

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Efeito do uso prolongado do glifosato e 2,4-D sobre parâmetros
reprodutivos de camundongos C57BL/6J obesos**

LETICIA CARDOSO VALENTE

**Dourados – MS
2023**

LETICIA CARDOSO VALENTE

Efeito do uso prolongado do glifosato e 2,4-D sobre parâmetros reprodutivos de camundongos C57BL/6J obesos

Área do CNPq: Ciências da Saúde 04.00.00.00-1

Exame de Defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Arielle Cristina Arena

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Ribeiro Romualdo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

V154e Valente, Leticia Cardoso

Efeito do uso prolongado do glifosato e 2,4-D sobre parâmetros reprodutivos de camundongos C57BL/6J obesos [recurso eletrônico] / Leticia Cardoso Valente. -- 2023.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Arielle Cristina Arena.

Coorientadora: Guilherme Ribeiro Romualdo.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2023.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Herbicidas. 2. Glifosato. 3. 2,4-D. 4. Sistema Genital. 5. Dieta Ocidental. I. Arena, Arielle Cristina. II. Romualdo, Guilherme Ribeiro. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



Ministério da Educação
Universidade Federal da Grande Dourados
PROPP - Pró-Reitoria de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR LETICIA CARDOSO VALENTE, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e três, às treze horas, em sessão pública, realizou-se na Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada **"Efeito do Uso Prolongado do Glifosato e 2,4-d sobre Parâmetros Reprodutivos de Camundongos C57bl/6j Obesos"**, apresentada pela mestrand Leticia Cardoso Valente, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof.^a Dr.^a Arielle Cristina Arena/UFGD (presidente/orientador), Prof. Dr. Fabio Juliano Negrao/UFGD (membro titular interno), Prof. Dr. José Eduardo Baroneza/UNB (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua Dissertação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada aprovada. O Presidente da Banca atesta a participação dos membros que estiveram presentes de forma remota, conforme declarações anexas. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados/MS, 27 de fevereiro de 2023.

Documento assinado digitalmente
gov.br ARIELLE CRISTINA ARENA
Data: 27/02/2023 16:10:46-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a Dr.^a Arielle Cristina Arena
Presidente/orientador
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIO JULIANO NEGRAO
Data: 27/02/2023 16:14:30-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Fabio Juliano Negrao
Membro Titular Interno
(Participação Remota)

Prof. Dr. José Eduardo Baroneza
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer aos meus pais Enrique Valente e Rosa Cardoso, por todo carinho, amor e, que apesar da saudade, sempre buscaram entender, acreditar e apoiar as minhas decisões, serei sempre grata por darem o melhor para que eu tivesse uma boa formação e terem contribuído para aquilo que mais amo fazer. Vocês são uma inspiração e um exemplo de superação. Assim como, gostaria de agradecer aos meus irmãos, Rafael, Mayara, Lorena e Maria Eduarda, os melhores presentes que eu poderia receber, sempre estivemos juntos e me alegra saber que mesmo com a distância, sempre estaremos torcendo e incentivando uns aos outros. Gostaria de agradecer ao meu tio/padrinho, Gabriel Vilalba, por ser um segundo pai, amigo e a pessoa que sempre me incentiva. Agradecer a minha amiga Débora Ancelmo, que desde a época da graduação ouviu incansável vezes como eu queria ingressar no mestrado e, como sempre, me incentivou, deu os melhores conselhos, mesmo com a distância, sempre se fez presente, obrigada pelas ligações ilimitadas e mensagens de carinho. Eu amo todos vocês demais.

Não menos importante, não poderia deixar de agradecer a aquele que convive diariamente comigo, meu melhor amigo e a melhor pessoa desse mundo e sob a qual, nunca saberei se um dia irei conseguir retribuir tudo aquilo que já fez por mim, meu noivo Matheus de Souza Alano, obrigada por ter me acompanhado e embarcado nessa jornada, por me apoiar e aconselhar em minhas decisões. Obrigada por sempre estar comigo, nos melhores e piores dias, obrigada por escolher viver a vida comigo, eu te amo muito.

A minha orientadora, Professora Doutora Arielle Cristina Arena, por confiar em mim e abrir as portas do laboratório, muito obrigada pelas oportunidades. Aos membros do Laboratório de Toxicologia de Produtos Naturais e Sintéticos, Beatriz, Velma, Júlia, Livia e Bárbara pelo auxílio experimental, conselhos e risadas, obrigada pelos ensinamentos, sempre estarei torcendo para o sucesso e realização de todas vocês.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Guilherme Ribeiro Romualdo, por confiar e acreditar em mim, obrigada por oferecer a oportunidade de me deixar fazer parte deste projeto, serei sempre grata por seus ensinamentos. Aos membros do Laboratório de Carcinogênese e Química Experimental, por serem os primeiros a me receber em Botucatu e apresentar diversas experiências gastronômicas, Professor Doutor Luís Fernando Barbisan, por embarcar em nossas ideias e apoiar nosso crescimento, a Gabriel, Isadora e Luís por serem fontes de alegria em meio há dias turbulentos.

Ao programa de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados, assim como aos professores e a secretaria do programa, Geni e Anderson, por sempre auxiliar e fazer o possível para nos amparar. Ao Instituto de Biociências, Faculdade de Medicina de Botucatu e a Unidade de Pesquisa Experimental, especialmente ao técnico de laboratório, José Eduardo (Zé), por toda ajuda na confecção das lâminas histológicas, suporte e auxílio.

A FUNDECT, CAPES e FAPESP, por todo auxílio e suporte financeiro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Foto histológica (hematoxilina e eosina, HE) do testículo e do epidídimo humano. (A) Representação histológica geral de ambos os órgãos. **(B)** Cortes transversais do ducto epididimário presentes no corpo do epidídimo. **(C)** Epitélio pseudoestratificado do ducto epididimário da cauda do epidídimo. **(D)** Túbulo seminíferos do testículo. **(E)** Células de Sertoli (detalhe). **(F)** Células de Leydig (detalhe).

19

Figura 2 - Consumo de *fast food* uma vez ao dia nos EUA de 2013 a 2016.

21

Figura 3 - (A) Aumento no uso global de pesticidas mundialmente desde 1990. **(B)** Porcentagem do uso global total de pesticidas em cada continente, **(C)** Mapa indicando a relação do uso anual de pesticidas por área cultivada (em kg por hectare, he), apresentando o Brasil como um dos maiores utilizadores de pesticidas por he.

26

Figura 4 - Uso nacional, estrutura e seletividade dos herbicidas glifosato e 2,4-D. (A) Quantidade dos Ingredientes Ativos (IA) mais utilizados no Brasil durante o ano de 2020 (último dado nacional divulgado). Adaptado de IBAMA, 2022. Estrutura química e representação ilustrativa da seletividade do **(B)** glifosato e do **(C)** 2,4-D.

30

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AG: ácidos graxos
AMPA: ácido aminometilfosfônico
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC: *Center of Disease Control*
CGP: Células Germinativas Primordiais
CMP: Células Mióides Peritubulares
DHGNA: Doença Hepática Gordurosa não-alcoólica
DM2: Diabetes mellitus tipo 2
DO: Dieta Ocidental
EFSA: *European Food Safety Authority*
EPSPS: 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase
EUA: Estados Unidos da América
FAO: *Food and Agriculture Organization*
FDA: *Food and Drug Administration*
he: hectare
HE: hematoxilina e eosina
HHG: hipotálamo-hipófase-gônada
HSF: *high-sugar-fat*
HSS: *high sugar solution*
IA: ingrediente ativo
IARC: Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer
IMC: Índice de Massa Corporal
KO: knockout
LH: hormônio luteinizante
LMR: limites máximos de resíduos
MEC: matriz extracelular
OMS: Organização Mundial da Saúde
PNS: Pesquisa Nacional de Saúde
SM: Síndrome Metabólica

Efeito do uso prolongado do glifosato e 2,4-D sobre parâmetros reprodutivos de camundongos C57BL/6J obesos

RESUMO

O consumo de dieta ocidental (DO) – rica em gorduras e açúcares – está associado ao sobrepeso, obesidade e alterações reprodutivas masculinas. Além disso, os alimentos podem possuir resíduos de herbicidas, como o glifosato e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que são substâncias amplamente utilizadas no mundo. Como os efeitos do consumo da DO concomitante à exposição a combinação de herbicidas - mimetizando exposições contemporâneas – são pouco explorados, este estudo avaliou os efeitos da exposição ao glifosato e do 2,4-D, isoladamente ou em combinação, sobre as alterações induzidas pela DO no sistema genital masculino. Camundongos C57BL/6 machos foram submetidos à DO (ração hiperlipídica e hipercalórica além de solução rica em açúcares com D-frutose e D-glicose). Concomitantemente às dietas, os animais receberam glifosato (0.05, 5 ou 50 mg/kg/dia), 2,4-D (0.02, 2 ou 20 mg/kg/dia) ou a combinação de ambos (0.05+0.02; 5+2 ou 50+20 mg/kg/dia) por gavagem (5×/semana). As doses foram baseadas nos valores de Ingestão Diária Aceitável (IDAs) ou no *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL). Os herbicidas não interferiram na obesidade, hipercolesterolemia e na intolerância à glicose induzida pela DO. O consumo da DO induziu anormalidades na morfologia espermática, reduziu a proliferação das espermatogônias, o número, área e volume dos núcleos das células de Leydig no testículo, além de aumentar a ocorrência de anormalidades histológicas no epidídimo. Notavelmente, somente as combinações de herbicidas promoveram tais efeitos induzidos pela DO: a combinação nas menores doses (0.05+0.02) reduziu a proliferação de espermatogônias. A combinação nas doses intermediárias (5+2) e maiores (50+20) aumentaram a quantidade de espermatozoides com anormalidade de cabeça reta, e reduziram a área e volume dos núcleos das células de Leydig. Por fim, a combinação de doses maiores de herbicidas (50+20) aumentou a frequência de anormalidades do epidídimo (ausência de espermatozoides, vacúolos citoplasmáticos e hipertrofia de células claras). Nossos achados indicam que a combinação dos herbicidas glifosato e 2,4-D, mimetizando exposições ambientalmente relevantes, promovem as alterações induzidas pela DO no sistema genital masculino.

Palavras-chave: herbicidas; glifosato; 2,4-D; sistema genital; dieta ocidental; obesidade.

Effect of prolonged use of glyphosate and 2,4-D herbicides on reproductive parameters of obese C57BL/6 mice

ABSTRACT

The consumption of Western diet (WD) - enriched in fats and sugars - is associated with overweight, obesity and male reproductive disorders. In addition to WD intake, crops and dairy products display residues of herbicides, including glyphosate and acid 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) that are widely applied worldwide. The concomitant exposure to WD and herbicides - mimicking contemporary scenarios - is not fully investigated. Thus, we evaluated the effects of glyphosate and 2,4-D, alone or in mixture, on WD-induced alterations in the male reproductive system. Male C57BL6 mice were submitted to WD (chow hyperlipidic and hypercaloric, and high sugar solution with D-fructose and D-glucose). Concomitantly to WD, the animals received glyphosate (0.05, 5 or 50 mg/kg/day), 2,4-D (0.02, 2 or 20 mg/kg/day) or their mixture (0, 05+0.02; 5+2 or 50+20 mg/kg/day) by force feeding (5×/week). Doses were based on Acceptable Daily Intake (ADIs) or No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) values. Herbicide exposure did not alter the WD-induced obesity, hypercholesterolemia and glucose intolerance. WD induced abnormalities in sperm morphology, reduced the proliferation of spermatogonia, the number, area and volume of Leydig cells in the testis, in addition to increasing the occurrence of histological abnormalities in the epididymis. Remarkably, only herbicide mixtures promoted such WD-induced effects: the mixture at the lower doses (0.05+0.02) reduced spermatogonia proliferation. The herbicide mixture at intermediate (5+2) and higher (50+20) doses increased the frequency spermatozoa with straight head abnormality, and reduced the area and volume of Leydig cells. Finally, the mixture of higher doses (50+20) increased the frequency of epididymal abnormalities (absence of sperm, cytoplasmic vacuoles, and clear cell hypertrophy). Our findings indicate that the mixture of glyphosate and 2,4-D herbicides, mimicking environmentally relevant scenarios, promotes WD-induced changes in the male reproductive system.

Keywords: herbicides; glyphosate; 2,4-D; male genital system; western diet; obesity

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	SISTEMA GENITAL MASCULINO	14
2.1.1	Testículo	14
2.1.2	Epidídimo	16
2.2	DIETA OCIDENTAL E OBESIDADE	20
2.2.1	Aspectos gerais: epidemiologia, patogênese e modelos experimentais	20
2.2.2	Implicações sobre o sistema genital masculino	24
2.3	HERBICIDAS	25
2.3.1	Aspectos gerais:	25
2.3.2	Glifosato	28
2.3.3	Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D)	29
2.3.4	Implicações sobre o sistema genital masculino	31
3	JUSTIFICATIVA	33
4	OBJETIVO	33
5	HIPÓTESE	33
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
7	APÊNDICES	44

1. INTRODUÇÃO

Mudanças no estilo de vida, sobretudo nos hábitos alimentares e aumento do sedentarismo, têm sido associados ao desenvolvimento de doenças metabólicas. As mudanças nos padrões alimentares, principalmente nos Estados Unidos da América (EUA), Reino Unido e Austrália, têm acompanhado a difusão da cultura do “*fastfood*” ou “*takeaway food*”, facilitado pelo surgimento de diversas redes alimentícias especializadas no ramo (JANSSEN *et al.*, 2017). Dados recentes do *Center of Disease Control* (CDC) dos EUA indicam que quase 40% dos indivíduos adultos consomem *fastfood* pelo menos uma vez por dia (FRYAR *et al.*, 2018). Notavelmente, o mesmo órgão indica uma prevalência de obesidade na população americana que atingiu 42,4% dos adultos no período de 2017 a 2018, sem diferença entre os sexos (HALES *et al.*, 2020).

Nutricionalmente, essa mudança para o padrão de dieta ocidental é caracterizada pelo aumento na ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos (AG) saturados, colesterol, carboidratos simples, além de baixo consumo de alimentos ricos em AG poli-insaturados, antioxidantes e fibras (JANSSEN *et al.*, 2017). Além disso, o indivíduo que adere à dieta ocidental aumenta a inatividade física, o que aumenta o sedentarismo, contribuindo para a patogênese da obesidade (WHO, 2021). Tanto a obesidade quanto o sobrepeso têm mostrado evidências crescentes de aumento na população mundial, e isso tem gerado um sério problema de saúde pública. Ambos são responsáveis por causar um acúmulo excessivo de gordura no corpo trazendo complicações e causando doenças. O Índice de Massa Corporal (IMC) é um método simples para avaliar o sobrepeso e a obesidade em adultos, onde, a classificação para um adulto com sobrepeso é com o IMC entre 25 a 29,9 kg/m² enquanto a obesidade apresenta um IMC ≥ 30 kg/m² (WHO, 2021).

Doenças cardiovasculares (cardíacas e acidente vascular cerebral), metabólicas (diabetes e doença hepática gordurosa não alcoólica) e alguns tipos de cânceres (endometrial, mama, ovário, próstata, vesícula biliar, etc.) são associados ao sobrepeso e a obesidade. Além disso, tem-se avaliado como a obesidade afeta a reprodução masculina e como ela está relacionada a uma redução na concentração e motilidade espermática, aumento do dano ao DNA do espermatozoide e alterações nos hormônios sexuais (YUE; ZHIDE, 2017; WHO, 2021). Além disso, com um crescente aumento na produção e consumo de produtos químicos sintéticos (produtos industriais, de uso doméstico, pesticidas, herbicidas, etc.), sob o qual humanos começaram a serem expostos após a segunda guerra mundial, gerou um potencial fator de risco para a obesidade além de contribuir para danos na reprodução masculina (NEEL; SARGIS, 2011; RODPRASERT *et al.*, 2019). Sabe-se que o acúmulo de tecido adiposo leva a

um aumento da conversão de testosterona em estradiol. Uma dieta ocidentalizada está associada a parâmetros seminais ruins, além de infertilidade quando comparado com dietas mediterrâneas e dietas “prudentes”, uma alimentação mais saudável (HAMMOUND *et al.*, 2006; KATIB, 2015; SALAS *et al.*, 2017). As anormalidades seminais mais detectadas em indivíduos obesos são oligospermia, azoospermia, morfologia espermática alterada, índice de fragmentação do DNA e alteração do potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides (CHOY; EISENBERG, 2018).

Em consonância, o uso de herbicidas tem desempenhado um papel importante na agricultura moderna, pois além de apresentarem efeitos capazes de controlar ervas daninhas, auxiliam na produção em grande escala de alimentos juntamente com outras tecnologias do agronegócio (POLLEGIONI *et al.*, 2011). O uso global de pesticidas aumentou em cerca de 30% nas últimas três décadas (1990-2020), passando de 1,68 milhões para 2,20 milhões de toneladas por ano (FAO, 2022). Dentre esses defensivos agrícolas, o herbicida sistêmico de amplo espectro glifosato (N-fosfonometil-glicina) tem sido utilizado em grande escala, considerado o herbicida mais utilizado globalmente, totalizando 825 milhões de quilos/ano (DILL *et al.*, 2010; BENBROOK, 2016). A poluição ambiental gerada pelo herbicida começou a chamar atenção de pesquisadores e estudos foram iniciados afim de saber quais são os efeitos adversos do produto sobre o organismo humano. Nos últimos anos, cada vez mais tem-se voltado a atenção para a toxicidade reprodutiva induzida pelo glifosato e suas formulações comerciais (BRNACHOUR *et al.*, 2007; PENGYAN *et al.*, 2016).

Além do glifosato, o 2,4-D, que é um herbicida seletivo, ocupa a quinta colocação entre os herbicidas mais vendidos para fins agrícolas, mas é o primeiro (cerca de 4 milhões de quilos/ano) em relação à utilização “doméstica”, incluindo gramados comerciais, residenciais, áreas de recreação e parques públicos, superando até o glifosato (EPA, 2017). O seu uso generalizado pode causar efeitos tóxicos em humanos, animais e no ambiente (BURNS; SWAEN, 2012). Estudos realizados por Amer e Aly (2001) e Venkov *et al.*, (2000), indicaram que o herbicida é responsável por causar anormalidades na cabeça do espermatozoide em camundongos e induzir alterações testiculares em ratos. Até onde sabe-se, não há estudos que demonstrem a ação de glifosato e 2,4-D em conjunto na reprodução masculina, ainda mais sob uma dieta com padrões ocidentais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMA GENITAL MASCULINO

2.1.1 Testículo

Durante a reprodução, dois processos preliminares são essenciais para gerar um novo organismo com sucesso: a espermatogênese e a ovogênese. Em embriões masculinos e femininos, várias células embrionárias no epiblasto entram na linhagem de células germinativas para se tornarem Células Germinativas Primordiais (CGP) (SAITOU; MIYAUCHI, 2016). A especificação dos precursores da linhagem germinativa durante o desenvolvimento embrionário inicial é essencial para a perpetuação da espécie, pois essas células eventualmente darão origem a gametas maduros, espermatozoides e ovócitos, sendo eles, os vetores da informação genética transgeracional. Durante a 5ª semana de desenvolvimento embrionário humano, os testículos (**Figura 1A**) se desenvolvem a partir de gônadas bipotenciais e passam por uma série de mudanças de expressão gênica fenotípicas, envolvendo migração de CGP e estabelecimento de um nicho de células germinativas. Órgãos acessórios do sistema genital como epidídimo (**Figura 1A**), próstata, vesículas seminais e trato urinário também se desenvolvem neste período, afim de formar o sistema urogenital. Ainda durante a vida fetal, os testículos descem da cavidade abdominal para o escroto, através do canal inguinal e proporcionam um ambiente altamente regulado no qual as células germinativas em desenvolvimento amadurecem em espermatozoides funcionais (MARTY *et al.*, 2003; NEF *et al.*, 2019).

A geração de espermatozoides via espermatogênese é um processo contínuo durante a vida reprodutiva masculina. Essa necessidade contínua de um grande número de gametas ainda não móveis impõe uma série de requisitos na espermatogênese; **primeiro**, uma grande população de células-tronco necessária durante toda a vida reprodutiva do organismo; **segundo**, afim de produzir gametas de forma suficiente para garantir a fertilização é necessária uma grande expansão das células progenitoras; **terceiro**, a necessidade de transformação morfológica do espermatozoide e a aquisição de mobilidade requer a expressão de genes exclusivos da espermatogênese; **quarto**, é necessário um alto nível de organização e controle para garantir a disponibilidade contínua de espermatozoides. Neste sentido, o testículo de mamíferos possui uma arquitetura tecidual complexa composta por compartimentos epiteliais e intersticiais (**Figura 1A e 1D**). Os túbulos seminíferos contêm células de Sertoli (**Figura 1E**) e células germinativas, ambos se apoiam em uma membrana basal e uma Matriz Extracelular (MEC) subjacente e circundada por Células Mióides Peritubulares (CMP), já o compartimento intersticial é composto basicamente por tecido conjuntivo ricamente vascularizado contendo

células de Leydig (**Figura 1F**) (OATLEY; BRINSTER, 2012; DE FELICI; DOLCI, 2013; SMITH; WILLIAM, 2014; MARTIN, 2016; GRISWOLD, 2016).

A formação das linhagens de células germinativas e somáticas do testículo ocorre de forma independente e, para que o testículo alcance suas principais funções, a produção de hormônios e espermatozoides, é necessário um microambiente multicelular complexo e dinâmico. As células de Sertoli são responsáveis por regular a passagem de sinais externos do túbulo seminífero, além de iniciar as cascatas de sinalização que culminarão na diferenciação das gônadas masculinas durante o desenvolvimento inicial e também desempenham funções críticas para o desenvolvimento testicular e regulação da espermatogênese. O citoplasma das células de Sertoli se estende desde a membrana basal até o lúmen do túbulo que circunda as células germinativas (barreira hemato-testicular), sendo responsável por nutrir e fornecer fator de crescimento a essas células que estão em desenvolvimento, portanto, a célula de Sertoli é um dos principais tipos celulares envolvidos tanto na formação quanto na função dos espermatozoides (FRANÇA *et al.*, 2016; PIPREK *et al.*, 2016). As CMP circundam a parede externa do túbulo seminífero e se contraem para forçar o espermatozoide a se locomover pelo túbulo seminífero e ir de encontro ao lúmen. Juntas, célula de Sertoli e CMP, cooperam entre si afim de produzir a membrana basal do túbulo seminífero e fornecer o nicho para as células-tronco espermatogônias que produzem as células germinativas (SMITH; WILLIAM, 2014).

Uma variedade de células reside no compartimento intersticial do testículo. A célula de Leydig é geralmente o tipo celular mais frequente observado, sendo responsável pela produção de andrógenos. Elas podem influenciar diretamente na produção de espermatozoides, principalmente através da sinalização da testosterona em resposta a estimulação do hormônio luteinizante (LH), sendo que grande parte desta testosterona atua como fator parácrino que se difunde nos túbulos seminíferos, que é essencial para a progressão meiótica e sobrevivência das células germinativas (SMITH; WILLIAM, 2014; GRISWOLD, 2016).

A formação do gameta masculino começa com a diferenciação das CGP em células-tronco espermatogônicas. A partir daí, a espermatogênese começa dentro dos túbulos seminíferos do testículo onde a espermatogênese irá se iniciar próximo da membrana basal com as espermatogônias que ficam próximas a porção mais externa das células de Sertoli que revestem os túbulos seminíferos e progride em direção ao lúmen do túbulo. Uma divisão mitótica final resulta na formação de espermatócitos primários pré-liptótenos. Esta etapa é muitas vezes considerada o ponto de entrada na meiose. Os espermatócitos primários então passam pela meiose I para produzir dois espermatócito secundários. Finalmente, cada espermatócito secundário se divide em duas espermátides haploides e redondas iguais durante

a meiose II. Essas espermatídes redondas passam condensação e alongamento para se tornarem espermatídes alongadas durante um processo chamado espermiogênese. Quando, finalmente, essas células são liberadas das células de Sertoli no lúmen do túbulo seminífero, elas são consideradas espermatozoides imaturos e estão prontas para transitar pelo sistema genital masculino e ganhar competência para fertilizar um ovócito e apoiar o desenvolvimento embrionário (GRISWOLD, 2016; JAUREGUI *et al.*, 2018; JAMES *et al.*, 2020).

2.1.2 Epidídimo

O epidídimo possui quatro principais funções: transporte dos espermatozoides, aquisição de motilidade espermática, desenvolvimento da capacidade de fertilização do espermatozoide e a criação de um ambiente luminal propício para o processo de maturação através da absorção e atividades secretoras do epitélio epididimal (JONES; LOPEZ, 2004). Os túbulos seminíferos convergem para formar a rede testicular, que por sua vez dá origem aos ductos eferentes e a uma série de túbulos. Esses túbulos convergem para formar um único duto altamente espiralado, o epidídimo (**Figura 1A**). O epidídimo é um único ducto epitelial organizado em várias regiões: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda, sendo cada região é organizada em lóbulos separados por septos de tecido conjuntivo (**Figura 1B**; **Figura 1C**). Esses septos servem como suportes internos para o órgão e também separam os lóbulos, o que permite a expressão de genes e proteínas dentro de compartimentos específicos (ROBAIRE *et al.*, 2006).

Existem várias células epiteliais que revestem o ducto epididimário, algumas delas estão localizadas ao longo do ducto, já outras, são encontradas exclusivamente em regiões específicas, essas células são denominadas: principal, basal, apical, clara, estreita e célula halo (ROBAIRE *et al.*, 2006). O tipo celular encontrado no epidídimo de todos os mamíferos é referido como célula principal, as quais estão situadas ao longo de todo o ducto, mas apresentam diferenças estruturais em cada região. Uma das características mais marcantes desta célula é sua secreção altamente desenvolvida e seus núcleos basais alinhados. Dependendo dos segmentos examinados, as células principais compreendem aproximadamente 65-80% do total de células epiteliais da população de células do epidídimo. Elas também são responsáveis por sintetizar um grande número de proteínas que são retidas dentro das células ou ativamente secretadas no compartimento luminal, além de desempenhar um papel ativo na endocitose de proteínas encontradas no compartimento luminal do epidídimo. As células apicais são encontradas dentro do epitélio do segmento inicial e do segmento intermediário (corpo), tendo a capacidade de realizar endocitose de determinadas substâncias no lúmen. As células estreitas

estão presentes dentro do segmento intermediário, e são responsáveis por secretar íons H^+ no lúmen do epidídimo e responsáveis também pela endocitose. Já as células claras são grandes células endocíticas ativas presentes apenas nas regiões da cabeça, corpo e cauda, as quais normalmente absorvem o conteúdo das gotículas citoplasmáticas liberadas pelos espermatozoides à medida que atravessam o ducto. As células basais estão presentes ao longo do túbulo e aderem à membrana basal. As células halo estão em todo o epitélio e são células imunes primárias (ROBAIRE *et al.*, 2006; JAMES *et al.*, 2020).

Uma das principais funções do epidídimo é transportar os espermatozoides da rede testicular para o ducto deferente. Em diferentes espécies, leva aproximadamente 6 a 14 dias para os espermatozoides transitarem pelo epidídimo. Este órgão é circundado por uma camada de músculo liso de espessura crescente e fibras alfa-adrenérgicas portanto, o mecanismo responsável por conduzir o conteúdo através do lúmen do epidídimo tem sido atribuída principalmente ao movimento rítmico dessa musculatura envoltória do ducto epididimário. O epidídimo é responsável também por realizar a absorção de fluidos através das células epiteliais, este processo ocorre no segmento inicial, e essa absorção ocorre durante o trânsito epididimário, causando um aumento significativo na concentração de espermatozoides na cauda do epidídimo em comparação com o restante do órgão (TURNER, 1984; ROBAIRE *et al.*, 2006).

Além disso, o epidídimo também é responsável por proteger os espermatozoides durante o trânsito epididimário de possíveis danos que são causados pelo ambiente externo. As células epiteliais possuem alta atividade metabólica que resulta na geração de espécies reativas de oxigênio que são prejudiciais aos espermatozoides. Para combater este problema, essas mesmas células secretam diversas enzimas antioxidantes, afim de neutralizar as espécies reativas de oxigênio. Existe também, uma barreira que separa sangue/epidídimo, que serve para proteger os espermatozoides que estão em maturação do sistema imunológico e de substâncias nocivas que possam vir das correntes sanguíneas (HILTON *et al.*, 1996; ROBAIRE *et al.*, 2006; O'FLAHERTY, 2019).

A cauda do epidídimo tem a principal função de armazenar as células espermáticas funcionalmente maduras. As células epiteliais presentes na cauda do órgão secretam fatores que ajudam a manter um ambiente adequado para os espermatozoides (ROBAIRE *et al.*, 2006; CORNWALL, 2009). Porém, antes de chegar à cauda do epidídimo, é necessário que ocorra a maturação dos espermatozoides, e esse processo ocorre durante o trânsito epididimário. Durante este período, eles adquirem motilidade e fatores necessários para uma fertilização bem sucedida, e para que essa maturação aconteça, os espermatozoides precisam estar em contato direto com o conteúdo do ambiente do lúmen epididimal. Esse ambiente é específico para cada

região do epidídimo e essa diferença se dá pela composição celular variada do epitélio além da regulação hormonal. À medida que os espermatozoides progridem para o lúmen ao longo do epidídimo, eles sofrem alterações na compactação nuclear, composição da membrana plasmática, estrutura do citoesqueleto, carga útil de proteína e carga útil de RNA não codificante (CORNWALL, 2009; SULLIVAN, 2016).

Os espermatozoides testiculares, apesar da sua capacidade de se contrair, são considerados imóveis, visto que são incapazes de realizar qualquer movimento progressivo. No momento que o espermatozoide alcança a cauda do epidídimo, a maioria dessas células já possuem motilidade progressiva. A composição da membrana plasmática do espermatozoide é alterada ao longo do trânsito epididimário, resultando em um estreitamento do acrossoma do espermatozoide (CORNWALL, 2009; GERVASI; VISCONTI, 2017).

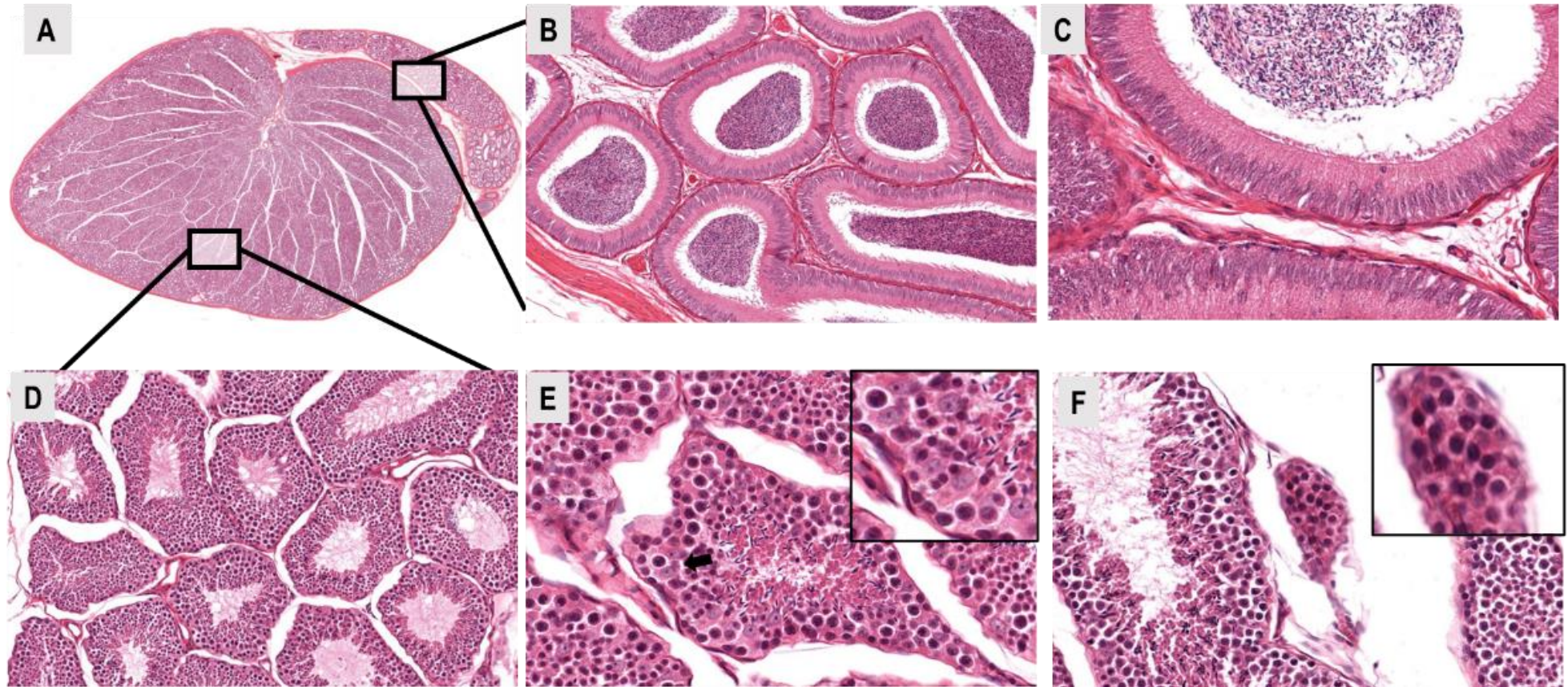


Figura 1. Foto histológica (hematoxilina e eosina, HE) do testículo e do epidídimo humano. (A) Apresentação histológica geral em ambos os órgãos. (B) Cortes transversais do ducto epididimário presente no corpo do epidídimo. (C) Epitélio pseudoestratificado do ducto epididimário da cauda do epidídimo. (D) Túbulo seminíferos do testículo. (E) Células de Sertoli (detalhe). (F) Células de Leydig (detalhe). Imagens adaptadas de *Histology Guide*, 2005-2021, disponível em <https://www.histologyguide.com/>, acessado em 28 de setembro de 2022.

2.2 DIETA OCIDENTAL E OBESIDADE

2.2.1 Aspectos gerais: epidemiologia, patogênese e modelos experimentais

A adoção de padrões dietéticos distintos daqueles que moldaram o genoma humano por mais de 2 milhões de anos é um fator importante na prevalência generalizada de doenças crônicas e degenerativas que são epidêmicas nos países ocidentais (CORDAIN *et al.*, 2005; CARRERA-BASTOS *et al.*, 2011; RAKHRA *et al.*, 2020). Antes do desenvolvimento da agricultura e da pecuária, as escolhas dietéticas dos hominídeos eram necessariamente limitadas a alimentos minimamente processados, como vegetais silvestres e animais. Com a domesticação inicial de animais e controle dos cultivos, e, sobretudo, com o avanço e domínio da tecnologia após a Revolução Industrial, o perfil nutricional da população humana mudou rapidamente. Os procedimentos de processamento de alimentos introduzidos durante os períodos Neolítico e Industrial alteraram fundamentalmente sete características nutricionais cruciais das dietas humanas: 1) carga glicêmica, 2) composição de AG, 3) composição de macronutrientes, 4) densidade de micronutrientes, 5) equilíbrio ácido-base, 6) relação sódio-potássio e 7) conteúdo de fibras (CORDAIN *et al.*, 2005; CARRERA-BASTOS *et al.*, 2011; RAKHRA *et al.*, 2020). Ao longo de 6–8 gerações, especialmente nas últimas 2–3 gerações, observa-se uma epidemia de doenças não-infecciosas conhecidas como “doenças da civilização”, principalmente em países desenvolvidos, mas também em países em desenvolvimento.

Enquanto os agentes infecciosos eram as principais causas de doenças no início do século XX, as doenças infecciosas foram substituídas pelas doenças metabólicas, cardiovasculares e câncer como as principais causas de morte no século XXI (CORDAIN *et al.*, 2005; CARRERA-BASTOS *et al.*, 2011; RAKHRA *et al.*, 2020). As mudanças nos padrões alimentares, principalmente nos EUA, Reino Unido e Austrália, têm acompanhado a difusão da cultura do “*fast food*” ou “*takeaway food*”, facilitado pelo surgimento de diversas redes alimentícias especializadas no ramo (JANSSEN *et al.*, 2017). Dados recentes do CDC dos EUA indicam que cerca de 40% dos indivíduos adultos consomem *fast food* pelo menos uma vez por dia (FRYAR *et al.*, 2016) (**Figura 2**). Nutricionalmente, essa mudança para o padrão de DO, do inglês *Western Pattern Diet* (WPD) ou *Standard American Diet* (SAD), é caracterizada pelo aumento na ingestão de alimentos ricos em AG saturados, colesterol, carboidratos simples (como frutose, glicose e sacarose), e do baixo consumo de alimentos ricos em AG poli-insaturados, antioxidantes e fibras. Além da baixa qualidade de nutrientes, a DO também é caracterizada por um alto consumo de calorias (JANSSEN *et al.*, 2017). Dentre os alimentos consumidos que estão dentro do padrão de DO, destacam-se as bebidas açucaradas (refrigerantes e sucos), alimentos fritos, sobremesas e *snacks* (JANSSEN *et al.*, 2017).

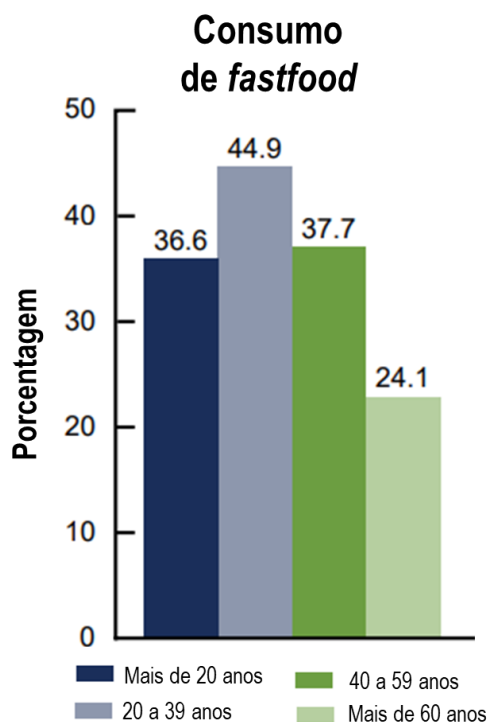


Figura 2. Consumo de fast food uma vez ao dia nos EUA de 2013 a 2016. Adaptado de FRYAR *et al.*, 2016.

De fato, a DO tem contribuído significativamente para a crescente taxa de obesidade e suas comorbidades nos últimos anos. Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos, de revisão sistemática com ou sem meta-análise, em diferentes populações que evidenciam maior prevalência e risco de sobrepeso e/ou obesidade em indivíduos que consomem DO (MURTAUGH *et al.*, 2007; NAJA *et al.*, 2015; MU *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2019; ENG *et al.*, 2020; MIN *et al.*, 2021). Conceitualmente, a obesidade pode ser definida como um excesso de gordura corporal, geralmente acompanhada de inflamação sistêmica leve ou crônica. Sua avaliação geralmente ocorre na prática clínica pelo IMC, sendo ele expresso como a razão entre o peso corporal em quilogramas dividido pela altura em metro quadrado (kg/m^2). A classificação do sobrepeso se dá com o IMC entre 25 a 29,9 kg/m^2 enquanto a obesidade apresenta um $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$, podendo ser classificada ainda como grau 1: IMC 30 – 34,9; Grau do 2: IMC entre 35 – 39,9 e grau

3: $\text{IMC} \geq 40,0$ (WHO, 2016; MA *et al.*, 2017; GONZÁLES *et al.*, 2017). No entanto, o tipo e a distribuição do acúmulo de gordura corporal são de importância clínica na avaliação do risco de complicações relacionadas à obesidade. Tanto a obesidade quanto o sobrepeso estão associados ao desenvolvimento de Síndrome Metabólica (SM) e comorbidades, incluindo: Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA), hipertensão, hiperlipidemia, doença renal crônica, Doença Cardiovascular além de alguns tipos de câncer (GONZÁLES *et al.*, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2020), cerca de 1,9 bilhão de adultos estavam acima do peso e mais de 650 milhões eram obesos em 2016, estima-se também que até 2025, aproximadamente 167 milhões de pessoas, tanto crianças, quanto adultos, terão a saúde comprometida por estarem acima do peso (OMS, 2022). Foi estimado pelo *Global Burden of Disease Obesity Collaborators* que valores elevados de IMC foram associados com 4 milhões de mortes em 2015 (AFSHIN *et al.*, 2017). Nos EUA, a obesidade aumentou de 30,5% para 41,9% em 2020 (CDC, 2022). No Brasil, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS, 2020), 137 milhões de pessoas apresentavam excesso de peso ou estavam obesas, onde a maior prevalência ocorre em mulheres, cerca de 62,6%, enquanto em homens a prevalência é cerca de 57,5%.

A dinâmica do peso corporal é determinada pela interação de fatores genéticos, ambientais e psicossociais que atuam através de vários mediadores fisiológicos da ingestão alimentar e do gasto energético que afetam a disposição de gordura (GONZÁLES *et al.*, 2017). Existem dois tecidos responsáveis pela detecção e resposta às mudanças no balanço energético sistêmico, sendo eles o tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom. O tecido adiposo marrom contribui para o gasto energético, visto que ele é rico em mitocôndrias, via termogênese afim de manter a temperatura corporal. Está presente de forma abundante em recém nascidos, estando localizado em diversas regiões do corpo que ao longo dos anos acabam diminuindo (GIRALT; VILLARROYA, 2013; SACKS; SYMONDS, 2013; SANTHANAM *et al.*, 2015; PHODHOMME *et al.*, 2016). Já o tecido adiposo branco está presente de forma mais abundante no organismo humano e ao longo dos anos pensava-se que sua única função seria a de armazenar energia, porém, pesquisas revelaram que os adipócitos são capazes de secretar diversas substâncias bioativas além do controle energético e secreção de hormônios (MATSUZAWA, 2006; ROGGE; GAUTAM, 2017). Ele é o principal depósito de armazenamento de triglicerídeos e também um órgão endócrino crítico que regula o gasto energético e a ingestão calórica através da produção de adipocinas, como leptina e adiponectina.

Durante o período pós-prandial, ácidos graxos livres e, em menor grau, glicose são armazenados no tecido adiposo branco como triglicerídeos e eles são hidrolisados por lipases para fornecer energia a outros órgãos durante o jejum (BHATT *et al.*, 2017). Além disso, o tecido adiposo branco é classificado, com base em sua localização no corpo, em tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo visceral. O tecido adiposo visceral inclui tecido adiposo intra-abdominal (principalmente tecido adiposo mesentérico), tecido adiposo perirrenal e pericárdico (KOTANI *et al.*, 1994), é também um tecido hormonalmente mais ativo e inflamatório, quando disposta de forma excessiva, pode relacionar-se com deficiências metabólicas significativas (ROGGE; GAUTAM, 2017). Já o tecido adiposo subcutâneo, é uma camada de gordura superficial disposta na parte superior do corpo (braço, mama e abdômen) e inferior do corpo (gluteofemoral) (KWOK; LAM; XU, 2016).

Além do padrão alimentar, o estilo de vida sedentário, e interação complexa com fatores hereditários e ambientais subjacentes (*e.g.*, disponibilidade de sistemas de saúde, o papel do status socioeconômico) podem contribuir para o desenvolvimento da doença (MARTINEZ, 2000; LIN; LI, 2021). Muito além da quantidade bruta de calorias, o tipo e a qualidade (lipídios saturados *versus* não saturados, assim como fonte de gordura, carboidratos e proteínas) das calorias consumidas acabam influenciando o balanço energético e o peso corporal a longo prazo (LUDWING, 2016). Os problemas gerados pela obesidade, como é o caso SM citada anteriormente, pode ser agravado em indivíduos que possuem uma certa suscetibilidade genética ao acúmulo de gordura, o que pode ser causado por interações significativas entre o circuito homeostático e a recompensa cerebral. Neste sentido, o

acúmulo de metabólitos lipídicos, sinalização inflamatória e ou outros mecanismos de comprometimento do neurônio hipotalâmico também podem levar à obesidade, o que pode explicar a defesa biológica da massa de gordura corporal elevada (OBRI; CLARET, 2019).

Para a elucidação dos aspectos clínicos, morfológicos e moleculares relacionados aos efeitos da DO, assim como potenciais fatores predisponentes, terapêuticos ou preventivos, são utilizados modelos experimentais pré-clínicos em roedores (ratos e camundongos). Dentre os modelos experimentais utilizados para o estudo da obesidade e de suas comorbidades associadas, destacam-se os modelos denominados de “genéticos” (*e.g.*, monogênicos, poligênicos e transgênicos) e os “não-genéticos” (*e.g.*, sobretudo os dietéticos e cirúrgicos), ou até uma combinação dos dois. Os modelos de obesidade monogênica, que são os mais utilizados experimentalmente, são derivados de alterações em genes específicos da via da leptina-melanocortina. Dentre os animais com mutações no receptor de leptina, destacam-se os camundongos *ob/ob* e *db/db*, além dos ratos das linhagens Zucker (*fa/fa*) e Koletsky (PHILLIPS *et al.*, 1996; WU-PENG *et al.*, 1997; KOBAYASHI *et al.*, 2000; SURIANO *et al.*, 2021). Já na via da melanocortina, destacam-se os camundongos *knockout* (KO) para os receptores de melanocortina 3 e 4 (CHEN *et al.*, 2000; ITOH *et al.*, 2011). Dentre as abordagens “não-genéticas”, destaca-se a administração de dietas que mimetizam os padrões de composição nutricional e hipercalórica da DO, compostas por: (A) ração *high-sugar-fat* (HSF), hiperlipídica (cerca de 20-35% de gordura, correspondendo 50 a 60% das calorias totais), rica em carboidratos simples, (B) por vezes associada ao consumo carboidratos simples também na água (frutose e glicose) na forma de *high sugar solution* (HSS) na proporção de 55%/45%, mimetizando o consumo de bebidas açucaradas (CHARLTON *et al.*, 2011; DE MOURA E DIAS *et al.*, 2021; ROMUALDO *et al.*, 2022).

Embora numerosas linhagens de camundongos sejam suscetíveis ao modelo de dieta “*fast food*”, os camundongos C57BL6 são amplamente utilizados devido a sua alta propensão ao desenvolvimento de obesidade por possuírem, pelo menos, 10 cromossomos (2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 16 e 17) com loci implicados na regulação do peso corporal, gordura corporal, obesidade e desenvolvimento de depósitos locais de gordura (REED *et al.*, 2003; 2006; LIN *et al.*, 2017). Tais loci, até 8 semanas de idade, podem estar associados com a ativação de vias pró-lipogênicas essenciais para o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta nessa linhagem (CHU *et al.*, 2017). Assim, a combinação dessa linhagem com perfil obesogênico poligênico com a DO é um dos bioensaios mais utilizados para a modelagem de tal doença. Nesse aspecto, o nosso grupo de pesquisa padronizou recentemente modelo em camundongos C57BL6 que, sob dieta rica em gorduras saturadas e açúcares, resultou no desenvolvimento evidente de obesidade e suas comorbidades associadas, como Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (NAFLD), hipercolesterolemia, intolerância à glicose e hiperinsulinemia (ROMUALDO *et al.*, 2022).

2.2.2 Implicações sobre o sistema genital masculino

O tecido adiposo é classificado como um tecido conjuntivo especializado, composto por adipócitos e pré-adipócitos, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais. Citocinas e proteínas de interação imune (por exemplo, leptina) sintetizadas e liberadas pelos adipócitos são denominadas adipocinas, modulando processos imunológicos, metabólicos e endócrinos. Todos esses fatores tornam o tecido adiposo um importante órgão endócrino (XU *et al.*, 2003; VÁZQUEZ *et al.*, 2008; GALIC *et al.*, 2010).

Uma relação entre o aumento do IMC e os parâmetros reprodutivos tem sido investigado ao longo os anos. A OMS (2020), estima que 186 milhões de indivíduos vivem com infertilidade em todo o mundo. Os mecanismos associados a distúrbios do sistema genital ocasionado pela obesidade estariam relacionados com distúrbios hormonais, aumento da quantidade de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, aumento do calor testicular que pode levar a um impacto considerável, influenciando de forma nociva a espermatogênese (PALMER *et al.*, 2012; SERMONDADE *et al.*, 2013; KAHN; BRANNIGAN, 2017). O plasma seminal contém uma ampla variedade de citocinas que parecem se originar das células de Leydig, células de Sertoli, macrófagos testiculares residentes, epidídimo, próstata, vesículas seminais e glândulas acessórias masculinas. Essas citocinas são capazes de exercer efeitos fisiológicos na espermatogênese e na função do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Eixo HHG). Porém, os níveis crescentes de citocinas inflamatórias estão correlacionados com conseqüências negativas para a reprodução masculina visto que, a obesidade pode aumentar a inflamação crônica no sistema genital, com aumento de citocinas inflamatórias identificadas no testículo, epidídimo, vesículas seminais, e próstata (MARTINEZ *et al.*, 2007; POLITCH *et al.*, 2007). Além disso, de acordo com estudos em humanos (TUNC *et al.*, 2011) e animais (PALMER *et al.*, 2012), quando o estresse oxidativo e as respostas inflamatórias nos espermatozoides de indivíduos obesos são aumentados, a motilidade espermática é reduzida, os defeitos morfológicos são mais recorrentes, além de ocorrer um dano maior ao DNA seguida de apoptose das células germinativas (TUNC *et al.*, 2011).

O acúmulo de tecido adiposo leva a um aumento da conversão de testosterona em estradiol. Isso é mediado pelo excesso de produção e hiperatividade da enzima citocromo P450 no tecido adiposo branco. Uma dieta ocidentalizada está associada a parâmetros seminais ruins além de infertilidade quando comparado com dietas mediterrâneas e dietas “prudentes” (HAMMOUND *et al.*, 2006; KATIB, 2015; SALAS *et al.*, 2017). As anormalidades seminais mais encontradas em indivíduos obesos são oligospermia, azoospermia, morfologia anormal dos espermatozoides, aumento no índice de fragmentação do DNA e alteração do potencial de membrana de ação mitocondrial (CHOY;

EISENBERG, 2018), demonstrando então, que a DO pode influenciar tanto no estado nutricional quanto em parâmetros importantes da infertilidade na população (GONZÁLES *et al.*, 2017; CHOY; EISENBERG, 2018).

2.3 HERBICIDAS

2.3.1 Aspectos gerais:

Ao final da Segunda Guerra Mundial, visando suprir a demanda mundial de alimentos aliada à expansão populacional (“*baby boom*”), iniciou-se a “era química” agrícola (OERKE *et al.*, 2006). Assim, estabeleceu-se o desenvolvimento e a difusão do uso de pesticidas, incluindo herbicidas, como solução ao controle das pragas agrícolas, em detrimento aos controles mecânico e biológico (OERKE *et al.*, 2006). Os pesticidas são produtos químicos responsáveis por controlar ou eliminar uma determinada variedade de pragas que podem estar presentes na agricultura, sendo elas capazes de danificar as plantações gerando uma redução na produtividade agrícola, alguns desses produtos podem ser fungicidas, herbicidas e inseticidas. Apesar de estável nos últimos anos, o uso global de pesticidas aumentou em cerca de 30% nas últimas três décadas (1990-2020), passando de 1,68 milhões para 2,20 milhões de toneladas por ano (FAO, 2022) (**Figura 3A**). Em números totais, as Américas são responsáveis pelo maior consumo dessas substâncias (**Figura 3B**). Notavelmente, o Brasil, um dos maiores produtores de *commodities* agrícolas do mundo, é considerado o terceiro maior consumidor de pesticidas mundialmente (231 mil toneladas), somente atrás de China (262 mil toneladas) e EUA (406 mil toneladas), e ainda está entre os países que mais utilizam pesticidas por área cultivada (cerca de 6 kg/hectare) (**Figura 3C**) (FAO, 2022). O mercado global de pesticidas chegou a atingir aproximadamente 5,9 milhões de toneladas em 2018, tendo um valor de US\$ 37,6 bilhões (FAO, 2020). Tais dados reiteram a importância nacional e, sobretudo, o impacto a nível global dessas substâncias.

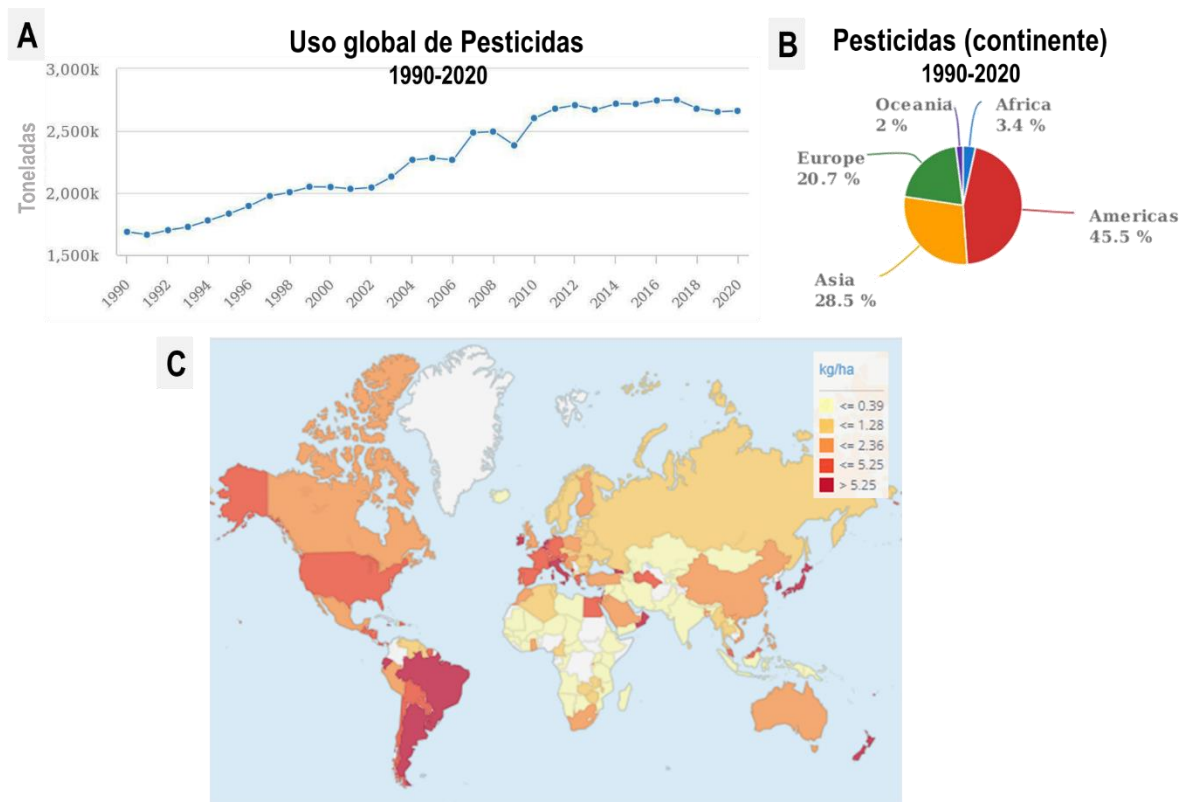


Figura 3. Dados globais do uso de pesticidas. (A) Aumento no uso global de pesticidas mundialmente desde 1990. **(B)** Porcentagem do uso global total de pesticidas de acordo com o continente, **(C)** Mapa indicando a relação do uso anual de pesticidas por área cultivada (em kg por hectare, he), indicando o Brasil como um dos maiores utilizadores de pesticidas por he. Adaptado de FAO (2022).

Pesquisas realizadas demonstraram que, se uma capina manual for feita em momentos ideais os rendimentos na cultura não são reduzidos pela competição com ervas daninhas (PRASAD *et al.*, 2008). No entanto, este processo não ocorre visto que, muitas vezes os trabalhadores não estão disponíveis no momento, além de ser um trabalho longo e árduo, e quando realizada no tempo incorreto, acaba causando perdas significativas na produtividade (RASHID *et al.*, 2012). Neste sentido, os herbicidas sintéticos foram desenvolvidos e introduzidos nos agrossistemas há mais de 70 anos e continua sendo uma das principais ferramentas agrícolas utilizadas para reduzir a densidade de ervas daninhas (POWLES, 2014). Estes compostos foram desenvolvidos para facilitar no manejo e auxiliar os trabalhadores rurais já que são uma classe responsável por controlar o crescimento de espécies indesejáveis e têm promovido um rendimento notável na agricultura. O valor de venda dos herbicidas

representou aproximadamente 52% da participação total do mercado de pesticida globalmente em 2019 (THE BUSINESS, 2020).

Em 1994, a Monsanto, uma das empresas responsáveis por melhorar produtos agrícolas dentro do agronegócio, teve o primeiro alimento transgênico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), um alimento desenvolvido geneticamente para apresentar uma maior vida útil ou uma maturação retardada. Até o ano de 2019, foram comercializados um total de 525 produtos transgênicos em apenas 32 culturas (JAMES, 1997; ISAAA, 2019). Com isso, essa tecnologia de cultivos geneticamente modificados vem sendo utilizada a mais de 20 anos em vários países, sendo encontradas principalmente em culturas de soja, milho algodão e canola. Os principais motivos que levaram o desenvolvimento e aceite da comercialização das culturas geneticamente modificadas foram principalmente a tolerância a herbicidas (TH), visto que as ervas daninhas competem com as plantas cultivadas por nutrientes, água, luz solar e espaço, levando a perdas significativas de rendimento. Por este motivo, é necessário manejos adequados e, como citado anteriormente, os herbicidas têm um papel fundamental no controle dessas pragas, porém, por essas ervas daninhas serem plantas herbáceas, nem sempre é possível ter um controle seletivo de que os herbicidas irão matar apenas essas ervas sem danificar as plantas cultivadas (ISAAA, 2017; KUMAR *et al.*, 2020).

Neste sentido, desenvolver cultivos com características tolerantes a herbicidas é uma solução potencial que pode facilitar o controle sem danificar a cultura principal. Os herbicidas disponíveis para controle de ervas daninhas possuem dois modos de ação distintos, os seletivos e não seletivos. Dentre os não seletivos, o glifosato é um dos herbicidas de amplo espectro mais conhecido do mundo e o 2,4-D, um herbicida seletivo mais comercializado. Com um uso indiscriminado desses herbicidas, as ervas daninhas sofreram uma evolução e acabaram apresentando uma resistência aos herbicidas presentes no mercado, tornando-se um problema para as lavouras e seus agricultores. Com isso, afim de minimizar os danos causados por pragas resistentes, produtores começaram a combinar uso de herbicidas em suas lavouras, aumentando também o uso de Ingredientes Ativos (IA) nas formulações. Em 2018, a quantidade de IA aplicado à cultura global teve um aumento de 6,8 milhões de kg (BROOKES; BARFOOT, 2020).

Em contrapartida ao aumento da eficiência na produção agrícola, a difusão dos pesticidas no ambiente, sobretudo no solo e em mananciais, gera crescente preocupação quanto aos potenciais impactos ambientais e riscos de contaminação humana, principalmente em trabalhadores que lidam diretamente com essas substâncias e em comunidades rurais próximas às plantações (VAN BRUGGEN *et al.*, 2018). Estima-se que aconteça, anualmente, 200 mil óbitos por intoxicação não-intencional por pesticidas, ocorrendo preferencialmente (84%) em países em desenvolvimento e emergentes na produção agrícola, como a China, o Brasil e a Índia (OMS, 2012). A preocupação não

se limita à exposição ocupacional, os herbicidas de primeira geração causam notáveis efeitos adversos à saúde humana e também ao meio ambiente devido a sua alta persistência e toxicidade fora do alvo específico, visto que são facilmente transportados por lixiviação ou escoamento superficial para contaminar águas ou fontes de águas superficiais distantes (GIANESSI, 2013).

Alguns dos *commodities* agrícolas que chegam à mesa do consumidor muitas vezes possuem resíduos de pesticidas, e alguns desses produtos possuem irregularidades quanto à presença ou quantidade permitida de pesticidas pelas agências reguladoras. Considerando alguns dos principais produtores agrícolas mundiais (Brasil, EUA e União Europeia), a *European Food Safety Authority* (EFESA) indica que 46,1% dos vegetais e 12,5% dos produtos de origem animal analisados possuem resíduos de pesticidas, sendo que 41,3% e 11,4% estão dentro dos limites aceitos pelo órgão, enquanto 4,8% e 1,1% estão acima dos limites permitidos, respectivamente (EFSA, 2019). Já nos EUA, o FDA indica que 62,5% dos vegetais e 4,7% dos produtos de origem animal possuem resíduos de herbicidas. Enquanto nenhum dos produtos de origem animal violou as quantidades indicadas, 9,4% dos vegetais apresentaram níveis acima dos estabelecidos (FDA, 2017). No Brasil, os dados mais recentes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) revelaram que 51% dos produtos analisados apresentaram resíduos de pesticidas. Dessa porcentagem, 28% estavam dentro dos limites permitidos pelo programa e 23% apresentavam irregularidades, sobretudo quanto à presença de algum herbicida proibido em determinada cultura (17,3%) ou quantidades acima dos limites (2,3%) (ANVISA, 2018). No Brasil, produtos de origem animal não são testados quanto à presença de resíduos de pesticidas. Principalmente em países em desenvolvimento, a falta de monitoramento pode ser um agravante à exposição humana. De acordo com a própria ANVISA, os herbicidas glifosato e 2,4-D não eram avaliados nos alimentos até o ano de 2016, sendo estes alguns dos herbicidas mais comumente utilizados no mundo (ANVISA, 2016). Ainda no Brasil, segundo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (2020), glifosato e 2,4-D estão no ranking de IA mais utilizados (**Figura 4A**).

2.3.2 Glifosato

O herbicida glifosato (**Figura 4B**), N-(fosfonometil) glicina, é uma biocina com atividade de amplo espectro (**Figura 4B**) que foi introduzido com IA para controle de plantas daninhas em campos de produção agrícola no ano de 1974, como parte da formulação comercial denominada de *Roundup* e vendido, primeiramente, comercialmente pela Monsanto e hoje em dia pela Bayer (BENBROOK, 2016). O glifosato é um herbicida que pertence à família dos compostos organofosforados e atualmente, produtos que têm como base o glifosato, é usado principalmente entre plantios nas lavouras e após o plantio de culturas geneticamente modificadas resistentes ao glifosato. Porém, cada

vez mais têm se usado o produto para dessecação, funcionando como um “auxílio” à colheita em culturas de grãos visto que, o glifosato é absorvido e transportado pela planta, resultando em sua morte dentro de alguns dias já que ele é capaz de inibir as atividades de enzimas antioxidantes, induzindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) que levam a uma disfunção fisiológica e a dano celular (DUKE; POWLES, 2009; GOFFNETT *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2016; EU, 2017). Este produto interfere na enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) na sexta etapa da via do ácido chiquímico, destruindo assim, a biossíntese de aminoácidos aromáticos como precursores de metabólitos importantes, como hormônios vegetais na via do ácido chiquímico. No solo, a meia vida do glifosato varia de 2 a 197 dias (TOMLIN, 2006; BENSLAMA; BOULAHROUF., 2016), sendo uma molécula com alta polaridade, o que contribui para sua alta solubilidade em água e insolubilidade em solventes orgânicos. Glifosato e seu principal produto de degradação, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), foram detectados de forma ubíqua no meio ambiente, o que tem despertado preocupação por parte das agências reguladoras (WILLIAMS *et al.*, 2000; BRUGGEN *et al.*, 2018).

Em 2018, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), classificou o glifosato como um “provável carcinogênico para humanos (grupo 2A)”. De acordo com FAO, a quantidade de resíduos de glifosato nos alimentos deve estar abaixo da ingestão diária dietética e dos Limites Máximos de Resíduos (LMR), que variam entre 0,025 a 2mg/kg entre diferentes tipos de alimentos, para carnes, feijão e leite devem apresentar um LMR de 0,05 e 2mg/kg. O LMR está acima de 30 mg/kg para alguns cereais, incluindo arroz, trigo e aveia (FAO/OMS, 2016).

Após a evolução das culturas geneticamente modificadas resistentes ao glifosato e o seu uso extensivo nos últimos 45 anos, cerca de 38 espécies de plantas daninhas desenvolveram resistência a este herbicida e, conseqüentemente, seu uso restrito ou proibido em mais de 20 países. A quantidade total de glifosato utilizado aumentou de 3.200 toneladas no ano de 1974 para 825.000 toneladas por ano em 2014, isso, em mais de 140 países. As estimativas mostram que o consumo anual de glifosato continuará aumentando, e espera-se que nos próximos anos seja atingida a marca de 1 milhão de toneladas de glifosato em todo o mundo (BENBROOK *et al.*, 2016; AGOSTINE *et al.*, 2020).

2.3.3 Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D)

Um dos primeiros herbicidas sintéticos comercialmente disponível, o 2,4-D (**Figura 4C**) foi desenvolvido durante a Guerra do Vietnã, sendo um composto integrado a uma arma química chamada agente laranja, um desfolhante usado para desbastar árvores afim de limpar perímetros de instalações militares, assim como destruir hostis colheitas como tática para diminuir o suprimento de alimentos dos soldados inimigos. Ele foi lançado no mercado por volta da década de 1940, devido a sua alta eficiência, seletividade (**Figura 4C**), baixo custo e amplo espectro no controle de pragas. Este

herbicida tornou-se amplamente utilizado e iniciou uma nova era de manejo de ervas daninhas na agricultura moderna (BUCKINGHAM, 1982; SUZUKI, 2017; ISLAM *et al.*, 2018; DEHNERT *et al.*, 2018; QU *et al.*, 2021).

Segundo Islam *et al.*, (2018), o 2,4-D foi registrado em aproximadamente 1.500 herbicidas agrícolas e de uso doméstico, como IA único ou em conjunto com outros IA. O citado composto, imita as auxinas vegetais naturais e promove a divisão, diferenciação e alongamento das células vegetais, atuando como regulador do crescimento vegetal (SONG, 2014; ISLAM *et al.*, 2017). Sua maior comercialização ocorre em países pioneiros na agricultura. Por exemplo, nos EUA o custo anual estimado de comercialização é de aproximadamente 57 milhões de dólares (RED, 2006). Na China, a produção de 2,4-D em 2010 atingiu cerca de 40.000 toneladas (LIU *et al.*, 2013). Os países em desenvolvimento da América do Sul, como Argentina e Brasil, também apresentam grande consumo de 2,4-D (MERINI *et al.*, 2007). Dados do IBAMA classificaram 2,4-D como o segundo agrotóxico mais vendido no país em 2017 (atrás apenas do glifosato), com 57.389,35 toneladas (IBAMA, 2018).

Nas lavouras, o 2,4-D é aplicado diretamente no solo através de pulverizações, o que faz com que suas moléculas cheguem facilmente aos corpos hídricos por escoamento superficial ou por infiltração, lixiviação e percolação do solo. Além disso, apresenta persistência moderada no meio ambiente, com uma meia vida de 20 a 312 dias, tornando-se um problema ambiental e de saúde pública (CHINALIA; KILHAM, 2006; GAULTIER *et al.*, 2008; SHAREEF; SHAW, 2008; WALTERS, 2011; KEARNS *et al.*, 2014).

A Ingredientes Ativos (IA) mais utilizados - Brasil 2020

IA	Toneladas	Ranking
Glifosato (e sais)	246.017,51	1º
2,4-D	57.597,57	2º
Mancozebe	50.526,87	3º
Atrazina	33.321,11	4º
Acefato	29.982,50	5º
Clorotalonil	24.191,03	6º

IBAMA, 2020

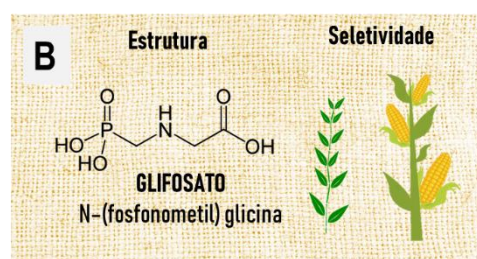


Figura 4. Uso nacional, estrutura e seletividade dos herbicidas glifosato e 2,4-D. (A) Quantidade dos IA mais utilizados no Brasil durante o ano de 2020 (último dado nacional divulgado). Adaptado de IBAMA, 2022. Estrutura química e representação ilustrativa da seletividade do (B) glifosato e do (C) 2,4-D.

2.3.4 Implicações sobre o sistema genital masculino

O uso de agrotóxicos é quase tão antigo quanto a agricultura. No entanto, o seu uso oficial só começou no final do século XIX, com a venda de alguns sais inorgânicos, porém, alguns desses sais foram considerados tóxicos, principalmente, para humanos e acabaram sendo substituídos por compostos orgânicos. O aumento da demanda global de alimentos levou a um maior uso de pesticidas afim de aumentar a produtividade agrícola. Devido a isso, a exposição humana aos agrotóxicos é inevitável (ECOBICHON, 2001; US EPA, 2015).

O uso desses compostos não representa um risco apenas para os agricultores que estão diretamente ligados com seu manuseio, visto que os agrotóxicos podem estar presentes no ar, solo, água e em tecidos de animais expostos a longo prazo. A exposição dos pesticidas pode ocorrer por diversas vias seja pela derme, olhos, inalação ou ingestão. É nítido que indivíduos mais suscetíveis a está exposição sejam os que manuseiam, transportam, entregam ou aplicam esses pesticidas (exposição ocupacional). Porém, a exposição na população geral pode ocorrer também através de ingestão de alimentos que contém resíduos de pesticidas que se acumulam na superfície do alimento durante a pulverização (ANWAR, 1997; PESHIN *et al.*, 2014; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2017). Apesar de serem projetados para diminuir as pragas das lavouras, esses compostos raramente são completamente seletivos, levando a efeitos adversos à saúde humana em relação à exposição aos pesticidas visto que, indivíduos expostos têm apresentado doenças metabólicas, imunotoxicidade, neurotoxicidade, disfunção endócrina e câncer (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2017; XIAO *et al.*, 2017).

Os pesticidas podem atuar como desreguladores endócrinos, capazes de interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais responsáveis pela manutenção da homeostase da reprodução e desenvolvimento (HEINDEL, 2019). A espermatogênese requer a regulação precisa das populações de células somáticas, células de Leydig, Sertoli e mióides peritubulares. Apesar das diferentes características e funções de cada tipo celular, todas são suscetíveis a fatores internos e externos, sendo eles fatores ambientais, desregulação hormonal, doenças e estresse oxidativo. Considerando os herbicidas, eles podem causar danos ao sistema genital de diversas formas, seja por toxicidade direta à estrutura celular, alteração na estrutura do DNA, levando a mutações genéticas que podem causar defeitos congênitos e efeitos epigenéticos (ZHOU *et al.*, 2019; YAWER *et al.*, 2020; VAN *et al.*, 2020).

A espermatogênese é um processo rigorosamente regulado por diversos fatores e extremamente sensível por contaminantes ambientais devido à sua influência negativa na proliferação e diferenciação de células germinativas, resultando em infertilidade masculina (SMITH; WALKER, 2014). Os principais mecanismos responsáveis por perturbar o sistema genital através de poluentes ambientais

seriam os efeitos reprotóxicos ao atingir o sistema endócrino, visto que eles possuem propriedades estrogênicas ou antiandrogênicas que afeta o eixo HHG, resultando em comprometimento da função reprodutiva.

O testículo é um alvo sensível para xenobióticos. A rápida diminuição da qualidade do espermatozoide nas últimas décadas é, principalmente, relacionada a contaminantes ambientais, incluindo herbicidas. Em um estudo realizado por LI *et al.*, (2019), observou-se que ratos tratados com baixas doses de Paraquat, um herbicida não seletivo, apresentaram um atraso na regeneração das células de Leydig a partir das células progenitoras, causando baixa produção de testosterona e interrupção da espermatogênese. Estudos anteriores realizados com glifosato demonstraram que este herbicida é capaz de causar efeitos adversos no sistema genital de humanos e roedores (BRITO *et al.*, 2016; WILLIAMNS *et al.*, 2016). Segundo ROMANO *et al.*, (2010), uma exposição pré-púbere em ratos machos foi capaz de alterar a histologia testicular, causando redução na altura do epitélio seminífero, além de diminuir a concentração sérica de testosterona. VANLAEYS *et al.*, (2018), complementam ainda que herbicidas a base de glifosato induzem disfunção mitocondrial de células TM4.

O glifosato pode também atuar como desregulador endócrino químico, perturbando o equilíbrio androgênio/estrogênio. Essa variação no nível hormonal pode ser decorrente de mudanças no número e função das células de Leydig e modificação de proteínas reguladora aguda esteroidogênica ou níveis de atividade de aromatase (DEFARGE *et al.*, 2016; BARRATT *et al.*, 2017; SIFAKIS *et al.*, 2017; NARDI *et al.*, 2017). As alterações histológicas comumente encontradas nos testículos de modelos animais expostos a vários agrotóxicos incluem principalmente descamação do epitélio seminífero e vacuolização das células de Sertoli (JOHNSON, 2014).

Os espermatozoides que saem do testículo são imóveis e não possuem a capacidade de fertilizar um ovócito. Por este motivo, o epidídimo acaba fornecendo um ambiente ideal para a maturação e armazenamento desses espermatozoides, onde eles adquirem motilidade e capacidade de fertilização durante o trânsito epididimário (SULLIVAN; MIEUSSET, 2016). Como o epidídimo é um órgão muito diversificado em questão de composição celular, proteínas e enzimas, claramente, qualquer fator que perturbe a estrutura ou a função do epidídimo pode acabar resultando em um comprometimento da maturação espermática e, conseqüentemente, afetar a fertilidade masculina. Os efeitos mais comuns relatados incluem redução no peso do epidídimo, alterações degenerativas no epitélio além de uma diminuição da contagem de espermatozoides (LI *et al.*, 2019). Ratos tratados com 2,4-D apresentaram uma diminuição na contagem e motilidade dos espermatozoides, além de espermatozoides com morfologia anormal, a histologia revelou uma redução de espermatozoide no lúmen do túbulo acompanhada do desaparecimento de células de Sertoli (MAROUANI, 2016).

3 JUSTIFICATIVA

Apesar de haver estudos individuais sobre efeitos da obesidade, do 2,4-D e do glifosato, não constam, ainda, pesquisas na literatura que demonstrem as implicações da exposição concomitante a Dieta Ocidental e os herbicidas, sobretudo em combinação.

4 OBJETIVO

Avaliar os efeitos da Dieta Ocidental no sistema genital masculino e, se a administração de glifosato e 2,4-D, isoladamente ou combinado, promovem as alterações deletérias induzidas pela Dieta Ocidental.

5 HIPÓTESE

A combinação dos herbicidas 2,4-D e do glifosato irá promover os efeitos deletérios da Dieta Ocidental no sistema genital masculino.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSHIN, A; Forouzanfar, M. H; Reitsmar, M. B; Sur, P; Estep, K; Lee, A; Marczak, L; Mordad, A. H; Moradi-Lakeh, M; Naghavi, M. GBD 2015 Obesity Collaborators. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. **N Engl J Med**, v. 1, p. 13-17, 2017.

AGOSTINE, L. P; Dettogni, R. S; Reis, R. S; Stur, E; Santos, E. V. W; Ventorim, D. P Garcia, E. M; Cardoso, R. C; Graceli, J. B Louro, I. D. Effects of glyphosate exposure on human health: insights from epidemiological and in vitro studies. **Sci. Total environ**, 2020.

ANVISA. Divulgado relatório sobre resíduos de agrotóxicos em alimentos [Internet]: 2016 [cited 2020 Jan 9]. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/divulgado-relatorio-sobre-residuos-de-agrotoxicos-em-alimentos/219201?inheritRedirect=false. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): 2018 [cited 2020 Jan 9]. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Acesso em: 20 de setembro de 2022

ANWAR, W.A. Biomarkers of human exposure to pesticides. **Environ Health Perspect**, v. 105, p. 801-806, 1997.

BARRAT, C. L. R; Bjorndahl, L; Jonge, C. J; Lamb, D. J; Osorio, F; McLachlan, R; Oates, R. D Poel, S; John, B; Sigman, M; Sokol, R; Tournaye, H. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. **Hum. Reprod. Update**, v. 6, p. 660-680, 2017.

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. 126-133, 2007.

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environ. Sci. Eur**, v. 28, p. 1-15, 2016.

BENSLAMA, O; Boulahrouf, A. Hight-qualit draft genome sequence of *Enterobacter* sp. Bisph2, a glyphosate-degrading bacterium isolated from a sandy soil of Biskra, Algeria. **Genom. Data**, v. 8, p. 61, 2016.

BHATT, P. S; Dhillo, W. S; Salem, V. Human brown adipose tissue-function and therapeutic potential in metabolic disease. **Curr. Opin. Pharmacol**, v. 37, p. 1-9, 2017.

BRITO, L. R; Oliveira, R; Abe, F. R; Brito, L. B; Moura, D. S; Valadares, M. C; Grisolia, C. K; Oliviera, D. P; Oliveira G. A. Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: effectes on differente organisms. **Environ. Toxicol. Chem**, v. 36, v. 1755-1763, 2017.

BROOKES, G; Barfoot, P. Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996-2918: Impacts on pesticide use and carbon emissions. **Gm crops food**, v. 4, p. 215-241, 2020.

BRUGGEN, V. A, H, C; He, M. M; Skin, K; Mai, V; Jeong, K. C; Finckh, M. R; Morris, J. G. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Sci total environ**, p. 255-268, 2018.

BUCKINGHAM, W; Jr, A. Operation ranch hand: the air force and herbicides in southeast Asia 1961-1971. Office of United States Air Force History, Washington DC, 1982.

CARRERA, B.P.; Fontes, O. L., Cordain. The western diet and lifestyle and diseases of civilization. **Research Reports in Clinical Cardiology**, 2, 15–35, 2011.

Centers for Disease Control and Prevention. Adult Obesity Facts. 2022. <https://www.cdc.gov/obesity/data/adult.html> Acesso em:19 de setembro de 2022.

CHARLTON, M; Krishnan, A; Viker, K; Sanderson, S; Cazanave, S; McConico, A; Masuoko, H; Gores, G. Fast food diet mouse: Novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 301, p. 825-834, 2011.

CHEN, A. S; Marsh, D. J; Trumbauer, M. E; Frazier, E. G; Guan, X. M; Yu, H; Rosenblum, C. I; Vongs, A; Feng, Y; Cao, L; Metzger, J. M; Strack, A. M; Camacho, R. E; Mellin, T. N; Nunes, C. N; Min, W; Fisher, J; Gopal-Truter, S; MacIntyre, D. E; Chen, H. Y; Van der Ploeg, L. H. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. **Nature genetics**, v. 1, p. 97–102, 2000.

CHINALIA, F. A; Kilham, k. S. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biodegradation in river of Northeast-Scotland and its effect on the microbial communities (PLFA an DGGE). **Chemosphere**, v. 64, p. 1675-1683, 2006.

CHOY, J. T; Eisenberg, M. L. Male infertility as a window to health. **Fertil steril**, v. 110, p. 810-814, 2018.

CHU, D. T; Malinowska, E; Jura, M; Kozak, L. P. C57BL/6J mice as a polygenic developmental model of diet-induced obesity. **Physiological reports**, v. 5, 2017.

CORDAIN, L; Eaton, S, B; Sebastian, A; Mann, N; Lindeberg, S; Watkins, B, A; O'Keefe, J, H; Brand-Miller, J. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **Am J Clin Nutr**, v. 81, n. 2, p. 341–354, 2005.

CORWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Hum. Reprod. Update**, v. 15, p. 213-227, 2009.

DE FELICI, M; Dolci, S. From testis to teratomas: a brief history of male germ cells in mammals. **Int J Dev Biol**, v. 57, p. 115-121, 2013.

DEFARGE, N; Takács, E; Lozano, V. L; Mesnage, R; Spiroux, J; Séralini, G. E; Székács, A. Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 3, p. 13, 2016.

DEHNERT, G. K; Freitas, M. B; Dequattro, Z. A; Barry, T; Karosov, W. H. Effects of low, subchronic exposure of 2,4-D – formulations on early life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Environ. Toxicol. Chemistry**, v. 37, p. 2550-2559, 2018.

DUKE, S. O; Powles, S. B. Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. **AgBioforum**, v. 12, p. 346-357, 2009.

ECOBICHON, D. J. Pesticide use in developing countries. **Toxicology**, v. 160, p. 27-33, 2001.

EFSA. Scientific report on the 2017 European Union report on pesticide residues in food. **EFSA Journal**, v. 17, n. 6, p. 5743-6152, 2019.

ENG, J. Y; Moy, F. M; Bulgiba, A; Rampal, S. Dose–response relationship between western diet and being overweight among teachers in Malaysia. **Nutrients**, v. 10, p. 1–15, 2020.

EU - Commission Regulation. Official Journal of the European Union, Brussels, Belgium, 2017.

FAO. Pesticide Indicators: 2022 [cited 2022 Sep 27]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize> Acesso em 22 de setembro de 2022.

FAO. Pesticides trade 1990 – 2018. Global, Regional country trends. FAOSTAT Analytical Brief Series, n°. 11, 2020.

FDA. Pesticide Residue Monitoring Program Fiscal Year 2017 Pesticide Report: 2017 [cited 2020 Jan9]. Available from: <https://www.fda.gov/food/pesticides/pesticide-residue-monitoring-program-reports-and-data>. Acesso em 20 de setembro de 2022.

Food and agriculture organization of the United Nation/World Health Organization. Pesticides Residues in Food, 2016.

FRANÇA, L. R; Hess, R. A; Dufour, J. M; Hofmann, M. C; Griswold, M. D. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. **Andrology**, v. 4, p. 189-212, 2016.

FRYAR, C. D; HUGHES, J. P; HERRICK, K. A; AHLUWALIA, N. Fast food consumption among adults in the United States, 2013–2016. **NCHS Data Brief**, no 322. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics, 2018.

FRYAR. C, D; Hughes. J, P; Herrick. K, A; Ahluwalia. N. Fast Food Consumption Among Adults in the United States, 2013-2016. **NCHS Data Brief**, n. 322, 2018.

GALIC, S; Oakhill, J. S; Steinberg, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol cell endocrinol**, v. 2, p. 129-139, 2020.

GAULTIER, J; Farenhorst, A; Cathcart, J; Goddard, T. Degradation of (carboxyl-14C) 2,4-D and (ring-U-14C) 2,4-D in 114 agricultural soils as affected by soil organic carbon content. **Soil Biol. Biochem**, v. 40, p. 217-227, 2008.

GERVASI, M. G; Visconti, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology**, v. 5, p. 204-218, 2017.

GIANESSI, L. P. The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. **Pest Monage SCI**, v.47, p. 1099-1105, 2013.

GIRALT, M; Villarroya, F. white, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? **Endocrinology** v. 154, p. 2992-3000, 2013.

GOFFNETT, A. M; Sprague, C. L; Mendonza, F; Cichy, K. A. Preharvest herbicide tretments affect black bean desiccation, yield, and canned bean color. **Crop Sci**, v. 56, p. 1962-1969, 2016.

GOMES, M. P; Gingras, S. L. M; Maccario, S; Labrecque, M; Lucotte, M; Juneau, P. Differential effect of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. **Pestic. Biochem. Physiol**, v. 130, p. 65-70, 2016.

GONZÁLEZ-MUNIEZA, P; Mániesa-Goszáles, M. A; HU, F. B; Despés, J. P; Matsuzawa, Y; Loos, R. J. F; Moreno, L. A; Bray, G. A; Martinez, J. A. Obesity. **Nat Ver Dis Primers**, v. 3, p. 17034, 2017.

GRISWOLD, M. D. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. **Physiol. Rev**, v. 96, p. 1-17, 2016.

HALES. C, M; CARROLL. M, D; FRYAR. C, D; OGDEN. C, L. Prevalence of obesity and severe obesity among adults: United States, 2017–2018. NCHS Data Brief, no 360. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics, 2020.

HAMMOUD, A. O; Gibson, M; Peterson, C; Hamilton, M; Carrell, B. D. Obesity and male reproductive potential. **Journal of Andrology**, v. 5, p. 619-626, 2006.

HEINDEL, J. J. History of the obesogen field: looking back to look forward. **Front. Endocrinol**, 2019.

IBAMA. Os 10 ingredientes ativos mais vendidos – 2017 – consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do decreto nº 4.074/2002. 2018.

International Agency for Research on Cancer. IARC response to criticisms of the monographs and the glyphosate evaluation, 2018.

ISAAA database GM approval database retrieved, 17 nov 2019
<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>. Acesso em: 19 de setembro de 2022.

ISAAA, Global status of commercialized biotech/gm crops in 2017: biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years. **ISAAA brief** n. 53, p. 2017.
<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/53/>. Acesso em 19 de setembro de 2022.

ISLAM, F; Farooq, M. A; Gill, R. A; Wang, J; Yang, C; Ali, A; Wang, G. X; Zhou, W. 2,4-D attenuates salinity-induced toxicity by mediating anatomical changes, antioxidant capacity and cation transporters in the roots of rice cultivars. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 1-23, 2017.

ISLAM, F; Wang, J; Farooq, M. A; Khan, M. S. S; Xu, L; Zhu, J; Zhao, M; Munos, S; Li, Q. X; Zhou, W. Potential impact of the herbicide 2,4-D-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environ. Int.**, v. 111, p. 332-351, 2018.

ITOH, M; Suganami, T; Nakagawa, N; Tanaka, M; Yamamoto, Y; Kamei, Y; Terai, S; Sakaida, I; Ogawa, Y. Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. **The American journal of pathology**, v. 179, p. 2454-2463, 2011.

JAMES, C. Global status of transgenic crops in 1997. **ISAAA Brief** n. 5, p. 31, 1997.

JAMES, E. R; Carrell, D. T; Aston, K. I; Jenkins, T; Yeste, M; Huetos, A. S. The role of the Epididymis and the contribution of epididymosomes to mammalian reproduction. **Int J Mol Sci**, v. 15, 2020.

JANSSEN, H. G; Davies, I. G; Richardson, L. D; Stevenson, L. Determinants of takeaway and fast-food consumption: a narrative review. **Nutr. Res. Rev.**, p. 1–19, 2017.

JAUREGUI, E. J; Michell, D; Topping, T; Hogarth, C. A; Griswold, M. D. Retinoic acid receptor signaling is necessary in steroidogenic cells for normal spermatogenesis and epididymal function. **Development**, 2018.

JOHNSON, K. J. Testicular histopathology associated with disruption of the Sertoli cell cytoskeleton. **Spermatogenesis**, v. 4, p. 2, 2014.

JONES, R; Lopez, K. H. Human Reproductive Biology. 4th ed. **Academic Press; Cambridge**, NY, USA, 2004.

KAHN, B. E; Brannigan, R. E. Obesity and male infertility. **Curr Opin Urol**, v. 27, p. 441-445, 2017.

KATIB, A. Mechanisms linking obesity to male infertility. **Central European Journal of urology**, v. 1, p. 79, 2015.

KEARNS, J. P; Wellborn, L. S; Summers, R. S; Knappe, D. R. U. 2,4-D adsorption to biochars: effect of preparation on equilibrium adsorption capacity and comparison with commercial activated carbon literature data. **Water Res.**, v. 62, p. 20-28, 2014.

KOBAYASHI, K; Forte, T. M; Taniguchi, S; Ishida, B. Y; Oka, K; Chan, L. The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 1, p. 22–31, 2000.

KOTANI, K; Tokunaga, K; Fugioka, S; Kobatake, T; Keno, Y; Yoshida, S; Tarui, S; Matsuzawa, Y. Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 4, p.207, 1994.

KURMAR, K; Gambhir, G; Dass, A; Tripathi, A. K; Singh, A; Jha, A. K; Yadava, P; Choudhary, M; Rakshit, S. Genetically modified crops: current status and future prospects. **Planta**, 2020.

KWOK, K; Lam, K; Xu, A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. **Exp Mol Med**, v. 48, p. 215, 2016.

LI et al. Paraquat exposure delays stem/progenitor Leydig cell regeneration in the adult rat. **Chemosphere**, v. 231, p. 60-71, 2019.

LI, R; Zhou, S. U; Zhu, H; Zhang, Z; Fang, J; Liu, P; Zhou, Z. Low dose of flurochloridone affected reproductive system of male rats but not fertility and early embryonic development. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, p. 64, 2019.

LIN, C; Theodorides, M. L; McDaniel, A. H; Tordoff, M. G; Zhang, Q; Li, X; Bosak, N; Bachmanov, A. A; Reed, D. R. QTL analysis of dietary obesity in C57BL/6byj X 129P3/J F2 mice: diet- and sex-dependent effects. **PloS one**, v, 2013.

LIN, X; Li, H. Obesity: epidemiology, pathophysiology, and therapeutics. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 12, 2021.

LIU, W; Li, H; Tao, F; Li, S; Tian, Z; Xie, H. Formation and contamination of PCDD/Fs, PCBs, PeCBz, HxCBz and polychlorophenols in the production of 2,4-D products. **Chemosphere**, v. 92, p. 304-308, 2013.

LUDWING, D. S. Lifespan weighed down by diet. **JAMA**, v. 315, p. 2269-2270, 2016.

MA C; Avenell, A; Bolland, M; Hudson, J; Stewart, F; Robertson, C; Sharma, P; Fraser, C; MacLennan, G. Effects of weight loss interventions for adults who are obese on mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 14, p. 359, 2017.

MAROUANI, N; Tebourbi, O; Cherif, D; Hallegue, D; Yacoubi, M. T; Saky, M; Benkhalifa, M; Rhouma, K. B. Effects of oral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on reproductive parameters in male wistar rats. **Environmental Science and Pollution research**, v. 24, p. 519-526, 2017.

MARTIN, L. J. Cell interactions and genetic regulation that contribute to testicular Leydig cell development and differentiation. **Mol Reprod Dev**, v. 83, p. 470-487, 2016.

MARTINEZ, J. A. Body-weight regulation: causes of obesity. **Proc. Nutr. Soc**, v.59, p. 337-345, 2000.

MARTINEZ, R; Proverbio, F; Camejo, M. I. Sperm lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines. **Asian J Androl**, v. 9, p. 102-107, 2007.

MARTY, M. S; Chaping, R. E; Parks, L. G; Thorsrud, B. A. Development and maturation of the male reproductive system. **Birth defects reproductive toxicology**, v. 68, p. 125-136, 2003.

MATSUZAWA, Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. **FEBS Lett**, v. 580, p. 2917-2921, 2006.

MERINI, L. J; Cuadrado, V; Flocco, C. G; Giuliatti, A. M. Dissipation of 2,4-D in soils of the Humid Pampa region, Argentina: a microcosm study. **Chemosphere**, v. 68, p. 259-265, 2007.

MIN, K; Wang, J; Liao, W; Astell-Burt, T; Feng, X; Cai, S; Liu, Y; Zhang, P; Su, F; Yang, K; Sun, L; Zhang, J; Wang, L; Liu, Z; Jiang, Y. Dietary patterns and their associations with overweight/obesity among preschool children in Dongcheng District of Beijing: a cross-sectional study. **BMC Public Health**, v.1, p 1–14, 2021.

MOSTAFALOU, S; Adollahi, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Arch. Toxicol**, v. 91, p. 549-599, 2017.

MOURA, E; Dias, M; dos Reis, S. A; da Conceição, L. L; Sediya, C. M. N. de O; Pereira, S. S; de Oliveira, L. L; Gouveia Peluzio, M. do C; Martinez, J. A; Milagro, F. I. Diet-induced obesity in animal models: points to consider and influence on metabolic markers. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 13, 2021.

MU, M; Xu, L. F; Hu, D; Wu, J; Bai, M. J. Dietary patterns and overweight/obesity: A review article. **Iranian Journal of Public Health**, v. 7, p. 869–876, 2017.

MURTAUGH, M. A., Herrick, J. S., Sweeney, C., Baumgartner, K. B., Guiliano, A. R., Byers, T., & Slattery, M. L. Diet Composition and Risk of Overweight and Obesity in Women Living in the Southwestern United States {A figure is presented}. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 8, p. 1311–1321, 2007.

NAJA, F; Hwalla, N; Itani, L; Karam, S; Mehio Sibai, A; Nasreddine, L. A. Western dietary pattern is associated with overweight and obesity in a national sample of Lebanese adolescents (13-19 years): A cross-sectional study. **British Journal of Nutrition**, v.11, p. 1909–1919, 2015.

NARDI, J; Moras, P. B; Koeppe, C; Dallegrove, E; Leal, M. B; Grando, L. G. Prepubertal subchronic exposure to soy milk and glyphosate leads to endocrine disruption. **Food chem. Toxicol**, v. 100, p. 247-252, 2017.

NEF, S; Stévant, I; Greenfield, A. Characterizing the bipotential mammalian gonad. **Current topics in developmental biology**, v. 134, p. 167-194, 2019.

O' Flaherty, C. Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. **Andrology**, v. 7, p. 662-668, 2019.

OATLEY, J. M; Brinster, R. L. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. **Physiol Rev**, v. 92, p. 577-595, 2012.

OBRI, A; Claret, M. The role of Epigenetics in Hypothalamic Energy Balance Control: implications for obesity. **Cell Stress**, v. 7, 2019.

- OERKE, E. C. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, v. 144, p. 31–43, 2006.
- PALMER, N. O; Bakos, H. W; Fullston, T; Lane, M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. **Spermatogenesis**, V. 4, p. 253-263, 2012.
- PALMER, N. O; Bakos, H. W; Owens, J. A; Setchell, B. P; Lane, M. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. **American journal of physiology endocrinology and metabolism**, v. 7, p. 768-780, 2012.
- PENG, W; Liu, Y; Liu, Y; Zhao, H; Chen, H. Major dietary patterns and their relationship to obesity among urbanized adult Tibetan pastoralists. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 3, p. 507–519, 2019.
- PENGYUAN, D et al. Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. **Acta histochemica**, v. 118, n. 5, p. 519-526, 2016.
- PESHIN, R; Kranthi, K. R; Sharma, R. Pesticide use and experience with integrated pest management programs and Bt Cotton in India. In *Integrated pest management: experience with implementation, global overview*. **Springer Netherlands**, v. 4, p. 269-306, 2014.
- Pesquisa nacional de saúde – Secretaria de atenção primária a saúde – Promoção da saúde e da Alimentação Adequada e Saudável. Excesso de peso e obesidade, 2020. [https://aps.saude.gov.br/ape/promocaosaude/excesso#:~:text=De%20acordo%20com%20a%20Pesquisa,mascu%20\(57%2C5%25\)](https://aps.saude.gov.br/ape/promocaosaude/excesso#:~:text=De%20acordo%20com%20a%20Pesquisa,mascu%20(57%2C5%25).). Acesso em 19 de setembro de 2022.
- PHILLIPS, M. S; Liu, Q; Hammond, H. A; Dugan, V; Hey, P. J; Caskey, C. J; Hess, J. F. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. **Nature genetics**, v. 1, p. 18–19, 1996.
- PIPREK, R. P; Kloc, M; Kubiak, J. Z. Early development of the gonads: origin and differentiation of the somatic cells of the genital ridges. Molecular mechanisms of cell differentiation in gonad development. **Springer International**, p. 47-66, 2016.
- POLITCH, J. A; Turker, L; Bowman, F. P; Anderson, D. J. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. **Human Reprod**, v. 11, p. 2928-2935, 2007.
- POLLEGIONI, L; SCHONBRUNN, E; SIEHL, D. Molecular basis of glyphosate resistance different approaches through protein engineering. **FEBS J**, v. 278, n. 16, p. 2753-2766, 2011.
- POWLES, S. Global herbicides resistance challenge. **Pest Manag. Sci**, v. 70, n. 9, 2014.
- PRASAD, A; Singh, G; Upadhyay, R. K. Integrated weed management in maize (*Zea mays* L.) and maize + blackgram. **Indian J Weed Sci** v. 40, p. 191-192, 2008.
- PRODHOMME, H; Orgnad, J; Robin, P; Alavi, Z; Salaun, P-Y; Salem, D. B. Imaging and identification of brown adipose tissue on CT scan. **Clinical Physiology and Functional Imaging**, v. 38, p. 186-191, 2016.
- QU, R; He, B; Yang, J; Lin, H. Y; Yang, H. Y; Yang, W. C; Wu, Q. Y; Li, Q. X; Yang, G. F. Where are the new herbicides? **Pest Manag Sci**, v. 6, p. 2620-2625, 2021.

RASHID, M. H; Alam, M. M; Ladha, J. K. Comparative efficacy of pretilachlor and hand weeding in managing weeds and improving the productivity and net income of wet-seeded rice in Bangladesh. **Field Crops Res**, v. 128, p. 17-26, 2012.

RED. Registrations eligibility decision (RED) 2,4-D, United States environ. **Prot. Agency**, 2006.

REED, D. R.; McDaniel, A. H; Li, X; Tordoff, M. G; Bachmanov, A. A. Quantitative trait loci for individual adipose depot weights in C57BL/6ByJ x 129P3/J F2 mice. **Mammalian genome: journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 17, p. 1065–1077, 2006.

REED, D. R; Li, X; McDaniel, A. H; Lu, K; Li, S; Tordoff, M. G; Price, R. A; Bachmanov, A. A. Loci on chromosomes 2, 4, 9, and 16 for body weight, body length, and adiposity identified in a genome scan of an F2 intercross between the 129P3/J and C57BL/6ByJ mouse strains. **Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 14, p. 302–313, 2003.

ROBAIRE, B; Hinton, B. T; Orgebin, C. M. Chapter 22-the epididymis. In: Neill K, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3rd ed. **Academic press; Cambridge**, NY, USA, 2006.

ROGGE, M. M; Gautam, B. Biology of obesity and weight regain: implications for clinical practice. **J Am Assoc Nurse Pract**, v. 29, p. 515-519, 2017.

SACKS, H; Symonds, M. E. Anatomical locations of human brown adipose tissue functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 62, p. 1783-1790, 2013.

SAITOU, M; Miyauchi, H. Gametogenesis from Pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 18, p. 721-735, 2016.

SANTHANAM, P; Solnes, L; Gannukainen, J. C; Taieb, D. Adiposity-related cancer and functional imaging of brown adipose tissue. **Endocrinology. Pract**, v.21, p. 1282-1290, 2015.

SERMONDADE, N; Faure, C; Fezeu, L et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. **Human Reprod Update**, v, 3, p. 221-213, 2013.

SFAKIS, S; Androutsopoulos, V. P; Tsatsakis, A. M; Spandidos, D. A. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. **Environ. Toxicol. Pharmacol**, v. 51, p. 56-70, 2017.

SHAREEF, K; Shaw, G. Sorption kinetics of 2,4-D and carbaryl in selected agricultural soils of northern Iraq: application of a dual-rate model. **Chemosphere**, v. 72, p. 8-15, 2008.

SMITH, L. B; Walker, W.H. The regulation of spermatogenesis by androgens. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 30, p. 2-13, 2014.

SONG, Y. Insight into the mode of action of 2,4-D-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. **J. Integr. Plant Biol**, v. 56, p. 106-113, 2014.

SULLIVAN, R; Mieusset, R. The human epididymis: its function in sperm maturation. **Human. Reprod. Update**, v. 22, p. 574-587, 2016.

SURIANO, F; Vieira-Silva, S; Falony, G; Roumain, M; Paquot, A; Pelicaen, R; Régnier, M; Delzenne, N. M; Raes, J; Muccioli, G. G; Van Hul, M; Cani, P. D. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin. **Microbiome**, v. 1, p. 1–20, 2021.

SUZUKI, J. B. Rotulagem de transgênicos no Brasil: o retrocesso do PL N° 4.181/08. **Revista de Direito** – Viçosa, v. 9, n. 1, p. 95-123, 2017.

The Business Research Company, Pesticides Global Market Opportunities and Strategies. Pesticides Market – By type (herbicides, fungicides and insecticides), by region, opportunities and strategies - Global Forecast to 2023. <https://www.thebusinessresearchcompany.com/report/pesticides-market>. Acesso em 15 de setembro de 2022.

TOMLIN, C. The pesticide manual: A world Compendium. British Crop Protection Council, Hampshire, 2006.

TUNC, O; Bakos, H. W; Tremellen, K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. **Andrology**, v. 2, p. 121-128, 2011.

TURNER, T. T. Resorption versus secretion in the rat epididymis. **J. Reprod. Fertil**, v. 72, p. 509-514, 1984.

US EPA. Pesticides industry Sale and usage 2008-2012 market estimates. US EPA, reports and assessments, 2015.

VAN BRUGGEN. A, H, C; He. M, M; Shin. K; Mai. V; Jeong. K, C; Finckh. M, R, et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Sci Total Environ**, v. 616, n. 617, p. 255–268, 2018.

VAN, C. O; Serafino, A; Tytgat, J; Soubry, A. Transmeridional epigenetic effects from male exposure to endocrine-disrupting compounds: A systematic review on research in mammals. **Clin. Epigenetics**, v. 12, p. 65, 2020.

VÁZQUEZ-Vela, M; Torres, N; Tovar, A. R. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. **Arch med res**, v. 8, p. 715-728, 2008.

WALTERS, J. Environmental fate of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. **Environ. Monit. Pest Manag**, p-1-18, 2011.

WHO. Poison prevention and Management. International Programme on Chemical: 2012 [cited 2022 Jan 9]. Available from: <http://www.who.int/ipcs/poisons/en/>. Acesso em 26 de setembro de 2022.

WILLIAMS, G. M; Berry, C; Burns, M; Camargo, J. L; Greim, H. Glyphosate rodent carcinogenicity bioassay expert panel review. **Crit. Rev. Toxicol**, v. 46, p. 44-55, 2016.

WILLIAMS, G. M; Kroes, R; Munro, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Toxicol. Pharmacol**, v. 31, p. 117-165, 2000.

World Health Organization. Infertility, 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>. Acesso em 17 de setembro de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight, 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso 20 de setembro de 2022.

World Health Organization. World obesity day 2022 – accelerating action to stop obesity. 2022. <https://www.who.int/news/item/04-03-2022-world-obesity-day-2022-accelerating-action-to-stop-obesity>. Acesso em: 20 de setembro de 2022.

WU-PENG, X. S; Chua, S. C; Jr, O. N; Liu, S. M; Nicolson, M; Leibel, R. L. Phenotype of the obese Koletsky (f) rat due to Tyr763Stop mutation in the extracellular domain of the leptin receptor (Lepr): evidence for deficient plasma-to-CSF transport of leptin in both the Zucker and Koletsky obese rat. **Diabetes**, v. 3, p 513–518, 1997.

XIAO, X; Clark, J. M; Park, Y. Potential contribution of insecticide exposure and development of obesity and type 2 diabetes. **Food Chem. Toxicol**, v. 105, p. 456-474, 2017.

XU, H; Barnes, G. T; Yang, Q et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J. Clin Invested**, v. 12, p. 1821-1830, 2003.

YAWER, A et al. Endocrine-disrupting chemicals rapidly affect intercellular signaling in Leydig cells. **Toxicol. Appl. Pharm**, v. 404, p. 115-177, 2020.

ZHOU, R et al. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. **Cell Mol. Life Sci**, v. 76, p. 2681-2695, 2019.

Abarikwu SO, Akiri OF, Durojaiye MA, Adenike A (2015) Combined effects of repeated administration of Bretmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on testosterone, oxidative stress and sperm quality of Wistar rats. *Toxicol Mech Methods* 25(1):70–80. doi:[10.3109/15376516.2014.989349](https://doi.org/10.3109/15376516.2014.989349)

Marouani, N., Tebourbi, O., Cherif, D. et al. Effects of oral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on reproductive parameters in male Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res* 24, 519–526 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7656-3>

7 APÊNDICIES

A mixture of herbicides Glyphosate and 2,4-D promotes deleterious reproductive outcomes induced by Western diet in obese male mice

A ser submetido para a revista *Environmental Toxicology*

- Fator de impacto 4,109;
- Qualis A1.

Link com as normas da revista:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/15227278/homepage/forauthors.html>

Original paper

A mixture of Glyphosate and 2,4-D herbicides promotes the deleterious reproductive outcomes induced by Western diet in obese male mice

Leticia Cardoso Valente^{1,2,3}; Beatriz de Matos Manoel²; Ana Carolina Casali Reis²; Julia Stein²; Bárbara Campos Jorge²; Luís Fernando Barbisan^{2,3#}; Guilherme Ribeiro Romualdo^{2,3#*}; Arielle Cristina Arena^{1,2#*}

¹Federal University of Grande Dourados (UFGD), Faculty of Health Sciences, Dourados, Mato Grosso do Sul state, Brazil

²São Paulo State University (UNESP), Biosciences Institute, Department of Structural and Functional Biology, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

³São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School, Experimental Research Unit (UNIPLEX), Multimodel Drug Screening Platform – Laboratory of Chemically induced and Experimental Carcinogenesis (MDSP-LCQE), Botucatu, São Paulo State, Brazil.

*Corresponding authors

São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School, Experimental Research Unit (UNIPLEX)

Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, Botucatu/SP, Brazil, zip code: 18618687, Tel/Fax: +55 14 38800469. E-mail address: guilherme.romualdo@unesp.br

São Paulo State University (UNESP), Biosciences Institute, Department of Structural and Functional Biology.

R. Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250, Botucatu/SP, Brazil, zip code:18618-689, Tel/Fax: +55 14 38800496. E-mail address: arielle.arena@unesp.br

#Authors share senior authorship.

Abstract

The consumption of Western diet (WD) - enriched in fats and sugars - is associated with overweight, obesity and male reproductive disorders. In addition to WD intake, crops and dairy products display residues of herbicides, including glyphosate and 2,4-D that are widely applied worldwide. The concomitant exposure to WD and herbicides - mimicking contemporary scenarios - is not fully investigated. Thus, we evaluated the effects of glyphosate and 2,4-D, alone or in mixture, on WD-induced alterations in the male genital system. Male C57BL6J mice were submitted to WD (chow containing 20% lard, 0.2% cholesterol, 20% sucrose, and high sugar solution with 23.1 and 18.9 g/L of D-fructose and D-glucose) for six months. Concomitantly to WD, the animals received glyphosate (0.05, 5 or 50 mg/kg/day), 2,4-D (0.02, 2 or 20 mg/kg/day) or their mixture (0, 05+0.02; 5+2 or 50+20 mg/kg/day) by intragastrical administration (5×/week). Doses were based on Acceptable Daily Intake (ADIs) or No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) values. Herbicide exposure did not alter the WD-induced obesity, hypercholesterolemia and hyperglycemia. WD induced sperm cell abnormalities, reduced the number, volume and area of Leydig cells, enhanced the frequency of epididymal abnormalities, decreased the proliferation in both germinal and epididymal epithelia, and reduced the number of androgen receptor (AR) positive epididymal cells. Remarkably, only the herbicide mixtures promoted such WD-induced effects: increased the frequency of sperm cell and epididymal abnormalities (absence of sperm, cytoplasmic vacuoles, and clear cell hypertrophy) (5+2 and 50+20 doses); decreased Leydig cell nuclei volume and area (5+2 and 50+20 doses), reduced epididymal cell proliferation (all mixtures), and AR expression (50+20 dose). In agreement, herbicide mixtures reduced serum testosterone levels (5+2 and 50+20 doses). Our findings indicate that the mixture of glyphosate and 2,4-D herbicides, mimicking environmentally relevant scenarios, promotes WD-induced changes in the male genital system.

Keywords: herbicides; glyphosate; 2,4-D; male genital system; western diet; obesity

1. Introduction

There are accumulating epidemiological studies and meta-analyses postulating the positive correlation between the western diet (WD) – featuring a high consumption of saturated fat-, cholesterol-, and carbohydrate-enriched foods – and a higher risk of overweight and obesity.¹⁻⁶ Both overweight and obesity are considered worldwide growing public health concerns. In the United States (US), where 37% of the adult population eats fast food once a day, obesity prevalence increased from 30.5% to 41.9% in 2020.^{7,8} In Brazil, overweight and obesity occurrences range from 57% to 62%, affecting 137 million people.⁹ Both conditions contribute to numerous chronic diseases, including cancers, diabetes, metabolic syndrome, non-alcoholic fatty liver disease, and cardiovascular diseases.¹⁰ In addition to these comorbidities, preclinical and clinical studies indicate that obesity may impair male reproductive function. In obese men, increased inflammation status and oxidative stress, which are hallmarks of obesity, were correlated to reproductive dysfunction.¹¹ In sexually active male rats, WD consumption (4 weeks) reduced sperm concentration and motility.¹² Furthermore, WD consumption (10 weeks) compromised the blood-testis barrier (BTB), reducing serum testosterone and causing sperm morphological alterations, and microRNA deregulation.^{13,14}

In addition to a “westernized” dietary pattern, the world population is currently exposed to herbicide residues in foods of both animal or vegetable origin.¹⁵⁻¹⁷ Noteworthy, in the last three decades (1990-2020), the global use of pesticides (*i.e.*, herbicides, fungicides, and insecticides) increased by ~30% (1.68 to 2.20 million tons/year).¹⁸ Brazil, one of the world’s greatest agricultural producers, is the third leading country in absolute pesticide use.¹⁸ Among the most used active ingredients (AI), glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] and 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) are the leading herbicides in Brazil, totalizing 246 and 57 million kg in 2020, respectively.¹⁹ Glyphosate, a broad-spectrum systemic organophosphorus compound and crop desiccant, is the most used herbicide globally (825 million kg/year) as well.²⁰ While 2,4-D, a selective auxin, is extensively used in the US for both agricultural and residential purposes, reaching ~20 million kg/year.²¹ In some agricultural settings, 2,4-D and glyphosate can be mixed to increase the efficiency of weed control.²² The widespread use of these herbicides may result in daily human exposure.²³⁻²⁶ Thus, the biological effects of these herbicides in non-vertebrate and vertebrate organisms are widely investigated and discussed, including reports of deleterious effects on different organs/systems, including reproductive repercussions.²⁷⁻³⁰ The *in vitro* exposure to glyphosate (0,36 mg/L) reduced sperm motility.³¹ Male rats exposed to glyphosate (250 mg/kg body weight, 8 weeks) also impaired sperm motility, reduced the number of spermatogenic cells, and caused intraepithelial vacuolization.³² Subacute exposure to 2,4-D (33 mg/kg body weight, 5 days) led to abnormal sperm morphology in mice.³³ In higher doses, 2,4-D (100 and 200 mg/kg body

weight, 30 days) also reduced serum levels of testosterone, while increasing follicle-stimulating (FSH) and luteinizing hormones (LH) in rats.³⁴

Although these findings demonstrate the deleterious effects of glyphosate or 2,4-D on the morphology and/or function of the male genital system in rodents, the implications of the concomitant exposure to WD and herbicides - mimicking contemporary settings - have not been investigated yet. Furthermore, mixtures of herbicides, reflecting real human exposures, have not been fully explored in preclinical studies. In this context, we aimed at (A) assessing the effects of WD on the male genital system; and (B) whether glyphosate and 2,4-D, alone or mixed, promote the deleterious changes induced by WD.

2. Materials and methods

2.1 Animals and herbicides

Male C57BL/6J mice (n = 130) were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (UNICAMP, Brazil), and kept in the Experimental Research Unit (UNIPEX) of Botucatu Medical School (FMB, UNESP, Brazil) in polypropylene cages with stainless steel grid-shaped lids, with autoclaved pine shavings (5 animals/cages), under standard conditions ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\%$ humidity, 12-h light/dark cycle and continuous air changes). The herbicide glyphosate (cat. #P9556) and 2,4-D (cat. #D7299) were purchased from Sigma-Aldrich (USA).

2.2 Experimental design

Five to six-week-old male C57BL/6J mice were randomly allocated into thirteen experimental groups (G) (n=10 animals/group). Animals were submitted to a WD-induced obesity model (G4-G13), as recently established by our research group, by receiving high-sugar fat chow (HSF, 20% sucrose, 30% lard and 0.2% cholesterol, w/w) and high sugar solution (HSS, 23.1 and 18.9 g/L of D-fructose g/L and D-glucose) *ad libitum* for six months (**Figure 1**).³⁵ The other groups (G1-G3) received a standard chow (AIN-93G diet) and filtered water *ad libitum* for the same period. Details of the diet compositions are shown in **Supplementary Table 1**. Concomitantly to the diets, animals received by intragastrical (i.g.) administration glyphosate at the doses of (G5) 0.05, (G6) 5, and (G7) 50 mg/kg body weight (bw)/day; 2,4-D at doses of (G8) 0.02, (G9) 2 and (G10) 20 mg/kg bw/day; or the mixture of glyphosate and 2,4-D, in the lowest (G11; 0.05 mg + 0.02 mg), intermediate (G12; 5 mg + 2 mg) and highest (G13; 50 mg + 20 mg) doses (5×/week), respectively, diluted in ultrapure distilled water vehicle (Invitrogen, USA) (**Figure 1**). G1 (negative control) and G4 (positive control) received the vehicle, while G2 and G3

were administered the mixture of glyphosate and 2,4-D at the lowest (0.05 mg + 0.02 mg) and highest doses (50 mg + 20 mg), and served as herbicide mixture controls. Herbicide solutions were weekly prepared and the pH was adjusted to physiological (~7.4) before administration, and the animals were treated in the morning (between 8:00-9:00 am).

At the end of six months, after 12h-fasting, the animals were euthanized by exsanguination under anesthesia (intraperitoneal injection of ketamine/xylazine at 100/16 mg/kg bw). Blood was collected by cardiac puncture, centrifuged (1503×g, 10 min), and the serum was collected and stored (-20°C). At the necropsy, epididymal, mesenteric, retroperitoneal, and subcutaneous fat pads, testis, epididymis, *ductus deferens*, and seminal vesicles were removed and weighed. The testis and right epididymis were fixed in Bouin solution for 24h and, subsequently, these organs were washed with 70% alcohol for histological and immunohistochemical processing. The left *ductus deferens* was washed with 10% formalin solution to perform the sperm morphology. The procedures described herein followed the guidelines of ARRIVE (Animal Research: Reporting of in Vivo Experiments)³⁶ and were approved by the local committee for Ethics in the Use of Animals of Botucatu Medical School (UNESP), under protocol 1344/2020.

2.3 Dose determination

The lowest dose of glyphosate (0.05 mg or 50 µg/kg bw/day) is lower than the acceptable daily intake (ADI) values applied globally (0.5-1.0 mg/kg bw/day), also closely representing the estimated human environmental exposure.^{37,16-18} The remaining doses are below (5 mg) or within the European No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) (50 mg). For 2,4-D, the lowest dose (0.02 mg/kg bw/day) corresponds to the new European ADI.¹⁷ The intermediate (2 mg) and highest (20 mg) doses are below and similar to the NOAEL (16.6 mg) of the American minimal risk level worksheet, respectively.³⁸

2.4 Glucose tolerance test, cholesterol, and testosterone determinations

A week before euthanasia, 12-hour fasted animals received a dose of 2 g/kg of D-glucose (Dinâmica Brazil) for a Glucose tolerance test (GTT). Blood glucose was measured again at 30, 60, 90, and 120 minutes after the glucose injection. A blood glucose curve was determined, and the area under the curve (AUC) was calculated. The serum collected at necropsy was used to measure total cholesterol by an enzymatic method (BioClin 200, Bioplus, Brazil), or to determine total testosterone levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, #8505, Monobind, USA; sensitivity: ≥0.10 ng/mL) using commercial kits.

2.5 Sperm morphology

The interior of the left *ductus deferens* was sectioned at the proximal and distal ends, and washed with a syringe and needle with 1 ml of formalin solution. Then, 20 µl of the duct wash was placed on histological slides for qualitative evaluation of the sperm. For this, 200 sperm per animal were evaluated under light microscopy (40×). Morphological abnormalities found in sperm were classified as changes in the head (straight or isolated head) and tail (broken or curled in a spiral), in addition to a cytoplasmatic droplet of the sperm.³⁹

2.6 Histological procedures and histopathological evaluation

Right testis and epididymis were fixed in Bouin, and later processed as described by Balin et al.⁴⁰ Histological sections (5 µm, 3 sections/animal) were obtained, which were stained in hematoxylin and eosin (HE). For the histopathological analysis of the testis, 100 random sections of the seminiferous tubules were classified into normal and abnormal, and the quantified abnormalities were: tubular atrophy, residual bodies, exfoliation of germ cells, and vacuolization Sertoli cells.⁴¹ For the epididymis, the portions (head, body, and tail) were evaluated and classified as normal and abnormal. For this, 100 sections of the same tubules were counted uniformly in the portions of the epididymis, the following parameters were present in the abnormalities: vacuolated cytoplasm, clear cell hypertrophy, and absence of sperm cells.⁴²

2.6.1 Stages of the seminiferous tubules: For this purpose, 100 random sections of seminiferous tubules per animal were classified as stages I-VI, VII-VIII, IX-XI, or XII, according to the proportion of cells in the germinal epithelium.⁴³

2.6.2 Leydig cell nuclei and volume: Leydig cell nuclei were counted in 10 random fields in each testis section. Subsequently, 50 randomly selected nuclei were measured per animal.⁴⁴ The largest and smallest diameters of the cores were analyzed using a Nikon E-200 microscope (40×) coupled to a digital camera and computer with NisElements software (version 4.20 for Windows). The mean diameter was determined using the formula⁴⁵ and described by Balin et al.⁴⁰

2.6.3 Seminiferous tubules diameter and germinal epithelium height: For this purpose, 100 round cross sections of seminiferous tubules (in stages VII-XI of the spermatogenic cycle) were randomly analyzed using a Niko E-200 microscope (40×) coupled to a digital camera and computer with NisElements software (version 4.20 for Windows). Two perpendicular

diameters of each cross-section were measured, and their measurements were determined. The height of the germinal epithelium was also determined at four equidistance from each cross-section of the seminiferous tubules.⁴⁶

2.7 Immunohistochemistry

Testis and epididymis sections (5 μ m, 1 section/animal) were deparaffinized, and submitted to antigen retrieval in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0, 120°C, 5 min) in a Pascal pressure chamber (Dako Cytomation, Denmark). After endogenous peroxidase blockade with 10% H₂O₂ phosphate buffer solution (PBS) (15 min), slides were treated with skim milk (60 min), to block nonspecific bindings. Then, the histological sections were incubated with primary antibody for proliferating cell nuclear antigen solution (PCNA, PC10, 1:100 dilution, Dako Cytomation, Denmark) or androgen receptor (AR, sc-816, 1:300 dilution, Santa Cruz Biotechnologies, USA) in a humid chamber (4°C, overnight). Subsequently, the slides were incubated with one step Polymer/HRP (Dako Cytomation, USA) (30 min). The reaction was developed with 3'3-diaminobenzine (DAB) chromogen (Sigma-Aldrich, USA) and the slides were counterstained with Harris' hematoxylin. For PCNA analysis, PCNA+ epithelial cells were uniformly counted in 40 or 24 tubules, considering the different seminiferous tubules stages (n=10/stage) or epididymis portions (n=8/portion; considering head, body, and tail), respectively⁴⁷. The number of PCNA or AR positive cells was normalized by the analyzed area (mm²). The intensity of AR immunostaining was also evaluated, considering the staining pattern: 0 (absence), 1 (weak), 2 (mild), or 3 (strong). Analyses were blind and performed using Image J software (NIH, EUA) (20 or 40 $\times$).

2.8 Statistical analysis

GTT data were evaluated by two-way ANOVA. The remaining data were evaluated by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis and *post hoc* Tukey test. The significance level adopted was $p \leq 0.05$. Parametric data was presented as mean $\pm$ standard deviation (S.D.), while non-parametric as box plots. The number of replicates per group for each experiment is depicted in the footnotes of tables and figures. Analyses were performed using Prism 6.01 software (GraphPad, EUA).

3. Results

3.1 General findings

All groups had similar initial body weights (**Figure 2A**). All groups that received WD (G4-G13) showed increased final body weight (**Figures 2B and C**), absolute (**Figure 2D**), and relative (**Figure 2E**) total fat weights ($p < 0.0001$, for all).

This feature was also depicted in the representative body phenotype photos, indicating WD-induced obesity (**Figure 2C**). Mice exposed to 2,4-D (G8-G13) - regardless of dose and mixture - showed decreased body weight compared to their WD counterpart (G4), while still obese (**Figure 2B and C**). Although the animals exposed to the higher 2,4-D doses (G10 and G13) had decreased HSF chow intake, this outcome was not observed in AIN-93G chow intake in herbicide controls (G2 and G3) (**Figure 2F**), and body weight remained unmodified in these groups (G2 and G3) compared to the negative control (G1) (**Figure 2B**). Groups did not differ on water/HSS solution intake (data not shown). In general, groups exposed to herbicides alone and in mixture did not modify the WD-induced obesity, hypercholesterolemia (**Figure 2G**), and glucose intolerance (**Figure 2H**) ($p < 0.0001$, for all).

In general, WD and herbicides exerted no major effects on testis, epididymis, *ductus deferens*, and seminal vesicle absolute weights (**Supplementary Table 2**). All groups that received WD (G4-G13) showed decreased relative weights of the aforementioned organs ($p < 0.0001$, for all) (**Supplementary Table 3**) due to the increase in body weight, an effect that was not modified by herbicide exposure (G5-G13). Herbicide mixture controls (G2-G3) showed no difference in GTT, cholesterol, and organ weights compared to the control group (G1).

3.2 Sperm morphology

The animals exposed to WD (G4-G13) had increased abnormal sperm morphology compared to control (G1) ($p < 0.0001$, for both) (**Figure 3A**). The different herbicide exposures did not modify this WD-induced effect (G5-G13). Herbicide controls (G2 and G3) also featured increased abnormal sperm morphology, while this effect was similar to WD (G4). Regarding the frequency of specific abnormalities, noteworthy, only the herbicide mixture at the intermediate dose (G12) increased cytoplasmic droplets compared to most groups (G1, G3 – G5, G8-G10, G13) ($p < 0.0001$) (**Figure 3B**). Furthermore, only the herbicide mixtures at intermediate and higher doses (G12 and G13) presented an increased frequency of straight-head cells compared to the control (G1) ($p = 0.0002$) (**Figure 3C**). The increased frequency of sperm cells displaying isolated heads was common in most WD-fed groups, and it was not modified by herbicide exposure (**Figure 3D**). Tail abnormalities did not differ among the experimental groups (**Figures 3E and F**).

3.3 Testis morphometry, histopathological analysis, and serum testosterone

WD and herbicides did not alter the diameter of seminiferous tubules, and the height of the germinal epithelium. Tubule staging and histopathological analysis also did not reveal pronounced effects of WD and/or herbicides

(**Supplementary Figure 1**). Nonetheless, WD-fed groups (G4-G13) reduced the number, nuclei area, and volume of Leydig cells compared to control group (G1) ($p < 0.0001$, for all) (**Figure 4**). Of note, the exposure to 2,4-D at the higher dose (G10), as well as herbicide mixtures at intermediate and higher doses (G12 and G13) promoted this WD-mediated effect, reducing, even more, the Leydig cell nuclei and area and volume parameters compared to WD control group (G4) ($p < 0.0001$, for both). Representative photomicrographs of HE-stained testis sections are displayed in **Supplementary Figure 2**. In agreement with these findings, total testosterone serum determination revealed that the same groups (G10, G12, and G13) decreased the levels of this hormone compared to control counterparts (G1) ($p = 0.0008$) (**Figure 4**). When analyzed only controls (G1 and G4) and herbicide mixtures (G11-G13), WD (G4) had slightly decreased testosterone levels compared to control (G1), and all mixtures similarly reduced testosterone levels compared to both negative and WD counterparts ($p < 0.0001$) (**Supplementary Figure 3**).

3.4 Epididymis histopathological analysis

The animals exposed to WD (G4-G13) had increased abnormal epididymis histology compared to control (G1) ($p < 0.0001$, for both) (**Figure 5**). Herbicide controls (G2 and G3) also featured increased abnormal histology, while this effect was similar to WD (G4). The exposure to herbicide mixture at the intermediate and higher doses (G12 and G13) promoted the WD-mediated effect, increasing the percentage of tubules with abnormalities compared to WD control (G4) and herbicide controls (G2-G3) ($p < 0.0001$, for both) (**Figure 5**). Among the specific alterations (**Figure 5**), animals exposed to herbicide mixture at a higher dose (G13) showed an increased number of tubules with the absence of sperm cells, cytoplasmic vacuoles, and clear cell hypertrophy compared to most experimental groups (G1-11) ($p < 0.0001$, for all). The increase in the occurrence of cytoplasmic vacuoles was also observed in the group receiving WD and herbicide mixture at the intermediate dose (G12) (**Figure 5**). Representative photomicrographs of the main histopathological alterations observed in the group exposed to the herbicide mixture at a higher dose (G13) are also displayed in **Figures 5A-D**.

3.5 PCNA and AR immunoexpression

WD (G4-G13) reduced the cell proliferation (PCNA) in the spermatogonium compared to the negative control (G1) ($p < 0.0001$) (**Figure 6**). Of note, the herbicide mixture at the lower dose (G11) promoted this WD-mediated effect, reducing cell proliferation compared to WD control (G4) and herbicide controls (G2 and G3) ($p < 0.0001$, for both) (**Figure 6**). The

herbicide controls (G2 and G3) did not exert any effects on spermatogonium proliferation. Leydig, Sertoli, and the other germinative epithelial cells were negative for PCNA in all groups. In the epididymis, the animals exposed to WD (G4-G13) also showed reduced proliferation of epithelial cells compared to the negative control (G1) ($p < 0.0001$) (**Figure 7**). Herbicide controls (G2 and G3) also reduced cell proliferation, while the effect was similar to WD control (G4). Noteworthy, the groups exposed to the intermediate and higher 2,4-D doses (G9 and G10), as well as all herbicide mixtures (G11-G13), promoted this WD-induced effect similarly, decreasing cell proliferation compared to most groups (G2-G8) ($p < 0.0001$) (**Figure 7**).

Regarding AR in the epididymis, groups did not differ on the intensity of the immunostaining (data not shown). Mice exposed to WD (G4-G13) showed a reduced number of AR positive epithelial cells in the epididymis compared to the negative control (G1) ($p < 0.0001$) (**Figure 8**). Herbicide controls (G2 and G3) also presented reduced AR positive cell counting, while the effect was also similar to WD control (G4). Only the group exposed to the herbicide mixture at the higher dose (G13) promoted this WD-mediated effect, increasing the number of AR+ cells compared to WD (G4) and herbicide controls (G2 and G3) ($p < 0.0001$) (**Figure 8**).

4. Discussion

Mixtures of herbicides are scarcely explored in preclinical settings, despite reflecting real and contemporary exposures. Due to the increase in fast food consumption in recent years. This study aimed to evaluate the effects of WD on the male genital system; and assess whether chronic exposure to the most consumed herbicides worldwide (2,4-D and glyphosate) - alone or mixed - promotes the deleterious changes induced by WD in the genital system of male mice. We highlight that the present investigation is the first to evaluate the potential outcomes of concomitant exposure to WD, WD-induced obesity, and herbicide exposure in mice.

In general, our results indicate that the concomitant exposure to WD and herbicide mixtures - at doses within the current toxicological limits – exceeded the negative impacts induced by WD or herbicide mixture alone on male reproduction, increasing sperm cell and epididymal abnormalities, reducing Leydig cell nuclei area and volume, lowering serum testosterone, and decreasing epididymal epithelial cell proliferation and AR immunoexpression. Such findings reinforce the role of herbicide mixtures as potential endocrine-disrupting chemicals (EDCs), interfering with the normal function and outcomes of natural hormones. The exposure to WD (G4-G13) for 6 months resulted in a clear 2- and 4-fold increase in body and fat weights, respectively, indicating obesity. Furthermore, these animals also had elevated serum cholesterol and blood glucose levels, which are indicators of hypercholesterolemia and glucose intolerance. The nutritional models in

rodents- induced by the increased caloric, fat, and/or sugar intake - are widely used and accepted as a reliable preclinical setting to investigate the pathogenesis of obesity, and its associated metabolic comorbidities.^{35,48} In fact, these models reproduce key morphological, biochemical, and molecular features of the corresponding human condition.^{35,48}

Spermatogenesis is a key process in male reproduction, involving many cellular (somatic cell populations, Leydig, Sertoli, and peritubular myoid cells) and molecular (gonadotropins, testosterone, and estrogen) players, which are essential factors in a process that culminates on differentiation of the germinative epithelium to mature sperm cells.^{49,50} This complex process can be severely impaired by external conditions, including WD intake and its resulting comorbidities.¹¹⁻¹⁴ In general, our WD protocol 1) induced sperm cell abnormalities, 2) reduced the number, volume, and area of Leydig cells, 3) enhanced the frequency of epididymal abnormalities, 4) decreased the proliferation in both germinal and epididymal epithelia, 5) and reduced the number of AR+ epididymal cells.

An increased glucose availability due to WD intake can lead to increased glycolytic activity, which may result in an overproduction of reactive oxygen species (ROS). In the seminiferous tubules, the enhanced metabolic activity results in ROS production in the germinative epithelium and Sertoli cells, which can lead to lipid peroxidation and DNA fragmentation, culminating in morphological sperm abnormalities.^{51,52} In addition to the glucose effects on spermatogenesis, the enhanced free fatty acid (FFA) availability may result in FFA accumulation in different testicular components, impairing not only the spermatogenic process but also the synthesis of steroid hormones (steroidogenesis) by the Leydig cells.^{53,54} Both enhanced oxidative stress and impaired steroidogenesis may negatively interfere with spermatogonial proliferation^{55,56}, also contributing to the sperm cell abnormalities observed. The epididymis - responsible for sperm cell maturation, transport, and storage - also presented morphological abnormalities (clear cell hyperplasia and cytoplasmic vacuoles) that are associated with an increase in endocytosis, and the accumulation of lipids, phospholipids, and glycoproteins.⁴² The suppression of testosterone biosynthesis by Leydig cells can cause androgen deprivation in the epididymis, and negatively impact its morphology and function - which is mediated by AR signaling⁴² - contributing to the observed sperm cell abnormalities.

Along with WD popularization and the obesity epidemic, the high incidence of male infertility is concomitant with the increasing use of herbicides, suggesting they may be contributors to the development of this pathological state, although clinical and preclinical data are warranted. While the exposure to WD and 2,4-D (0.02, 2 or 20) or glyphosate (0.05, 5, 50) alone did not exceed the WD-mediated reproductive effects, the herbicide mixtures promoted many of the changes induced by WD in both the testis and the epididymis. In perspective, the most pronounced effects were observed when animals were

chronically exposed to the mixture of herbicides at the intermediate (5 + 2, G12), and, mainly, at the higher doses (50 + 20, G13). These mixtures not only promoted WD-mediated effects but exceeded the effects of herbicide controls (G2 and G3). The herbicide mixtures promoted: 1) an increase in the frequency of sperm cell and epididymal abnormalities (G12 and G13); 2) a decrease in Leydig cell nuclei volume and area (G12 and G13), 3) a reduction in serum testosterone levels (G12 and G13), 4) in epididymal cell proliferation (G11-G13), 5) and in AR expression (G13). Different mechanisms are proposed to explain the deleterious effects of herbicides on male fertility. Herbicides may induce reproductive toxicity with direct cytotoxicity, or by generating reactive metabolites or ROS that may damage different biological molecules, including lipids, proteins, RNA, and DNA, also interfering with gene expression and epigenetics. Herbicides may also act as EDCs, interfering in different aspects of steroidogenesis, such as synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of hormones. Additionally, these chemicals may indirectly promote male infertility by promoting obesity, acting as obesogens.⁵⁷

Herein, our findings indicate that the herbicides - alone or in the mixture – did not act as obesogens, as the different exposure did not promote WD-induced obesity and its comorbidities, such as hyperglycemia, and hypercholesterolemia. Nonetheless, our findings may not discard this mode of action of other herbicides in future experimental settings. Although 2,4-D and glyphosate have never been investigated in the mixture, and under the context of WD and related comorbidities, preclinical studies have already demonstrated the deleterious reproductive effects of these herbicides separately in the absence of WD context. In a recent bioassay, oral exposure to a 5-fold higher dose of glyphosate (250 mg/kg, for 8 months) reduced the number and induced cytoplasmic vacuolization of spermatogonium, also inducing morphological nuclear alterations in the Sertoli cells, and reducing the sperm cell motility in rats.³² The oral exposure to 5-to-10-fold higher doses of 2,4-D (100 and 200 mg/kg, for 1 month) resulted in reduced reproductive organs weight, decreased reproductive organ weights, decreased serum testosterone levels, and a compensatory increase in luteinizing (LH), and follicle-stimulating hormones (FSH) in rats.³⁴ Of note, the higher dose (200 mg/kg) both motility and the number of sperm cells, also causing several morphological alterations in the testis (increased intracellular spaces, and reduced number of sperm cells in the lumen) and seminal vesicle (decreased luminal secretions, and thickness of the muscular layer and luminal space). Such changes were attributed to the direct decrease in testosterone biosynthesis by Leydig cells³⁴. In a mouse study, the oral exposure to 2,4-D in a ~6-fold higher dose (130 mg/kg, for 2 weeks) decreased testicular testosterone levels by negatively interfering with cholesterol levels in Leydig cells, through the downregulation 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase 1 and reductase, involved in *de novo* cholesterologenesis. These alterations were associated with spermatocyte/Sertoli cell damage. As these abnormalities were only observed in *Ppara*-null mice, it is possible to

hypothesize that 2,4-D disrupts testosterone synthesis in Leydig cells through peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α).⁵⁸

Although the exact mechanisms still need to be elucidated, the deleterious effects promoted by herbicide mixtures (G12 and G13) may be associated with both direct/indirect cytotoxic mechanisms and/or impaired steroidogenesis, as the morphometrical alterations in Leydig cells, testosterone levels - along with decrease AR immunostaining in the epididymis - indicate a possible endocrine disrupting role of these chemicals. The testosterone levels will be evaluated in serum samples. In the context of WD (G4-G13), considering that the isolated exposure to glyphosate (G5-G7) or 2,4-D (G9-11) herbicides little interfered with the analyzed parameters, our results may indicate a synergistic effect of herbicide mixtures and WD (G12 and G13). Furthermore, as most of the available studies exposed rodents to higher doses/concentrations than those applied herein, the deleterious reproductive effects observed at doses within the ADI or NOAEL values may contribute to a further reevaluation of the current toxicological limits.

5. Conclusion

Therefore, our findings indicate that the mixture of the most used herbicides worldwide – 2,4-D and glyphosate - promotes the deleterious effects of WD on the male genital system. Our preclinical findings can provide mechanistic insights for further studies and, mainly, for the future reassessment of the current toxicological limits, as our experimental design reflects actual contemporary settings.

Acknowledgments

The authors would like to thank the employees of the Experimental Research Unit (Unipex, Botucatu Medical School) and José Eduardo Bozano, of the Department of Morphology, Institute of Biosciences, for their support during animal experimentation and technical assistance.

Funding information

Leticia C. Valente was the recipient of a fellowship from CAPES/FUNDECT (88887.635485/2021-00). Guilherme R. Romualdo was the recipient of a fellowship from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (#2020/00377-0). Luis F. Barbisan was the recipient of support research from FAPESP (grant #2020/01078-7). The funders did not influence the writing and interpretation of data.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Figure Captions

Figure 1. Experimental design. For details, see “2.1 Experimental design” section. e: euthanasia; Glypho: glyphosate; n: number of mice/groups; WD: western diet; HSF: high sugar fat; HSS: high sugar solution. The figure was composed with the aid of illustrations from the Biorender website available at <https://app.biorender.com/> (accessed on 26th September 2022).

Figure 2. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on (A) initial, (B) final body weights, (C) representative body phenotype photos, (D) absolute and (E) relative total fat (epididymal, retroperitoneal, and mesenteric) weights, (F) chow intake, (G) serum cholesterol, and (H) glucose tolerance test (GTT) during western diet (WD)-induced outcomes. n = 5 (cholesterol) or 10 (other) mice/group. Data are presented as mean + standard deviation (parametric) or box plots (non-parametric). Data were analyzed by two-way ANOVA (GTT), one-way ANOVA or Kruskal-Wallis, and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5, or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

Figure 3. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on sperm morphology during western diet (WD)-induced outcomes. (A) Abnormal morphology, (B) cytoplasmic droplet, (C) straight or (D) isolated head, (E) curled or (F) broken tail. n = 10 mice/group. Data are presented as mean + standard deviation (parametric) or box plots (non-parametric). Data were analyzed by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5, or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

Figure 4. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on Leydig cell **(A)** count, **(B)** nuclei area and, **(C)** volume during, and **(D)** serum total testosterone levels during western diet (WD)-induced outcomes. $n = 5$ mice/group. Data are presented as mean + standard deviation (parametric) or box plots (non-parametric). Data were analyzed by one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

Figure 5. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on the histopathological evaluation of the epididymis during western diet (WD)-induced outcomes. Representative photomicrographs (G13) of HE-stained sections showing the absence of sperm cells on the tubules (*) of the epididymis **(A)** head (40× objective, scale bar: 25 μ m), and **(B)** body (20× objective, scale bar: 50 μ m). **(C)** Cytoplasmic vacuolization (arrowheads and detail) (40× objective, scale bar: 25 μ m). **(D)** Clear cell hypertrophy (arrowheads and detail) (40× objective, scale bar: 25 μ m). Occurrence of **(E)** abnormal (considering all alterations) morphology; **(F)** absence of sperm cells, **(G)** cytoplasmic vacuoles, and **(H)** clear cell hypertrophy. $n = 5$ mice/group. Data are presented as mean + standard deviation (parametric) or box plots (non-parametric). Data were analyzed by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

Figure 6. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on proliferating nuclear cell antigen (PCNA) immunoexpression in the germinal epithelium (spermatogonium) during western diet (WD)-induced outcomes. Representative photomicrographs of immuno-stained sections (40× objective, scale bar: 25 μ m), showing that WD and WD + Glypho (0.05) + 2,4-D (0.02) group had decreased proliferation in the spermatogonium (arrowheads and details). Semiquantitative analysis. $n = 5$ mice/group. Data are presented as boxplots (non-parametric data). Data were analyzed by Kruskal-Wallis and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male

C57BL/6J mice submitted to western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

Figure 7. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on proliferating nuclear cell antigen (PCNA) immunoexpression in the epididymis during western diet (WD)-induced outcomes. Representative photomicrographs of immuno-stained sections (40× objective, scale bar: 25 µm), showing that WD and WD + herbicide mixtures group had decreased proliferation in the epithelial cells of epididymis head (arrowheads and details). Semiquantitative analysis. n = 5 mice/group. Data are presented as boxplots (non-parametric data). Data were analyzed by one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

Figure 8. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on androgen receptor (AR) immunoexpression in the epididymis during western diet (WD)-induced outcomes. Representative photomicrographs of immuno-stained sections (20× objective, scale bar: 50 µm), showing that WD (G4) and WD + herbicide mixture at the higher dose (G13) group had decreased number of AR+ cells in the epididymis tail (arrowheads and details). Semiquantitative analysis. n = 5 mice/group. Data are presented as boxplots (non-parametric data). Data were analyzed by one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

6. References

1. Murtaugh MA, Herrick JS, Sweeney C, Baumgartner KB, Guiliano AR., Byers T, Slattery ML. Diet composition and risk of overweight and obesity in women living in the Southwestern United States {A figure is presented}. *J. Am. Diet. Assoc.* 2007;8:1311–1321.
2. Naja F, Hwalla N, Itani L, Karam S, Mehio Sibai A, Nasreddine LA. Western dietary pattern is associated with overweight and obesity in a national sample of Lebanese adolescents (13-19 years): A cross-sectional study. *Br. J. Nutr.* 2015;11:1909–1919.
3. Mu M, Xu LF, Hu D, Wu J, Bai MJ. Dietary patterns and overweight/obesity: A review article. *Iran. J. Public Health.* 2017;7:869–876.
4. Peng W, Liu Y, Liu Y, Zhao H, Chen H. Major dietary patterns and their relationship to obesity among urbanized adult Tibetan pastoralists. *Asia Pac. Clin. Nutr.* 2019;3:507– 519.
5. Eng JY, Moy FM, Bulgiba A, Rampal S. Dose–response relationship between western diet and being overweight among teachers in Malaysia. *Nutrients.* 2020;10:1–15.
6. Min K, Wang J, Liao W, Astell-Burt T, Feng X, Cai S, Liu Y, Zhang P, Su F, Yang K, Sun L, Zhang J, Wang L, Liu Z, Jiang Y. Dietary patterns and their associations with overweight/obesity among preschool children in Dongcheng District of Beijing: a cross-sectional study. *BMC Public Health.* 2021;1:1–14.
7. Fryar CD, Ostchega Y, Hales CM, Zhang, G, Kruszon, D. Hypertension Prevalence and Control Among Adults: United States, 2015-2016. *NCHS data brief.* 2017;289:1-8.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Adult Obesity Facts 2022. <https://www.cdc.gov/obesity/data/adult.html>. Accessed September 19, 2022.
9. Pesquisa Nacional de Saúde – Secretaria de atenção primária a saúde – Promoção da saúde e da Alimentação Adequada e Saudável. Excesso de peso e obesidade, 2020. [https://aps.saude.gov.br/ape/promocaosaude/excesso#:~:text=De%20acordo%20com%20a%20Pesqu%20isa,%20masculino%20\(57%2C5%25\)](https://aps.saude.gov.br/ape/promocaosaude/excesso#:~:text=De%20acordo%20com%20a%20Pesqu%20isa,%20masculino%20(57%2C5%25)). Accessed September 19, 2022.

10. González-Muníeza P, Mániesa-Goszáles MA, HU FB, Despés JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, Moreno LA, Bray GA, Martínez JA. Obesity. *Nat. Ver. Dis. Primers*. 2017;3:17034.
11. Pini T, Raubenheimer D, Simpson SJ, Crean AJ. Obesity and male reproduction; placing the western diet in context. *Front Endocrinol*. 2021;12.
12. Ferramosca A, Conte A, Zara MV. A high-fat diet negatively affects rats' sperm mitochondrial respiration. *Andrology*. 2016;4:520-525.
13. Fan Y, Liu Y, Xue K, Gu G, Fan W, Xu Y et al. Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *Plos One*. 2015;10.
14. Fullston T, Ohlsson TEMC, Palmer NO, DeBlasio MJ, Mitchell M et al. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB J*. 2013;27:4226-4243.
15. FDA. Pesticide Residue Monitoring Program Fiscal Year 2017 Pesticide Report: 2017. <https://www.fda.gov/food/pesticides/pesticideresidue-monitoring-program-reports-and-data>. Accessed september 20, 2022.
16. ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>. Accessed september 19, 2022.
17. EFSA. Scientific report on the 2017 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*. 2019;17:5743.
18. FAO. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues 2019. <http://www.fao.org/3/ca4888en/ca4888en.pdf>. Accessed September 19, 2022.
19. IBAMA. Os 10 ingredientes ativos mais vendidos – 2020 – consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do decreto nº 4.074/2002. 2020.
20. Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur*. 2016;28:1-15.
21. EPA. Pesticides Industry Sales and Usage 2008 - 2012 Market Estimates: 2017. <https://www.epa.gov/pesticides/pesticides-industry-sales23>. Accessed September 20, 2022.

22. Osipe JB, Oliveira RS, Constantin J, Takano HK, Biffe DF. Espectro de controle de plantas daninhas com os herbicidas 2,4-D e dicamba associados ou não ao glifosato. *Planta Daninha*, 2017;36.
23. Giesey JP, Dobson S, Solomon KR. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2000;167:35-120.
24. Walters J. Environmental fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environ. Monit. Pest Manag.* 2011;1-18.
25. Islam F, Wang J, Farooq MA, Khan MSS, Xu L, Zhu J et al. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environ Int.* 2018;111:332–51.
26. Kaniserry R, Gairhe B, Kadyampakeni D, Batuman O, Alferez F. (2019). Glyphosate: Its environmental persistence and impact on crop health and nutrition. *Plants*. 2019;8:1–11.
27. Mesnage R, Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini GE. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem Toxicol.* 2015;84:133–153.
28. Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, Hansen M, Landrigan PJ, Lanphear BP, Mesnage R, Vandenberg LN, Vom Saal FS, Welshons WV, Benbrook CM. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: A consensus statement. *Environmental Health.* 2016;15:1–13.
29. Peterson M, McMaster S, Riechers D, Skelton J, Stahlman P. (2016). 2,4-D Past, Present, and Future: A Review. *Weed Technology.* 2016;30:303-345.
30. Singh S, Kumar V, Gill J, Datta, S, Singh S, Dhaka V, Kapoor D, Wani AB, Dhanjal DS, Kumar M, Harikumar SL, Singh, J. Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020;17:7519.
31. Anifandis G, Katsanaki K, Lagodonti G, Messini C, Simopoulou M, Dafopoulos K, Daponte A. The effect of glyphosate on human sperm motility and sperm DNA fragmentation. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2018;15:1-8.
32. Liu JB, Chen, K, Li ZY, Wang L. Glyphosate – induced gut microbiota dybiosis facilitates male reproductive toxicity in rats. *Sci. Total Environ.* 2022;805.
33. Amer SM, Aly FAE. Genotoxic effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2,4-dichlorophenol in mouse. *Mutat. Res.* 2001;494:1-12.

34. Marouani N, Tebourbi O, Cherif D, Hallegue D, Yacoubi MT, Sakly M, Benkhalifa M, Rhouma KB. Effects of oral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on reproductive parameters in male wistar rats. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2017;24:6.
35. Romualdo GR, Valente LC, Sprocatti, AC, Bacil GB, de Souza IP, RodriguesJ, Rodrigues MAM, Vinken M, Cogliati B, Barbisan LF. A western diet-induced mouse model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease associated to metabolic outcomes: features of gut microbiome-liver-adipose tissue axis, *Nutrition.* 2022;111836.
36. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. *PloS. Biology.* 2010;8.
37. Stephenson CL, Harris CA. An assessment of dietary exposure to glyphosate using refined deterministic and probabilistic methods. *Food. Chem. Toxicol.* 2016;95:28–41.
38. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2020. Toxicological profile for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
39. Filler R. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. R.E. Chapin, J.J. Heindel (Eds.), *Methods in Toxicology: Male Reproductive Toxicology*, Academic Press, San Diego (1993).
40. Balin PS, Jorge BC, Leite ARR, Borges CS, Oba E, Silva RJR, Barros AL, Horta-Júnior JAC, Arena AC. Maternal exposure to ibuprofen can affect the programming of the hypothalamus of the male offspring. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2020;111:104576.
41. Vidal JD, Whitney KM. Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity. *Spermatogenesis.* 2014;4.
42. Grava Kempinas W, Klinefelter GR. Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis* 2015;8.
43. Leblond CP, Clemont Y, 1952. Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and Guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am. J. Anat.* 1952;90:167-215.
44. Mantovani A, Fucic A. Puberty dysregulation and increased risk of disease in adult life: possible modes of action. *Reprod. Toxicol.* 2014;44:15-22.
45. Cury CA, Azoubel R, Batigalia F. Bladder drainage and glandular epithelial morphometry of the prostate in benign prostatic hyperplasia with severe symptoms. *Int. Braz J. Urol.* 2006;32:211-215.

46. Vendramini V, Sasso-Cerri E, Miraglia SM. Amifostine reduces the seminiferous epithelium damage in doxorubicin-treated prepubertal rats without improving the fertility status. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2010;8:3.
47. Hou M, Eriksson E, Svechnikov K, Jahnukainen K, Söder O, Meinhardt A, Sävendahl L. Bortezomib treatment causes long-term testicular dysfunction in young male mice. *Mol. Cancer.* 2014;20:155.
48. Martins T, Catarina CR, Sílvia L, Tiago F, Elisabete N, Eduardo R, Paula AO, Luís MA. "Murine Models of Obesity" *Obesities.* 2022;2:127-147.
49. Liza O'D, Kirsten M, Robertson, Margaret E, Jones ER, Simpson. Estrogen and Spermatogenesis, *Endocr. Rev.* 2001;22:289–318.
50. Du L, Chen W, Cheng Z, Wu S, He J, Han L, He Z, Qin W. Novel Gene Regulation in Normal and Abnormal Spermatogenesis. *Cells.* 2021;17:666.
51. Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian. J. Androl.* 2003;5:231–242.
52. Rabbani SI, Devi K, Khanam S. Pioglitazone, a PPAR-gamma ligand inhibited the nicotinamide-streptozotocin induced sperm abnormalities in type-2 diabetic Wistar rats. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2010;23:326–331.
53. Rato L, Alves MG, Dias TR. High-energy diets may induce a pre-diabetic state altering testicular glycolytic metabolic profile and male reproductive parameters. *Andrology.* 2013;1:495–504.
54. Griswold MD. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiol. Rev.* 2016;96:1-17.
55. Verderame M, Migliaccio V, Scudiero R. Role of estrogen receptors, P450 aromatase, PCNA and p53 in high-fat-induced impairment of spermatogenesis in rats. *C. R. Biol.* 2018;341:371-379.
56. HE W, Liu H, Hu L, Wang Y, Huang L, Liang A, Wang X, Zhang Q, Chen Y, Cao Y, Li S, Wang J, Lei X. Icaritin improves testicular dysfunction via enhancing proliferation and inhibiting mitochondria-dependent apoptosis pathway in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2021;9:168.
57. Moreira S, Pereira SC, Seco-Rovira V, Oliveira PF, Alves MG, Pereira ML. Pesticides and Male Fertility: A Dangerous Crosstalk. *Metabolites.* 2021;11:799.

58. Harada Y, Tanaka N, Ichikawa M, Kamijo Y, Sugiyama E, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR α -dependent cholesterol/testosterone disruption in Leydig cells mediates 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced testicular toxicity in mice. *Arch. Toxicol.* 2016;90:3061-3071.

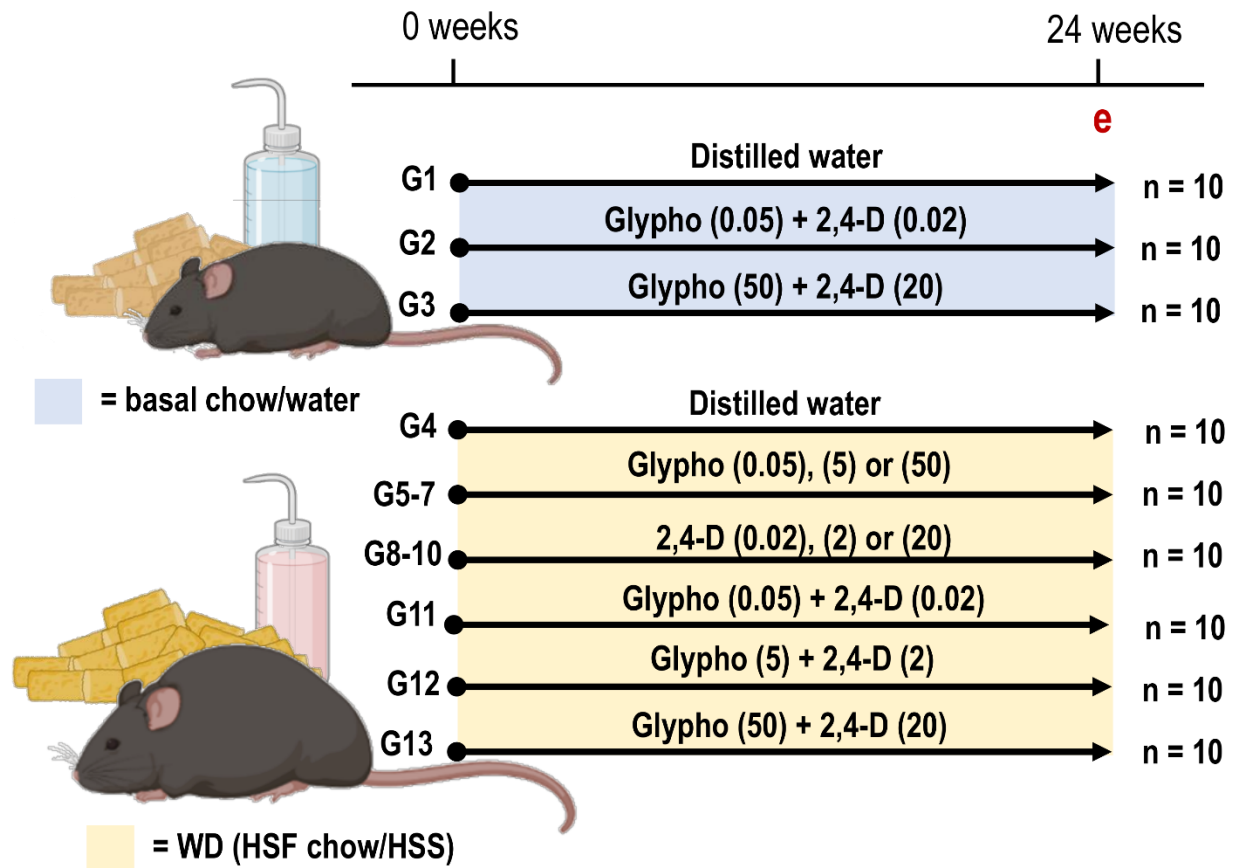


Figure 1. Experimental design. For details, see “2.1 Experimental design” section. e: euthanasia; Glypho: glyphosate; n: number of mice/groups; WD: western diet; HSF: high sugar fat; HSS: high sugar solution. The figure was composed with the aid of illustrations from the Biorender website available at <https://app.biorender.com/> (accessed on 26th September 2022).

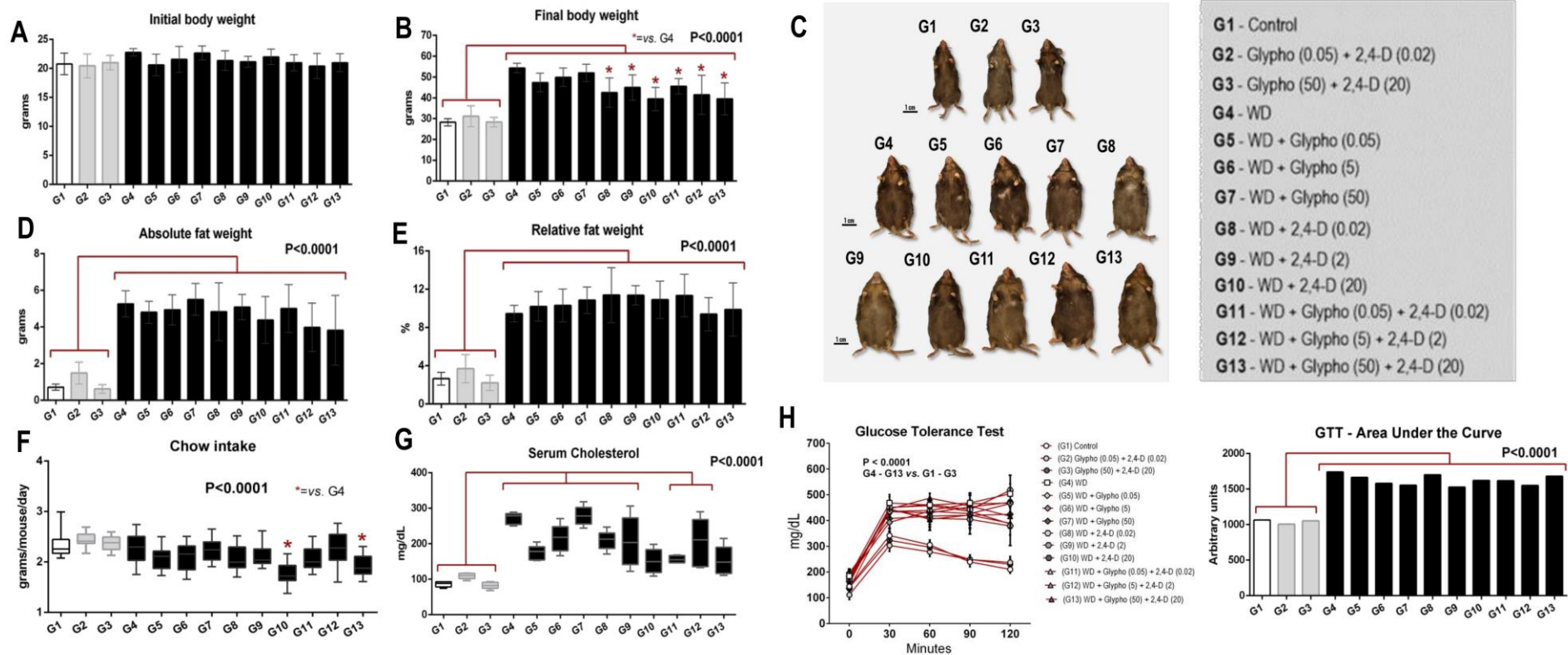


Figure 2. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on (A) initial, (B) final body weights, (C) representative body phenotype photos, (D) absolute and (E) relative total fat (epididymal, retroperitoneal, and mesenteric) weights, (F) chow intake, (G) serum cholesterol, and (H) glucose tolerance test (GTT) during western diet (WD)-induced outcomes. $n = 5$ (cholesterol) or 10 (other) mice/group. Data are presented as mean + standard deviation (parametric) or box plots (non-parametric). Data were analyzed by two-way ANOVA (GTT), one-way ANOVA or Kruskal-Wallis, and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5, or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

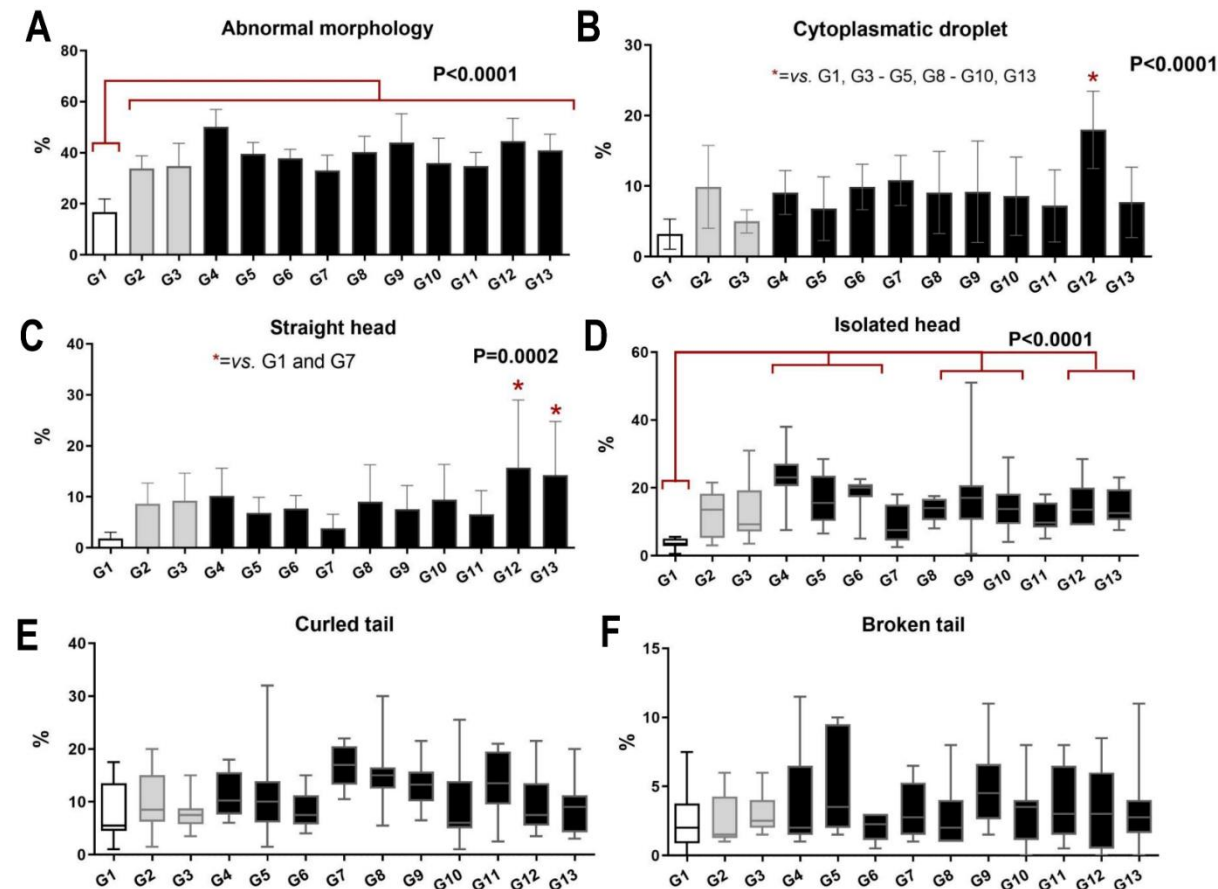


Figure 3. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on sperm morphology during western diet (WD)-induced outcomes. **(A)** Abnormal morphology, **(B)** cytoplasmic droplet, **(C)** straight or **(D)** isolated head, **(E)** curled or **(F)** broken tail. $n = 10$ mice/group. Data are presented as mean + standard deviation (parametric) or box plots (non-parametric). Data were analyzed by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5, or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

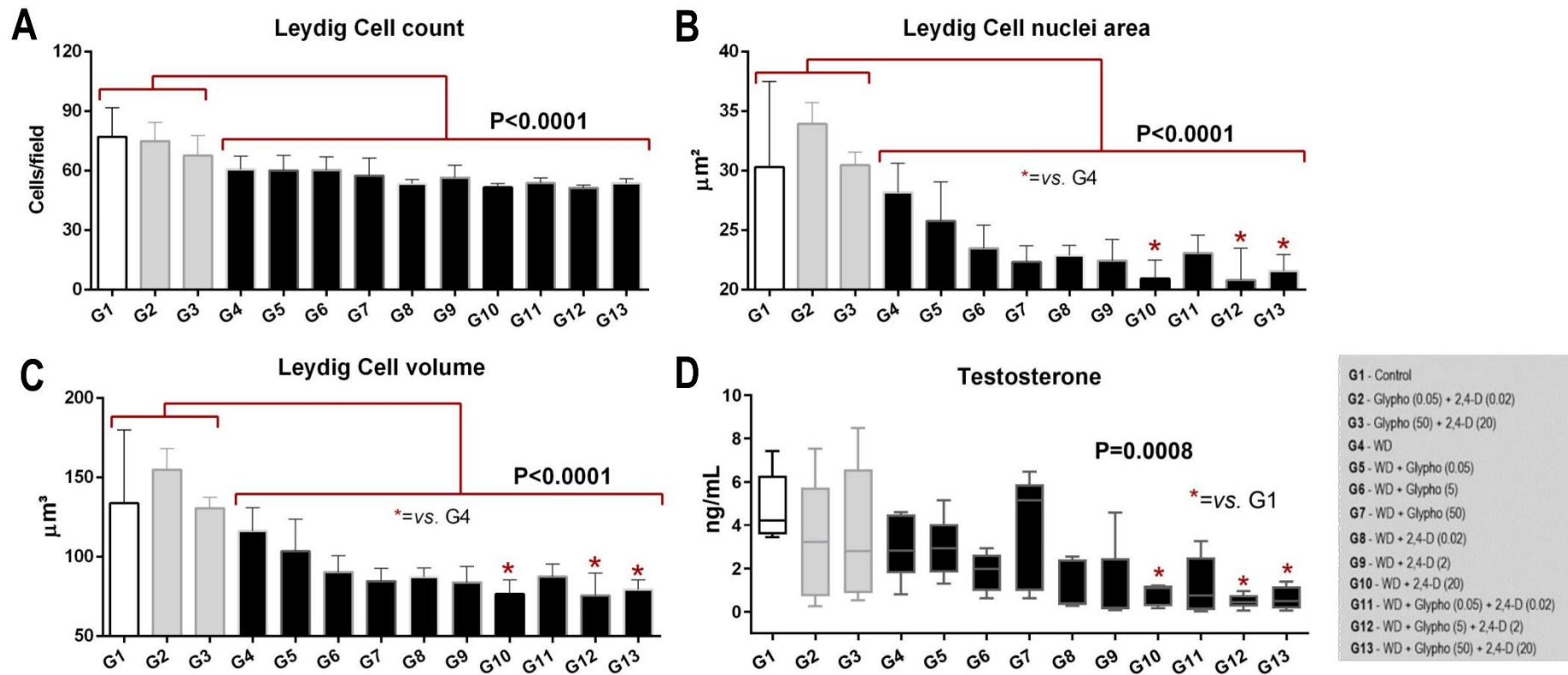


Figure 4. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on Leydig cell (A) count, (B) nuclei area and, (C) volume during, and (D) serum total testosterone levels during western diet (WD)-induced outcomes. $n = 5$ mice/group. Data are presented as mean + standard deviation (parametric) or box plots (non-parametric). Data were analyzed by one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

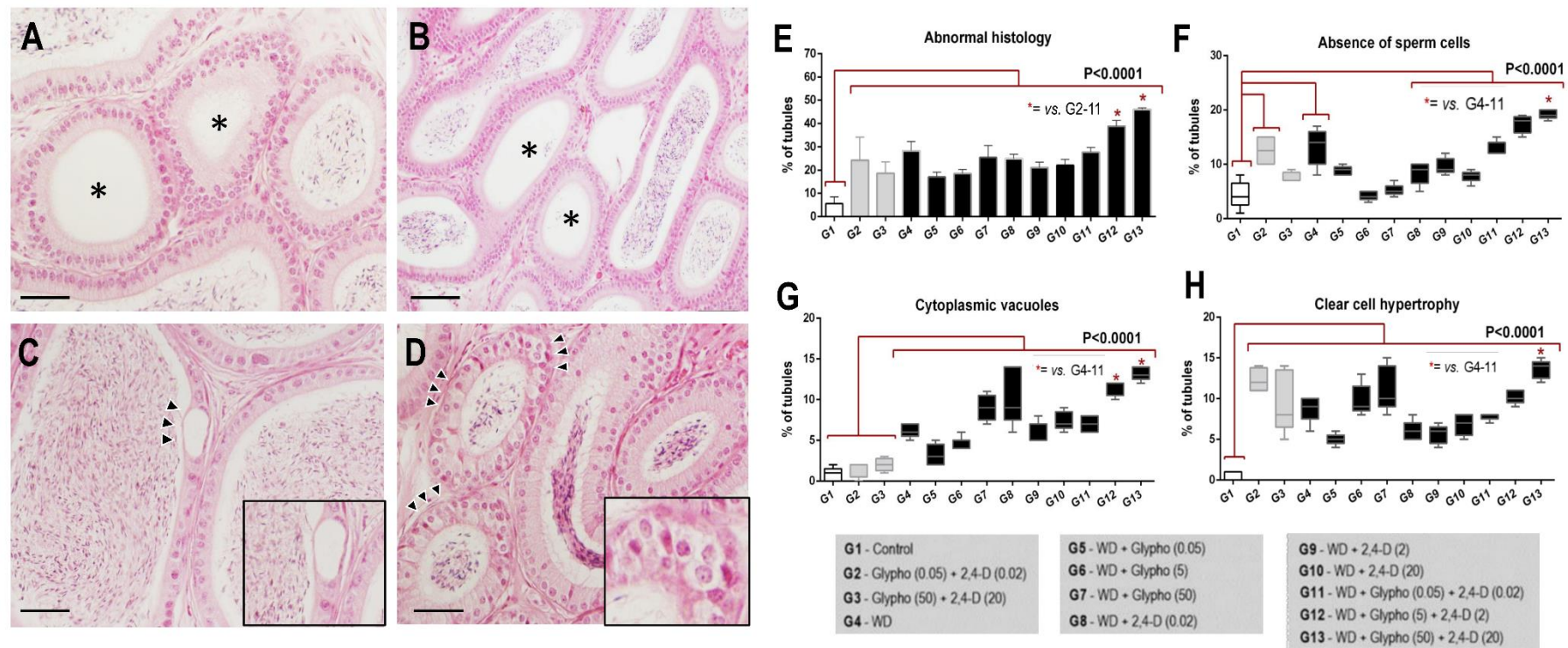


Figure 5. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on the histopathological evaluation of the epididymis during western diet (WD)-induced outcomes. Representative photomicrographs (G13) of HE-stained sections showing the absence of sperm cells on the tubules (*) of the epididymis (A) head (40× objective, scale bar: 25 μm), and (B) body (20× objective, scale bar: 50 μm). (C) Cytoplasmic vacuolization (arrowheads and detail) (40× objective, scale bar: 25 μm). (D) Clear cell hypertrophy (arrowheads and detail) (40× objective, scale bar: 25 μm). Occurrence of (E) abnormal (considering all alterations) morphology; (F) absence of sperm cells, (G) cytoplasmic vacuoles, and (H) clear cell hypertrophy. $n = 5$ mice/group. Data are presented as mean + standard deviation (parametric) or box plots (non-parametric). Data were analyzed by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

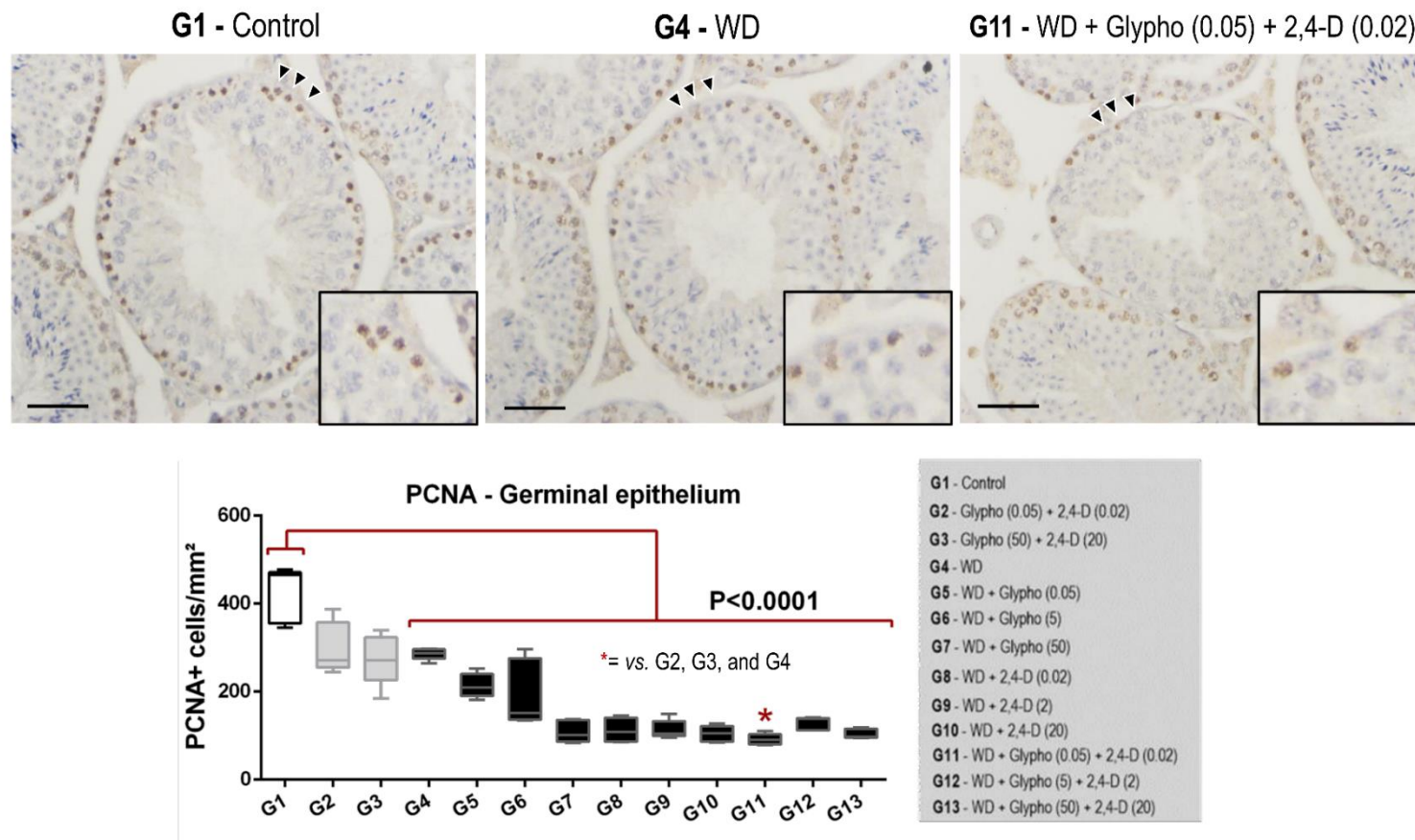


Figure 6. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on proliferating nuclear cell antigen (PCNA) immunopositivity in the germinal epithelium (spermatogonium) during western diet (WD)-induced outcomes. Representative photomicrographs of immuno-stained sections (40× objective, scale bar: 25 μm), showing that WD and WD + Glypho (0.05) + 2,4-D (0.02) group had decreased proliferation in the spermatogonium (arrowheads and details). Semiquantitative analysis. n = 5 mice/group. Data are presented as boxplots (non-parametric data). Data were analyzed by Kruskal-Wallis and *post hoc* Tukey's test (p < 0.05). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

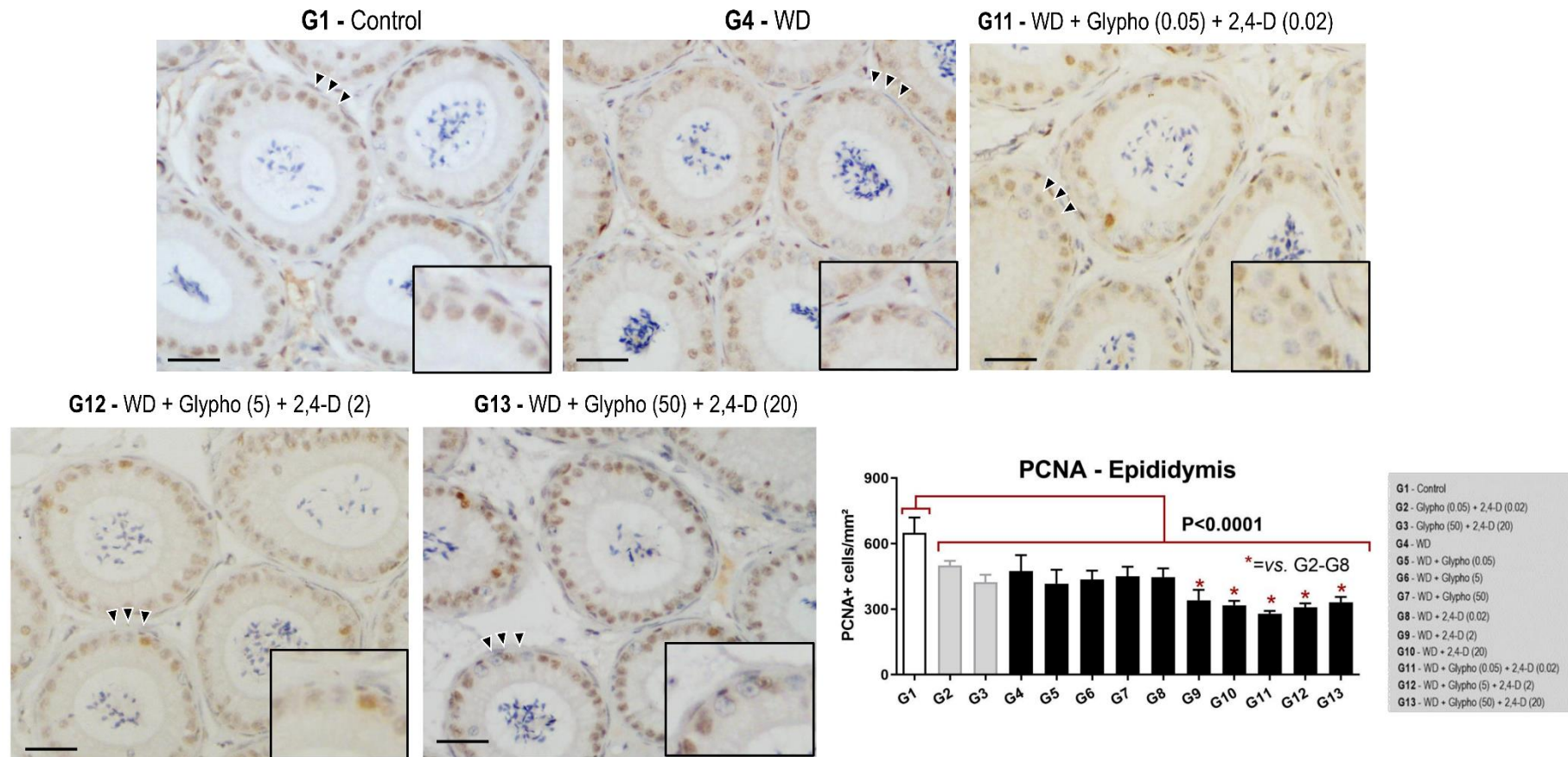


Figure 8. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on androgen receptor (AR) immunoexpression in the epididymis during western diet (WD)-induced outcomes. Representative photomicrographs of immuno-stained sections (20× objective, scale bar: 50 μm), showing that WD (G4) and WD + herbicide mixture at the higher dose (G13) group had decreased number of AR+ cells in the epididymis tail (arrowheads and details). Semiquantitative analysis. n = 5 mice/group. Data are presented as boxplots (non-parametric data). Data were analyzed by one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test (p<0.05). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

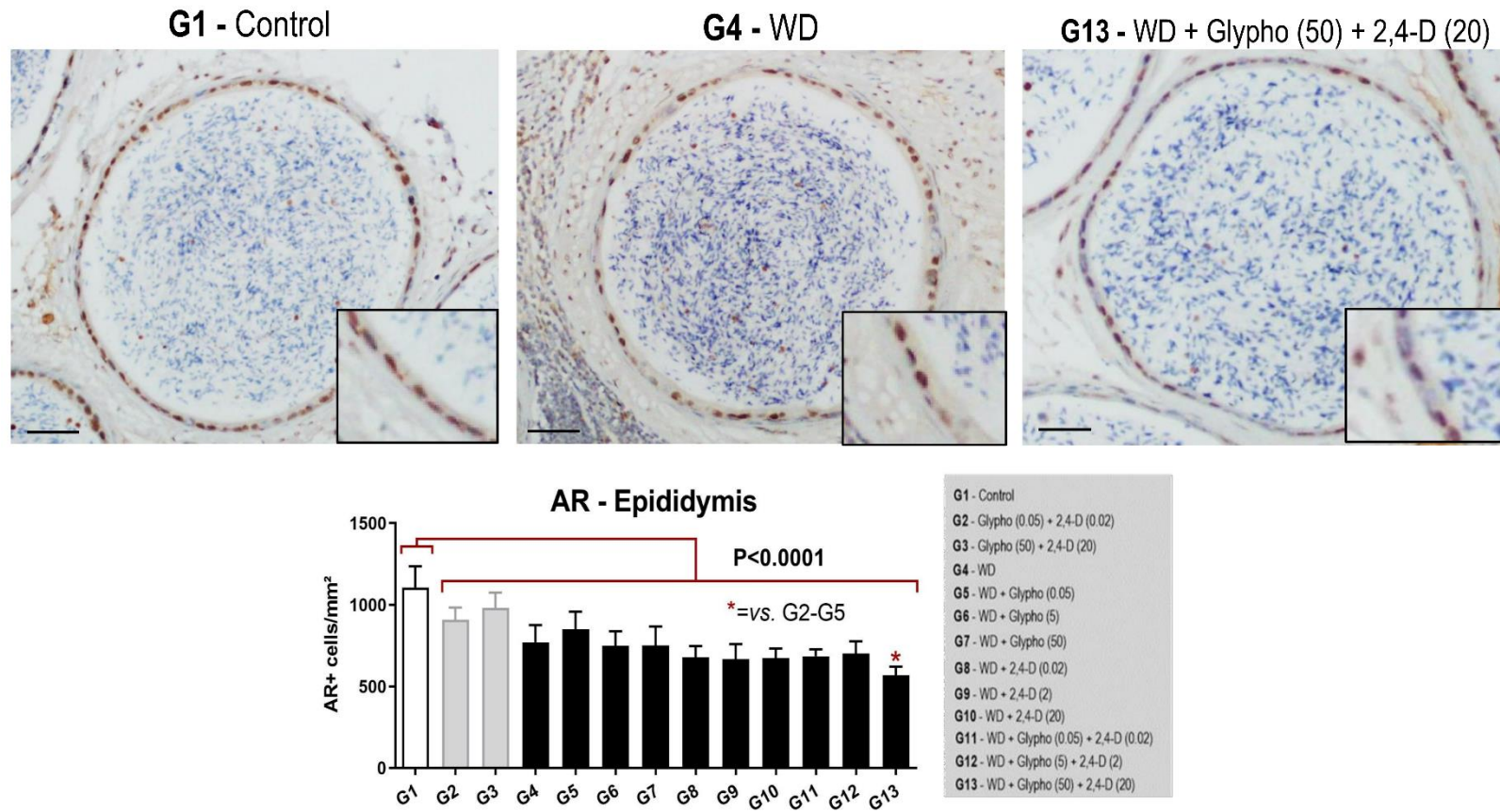


Figure 8. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on androgen receptor (AR) immunoexpression in the epididymis during western diet (WD)-induced outcomes. Representative photomicrographs of immuno-stained sections (20× objective, scale bar: 50 µm), showing that WD (G4) and WD + herbicide mixture at the higher dose (G13) group had decreased number of AR+ cells in the epididymis tail (arrowheads and details). Semiquantitative analysis. n = 5 mice/group. Data are presented as boxplots (non-parametric data). Data were analyzed by one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test (p<0.05). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. Male C57BL/6J mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50 mg/kg bw), 2,4-D (0.02, 2, and 20 mg/kg bw) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months

Supplementary data

Supplementary Table 1. Nutritional and caloric composition (100 g) of the chows.

Nutrient		Chow			
		AIN-93G		High-sugar-fat	
		Composition (g)	kcal	Composition(g)	kcal
Sugar	Corn starch	39.75	251.8	8.75	147.0
	Dextrinized starch	13.20		8.00	
	Sucrose	10.00		20.00	
Prot	Casein	20.00	80.0	20.00	80.0
	L-Cysteine	0.30		0.30	
Fat	Soy oil	7.00	63.0	3.00	298.8
	Lard	-		30.00	
	Cholesterol	-		0.20	
Cellulose		5.00	-	5.00	-
Mineral mix		3.50	-	3.50	-
Vitamins		1.00	-	1.00	-
Total		~100	394.8	~100	525.8

Supplementary Table 2. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on absolute (in g) testis, epididymis, ductus *deferens*, and seminal vesicles weights during western diet (WD)-induced outcomes.

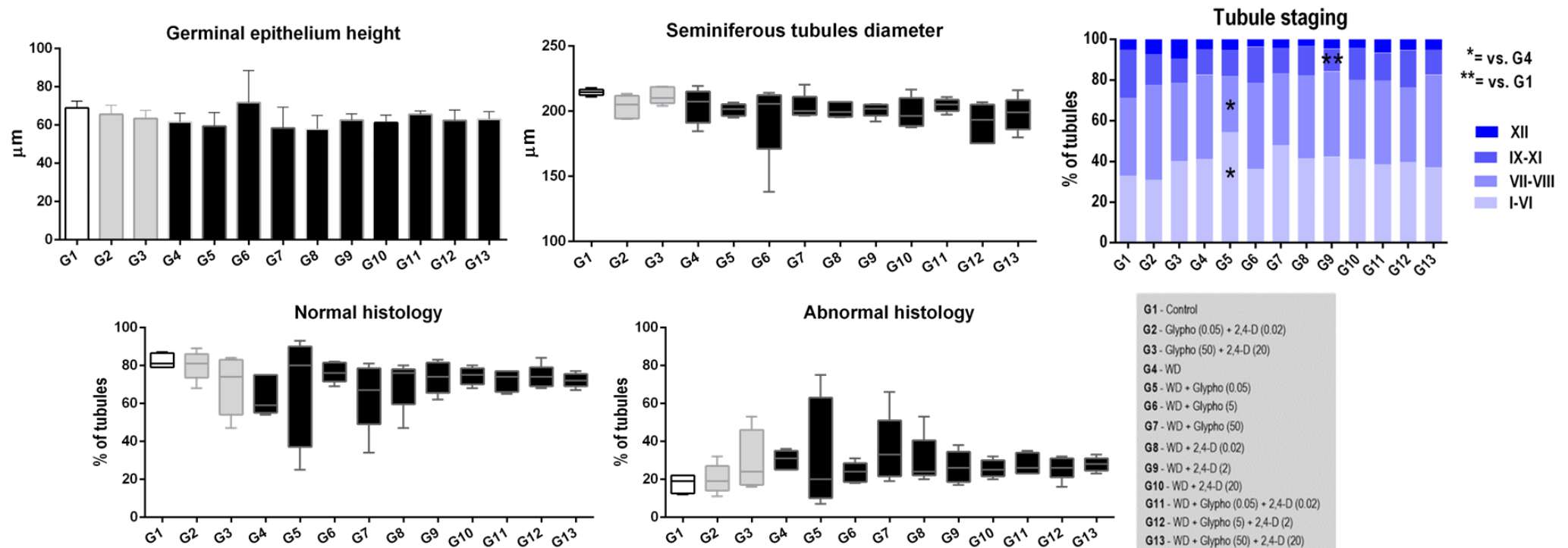
Groups/Parameters	Organs			
	Testis	Epididymis	Ductus deferens	Seminal vesicles
G1 - Control	0.093 ± 0.006	0.032 ± 0.003	0.009 ± 0.002	0.245 ± 0.034
G2 - Glypho (0,05) 2,4-D (0,02)	0.095 ± 0.005	0.033 ± 0.004	0.010 ± 0.002	0.222 ± 0.050
G3 - Glypho (50) 2,4-D (20)	0.089 ± 0.006	0.031 ± 0.003	0.009 ± 0.001	0.197 ± 0.022
G4 - WD	0.096 ± 0.006	0.034 ± 0.003	0.007 ± 0.001	0.268 ± 0.064
G5 - WD + Glypho (0,05)	0.088 ± 0.005	0.029 ± 0.004	0.006 ± 0.002	0.240 ± 0.067
G6 - WD + Glypho (5)	0.097 ± 0.005	0.037 ± 0.013	0.007 ± 0.004	0.243 ± 0.102
G7 - WD + Glypho (50)	0.095 ± 0.007	0.033 ± 0.004	0.009 ± 0.002	0.280 ± 0.045
G8 - WD + 2,4-D (0,02)	0.088 ± 0.005	0.030 ± 0.004	0.007 ± 0.002	0.278 ± 0.117
G9 - WD + 2,4-D (2)	0.094 ± 0.005	0.038 ± 0.016	0.011 ± 0.003*	0.274 ± 0.072
G10 - WD + 2,4-D (20)	0.089 ± 0.008	0.035 ± 0.004	0.011 ± 0.003*	0.249 ± 0.036
G11 - WD + Glypho (0,05) + 2,4-D (0,02)	0.096 ± 0.006	0.032 ± 0.002	0.010 ± 0.002	0.299 ± 0.067
G12 - WD + Glypho (5) + 2,4-D (2)	0.097 ± 0.001	0.036 ± 0.010	0.010 ± 0.002	0.251 ± 0.020
G13 - WD + Glypho (50) + 2,4-D (20)	0.090 ± 0.009	0.032 ± 0.004	0.009 ± 0.002	0.231 ± 0.057

n = 10 mice/group. Data are presented as mean + standard deviation. *Statistical difference compared to G4 and G5 by one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test (p<0.05). C57BL/6J male mice submitted to western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (Glypho, 0.05, 5 or 50), 2,4-D (0.02, 2, and 20) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

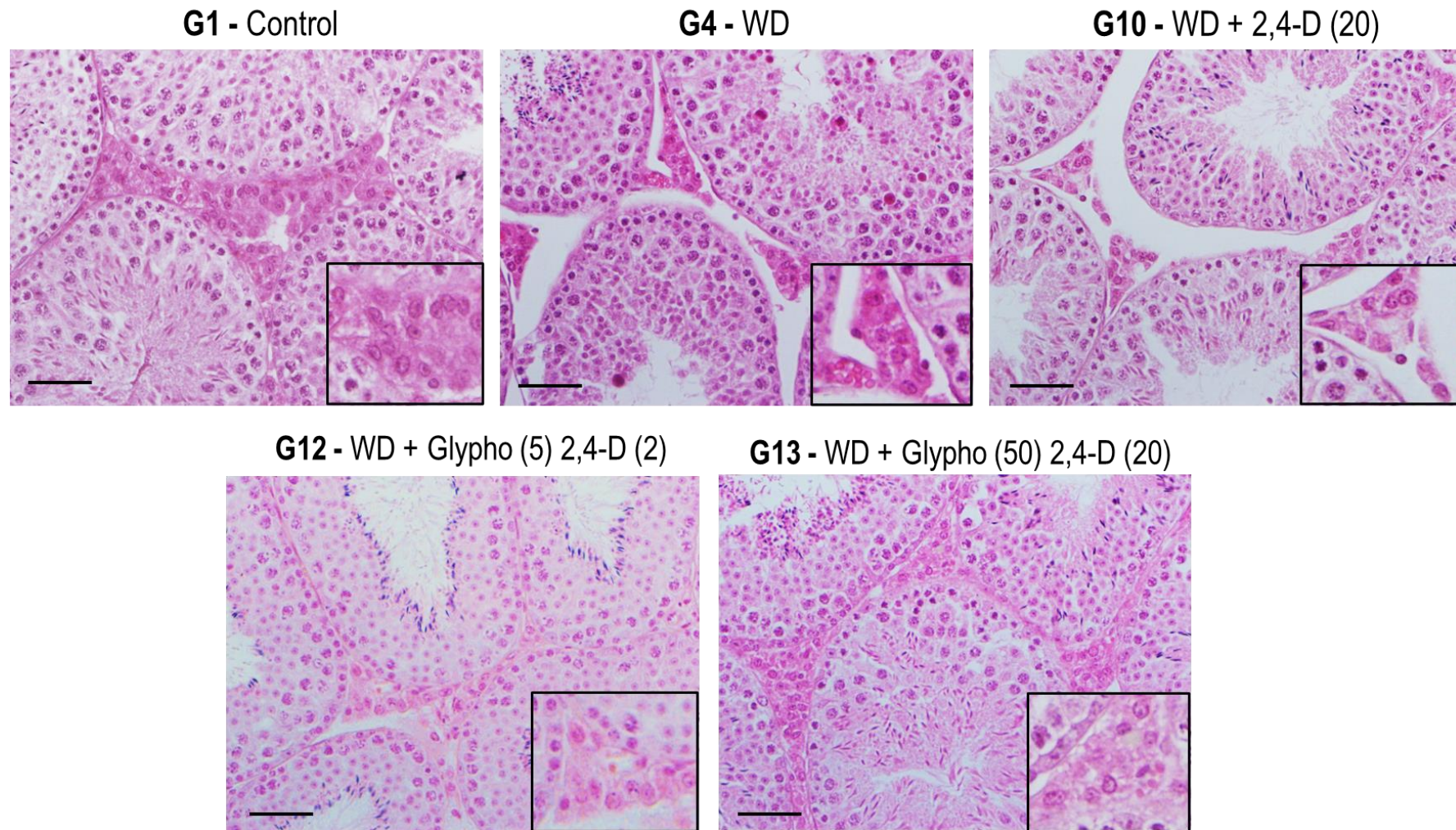
Supplementary Table 3. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on relative (in % of body weight) testis, epididymis, *ductus deferens*, and seminal vesicles weights during western diet (WD)-induced outcomes.

Groups/Parameters	Organs			
	Testis	Epididymis	<i>Ductus deferens</i>	Seminal vesicles
G1 - Control	0.335 ± 0.020	0.110 ± 0.026	0.039 ± 0.009	0.890 ± 0.123
G2 - Glypho (0,05) 2,4-D (0,02)	0.298 ± 0.036	0.108 ± 0.014	0.033 ± 0.010	0.683 ± 0.132
G3 - Glypho (50) 2,4-D (20)	0.318 ± 0.027	0.111 ± 0.014	0.033 ± 0.007	0.693 ± 0.116
G4 - WD	0.180 ± 0.015*	0.062 ± 0.009*	0.012 ± 0.004*	0.495 ± 0.126*
G5 - WD + Glypho (0,05)	0.177 ± 0.055*	0.070 ± 0.019*	0.020 ± 0.020*	0.552 ± 0.166*
G6 - WD + Glypho (5)	0.203 ± 0.032*	0.082 ± 0.034*	0.018 ± 0.014*	0.520 ± 0.228*
G7 - WD + Glypho (50)	0.199 ± 0.044*	0.063 ± 0.009*	0.020 ± 0.007*	0.542 ± 0.114*
G8 - WD + 2,4-D (0,02)	0.204 ± 0.037*	0.076 ± 0.035*	0.020 ± 0.011*	0.680 ± 0.225*
G9 - WD + 2,4-D (2)	0.208 ± 0.027*	0.081 ± 0.030*	0.025 ± 0.007*	0.578 ± 0.151*
G10 - WD + 2,4-D (20)	0.206 ± 0.066*	0.086 ± 0.015*	0.030 ± 0.009*	0.638 ± 0.097*
G11 - WD + Glypho (0,05) + 2,4-D (0,02)	0.206 ± 0.020*	0.070 ± 0.009*	0.023 ± 0.006*	0.631 ± 0.118*
G12 - WD + Glypho (5) + 2,4-D (2)	0.2480 ± 0.060*	0.093 ± 0.041*	0.022 ± 0.017*	0.566 ± 0.255*
G13 - WD + Glypho (50) + 2,4-D (20)	0.233 ± 0.040*	0.084 ± 0.019*	0.024 ± 0.009*	0.570 ± 0.119*

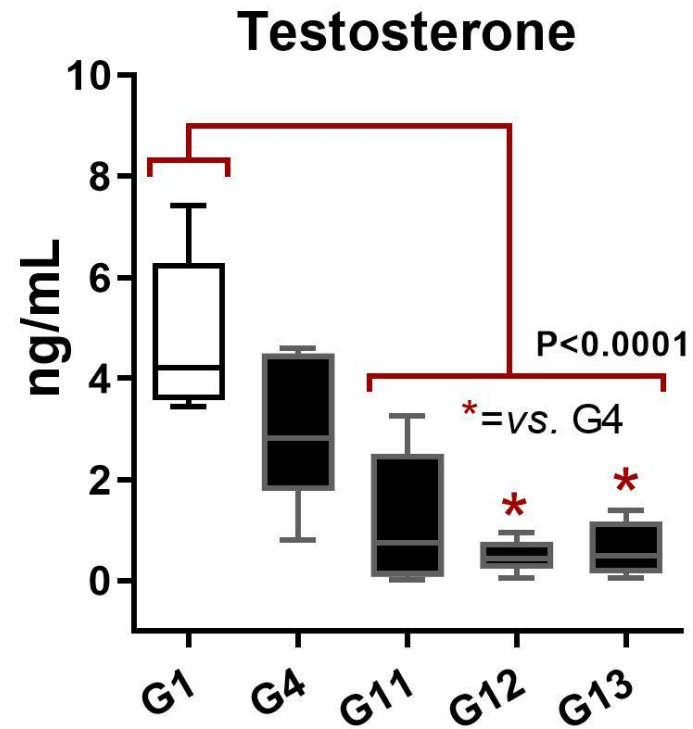
n = 10 mice/group. Data are presented as mean + standard deviation. *Statistical difference compared to G1-G3 (testis and epididymis) or only to G1 (*ductus* and vesicles) by one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test (p<0.05). C57BL/6J male mice submitted to western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (Glypho, 0.05, 5 or 50), 2,4-D (0.02, 2, and 20) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.



Supplementary Figure 1. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on testis histological parameters during western diet (WD)-induced outcomes. **(A)** Germinal epithelium height, **(B)** seminiferous tubules diameter and **(C)** staging, frequency of tubules presenting **(D)** normal or **(E)** abnormal (exfoliation of germ cells, tubular atrophy, residual bodies, and/or Sertoli cell vacuolization) morphology. $n = 5$ mice/group. Data are presented as mean + standard deviation or boxplots. Data were analyzed one way ANOVA or Kruskal-Wallis and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). The asterisks indicate statistical difference compared to (*) G4 or (**) G7. C57BL/6J male mice submitted to western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50), 2,4-D (0.02, 2, and 20) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.



Supplementary Figure 2. Representative photomicrographs of HE-stained testis sections (40× objective, scale bar: 25 μm), depicting Leydig cells in the details. C57BL/6J male mice submitted to western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50), 2,4-D (0.02, 2, and 20) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.



Supplementary Figure 3. Effects of Glyphosate and/or 2,4-D administration on serum total testosterone levels western diet (WD)-induced outcomes. $n = 5$ mice/group. Data are presented as mean + standard deviation. Data were analyzed by one-way ANOVA and *post hoc* Tukey's test ($p < 0.05$). Asterisks and/or brackets represent statistical differences among groups. C57BL/6J male mice submitted to a western diet (WD, chow with 30% lard, 20% sucrose, 0.2% cholesterol, and high sugar solution with 18.9/23.1 g/L glucose/fructose) were exposed to Glyphosate (0.05, 5 or 50), 2,4-D (0.02, 2, and 20) or Glyphosate + 2,4-D (0.05+0.02, 5+2, 50+20 mg/kg bw) for six months.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE COMITÊ DE ÉTI

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012
CERTIFICADO Nº 1344/2020 – CEUA			
Certificamos que o projeto intitulado: “Implicações do glifosato e do 2,4-D sobre a esteatohepatite não alcoólica in vico: Análise do transcriptoma e da microbiota”, conduzido pela Pesquisadora: Guilherme Ribeiro Romualdo – Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan, registrada com o nº 1344/2020, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (e xceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião extraordinária de 04 de março de 2020.			
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica		
Vigência da autorização	02/04/2022		
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo Isogênico		
Nº de animais	110		
Idade/Peso	04 semanas – 20gramas		
Sexo	Machos		
Origem	Biotério da USP		
 Sara Rosa Stanley Sampaio Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP		 Profa. Associada Bertha Furlan Polegato Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP	
Distrito Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – SP. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.18.80 – E-mail Secretaria: ceua@fmb.unesp.br			

