



C A P Í T U L O 11

EFEITO DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO GLIFOSATO NAS JUNÇÕES NEUROMUSCULARES NO MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS DE CAMUNDONGOS

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.3341725100711>

Eduarda Soligo

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Cascavel – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/5540431184678729>

Rafaella Cristina Lima da Silva

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Cascavel – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/5283470127086847>

Mikael Gerson Kuhn

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Cascavel – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/9197639483878066>

Ariadne Barbosa

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Cascavel – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/7900798582111763>

Marcia Miranda Torrejais

Orientadora, Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Cascavel – Paraná
<http://lattes.cnpq.br/6079757636423339>

RESUMO: O Glifosato é o composto ativo de diversos agrotóxicos e seu uso está relacionado a preocupações em relação à problemas metabólicos de saúde. A exposição materna a compostos a agrotóxicos pode promover alterações no desenvolvimento da prole. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a morfologia e morfometria das junções neuromusculares (JNMs) do músculo extensor longo dos dedos (ELD) da prole de camundongos expostos ao glifosato nos períodos pré e pós-natal e verificar se os efeitos desta exposição serão exacerbados pela

dieta hiperlipídica. Os animais foram separados em Grupo Controle (CTL-F1); Grupo Dieta Hiperlipídica (HIPER-F1); Grupo Glifosato (GF-F1) e Grupo Glifosato Dieta Hiperlipídica (GF-HIPER-F1). Aos 150 dias de vida os animais foram pesados, eutanasiados, foi avaliada obesidade através do índice de Lee e o músculo ELD foi coletado e armazenado no fixador Karnovsky, então submetido a técnica histoquímica Esterase Inespecífica para a realização dos estudos morfológico e morfométrico das JMN. O grupo HIPER-F1 teve aumento de 28% no peso corporal e 455% nas gorduras retroperitoneal e periepididimal comparados ao grupo CTL-F1. O grupo GF-HIPER-F1 teve redução de 35% nas gorduras retroperitoneal e periepididimal. O grupo GF-F1 apresentou aumento de 32% na área e de 15% no diâmetro maior quando comparado ao grupo CTL-F1. O diâmetro menor não apresentou alterações em nenhum dos grupos. Os outros grupos (HIPER-F1 e GF-HIPER-F1) não apresentaram alterações significativas.

PALAVRAS-CHAVE: Herbicida, Obesidade, Junção neuromuscular.

EFFECT OF MATERNAL EXPOSURE TO GLYPHOSATE ON NEUROMUSCULAR JUNCTIONS IN THE EXTENSOR DIGITORUM LONGUS MUSCLE OF MICE

ABSTRACT: Glyphosate is the active compound of several pesticides, and its use has been associated with concerns regarding metabolic health issues. Maternal exposure to pesticide compounds may induce changes in the development of the offspring. This study aimed to evaluate the morphology and morphometry of neuromuscular junctions (NMJs) in the extensor digitorum longus (EDL) muscle of the offspring of mice exposed to glyphosate during the prenatal and postnatal periods, and to investigate whether the effects of this exposure would be exacerbated by a high-fat diet. The animals were divided into four groups: Control Group (CTL-F1), High-Fat Diet Group (HIPER-F1), Glyphosate Group (GF-F1), and Glyphosate + High-Fat Diet Group (GF-HIPER-F1). At 150 days of age, the animals were weighed and euthanized; obesity was assessed using the Lee index, and the EDL muscle was collected and stored in Karnovsky's fixative, then subjected to the nonspecific esterase histochemical technique for the morphological and morphometric analysis of the NMJs. The HIPER-F1 group showed a 28% increase in body weight and a 455% increase in retroperitoneal and periepididymal fat compared to the CTL-F1 group. The GF-HIPER-F1 group showed a 35% reduction in retroperitoneal and periepididymal fat. The GF-F1 group showed a 32% increase in area and a 15% increase in major diameter when compared to the CTL-F1 group. The minor diameter showed no changes in any group. The other groups (HIPER-F1 and GF-HIPER-F1) did not show significant changes.

KEYWORDS: Herbicide, Obesity, Neuromuscular junction.

INTRODUÇÃO

Agrotóxico

O Glifosato é o composto ativo de diversos agrotóxicos, utilizado principalmente como herbicida na forma comercial de Roundup® (Monsanto, 2008), correspondendo ao composto de maior utilização no Brasil (Anvisa, 2012; Brasil, 2013). O glifosato é um herbicida organofosforado, de caráter não seletivo, e ação sistêmica, do grupo químico das glicinas substituídas (Monsanto, 2008). Seu mecanismo de toxicidade ocorre pela interferência na síntese de aminoácidos aromáticos essenciais (Willians *et al.*, 2000; Nodari *et al.*, 2020) que culmina na inibição do crescimento da planta.

O Estado do Paraná é o terceiro estado com maior consumo de agrotóxicos no país, correspondendo a 9,6 kg de agrotóxico/hectare/ano, ficando apenas posterior dos estados do Mato Grosso e São Paulo. A região de Cascavel está entre as três com maior consumo de agrotóxico do estado, chegando a 15,0 Kg/hectare/ano (Ipardes, 2013). Entre os anos de 2014 a 2017, Cascavel foi a cidade do Paraná que mais comercializou agrotóxicos, sendo 2.886,4 toneladas ao ano (Toledo *et al.*, 2021).

Obesidade

A Organização Mundial da Saúde (2020) define a obesidade como um acúmulo de gordura corporal, que pode desencadear problemas de saúde a longo prazo, sendo considerada uma doença de origem endócrina, nutricional e/ou metabólica (Dias *et al.*, 2017).

Dados da Pesquisa Nacional da Saúde (2020) mostraram que mais da metade dos adultos possuem excesso de peso (60,3%), sendo que a prevalência foi maior no sexo feminino (62,6%) e no sexo masculino (57,5%).

Visando compreender as consequências da obesidade para a saúde diversos modelos de indução a obesidade são utilizados, sendo um deles o modelo de obesidade com dieta hiperlipídica, que consiste na mudança da composição do alimento fornecido, sendo oferecido ao animal uma dieta com cerca de 20% a 60% de teor lipídico, de origem animal ou vegetal (Pereira *et al.*, 2003; Buettner *et al.*, 2007).

Programação metabólica

A exposição materna à agrotóxicos pode levar a programação metabólica (Oliveira *et al.*, 2021), pois, sua toxicidade pode influenciar o metabolismo e desenvolvimento dos tecidos a longo prazo (Cvitic *et al.*, 2018).

A programação metabólica está associada a diversas alterações no organismo, como doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão, e no tecido muscular (Barker *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2022).

A exposição materna à herbicidas como o glifosato está relacionada a mudanças metabólicas, como a deficiência óssea e até mesmo redução de atividade locomotora e aumento da ansiedade na vida adulta (Dallegrave *et al.*, 2003; Marc *et al.*, 2004; Gallegos *et al.*, 2016).

JNMs e os efeitos do agrotóxico nas JNMs

Estímulos provenientes do sistema nervoso controlam a atividade muscular e, participando deste mecanismo estão às JNMs, que são regiões sinápticas localizadas entre os neurônios motores e as fibras musculares esqueléticas (Wu *et al.*, 2010; Bloch-Gallego, 2015), responsáveis pela transmissão dos impulsos nervosos (Wu *et al.*, 2010), gerando a contração muscular (Fagerlund; Eriksson, 2009).

Quando um potencial de ação chega até a terminação nervosa, ocorre a abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}), desencadeando a migração das vesículas para a superfície nervosa, que se rompem e liberam a acetilcolina (ACh) para a fenda sináptica (Martym *et al.*, 2009). A parte pós-sináptica é constituída por receptores de ACh, que são ativados e respondem ao estímulo abrindo canais de sódio, promovendo a amplificação do sinal, garantindo a propagação da atividade elétrica e promovendo a contração muscular (Fagerlund; Eriksson, 2009).

Poucos são os trabalhos sobre os efeitos do glifosato nas JNMs. Marca (2021), estudando o músculo diafragma de camundongos adultos expostos ao glifosato através da gavagem, no período peripuberal, encontrou aumento na área e diâmetro maior das JNMs.

Sendo assim, poucos são os estudos sobre os efeitos do glifosato nas JNMs, e se esses efeitos podem serem exacerbados pela obesidade. Desta forma, acredita-se que a realização deste estudo será importante no entendimento de como esses dois insultos podem atuar nas JNMs do músculo extensor longo dos dedos (ELD).

OBJETIVOS

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a morfologia e morfometria das JNMs do músculo ELD da prole de camundongos expostos ao glifosato nos períodos pré e pós-natal e verificar se os efeitos desta exposição foram exacerbados pela dieta hiperlipídica.

MATERIAL E MÉTODOS:

Os experimentos envolvendo o uso de animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE em 16/09/2016.

Obtenção dos animais

Para a realização do experimento foram utilizados 30 camundongos da linhagem C57BL/6, desses 20 fêmeas e 10 machos, com idade entre 60 e 90 dias e média de peso corporal de 20g, oriundos do biotério central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE e mantidos no biotério setorial do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo - LAFEM, sob condições de temperatura ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (12 horas claro/escuro) controladas, que receberam ração padrão (Supralab, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o experimento.

Cruzamento

Após sete dias de aclimação foi realizado esfregaço vaginal para acompanhar o ciclo estral das fêmeas e, as que estavam na fase de proestro foram separadas para a realização dos cruzamentos, na proporção de duas fêmeas para um macho, durante todo o período noturno. Na manhã seguinte, foi realizado novo esfregaço vaginal, para identificação da presença de espermatozoides e, foi mantido o acompanhamento do ciclo estral durante quatro dias para a detecção da prenhez, sendo considerada prenhas as fêmeas que apresentaram espermatozoides no esfregaço vaginal e se mantiveram em fase de diestro durante os quatro dias.

Confirmada a prenhez as fêmeas foram acomodadas em caixas individuais, considerando este o dia primeiro dia de administração do glifosato. As que não estavam prenhas retornaram as caixas e o processo de cruzamento foi realizado novamente até que todas as fêmeas estivessem prenhas.

Administração do glifosato

As fêmeas foram separadas aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (CTL, $n=10$), que receberam água pura durante todo o período de prenhez (21 dias) e lactação (30 dias), e grupo glifosato (GF, $n=10$), que receberam a adição de 0,5% do herbicida glifosato (Roundup®, Monsanto Brasil) na água de beber durante o mesmo período. A formulação comercial de glifosato Roundup® Original DI (Monsanto, Brasil) que foi utilizada contém 445 g/L de sal de diamônio de N-fosfonometilglicina o que equivale a 370 g/L (37,0% m/v) do componente ativo glifosato (N-fosfometilglicina). Foi ofertada ração padrão *ad libitum* para os animais durante todo o experimento.

Procedimentos experimentais com a prole

Após 30 dias foi realizado o desmame e, durante os 30 dias seguintes a prole foi alimentada com ração padrão e água *ad libitum*. Em seguida, os camundongos machos foram separados em quatro grupos experimentais sendo nomeados de acordo com a administração de glifosato ou não às mães e, conforme a dieta ofertada aos filhotes. 1) Grupo Controle Dieta Padrão (CTL -F1, n=6): prole das mães CTL que receberam dieta padrão durante todo o período experimental; 2) Grupo Dieta Hiperlipídica (HIPER-F1, n=6): prole das mães CTL que receberam dieta hiperlipídica a partir dos 60 dias até os 150 dias de vida; 3) Grupo Glifosato Dieta Padrão (GF-F1, n=6): prole das mães GF que receberam dieta padrão durante todo o período experimental; 4) Grupo Glifosato Dieta Hiperlipídica (GF-HIPER-F1, n=6): prole das mães GF que receberam dieta hiperlipídica a partir dos 60 dias até os 150 dias de vida.

Composição das dietas

A dieta padrão para roedores (Supralab, Brasil) foi obtida no Biotério Central da UNIOESTE. Sua composição é de 70% de carboidratos, 20% de proteínas e 10% de gorduras, contendo 3,8 Kcal/g. Já a dieta hiperlipídica foi produzida no LAFEM, sendo que os ingredientes foram obtidos da empresa Prag Soluções, Brasil. Sua composição foi de: 29,95% de amido de milho, 14% de caseína, 12% de sacarose, 4% de óleo de soja, 5% de celulose microcristalina (fibra), 3,5% de mix mineral AIN 93 M, 1% de mix vitamina AIN 93 M, 0,3% de L cistina, 0,25% de bitartarato de colina, e 30% de gordura, contendo no total 5,35 Kcal/g.

Eutanásia e coleta do músculo ELD

A eutanásia foi realizada aos 150 dias de vida dos animais. Inicialmente os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (Anasedan®, Vetbrands, Brasil) e cloridrato de cetamina (Dopalen®, Vetbrands, Brasil) em concentração de 9mg/Kg e 90mg/Kg, respectivamente. Posteriormente, foi realizada a mensuração do comprimento nasoanal, peso corporal e peso das gorduras retroperitoneal e periepididimal.

Para a coleta do músculo ELD o músculo tibial anterior foi retirado para a exposição, dissecação e remoção do músculo ELD. Em seguida, foram medidos os parâmetros de comprimento (mm) e peso (g) do músculo com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess®, São Paulo, Brasil) e balança analítica. Os antímeros esquerdos foram fixados em Karnovsky (Karnovsky, 1965).

Avaliação da obesidade

Durante a eutanásia dos animais, o peso corporal e o comprimento nasal (CNA) foram obtidos para o cálculo do Índice de Lee {[raiz cúbica do peso corporal (g)/ pelo CNA (cm)] x1000}. As gorduras retroperitoneal e periepididimal foram retiradas e pesadas para avaliação da quantidade de gordura.

Estudo histoquímico das JNMs

Para o estudo das JNMs, um fragmento do antímero direito do músculo ELD foi retirado do fixador Karnovsky, e seccionado longitudinalmente em três ou quatro fatias com lâmina de inox, que foram submetidas a técnica de Esterase Inespecífica (Lehner & Ornstein, 1959), descrita abaixo:

1. Lavagem das peças durante 1 minuto em tampão fosfato 0,1M pH 7,4;]
2. Incubação das porções musculares a 37°C durante 5-10 minutos no seguinte meio:
 - a. Solução Tris HCl – 20ml (Tris aminometano 6,05g (3,02g) + ácido clorídrico concentrado 3,34ml (1,67ml) + água destilada 1000ml (500ml));
 - b. Alfa naftil acetato a 1% - 0,5ml (alfa naftil 1,0g (0,5g) + acetona 100ml (50ml));
 - c. Pararosalina Azotizada - 1,6ml (pararosalina* 0,8ml + nitrito de sódio* a 4% 0,8ml);
3. Ajuste do pH da solução entre 6,8 – 7,2;
4. Filtragem da solução e colocar sobre os músculos previamente cortados;
5. Incubação em estufa a 37°C durante 5 minutos;
6. Lavagem dos músculos em água corrente por 5 minutos;
7. Desidratação, diafanização e montagem com Permount.

As lâminas confeccionadas pela técnica descrita acima foram utilizadas para os estudos morfológico e morfométrico. Na análise morfométrica, foram medidas a área, diâmetros maior e menor de 100 JNMs por animal, a partir de imagens microscópicas (objetiva de 20X).

Análise das imagens

As imagens das JNMs foram obtidas através do microscópio Olympus Bx60® acoplado a câmera Olympus DP71 (Tóquio, Japão), com auxílio do programa DP Controller 3.2.1 276. E foi utilizado o programa Image Pro Plus 6.0® (Media Cybernetics, Maryland, USA) para realização da análise morfométrica.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com auxílio do programa GraphPad Prism® (La Jolla, USA), levando-se em consideração os resultados do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para os dados em normalidade, o teste estatístico empregado foi o teste de análise de variância One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Para dados não paramétricas foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Considerando valores de $p < 0,05$ significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais do grupo HIPER-F1 tiveram um aumento no peso corporal de 28% ($p = 0,0003$) e 455% nas gorduras retroperitoneal e periepididimal ($p < 0,0001$) em comparação ao grupo CTL-F1 (Tabela 1). O grupo GF-HIPER-F1 teve redução de 35% ($p < 0,0001$) nas gorduras retroperitoneal e periepididimal em relação ao grupo HIPER-F1. Çağlar e Kolankaya (2008) evidenciaram que os animais expostos ao glifosato apresentaram menor consumo hídrico e alimentar, justificando a redução nas gorduras retroperitoneal e periepididimal dos animais GF-HIPER-F1. Os dados de peso e comprimento do músculo, comprimento nasoanal e índice de Lee não mostraram diferença significativa entre os grupos estudados (Tabela 1).

As JNMs do músculo ELD dos quatro grupos exibiram aspecto polimórfico, com forma oval, redonda ou elíptica, sem alterações morfológicas (Figura 1). Na análise morfométrica, o grupo GF-F1 demonstrou aumento de 32% ($p < 0,0111$) na área e de 15% ($p < 0,0138$) no diâmetro maior quando comparado ao grupo CTL-F1 (Tabela 1). O glifosato é capaz de inibir a ação da enzima acetilcolinesterase (Larsen *et al.*, 2016), de forma que a acetilcolina não é degradada e se acumula na fenda sináptica, provocando uma estimulação excessiva da membrana pós-sináptica das JNMs, e com isso, estas aumentam de tamanho (Araújo *et al.*, 2016). O diâmetro menor não exibiu alterações nos grupos estudados.

GRUPOS	CTL-F1	HIPER-F1	GF-F1	GF-HIPER-F1
¹ Peso corporal (g)	25 ± 1,2 ^a	32 ± 4,5 ^b	23 ± 1,8 ^a	28 ± 2,0 ^a
¹ Peso ELD (mg)	9,8 ± 0,001 ^a	10,8 ± 0,002 ^a	9,3 ± 0,002 ^a	9,8 ± 0,002 ^a
¹ Comprimento nasoanal(cm)	9,3 ± 0,27 ^a	9,5 ± 0,32 ^a	8,9 ± 0,49 ^a	9,3 ± 0,26 ^a
² Comprimento ELD (mm)	7,2 ± 1,10 ^a	7,02 ± 0,72 ^a	7,6 ± 0,91 ^a	6,9 ± 1,05 ^a
² Gorduras retroperitoneal e periepididimal (mg)	301 ± 71 ^a	1670 ± 46 ^b	298 ± 11 ^a	1082 ± 53 ^c
² Índice de Lee (g/cm ³)	318 ± 10,4 ^a	331 ± 9,2 ^a	318 ± 13,3 ^a	326 ± 11,4 ^a
² Área (µm ²)	403 ± 63,7 ^a	394 ± 49,3 ^a	531 ± 62,7 ^b	487 ± 108 ^a
² Diâmetro maior (µm)	31,7 ± 2,87 ^a	32,1 ± 2,78 ^a	36,7 ± 3,44 ^b	36,1 ± 2,84 ^a
² Diâmetro menor (µm)	16,9 ± 1,48 ^a	16,7 ± 1,22 ^a	18,8 ± 0,896 ^a	19,4 ± 3,13 ^a

Valores expressos com média ± desvio padrão. n=6. Diferentes letras indicam diferença significativa (p<0,05). ¹Teste Kruskal-Wallis. ²Teste ANOVA.

Tabela 1- Parâmetros macroscópicos e avaliação morfométrica das junções neuromusculares (JNMs) do músculo extensor longo dos dedos (ELD) de camundongos com 150 dias de idade dos grupos: controle (CTL-F1), dieta hiperlipídica (HIPER-F1), glifosato (GF-F1) e glifosato dieta hiperlipídica (GF-HIPER-F1).

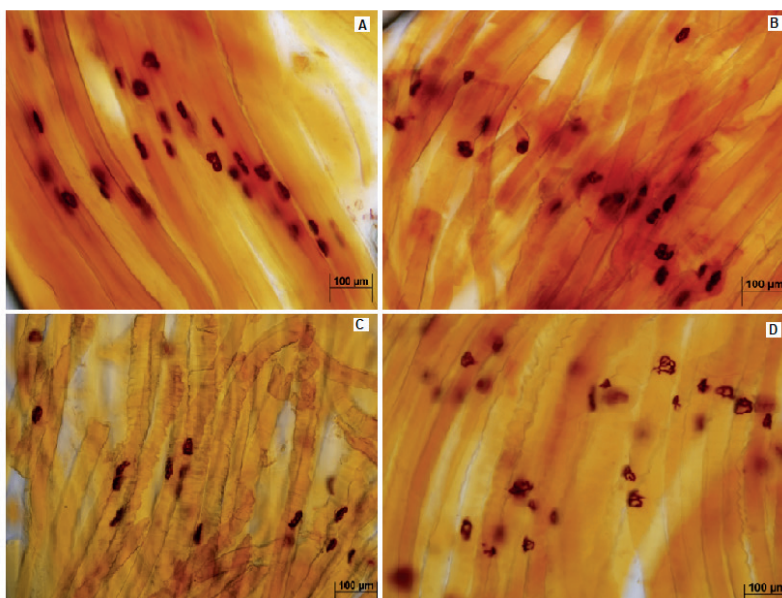


Figura 1- Fotomicrografias das junções neuromusculares do músculo extensor longo dos dedos de camundongos com 150 dias de idade. Secção longitudinal.

Reação de Esterase Inespecífica. **A:** Grupo controle; **B:** Grupo glifosato; **C:** Grupo dieta hiperlipídica e **D:** Grupo glifosato e dieta hiperlipídica.

CONCLUSÕES

Foi verificado que na prole de mães expostas ao glifosato associado a dieta hiperlipídica houve redução da deposição de gorduras retroperitoneal e periepididimal. Com relação as JNMs observaram na prole que o glifosato aumentou a área e o diâmetro maior, mas a associação do glifosato com a dieta hiperlipídica não mostrou alterações nas JNMs.

REFERÊNCIAS

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Seminário Mercado de Agrotóxico e Regulação**. UFPR, Brasília, 2012. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-2012/rap-09-de-maio-de-2012-anvisa-agenor>. Acesso em: 20 mar. 2023.

ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo; SANTOS, VL dos A.; GONSALVES, Arlan de Assis. **Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico**. *Revista virtual de Química*, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.

BARBOSA, Ariadne et al. **Maternal exposure to glyphosate-based herbicide promotes changes in the muscle structure of C57BL/6 mice offspring**. *The Anatomical Record*, v. 305, n. 11, p. 3307-3316, 2022.

BARKER, David JP et al. **Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis**. *International journal of epidemiology*, v. 31, n. 6, p. 1235-1239, 2002.

BLOCH-GALLEGO, Evelyne. **Mechanisms controlling neuromuscular junction stability**. *Cellular and molecular life sciences*, v. 72, n. 6, p. 1029-1043, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasília, 2013.

BUETTNER, Roland; SCHÖLMERICH, Jürgen; BOLLHEIMER, L. Cornelius. **High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents**. *Obesity*, v. 15, n. 4, p. 798-808, 2007.

ÇAĞLAR, Sinan; KOLANKAYA, Dürdane. **The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup**. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 25, n. 1, p. 57-62, 2008.

CVITIC, Silvija et al. **Human fetoplacental arterial and venous endothelial cells are differentially programmed by gestational diabetes mellitus, resulting in cell-specific barrier function changes**. *Diabetologia*, v. 61, n. 11, p. 2398-2411, 2018.

DALLEGRAVE, Eliane et al. **The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats.** *Toxicology letters*, v. 142, n. 1-2, p. 45-52, 2003.

DIAS, Patrícia Camacho et al. **Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro.** *Cadernos de Saúde Pública*, v. 33, p. e00006016, 2017.

FAGERLUND, M. J.; ERIKSSON, L. I. **Current concepts in neuromuscular transmission.** *British journal of anaesthesia*, v. 103, n. 1, p. 108-114, 2009.

GALLEGOS, Cristina E. et al. **Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring.** *Neurotoxicology*, v. 53, p. 20-28, 2016.

IPARDES – INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. Indicadores de desenvolvimento sustentável por bacias hidrográficas do estado do Paraná. Curitiba, 2013. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/IDS/index.php/IDS2017/article/view/31/29>. Acesso em: 15 mar. 2023.

KARNOVSKY, Morris J. **A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy.** *J. cell Biol*, v. 27, p. 1A-149A, 1965.

LARSEN, Karen E. et al. The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 45, p. 41-44, 2016.

LEHRER, Gerard M.; ORNSTEIN, Leonard. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. **The Journal of Cell Biology**, v. 6, n. 3, p. 399-406, 1959.

MARC, Julie et al. **Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition.** *Toxicological Sciences*, v. 82, n. 2, p. 436-442, 2004.

MARCA, A.P. A exposição peripuberal ao herbicida à base de glifosato influencia o efeito da dieta hiperlipídica no músculo diafragma de camundongos adultos. 2021. Dissertação (Mestrado em Biociências e Saúde) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.

MARTYN, J. A. J.; FAGERLUND, M. Jonsson; ERIKSSON, L. I. **Basic principles of neuromuscular transmission.** *Anaesthesia*, v. 64, p. 1-9, 2009.

MONSANTO. FISPQ – Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos: Roundup. 2008. Disponível em: <http://www.monsanto.com/global/br/produtos/documents/roundup-na-fispq.pdf>. Acesso em: 5 abr. 2023.

NODARI, Rubens Onofre; HESS, Sonia Corina. **Campeão de vendas, cientificamente o glifosato é um agrotóxico perigoso. Extensio: Revista eletrônica de extensão**, v. 17, n. 35, p. 2-18, 2020.

DE OLIVEIRA, Karen Cristine Silva et al. **Exposição a agrotóxicos e aumento de obesidade: uma revisão da literatura. Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 3, p. 92-92, 2021.

PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE. Vinhaes, F. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2020/10>. Acesso em: 10 maio 2023.

PEREIRA, Luciana O.; FRANCISCHI, Rachel P. de; LANCH JR, Antonio H. **Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 111-127, 2003.

TOLEDO, Jucineia; GARCIA, Simone Domingues. **Os principais agrotóxicos utilizados no Paraná e o reflexo na saúde/The main pesticides used in Paraná and their impact on health. Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 5, p. 19719-19734, 2021.

WILLIAMS, Gary M.; KROES, Robert; MUNRO, Ian C. **Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WU, Haitao; XIONG, Wen C.; MEI, Lin. **To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. Development**, v. 137, n. 7, p. 1017-1033, 2010.