 2, p. 164-76, Oct 2005. ISSN 0022-3417 (Print)0022-3417. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/path.1824> >.

SZAREK, J. et al. Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Mar Environ Res**, v. 50, n. 1-5, p. 263-6, Jul-Dec 2000. ISSN 0141-1136 (Print)0141-1136. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TREVISAN, R. **MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E OUTROS PARÂMETROS BIOLÓGICOS EM PEIXES E BIVALVES COMO FERRAMENTAS DE MONITORAMENTO AMBIENTAL: ANÁLISE DE DOIS ECOSISTEMAS CATARINENSES**. 2008.

ULLUWISHEWA, D. et al. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. **J Nutr**, v. 141, n. 5, p. 769-76, May 2011. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3945/jn.110.135657> >.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar 10 2006. ISSN 0009-2797 (Print)0009-2797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009> >.

VAN BRUGGEN, A. H. C. et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Sci Total Environ**, v. 616-617, p. 255-268, Mar 2018. ISSN 0048-9697. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309> >.

VASILUK, L.; PINTO, L. J.; MOORE, M. M. Oral bioavailability of glyphosate: studies using two intestinal cell lines. **Environ Toxicol Chem**, v. 24, n. 1, p. 153-60, Jan 2005. ISSN 0730-7268 (Print)0730-7268. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VRAKAS, S. et al. Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0170034, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0170034> >.

WALSH, L. P. et al. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. In: (Ed.). **Environ Health Perspect**, v.108, 2000. p.769-76. ISBN 0091-6765 (Print).

WANG, G. et al. Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate. In: (Ed.). **Parkinsonism Relat Disord**. England, v.17, 2011. p.486-7. ISBN 1873-5126 (Electronic)1353-8020 (Linking).

WANG, Y.; SUGIYAMA, H. Botulism in metronidazole- treated conventional adult mice challenged orogastrically with spores of *Clostridium botulinum* type A or B. **Infect Immun**, v. 46, n. 3, p. 715-9, Dec 1984. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WEISS, G. A.; HENNET, T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. **Cell Mol Life Sci**, v. 74, n. 16, p. 2959-2977, Aug 2017. ISSN 1420-682x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x> >.

WHO, W. H. O.-. Pesticide residues in food. 2018. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food> >.

WILLIAMS, G. M. et al. A review of the carcinogenic potential of glyphosate by four independent expert panels and comparison to the IARC assessment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n. sup1, p. 3-20, 2016/09/30 2016. ISSN 1040-8444. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1214677> >.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 31, n. 2 Pt 1, p. 117-65, Apr 2000. ISSN 0273-2300 (Print)0273-2300. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/rtp.1999.1371> >.

WOS-OXLEY, M. et al. Comparative evaluation of establishing a human gut microbial community within rodent models. **Gut Microbes**, v. 3, n. 3, p. 234-49, May-Jun 2012. ISSN 1949-0976. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.19934> >.

WU, H.; TREMAROLI, V.; BACKHED, F. Linking Microbiota to Human Diseases: A Systems Biology Perspective. **Trends Endocrinol Metab**, v. 26, n. 12, p. 758-770, Dec 2015. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.011> >.

YAMASHITA, T. Intestinal Immunity and Gut Microbiota in Atherogenesis. **J Atheroscler Thromb**, v. 24, n. 2, p. 110-9, Feb 1 2017. ISSN 1340-3478 (Print)1880-3873 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5551/jat.38265> >.

YAMASHITA, T. et al. Gut Microbiota and Coronary Artery Disease. **Int Heart J**, v. 57, n. 6, p. 663-671, Dec 2 2016. ISSN 1349-2365. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1536/ihj.16-414> >.

YANO, J. M. et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. **Cell**, v. 161, n. 2, p. 264-76, Apr 9 2015. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047> >.

YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222-7, May 9 2012. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature11053> >.

YU, L. C. et al. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. **World J Gastrointest Pathophysiol**, v. 3, n. 1, p. 27-43, Feb 15 2012. ISSN 2150-5330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4291/wjgp.v3.i1.27> >.

ZAMANI, S. et al. Detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in patients with ulcerative colitis. **Gut Pathog**, v. 9, p. 53, 2017. ISSN 1757-4749 (Print)1757-4749. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13099-017-0202-0> >.

ZHOU, L. et al. Gut microbe analysis between hyperthyroid and healthy individuals. **Curr Microbiol**, v. 69, n. 5, p. 675-80, Nov 2014. ISSN 0343-8651. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-014-0640-6> >.

ZHU, R. et al. Oxidative stress and liver disease. **Hepatology Research**, v. 42, n. 8, p. 741-749, 2012. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1872-034X.2012.00996.x> >.