



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO EM MEIO AMBIENTE E
DESENVOLVIMENTO REGIONAL - PPGMADRE**

JAMILE SILVEIRA TOMIAZZI SIMÕES

**SIMULAÇÃO DE PULVERIZAÇÃO AMBIENTAL DE HERBICIDAS E SEUS
EFEITOS REPRODUTIVOS MASCULINOS EM MODELO ANIMAL**

Presidente Prudente - SP
2023



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO EM MEIO AMBIENTE E
DESENVOLVIMENTO REGIONAL - PPGMADRE**

JAMILE SILVEIRA TOMIAZZI SIMÕES

**SIMULAÇÃO DE PULVERIZAÇÃO AMBIENTAL DE HERBICIDAS E SEUS
EFEITOS REPRODUTIVOS MASCULINOS EM MODELO ANIMAL**

Tese apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional - Área de concentração: Meio Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Alves Favareto

Coorientadora: Dra. Renata Calciolari Rossi

615.907
S593s

Simões, Jamile Silveira Tomiazzi.

Simulação de pulverização ambiental de herbicidas e seus efeitos reprodutivos masculinos em modelo animal / Jamile Silveira Tomiazzi Simões. – Presidente Prudente, 2023.

108 f.: il.

Tese (Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

Orientadora: Dra. Ana Paula Alves Favareto

Coorientadora: Dra. Renata Calciolari Rossi

1. Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético. 2. Glifosato. 3. Epidídimo. 4. Exposição ambiental. 5. Reprodução masculina. I. Título.

Catálogo na Fonte: Maria Leticia Silva Vila Real – CRB 8/10699

JAMILE SILVEIRA TOMIAZZI SIMÕES

**SIMULAÇÃO DE PULVERIZAÇÃO AMBIENTAL DE HERBICIDAS E SEUS
EFEITOS REPRODUTIVOS MASCULINOS EM MODELO ANIMAL**

Tese apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional - Área de concentração: Meio Ambiente.

Presidente Prudente, 15 de agosto de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Alves Favareto
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente – SP

Banca: Prof. Dr. Sérgio Marques Costa
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente – SP

Banca: Prof^a. Dr^a. Máira Rodrigues Uliana
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE
Presidente Prudente – SP

Banca: Prof^a. Dr^a. Marciana Sanabria
Universidade Federal Mato Grosso do Sul
Mato Grosso do Sul – MS

Banca: Prof^a. Dr^a. Carla Dal Bianco Fernandez
Faculdade São Leopoldo Mandic
Araras – SP

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus por ter me dado forças para chegar até aqui. Aos meus pais, esposo e filhos que vivenciaram tudo isso ao meu lado...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido realizar mais uma etapa de minha vida, ajudando-me nos momentos difíceis, não me deixando desanimar, me mostrando que as dificuldades fazem parte do trabalho, e servem para nos dar ainda mais força e gratidão naquilo que nos propomos a realizar.

Agradeço aos meus pais, Joel e Jane e minha irmã Janaína por todo amor, confiança, dedicação e orações. Por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado, me ajudando dentro daquilo que lhes era possível.

Ao meu esposo Gabriel Simões, por todo apoio, paciência e companheirismo durante todos esses anos. Por sempre acreditar em mim e não me deixar desistir. Te amo.

Aos meus filhos em terra e no céu que me fizeram amadurecer como pessoa e me tornaram uma melhor. Vocês nasceram e viveram mesmo que por semanas durante o doutorado, e me deram ainda mais coragem de acreditar que eu seria capaz de chegar aqui.

A minha orientadora Prof.^a Dra. Ana Paula Alves Favareto, que desde o mestrado está ao meu lado, contribuindo com todo seu conhecimento, paciência e sabedoria. Esse trabalho não aconteceria se não fosse você. Você é uma parte da minha história do qual sinto muito orgulho. Você merece o mundo pela sua simplicidade e carinho.

A minha Coorientadora Prof.^a Dra. Renata Calciolari Rossi pela oportunidade e parceria com os experimentos e conhecimento durante esses anos de estudo.

Ao Prof. Dr. Danilo Roberto Pereira, pela importante contribuição com as análises computacionais e atenção oferecida para a realização deste estudo.

A professora Dra. Gisele Alborghetti Nai por toda ajuda com a parte experimental e auxílios nos laboratórios.

Aos colegas Cibely, Daniel Ângelo, Douglas Gonçalves, Gabriele Moreira, Grazielle, Jaqueline Nascimento, Laura Alencar, Viviane Rias, por toda ajuda com a parte experimental, sacrifício dos animais, coleta de materiais biológicos, análise em laboratório e toda experiência passada no decorrer do trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Citopatologia da UNOESTE, Carlos Alexandre Santana de Oliveira, Mariana Fonseca Motta Borges e Talita Rizo Pereira por toda a parte de processamento histológico.

A minha amiga Meire Aparecida Judai Barreto, que aguentou meus surtos durante todos esses anos e não me deixou desistir, me acolheu, me ouviu, contribuiu como amiga, mestre e também doutoranda. Seu apoio foi fundamental. Te amo.

A Prof^a Dra. Cristina Alves Corazza, pela possibilidade da realização do estágio em docência no curso de fonoaudiologia e todo suporte necessário na realização das atividades acadêmicas.

Ao CEREST/PP pela parceria em palestras e participação em eventos como convidada.

A CAPES pela bolsa-taxa de estudos concedida durante o período de estudos no programa.

Ao PPGMADRE por todo apoio e conhecimento adquirido. Aos professores, coordenadores, funcionários e colaboradores do programa, meu muito obrigado.

*“Não se pode criar experiência.
É preciso passar por ela (Albert Camus).”*

RESUMO

Simulação de pulverização ambiental de herbicidas e seus efeitos reprodutivos masculinos em modelo animal

Os herbicidas 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) e glifosato (N-fosfonometil-glicina) são amplamente usados na agricultura. Ambos herbicidas podem levar a toxicidade e a alterações no sistema reprodutor. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar os impactos da exposição crônica oral e inalatória aos herbicidas 2-4D e glifosato sobre a saúde reprodutiva em modelo experimental, utilizando um modelo de simulação de pulverização ambiental. O estudo foi realizado em dois experimentos: (1) exposição ao 2,4-D e (2) exposição ao glifosato. Em cada experimento, ratos da linhagem Wistar foram divididos em 8 grupos experimentais (n=10/grupo): 4 grupos de exposição inalatória (controle e 3 concentrações) e 4 grupos de exposição oral (controle e 3 concentrações). As concentrações dos herbicidas utilizados foram: 0 (grupo controle - GC), 20,69 (grupo de baixa concentração - GBC), 34,63 (grupo de média concentração - GMC) ou 51,66 ppm por dia (grupo de alta concentração - GAC). Os animais (via inalatória) ou ração (via oral) foram expostos aos herbicidas diariamente por 15 minutos, por meio de nebulização, durante 180 dias. Após o período exposição, os animais sofreram eutanásia e os órgãos reprodutivos foram coletados e pesados. Os seguintes parâmetros foram analisados: peso de órgãos, contagens, motilidade, morfologia e vitalidade espermáticas, histologia testicular e epididimária. No experimento de exposição ao 2,4-D, a porcentagem de espermatozoides com movimento progressivo e a produção diária de espermatozoides diminuíram em todos os grupos expostos ao herbicida. A contagem de espermatozoides no epidídimo foi reduzida em GMC e GAC, e o tempo de trânsito espermático atrasado em GBC. Houve impacto negativo na morfologia espermática e na integridade da membrana plasmática em GMC e GAC, respectivamente. Descamação de células germinativas no testículo e vacuolização epitelial no epidídimo foram encontradas no GAC. No experimento de exposição ao glifosato, as porcentagens de espermatozoides com movimentação progressiva e não progressiva foram reduzidas e aumentadas, respectivamente, em GAC. A integridade de membrana plasmática do espermatozóide não foi afetada pelo herbicida. No entanto, houve aumento de alterações de cabeça e cauda nos espermatozoides de GMC e GAC. A contagem de espermatozoides no testículo e a histologia testicular e epididimária foram alteradas nos três grupos expostos ao herbicida. No testículo foram encontrados túbulos seminíferos com desorganização estrutural e perda de células germinativas, células germinativas esfoliadas na luz e vacuolização intraepitelial. Já no epidídimo, foram observadas alterações pontuais, como vacuolização do epitélio, células germinativa imatura esfoliada no lumen. Assim, a exposição crônica oral aos herbicidas 2,4-D e glifosato causou danos à espermatogênese e qualidade espermática, com possíveis repercussões para a fertilidade.

Palavras-chave: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético; Glifosato; Epidídimo; Exposição ambiental; Reprodução masculina.

ABSTRACT

Simulation of environmental spraying of herbicides and its male reproductive effects in an animal model

The herbicides 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid) and glyphosate (N-phosphonomethyl-glycine) are widely used in agriculture. Both herbicides can lead to toxicity and changes in the reproductive system. Thus, the objective of the study was to evaluate the impacts of chronic oral and inhalational exposure to 2,4-D herbicides and glyphosate on reproductive health in an experimental model, using an environmental spray simulation model. The study was carried out in two experiments: (1) 2,4-D exposure and (2) glyphosate exposure. In each experiment, Wistar rats were divided into 8 experimental groups (n=10/group): 4 inhalation exposure groups (control and 3 concentrations) and 4 oral exposure groups (control and 3 concentrations). The concentrations of herbicides used were: 0 (control group - CG), 20.69 (low concentration group - LCG), 34.63 (medium concentration group - MCG) or 51.66 ppm per day (high concentration group - HCG). The animals (inhalational route) or feed (oral route) were exposed to herbicides daily for 15 minutes, by means of nebulization, for 180 days. After the exposure period, the animals were euthanized and the reproductive organs were collected and weighed. The following parameters were analyzed: organ weight, counts, motility, sperm morphology and vitality, testicular and epididymal histology. At this point, only the results referring to oral exposures will be presented. In the 2,4-D exposure experiment, the percentage of progressively moving sperm and daily sperm production decreased in all groups exposed to the herbicide. Sperm count in the epididymis was reduced in MCG and HCG, and sperm transit time delayed in LCG. There was a negative impact on sperm morphology and plasma membrane integrity in MCG and HCG, respectively. Germ cell desquamation in the testis and epithelial vacuolization in the epididymis were found in the HCG. In the glyphosate exposure experiment, the percentages of progressive and non-progressive moving sperm were reduced and increased, respectively, in HCG. Sperm plasma membrane integrity was not affected by the herbicide. However, there was an increase in head and tail changes in MCG and HCG sperm. Testicular sperm count and testicular and epididymal histology were altered in the three groups exposed to the herbicide. In the testis, seminiferous tubules with structural disorganization and loss of germ cells, exfoliated germ cells in the lumen and intraepithelial vacuolization were found. In the epididymis, specific changes were observed, such as vacuolization of the epithelium, immature germ cells exfoliated in the lumen. Thus, chronic oral exposure to 2,4-D and glyphosate herbicides caused damage to spermatogenesis and sperm quality, with possible repercussions for fertility.

Keywords: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; Glyphosate; Epididymis; Environmental Exposure; Male Reproduction.

LISTA DE SIGLAS

AM	-Aprendizado de máquinas
ANVISA	-Agência Nacional de vigilância Sanitária
CAPES	-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	-Comitê de Ética no Uso de Animais
DNA	-Ácido Desoxirribonucleico
DL50	-Dose Letal Mediana 50%
DT	-Decision Tree
EPA	- <i>Environmental Protection Agency</i>
FSH	-Hormônio Folículo Estimulante
GLIFOSATO	-N-Fosfometil-Flicina
HE	-Hematoxilina e Eosina
IA	-Inteligência Artificial
IBAMA	-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	-Instituto Nacional de Câncer
kg	-Quilograma
Km ²	-Quilômetros quadrado
LH	-Hormônio Luteinizante
mg	-Miligrama
Nm	-Nanômetro
ONU	-Organização das Nações Unidas
PDE	-Produção Diária de Espermatozoides
PROSUP	-Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares
RAM	- <i>Random Access Memory</i>
RF	- <i>Random Forest</i>
UNIPONTAL	-União dos Municípios do Pontal do Paranapanema
UNOESTE	-Universidade do Oeste Paulista
KNN	- <i>Nearest Neighbors</i>
SVC1	- <i>Support Vector Classification 1</i>
SVC2	- <i>Support Vector Classification 2</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de exposição oral e inalatória com simulação à pulverização ambiental dos herbicidas.....	20
---	----

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

Figura 1 - Municípios e assentamentos rurais do Pontal do Paranapanema.....	23
Figura 2 - Registro anual de agrotóxicos no Brasil entre os anos 2010 e 2021.....	25
Figura 3 - Classes toxicológicas com base na DL ₅₀	26
Figura 4 - Representação do modelo toxicocinético.....	29
Figura 5 - Fórmula estrutural do glifosato.....	30
Figura 6 - Fórmula estrutural do 2,4-D.....	32
Figura 7 - Anatomia do sistema genital masculino de roedores.	35

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2

Figura 1 - Motilidade espermática em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D.	47
Figura 2 - Histologia do testículo (A – E) e do epidídimo (F – H) dos animais do grupo controle e expostos ao 2,4-D.	50

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 3

Figura 1 - Motilidade espermática em ratos do grupo controle e expostos ao glifosato.....	67
Figura 2 - Análise histológica do testículo de ratos do grupo controle e expostos ao glifosato.....	72
Figura 3 - Análise histológica do epidídimo de ratos do grupo controle e expostos ao glifosato.....	73

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 4

Figura 1- Motilidade espermática em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D e glifosato.....	84
--	----

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Peso dos órgãos de ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D.....	47
Tabela 2 -	Morfologia espermática e integridade de membrana plasmática em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D.	48
Tabela 3 -	Contagem de espermatozoides no testículo e epidídimo em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D.	49

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 3

Tabela 1-	Morfologia espermática e integridade da membrana plasmática em ratos dos grupos controle e expostos ao glifosato.	69
Tabela 2-	Contagem de espermatozoides no testículo e epidídimo em ratos do grupo controle e expostos ao glifosato.	70

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 4

Tabela 1 -	Desenho experimental	80
Tabela 2-	Morfologia espermática e integridade de membrana plasmática em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D e Glifosato.	86
Tabela 3-	Contagem de espermatozoides no testículo em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D e glifosato	88
Tabela 4-	Contagem de espermatozoides no epidídimo em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D e glifosato	89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
	CAPÍTULO 1	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	Desenvolvimento Regional – Pontal do Paranapanema	22
2.2	Agrotóxicos e meio ambiente.....	23
2.3	Toxicidade dos agrotóxicos e meios de intoxicação	25
2.3.1	Intoxicação por exposição oral e inalatória	27
2.4	N-Fosfometil-Glicina (Glifosato)	29
2.4.1	Toxicidade reprodutiva do glifosato	31
2.5	Ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D)	31
2.5.1	Toxicidade reprodutiva do 2,4-D.....	33
2.6	Sistema reprodutor masculino	34
	CAPÍTULO 2	38
	CONSUMO CRÔNICO DE RAÇÃO CONTAMINADA COM HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) EM ROEDORES: EFEITOS NA SAÚDE REPRODUTIVA MASCULINA	39
3.1	INTRODUÇÃO	41
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.2.1	Agentes Químicos	42
3.2.2	Animais.....	42
3.2.3	Desenho experimental.....	42
3.2.4	Protocolo de exposição ao herbicida 2,4-D	43
3.2.5	Coleta de tecidos e órgãos	43
3.2.6	Motilidade e morfologia espermática e integridade da membrana plasmática	44
3.2.7	Produção diária de espermatozoides por testículo, número de espermatozoides e tempo de trânsito no epidídimo	44

3.2.8	Histologia do testículo e epidídimo	45
3.2.9	Análise estatística	45
3.3	RESULTADOS	46
3.4	DISCUSSÃO	51
3.5	CONCLUSÃO.....	53
3.6	CONFLITOS DE INTERESSE.....	53
3.7	FINANCIAMENTO.....	53
3.8	AGRADECIMENTOS	54
3.9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
	CAPÍTULO 3	59
	EXPOSIÇÃO ORAL CRÔNICA AO HERBICIDA GLIFOSATO EM CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES: EFEITOS SOBRE A SAÚDE REPRODUTIVA EM MODELO EXPERIMENTAL.....	60
4.1	INTRODUÇÃO	62
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.2.1	Herbicida	63
4.2.2	Animais	63
4.2.3	Desenho experimental.....	64
4.2.4	Protocolo de exposição ao herbicida Glifosato	64
4.2.5	Coleta de tecidos e órgãos	65
4.2.6	Motilidade e morfologia espermática e integridade da membrana plasmática	65
4.2.7	Cálculo da produção diária de espermatozoides por testículo	65
4.2.8	Análise histológica	66
4.2.9	Análise estatística	66
4.3	RESULTADOS	67
4.4	DISCUSSÃO	73
4.5	CONCLUSÃO.....	75

4.6	CONFLITOS DE INTERESSE	76
4.7	FINANCIAMENTO	76
4.8	AGRADECIMENTOS	76
4.9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
	CAPÍTULO 4	79
	Análise da exposição crônica inalatória aos herbicidas glifosato e 2,4-D	79
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS	79
5.1.1	Agentes químicos	79
5.1.2	Animais	79
5.1.3	Desenho experimental	80
5.1.4	Protocolo de exposição ao herbicida	81
5.1.5	Coleta de tecidos e órgãos	81
5.1.6	Motilidade e morfologia espermática e integridade da membrana plasmática	81
5.1.7	Produção diária de espermatozoides por testículo, número de espermatozoides e tempo de trânsito no epidídimo	82
5.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	82
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.4	CONCLUSÃO	90
5.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXO A – PARECER FINAL 1	107
	ANEXO B – PARECER FINAL 2	108
	ANEXO C –ACEITE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO I	109

APRESENTAÇÃO

A discente de doutorado Jamile Silveira Tomiazzi Simões possui formação em Fonoaudiologia (2014) pela Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) e Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional (2017) pela Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).

Durante o mestrado foi bolsista pela CAPES-PROSUP e desenvolveu o projeto “Avaliação auditiva e citogenética de trabalhadores rurais do Pontal do Paranapanema – SP expostos a agroquímicos e tabagismo, isolados ou em combinação”, iniciando suas pesquisas na área de toxicologia de agroquímicos.

Durante o doutorado foi taxista pela CAPES-PROSUP de Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional pela Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).

O período de doutoramento possibilitou estudos na área experimental, com manuseio e avaliações dos animais, análise dos impactos causados pelo uso de agrotóxicos a saúde reprodutiva masculina e conhecimento na área reprodutiva e toxicológica.

No decorrer do doutorado a pesquisadora atuou junto a outros pesquisadores, o que resultou em publicações científicas, participação em eventos científicos, apresentações orais e estágio em docência, com vivência em sala de aula e conhecimento acadêmico.

Todo conhecimento adquirido durante esses anos de estudo proporcionou crescimento pessoal e profissional, possibilitando a vivência interdisciplinar e a troca de conhecimentos independentemente das áreas de formação.

1 INTRODUÇÃO

O impacto negativo à saúde humana e ao meio ambiente causado pela exposição aguda e crônica aos agrotóxicos já é bem conhecido na literatura. Estima-se que nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos teve um crescimento equivalente a 93% e o crescimento do mercado brasileiro foi correspondente a 190%. Desta forma, o Brasil teve um aumento maior que o dobro em relação ao crescimento global, ficando entre os maiores consumidores de agrotóxicos do mundo desde 2008 (Montagner; Vidal; Acayaba, 2017; Pignati, *et al.*, 2017; Dutra; da Souza *et al.*, 2017).

No meio ambiente, o efeito do uso intensivo de agrotóxicos pode causar desde a degradação do solo e da água (Augusto *et al.*, 2014), até a contaminação de organismos aquáticos e terrestres (Ruiz De Arcaute *et al.*, 2012; Egler *et al.*, 2012), podendo até mesmo levar à letalidade. Na saúde humana, a exposição aos agrotóxicos pode ocorrer por meio de absorção dérmica, inalação ou por intermédio de alimentos e água contaminados, causando desde intoxicações agudas (Santana; Moura; Nogueira, 2013; de Siqueira *et al.*, 2013) até efeitos tardios como alguns tipos de cânceres (Silva *et al.*, 2019).

No Brasil, as condutas que regulamentam a produção, comercialização, fiscalização e utilização de agrotóxicos foram incorporadas em 1989 com a lei 7.802 (Brasil, 1989) e a partir do Código Internacional de Conduta para Distribuição e Uso de Agrotóxicos.

A exposição aos agrotóxicos ocorre principalmente no setor agropecuário, dentre as atividades de plantio, colheita, manuseio direto ou indireto, transporte além da contaminação por alimentos e pelo meio ambiente, o que coloca em risco os agricultores e suas famílias pela proximidade com o agrotóxico, e a população em geral devido a ingestão de alimentos ou água contaminados (Almeida *et al.*, 2022).

Entre os agrotóxicos mais utilizados em todo o mundo, podemos destacar o glifosato (N-(fosfonometil)glicina) e o 2,4-D ácido diclorofenoxiacético. O herbicida 2,4-D foi registrado para o uso em 1940. É caracterizado pela sua seletividade e utilização para controlar ervas daninhas de folhas largas em diferentes locais como em plantações, gramados, florestas e em ambientes aquáticos (Burns *et al.*, 2012). Em ambientes aeróbicos é degradado com facilidade, com cerca de 2 a 13 dias. Assim é utilizado amplamente por todo mundo principalmente em culturas de cereais, grama e vegetais (Amarante Junior, *et al.*, 2002; Burns *et al.*, 2012). Vários estudos apontam que a exposição a esse herbicida causa diversos distúrbios em animais e seres

humanos como carcinogênese, embriotoxicidade, imunotoxicidade, teratogênese, neurotoxicidade, desregulação endócrina, toxicidade renal, necrose e estresse oxidativo (Venkov, *et al.*, 2000; Charles *et al.*, 2001; Tuschl; Schwab, 2003; Marouani *et al.*, 2017).

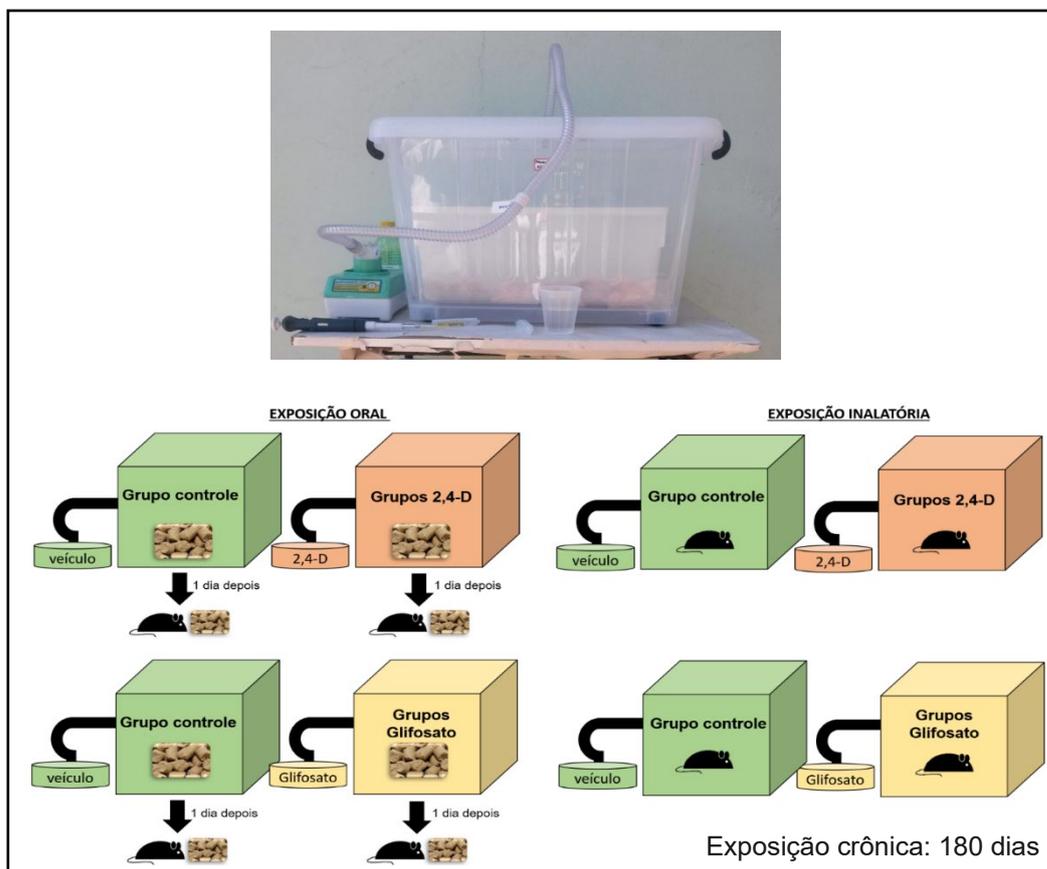
Em relação aos efeitos no sistema reprodutor masculino, um estudo realizado em Ontário no Canadá, com a análise espermática de 32 agricultores que eram diariamente expostos ao 2,4-D, foi apontado casos como oligoastenozoospermia, teratozoospermia e astenozoospermia. Em 50% das amostras de sêmen coletadas, foram encontradas quantidades acima de 20 nM de 2,4-D. Porém não se sabe ainda quais os mecanismos da possível interferência causada sobre a qualidade espermática (Arbuckle *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2016).

Já o glifosato é um herbicida pós-emergente, sistêmico, não seletivo, hidrossolúvel e de amplo espectro. Pertencente à classe química dos organofosforados, não inibidor da colinesterase. Há anos que esse herbicida está na posição de agrotóxico mais consumido no mundo, sendo constituinte de mais de 750 formulações, produtos utilizados não só em aplicações agrícolas e florestais como em urbanas e residenciais. Embora o glifosato e o ácido aminometilfosfônico (AMPA, principal metabólito do glifosato) sejam classificados na categoria de praticamente não tóxico e não irritante pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA - *US Environmental Protection Agency*), muitos estudos tem demonstrado efeitos tóxicos sobre o sistema hepático e renal, sistema neurológico, sistema reprodutivo de machos e fêmeas e sistema endócrino, assim como potenciais efeitos teratogênicos e carcinogênicos (Rocha, *et al.*, 2020).

O método de exposição por nebulização usado neste estudo (dos animais na via inalatória ou da ração na via oral – Figura 1) simula a pulverização ambiental utilizada a campo para os herbicidas, conforme Mello *et al.*, (2018) e Parizi *et al.*(2020). Além disso, as diferentes concentrações utilizadas foram adaptadas às dimensões do ambiente de exposição (caixa de exposição), a partir do uso agrônomo dos compostos em ambiente real. Desta forma, este método de exposição, que simula a pulverização ambiental, pode ser considerado mais relevante quando comparado aos estudos toxicológicos dos herbicidas encontrados na literatura até o momento. Os estudos de toxicidade geral e reprodutiva de agroquímicos geralmente utilizam a exposição oral por gavagem (alimentação forçada) em

exposições agudas ou subcrônicas e doses altas muito diferentes das exposições reais.

Figura 1 - Modelo de exposição oral e inalatória com simulação à pulverização ambiental dos herbicidas.



Fonte: Elaborado pelos autores.

A hipótese do estudo foi que a exposição crônica oral e inalatória aos herbicidas mais utilizados no mundo, glifosato e 2,4-D, causam alterações na saúde reprodutiva masculina em modelo animal, com possíveis impactos à fertilidade.

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar os impactos da exposição crônica oral e inalatória aos herbicidas 2-4D e glifosato sobre a saúde reprodutiva em modelo experimental, utilizando um modelo de simulação de pulverização ambiental.

Os objetivos específicos foram:

- Discutir o impacto ambiental dos agrotóxicos na região do Pontal do Paranapanema com suas possíveis implicações na saúde humana.

- Analisar os possíveis efeitos da exposição aos herbicidas sobre a morfologia testicular, processo de espermatogênese e possíveis repercussões sobre produção espermática;
- Avaliar a qualidade morfológica e funcional espermática dos animais dos diferentes grupos de exposição aos herbicidas e suas possíveis implicações sobre a fertilidade;
- Identificar possíveis diferenças de efeitos sobre morfofisiologia reprodutiva, de acordo com a via de exposição (inalatória e oral) e diferentes concentrações dos herbicidas e possíveis repercussões na fertilidade e saúde reprodutiva.

O presente trabalho contempla um dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU), sendo ele ODS 3 – Saúde e bem-estar: assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades.

Esta tese será apresentada em capítulos, conforme descrito a seguir:

- 1º Capítulo: Revisão de literatura;
- 2º Capítulo: Artigo - Consumo crônico de ração contaminada com herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em roedores: efeitos na saúde reprodutiva masculina
- 3º Capítulo: Artigo - Exposição oral crônica ao herbicida glifosato em concentrações ambientalmente relevantes: efeitos sobre a saúde; reprodutiva em modelo experimental.
- 4º Capítulo: Análise da exposição crônica inalatória aos herbicidas glifosato e 2,4-D.

CAPÍTULO 1

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desenvolvimento Regional – Pontal do Paranapanema

De acordo com Barone, Melazzo e Silva (2011), a região do Pontal do Paranapanema, é composta por 32 municípios (Figura 1) e está localizada no extremo Oeste do estado de São Paulo, ao norte do estado do Paraná e ao sul do rio Paranapanema, com uma área de 18.441,60 Km². A população total deste território é de 583.766 habitantes, dos quais 10,26% do total de indivíduos são os que vivem na área rural.

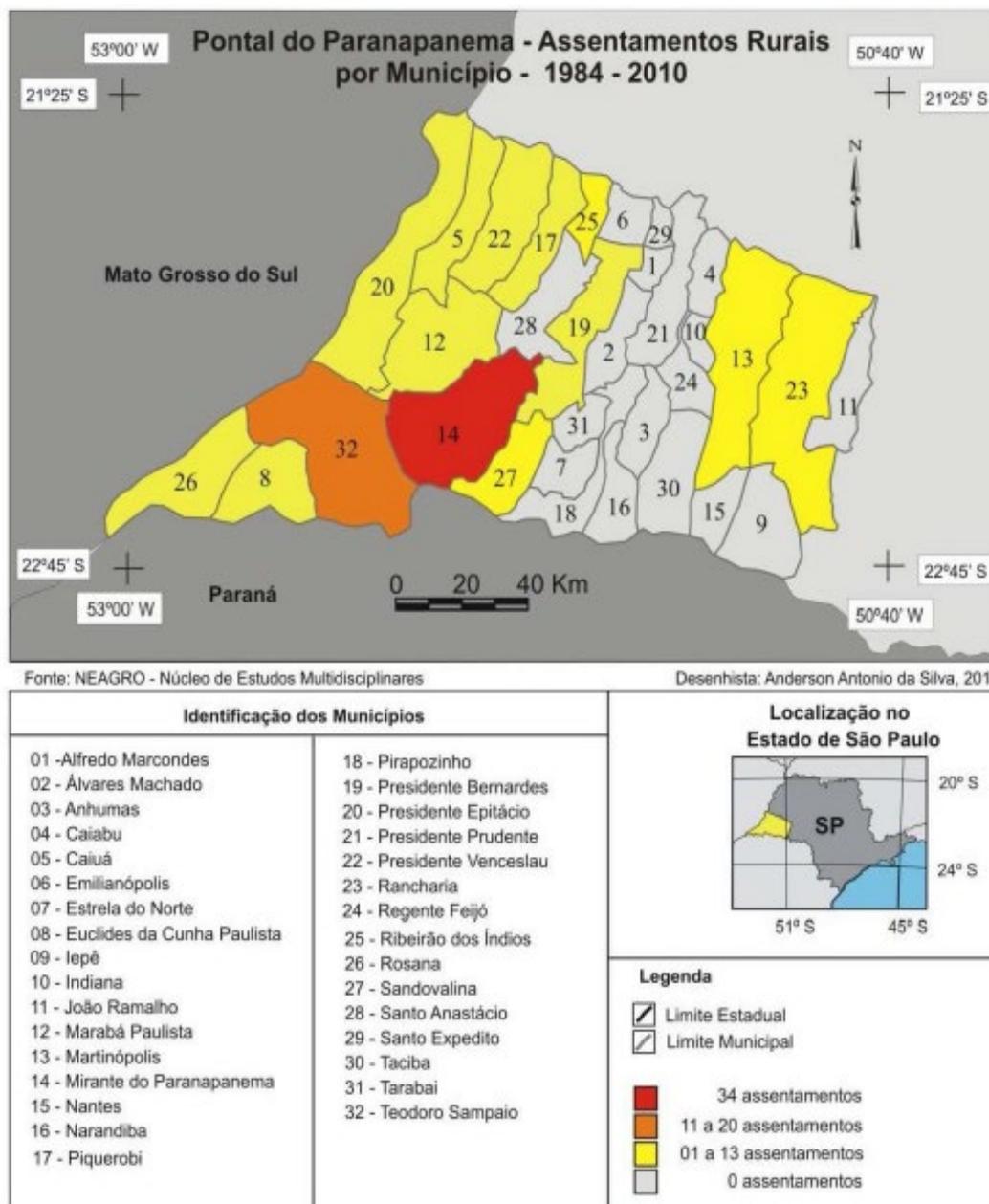
A maior concentração de assentamentos rurais do Brasil faz parte desse território, onde 14 dos 32 municípios, possuem 113 assentamentos dispersos que fazem parte da união dos municípios do Pontal do Paranapanema (UNIPONTAL). Conta com pelo menos cerca de 12.500 pequenos agricultores familiares e acima de 6 mil famílias assentadas (Verges, 2013).

Segundo Barone, Melazzo e Silva (2011):

Os assentamentos, experiências inovadoras na gestão econômica e social do território, sem dúvida, expressam tensões que são reveladoras das contradições e possibilidades da chamada agricultura familiar frente ao poder do grande capital agropecuário e agroindustrial, no âmbito do desenvolvimento social no campo paulista.

A agricultura familiar na região faz com que seja cenário de grandes atividades agrícolas, à vista disso, a região do UNIPONTAL está relacionada a ampla utilização de agrotóxicos. Cidades da região, como, Euclides da Cunha, Marabá Paulista, Mirante do Paranapanema, Rosana, Sandovalina e Teodoro Sampaio foram consideradas as predominantes de atividades agrícolas e que utilizam agrotóxicos em grande escala (Barreto, 2008), além da observação de contato direto de trabalhadores rurais com esses produtos que são potenciais de toxicidade (Petarli *et al.*, 2019).

Figura 1 - Municípios e assentamentos rurais do Pontal do Paranapanema.



Fonte: Barone, Melazzo e Silva (2011).

2.2 Agrotóxicos e meio ambiente

Os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção agrícola, agropecuária, industrial, uso doméstico, entre outros (Gerage; Meira; da Silva, 2017).

De acordo com a lei 7.802 de 1989, os agrotóxicos contêm princípios ativos, ingredientes inertes e aditivos, usados em sua fabricação, e podem ser produzidos,

exportados, importados e comercializados, mediante registro no órgão federal, seguindo as diretrizes e exigências necessárias (Brasil, 1989).

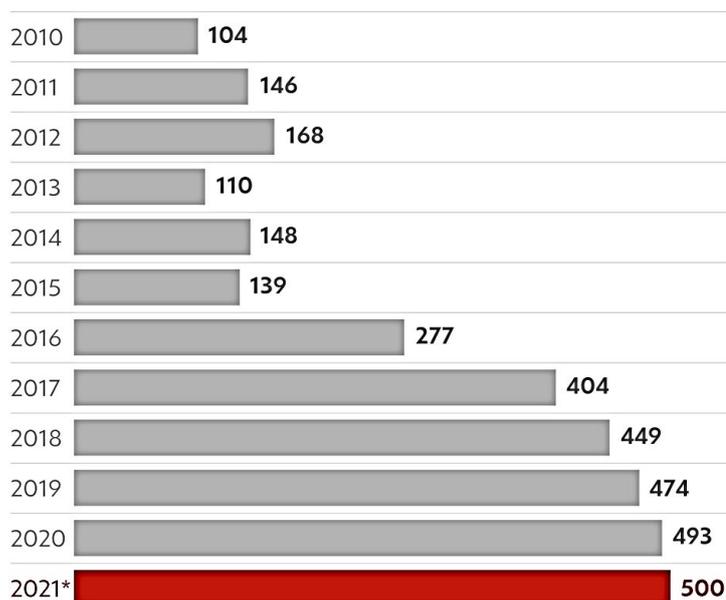
Dentre as classificações dos agrotóxicos existem quatro grupos principais e são subdivididos em piretróides, organoclorados, carbamatos e organofosforados. Os agrotóxicos atuam através de vários mecanismos. Nas diferentes classes, alguns são considerados reguladores de crescimento, no qual estimula ou retarda o crescimento da praga, já os repelentes tem a finalidade de repelir as pragas, enquanto os atrativos atraem as pragas e por fim, os quimioesterilizantes que esterilizam pragas (Abubakar *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas o uso desses compostos tem se intensificado, fazendo com que os países regulamentassem seu uso e produção (de Moraes, 2019) com o objetivo de minimizar as consequências danosas nos ecossistemas (Lazzari; Souza, 2017). No entanto, é possível encontrar no mercado inúmeros produtos sem a liberação pelos órgãos fiscalizadores, sendo de origem ilegal e/ou desconhecida (Wood *et al.*, 2012).

De acordo com o último censo agropecuário (IBGE, 2017), a comparação nos dados entre 2006 e 2017, indicam um aumento significativo no uso de agrotóxicos pelos estabelecimentos agropecuários do Brasil.

Sobre os agrotóxicos e sua relação com o uso excessivo desses compostos, pode-se afirmar que é devido “ao aumento da demanda por alimentos e, conseqüentemente, a necessidade de ampliar a produtividade das culturas levaram ao uso generalizado de agrotóxicos em todo o mundo” (Silva *et al.*, 2020, tradução nossa).

Com isso, no ano de 2021, o governo federal aprovou o registro de 500 agrotóxicos, 1,4% a mais do que em 2020. Tais aprovações vêm crescendo, significativamente, desde 2015 no Brasil (Figura 2).

Figura 2 - Registro anual de agrotóxicos no Brasil entre os anos 2010 e 2021.

Fonte: Salati (2021).

2.3 Toxicidade dos agrotóxicos e meios de intoxicação

A interação dos agrotóxicos com os organismos vivos, se lançados no meio ambiente, são capazes de causar múltiplas alterações, que levam a desequilíbrios ecológicos graves, decorrentes do tempo de exposição e/ou o grau de contaminação (Younes; Galal-Gorchev, 2000).

“A toxicidade e o modo de ação dos defensivos agrícolas nos seres vivos variam largamente, estando diretamente relacionados com sua estrutura química e concentração” (Dallegrave; Sebben, 2008).

A Dose Média Letal (DL_{50}) é o valor de referência e a forma comum de expressar a toxicidade da maioria dos agrotóxicos, por via oral. É retratado a partir de miligramas do ingrediente ativo do produto por quilograma de peso vivo, isso indica a quantidade substancial para matar 50% da população de ratos ou outros organismos teste. Melhor dizendo, a DL_{50} é usual no sentido de estabelecer padrões de seguridade a serem seguidas com o objetivo de reduzir riscos à saúde humana decorrente do produto (de Melo Aggio, 2021).

Devido a DL_{50} , existe uma classificação toxicológica dos agrotóxicos e passou recentemente por uma reclassificação, que foi publicada pela Anvisa no Diário Oficial da União, no dia 01 de agosto de 2019 (Brasil, 2019). Em consequência de novo

marco regulatório, aumentou de quatro para cinco categorias de classificação (Figura 3), no intuito de tornar mais claro tanto os critérios de avaliação, como os de classificação toxicológica de agrotóxicos no Brasil.

Figura 3 - Classes toxicológicas com base na DL₅₀.

	CATEGORIA 1	CATEGORIA 2	CATEGORIA 3	CATEGORIA 4	CATEGORIA 5	NÃO CLASSIFICADO
	EXTREMAMENTE TÓXICO	ALTAMENTE TÓXICO	MODERAMENTE TÓXICO	POUCO TÓXICO	IMPROVAVEL DE CAUSAR DANO AGUDO	NÃO CLASSIFICADO
PICTOGRAMA					Sem símbolo	Sem símbolo
PALAVRA DE ADVERTÊNCIA	PERIGO	PERIGO	PERIGO	CUIDADO	CUIDADO	Sem advertência
CLASSE DE PERIGO						
Oral	Fatal se ingerido	Fatal se ingerido	Tóxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
Dérmica	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
Inalatória	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
COR DA FAIXA	Vermelho PMS Red 199 C	Vermelho PMS Red 199 C	Amarelo PMS Yellow C	Azul PMS Blue 293 C	Azul PMS Blue 293 C	Verde PMS Green 347 C

Fonte: Brasil (2019).

Segundo a Lei nº 7.802 de 1989, a classificação toxicológica dos produtos deve ser analisada em seus rótulos, onde devem constar informações referentes à composição, classificação tóxica, efeitos à saúde humana, símbolos de perigo, instruções de uso e primeiro-socorros, precauções, dados do fabricante entre outras informações, já que muitos são os efeitos nocivos à saúde humana, associados à utilização dos agrotóxicos (Brasil, 1989).

Estudos mostram que alguns destes compostos podem ser encontrados no sangue, urina e leite materno, evidenciando a exposição e sua possível relação com o aumento de casos de câncer, doenças mentais, disfunções na reprodução, problemas de audição, entre outros (Fareed *et al.*, 2013; Mello *et al.*, 2018; Hassanin *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019; Tomiazzi *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020)

As sintomatologias decorrentes de intoxicações por agrotóxicos são diversificadas e seus meios de intoxicação podem ser por inalação, ingestão e/ou contato, no qual dependem da concentração do produto que foi absorvida pelo organismo e toxicidade do produto (Pereira; Corrêa, 2018; Peres *et al.*, 2019).

A propósito, a exposição direta ou indireta a agrotóxicos pode atingir a população geral, por meio de resíduos encontrados em alimentos e água em níveis acima do permitido pela legislação (Kim; Kabir; Jahan, 2016).

De acordo com Cunha (2011), os potenciais tipos de intoxicações podem ser subdivididas em três tipos: aguda, subaguda e crônica. A intoxicação aguda apresenta sintomas horas após a exposição; enquanto que a subaguda se manifesta de forma moderada ou baixa a produtos com uma classificação altamente tóxica. Já a intoxicação crônica caracteriza-se pelo surgimento tardio de sintomas e patologias, que pode ser de meses ou anos após a exposição.

Jallow *et al.* (2017) destaca que o uso excessivo dos agrotóxicos no ambiente rural tem levado a uma grande preocupação sobre os efeitos negativos na saúde e no meio ambiente. Além disso, destaca que existe a necessidade de se compreender a realidade vivida pelos trabalhadores, expondo os riscos do uso inadequado desses agrotóxicos.

Dentre vários estudos, foi evidenciado que o maior percentual de intoxicação por agrotóxicos são indivíduos do sexo masculino e isso está relacionado as atividades desenvolvidas que exigem um período maior de exposição, no qual há contato mais direto e concentração mais altas em relação as mulheres (de Oliveira Silva; Costa, 2018; Corcino *et al.*, 2019; Magalhães; Caldas, 2019; Neves *et al.*, 2020; Ristow *et al.*, 2020; Silvério *et al.*, 2020).

Conforme Tejerina *et al.* (2018), a exposição tem se intensificado cada vez mais, visto que o Brasil tem se tornado, nos últimos anos, o maior consumidor mundial de agrotóxicos.

2.3.1 Intoxicação por exposição oral e inalatória

Segundo Malhat *et al.* (2018), na maioria das vezes, os agrotóxicos são aplicados por grandes pulverizadores mecânicos ou manuais, conseqüentemente, durante a aplicação quantidades significativas do produto atingem, solo, vida selvagem, vegetação e água.

A presença de agrotóxicos no ambiente age como integradores de processos biogeoquímicos e a presença dessas substâncias transformam matrizes ambientais (água, ar e alimentos) em vias de contaminação, aumentando a extensão de possíveis

riscos sobre a saúde em locais muitas vezes distantes dos centros de utilização (Lima; Pignatti; Pignatti, 2020).

Assim, o consumo de água é um dos potenciais riscos de intoxicação por via oral, já que grande parte dos agrotóxicos é perdido por não atingir a praga alvo quando aplicado (Bedos; Loubet; Barriuso, 2013). Por consequência, a água da chuva leva resíduos de agrotóxicos para os recursos hídricos e para as águas de consumo causando efeitos tóxicos na saúde humana (Dores; de-Lamonica-Freire, 2001; Agrawal; Pandey; Sharma, 2010; Sankhla *et al.*, 2018; Tyagi *et al.*, 2021).

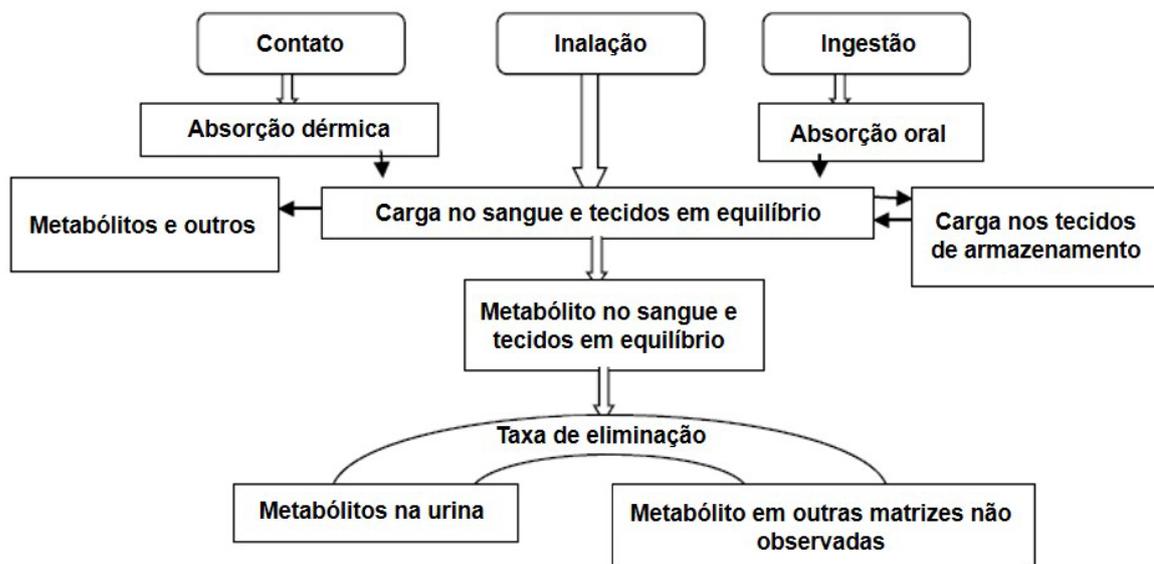
Estudos mostram que outro risco de intoxicação oral por agrotóxicos é através de resíduos que ficam nos alimentos e/ou entram na cadeia alimentar e passam a ser fonte de alimentação (Hajšlová; Zrostlikova, 2003; Hamilton *et al.*, 2004; Bajwa; Sandhu, 2014; Yigit; Velioglu, 2020).

Já a intoxicação por via inalatória é notável, principalmente no local de trabalho (Respiratory ..., 1998; Ye *et al.*, 2013) isso porque, problemas como doença pulmonar obstrutiva crônica e asma foram associados com o trabalho agrícola e a agricultura (Choma *et al.*, 1998; Tarmure *et al.*, 2020) e os agrotóxicos são considerados potenciais causadores dessas doenças por intoxicação inalatória (Sprince *et al.*, 2000; Hoppin *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2018).

A exemplo disso, dados de pesquisa pela Anvisa em 2012 apresentaram resultados insatisfatórios em 25% das amostras analisadas em diferentes cultivos (alface, abobrinha, uva e tomate), em 21% das amostras quantificou-se agrotóxicos que não são autorizados para as devidas culturas, inclusive substâncias que são proibidas no Brasil, enquanto que em 1,9% da amostragem havia resíduos além do permitido pela legislação brasileira (Brasil, 2014).

O indicativo do aumento dos efeitos deletérios por agrotóxicos na saúde humana, está relacionado a persistência no meio ambiente, toxicidade e a possibilidade de adentrar na cadeia alimentar. A toxicocinética, conforme figura 4, mostra que os agrotóxicos entram no corpo humano decorrente do contato direto com substâncias químicas através dos alimentos (em especial frutas e vegetais), água e ar contaminados (Maurya; Malik, 2016).

Figura 4 - Representação do modelo toxicocinético.



Fonte: Maurya e Malik (2016)

Dentre os efeitos associados a exposição crônica a ingredientes ativos de agrotóxicos podemos citar a infertilidade, impotência, abortos, malformações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, efeitos sobre o sistema imunológico e câncer.

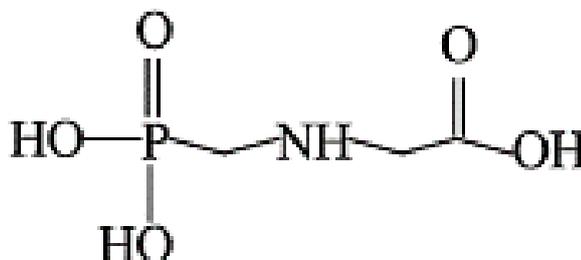
Portanto, esses tipos de intoxicações afetam principalmente os moradores e/ou trabalhadores do meio rural que estão diretamente expostos no dia-a-dia e manuseio, mas o meio urbano também sofre risco de intoxicação, devido a contaminação dos alimentos e ambiental (Palma; Lourencetti, 2011).

Outra informação importante é que dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), considerou os ingredientes ativos mais vendidos no ano de 2019 sendo: glifosato, 2,4-D, mancozebe, acefato, atrazina, entre outros (DE ASSUNÇÃO et al., 2021). Isso destaca a importância de estudo sobre potencial risco de intoxicações desses compostos que estão atualmente em alta de aplicação na agricultura.

2.4 N-Fosfometil-Glicina (Glifosato)

O N-fosfometil-glicina (glifosato) (Figura 5) é um herbicida de amplo espectro, pós-emergente e de ação não-seletiva, utilizado também em pastagens e culturas de milho, arroz e soja (Coutinho; Mazo, 2005).

Figura 5 - Fórmula estrutural do glifosato.



Fonte: TONI; SANTANA; ZAIA (2006).

Conforme Amarante Junior *et al.* (2002), o glifosato é indicado para o controle de ervas daninhas e algumas culturas que uso deste produto são, culturas de arroz irrigado, cana-de-açúcar, café, citros, maçã, milho, pastagens, soja (plantio direto ou indireto), fumo, uva e soqueira em cana-de-açúcar. É indicado, ainda, para as culturas de ameixa, banana, cacau, nectarina, pêra, pêsego, seringueira e plantio direto do algodão.

Segundo Murakami *et al.* (2017), a mistura com outros herbicidas pode reduzir a atividade do produto, ocasionando o chamado antagonismo. Para aumentar a eficiência na eliminação de ervas, pode-se utilizar glifosato misturado com outros herbicidas, tais como formulados à base de 2,4-D, terbutilazina, simazina, alaclor e diuron, por exemplo.

O glifosato costuma ser pulverizado sendo, em geral, absorvido na planta através de suas folhas, no qual é transportado por toda a planta, agindo nos vários sistemas enzimáticos, inibindo o metabolismo de aminoácidos (Amarante Junior *et al.*, 2002).

As plantas tratadas com glifosato morrem lentamente, em poucos dias ou semanas e, devido ao transporte por todo o sistema, nenhuma parte da planta sobrevive (Coutinho; Mazo, 2005).

Este herbicida livre no solo é degradado rapidamente a dióxido de carbono, pela atividade microbiana, enquanto que o glifosato adsorvido é degradado mais lentamente, ou não degradado, persistindo inativo durante anos (Arantes, 2010).

Apesar do glifosato ser considerado um produto de mediana ou baixa toxicidade (Rodríguez-Gil *et al.*, 2021), estudos têm demonstrado que o glifosato pode apresentar toxicidade, mesmo quando em baixas doses (Romano *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 2012; Abarikwu *et al.*, 2015), e efeitos deletérios no ambiente, principalmente pela resistência que algumas espécies de ervas adquire após o uso prolongado do herbicida.

2.4.1 Toxicidade reprodutiva do glifosato

Estudos demonstram que o glifosato pode desempenhar o papel de desregulador endócrino levando ao atraso na instalação da puberdade, redução significativa na espermatogênese e na esteroidogênese de ratos expostos durante a pré-puberdade, mesmo em baixa dose (5 mg/kg) (Romano *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 2012).

Segundo Dallegrave *et al.* (2007), ratos machos expostos *in utero* e durante lactação ao glifosato apresentaram aumento na percentagem de espermatozoides anormais e uma redução dose-dependente do nível sérico de testosterona durante a puberdade e uma redução da produção e reserva espermática durante a vida adulta. Além disso, os testículos dos animais demonstraram sinais de degeneração de espermátides em ambas as idades.

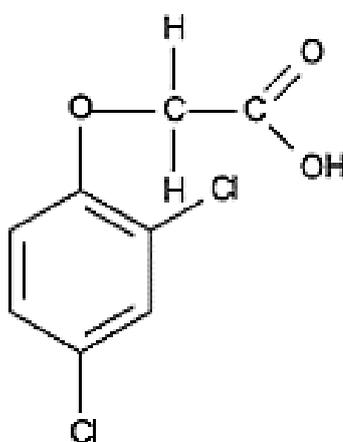
Diferentes estudos recentes, apresentaram alterações reprodutivas decorrentes da exposição ao glifosato. Essas avaliações foram baseadas em exposição aguda ou subaguda oral (gavagem ou ração preparada) em doses muito diferentes da exposição humana (Cai *et al.*, 2017; Anifandis *et al.*, 2018; Pham *et al.*, 2019; Gorga *et al.*, 2020).

Outra forma de avaliação é através da utilização de animais como modelos experimentais em estudos de exposição a agrotóxicos por vias oral e intraperitoneal (Arab *et al.*, 2018; Kaya *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2019). A via oral assemelha-se à exposição humana a alimentos e água contaminados, entretanto, a via intraperitoneal, não está relacionada à exposição humana real. As vias de exposição ocupacional são a dérmica e/ou inalatória, sendo estas ideais para a avaliação dos efeitos tóxicos em estudos experimentais, que visem correlações à exposição do trabalhador rural.

2.5 Ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D)

O herbicida 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) (Figura 6) foi registrado para o uso em 1940. É caracterizado pela sua seletividade e utilização para controlar ervas daninhas de folhas largas em diferentes locais como, em plantações, gramados, florestas e em ambientes aquáticos (Burns; Swaen, 2012). Em ambientes aeróbicos é degradado com facilidade, com cerca de 2 a 13 dias. Assim, é utilizado amplamente por todo mundo principalmente em culturas de cereais, grama e vegetais (Amarante Junior *et al.*, 2002; Burns; Swaen, 2012).

Figura 6 - Fórmula estrutural do 2,4-D.



Fonte: CAMPOS e VIEIRA (2002).

Diversos distúrbios em animais e seres humanos como carcinogênese, embriotoxicidade, imunotoxicidade, teratogênese, neurotoxicidade, desregulação endócrina, toxicidade renal, necrose e estresse oxidativo, são efeitos apontados como consequência quando exposição ao 2,4-D (Venkov *et al.*, 2000; Charles *et al.*, 2001; Tuschl, Schwab, 2003; Marouani *et al.*, 2017).

O 2,4-D apresenta classificação toxicológica como classe I (extremamente tóxico) (Mussy *et al.*, 2013). É amplamente utilizado nas culturas de arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, centeio, cevada, milho, pastagem, soja, sorgo e trigo, pode ser aplicado nas fases pré e pós-emergência de pragas infestantes, contaminando diretamente as matrizes (ar, água e solo), trabalhadores, moradores e até mesmo consumidores desses produtos (Brasil, 2019).

Para a avaliação da segurança ou do risco da exposição ao 2,4-D devem ser considerados a via de exposição e o momento da vida em que o contato com o agrotóxico ocorre (Tuschl; Schwab, 2003). Quanto a via de exposição, a mesma pode ocorrer através da respiração (via inalatória), da pele (via dérmica), da ingestão (via

oral). Além disso, as pessoas podem ser expostas em diferentes momentos da vida, intra-útero, lactação, infância, adolescência, fase adulta e senescência (Joshi *et al.*, 2012 *apud* Marouani *et al.*, 2017, p. 7).

Nos estudos de Arbuckle *et al.* (1999) e Swan *et al.* (2003); foi quantificado sinais do herbicida 2,4-D no sêmen de fazendeiros do Canadá e de homens de áreas urbanas nos Estados Unidos. Esse fato pode representar maior risco de alterações durante a fertilização e/ou dano para o feto na formação.

Os efeitos da exposição ao herbicida 2,4D a saúde pode ser dividida quanto a exposição crônica e aguda (Pignati *et al.*, 2017). A exposição aguda geralmente é considerada em uma única exposição em quantidade elevada, podendo causar efeitos que se manifestam em até 24 horas após exposição (Souza *et al.*, 2017). Em geral, essa exposição geralmente ocorre em acidentes, tentativas de suicídio e exposição através de pulverização (Monquero; Inácio; Silva, 2021). Já a exposição crônica, decorre da exposição repetida, em menores doses, podendo manifestar sintomas em semanas, meses ou anos (Murakami *et al.*, 2017).

Os efeitos a saúde por exposição ao 2,4D podem apresentar manifestações quanto a efeitos nefrotóxicos, hepatotóxicos, neurotóxicos, além disso, em ratos tem evidenciado alterações no sistema reprodutor (Charles *et al.*, 2001; Tayeb *et al.*, 2010).

2.5.1 Toxicidade reprodutiva do 2,4-D

A toxicidade sob o sistema reprodutor, decorrente da exposição ao 2,4-D, pode acometer e induzir alterações morfológicas em testículos, próstata e no processo de produção de espermatozoides, bem como a qualidade dos mesmos (Marty *et al.*, 2013).

Boulakoud *et al.* (2001), observaram a diminuição da fertilidade em ratos, em decorrência a exposição ao 2,4D nas doses de 100 ou 125mg/kg/dia. Já no estudo de Marouani *et al.* (2017), foi observado alterações na cabeça, corpo e calda dos espermatozoides, impactando diretamente na qualidade reprodutiva dos ratos machos.

Casos como oligoastenozoospermia, teratozoospermia e astenozoospermia foi detectado em Ontário no Canadá após realizar análise espermática de 32 agricultores que eram diariamente expostos ao 2,4-D. Em 50% das amostras de

sêmen coletadas, foi encontrado quantidades acima de 20 nM de 2,4-D. Porém não se sabe ainda quais os mecanismos da possível interferência causada sobre a qualidade espermática (Arbuckle *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2016).

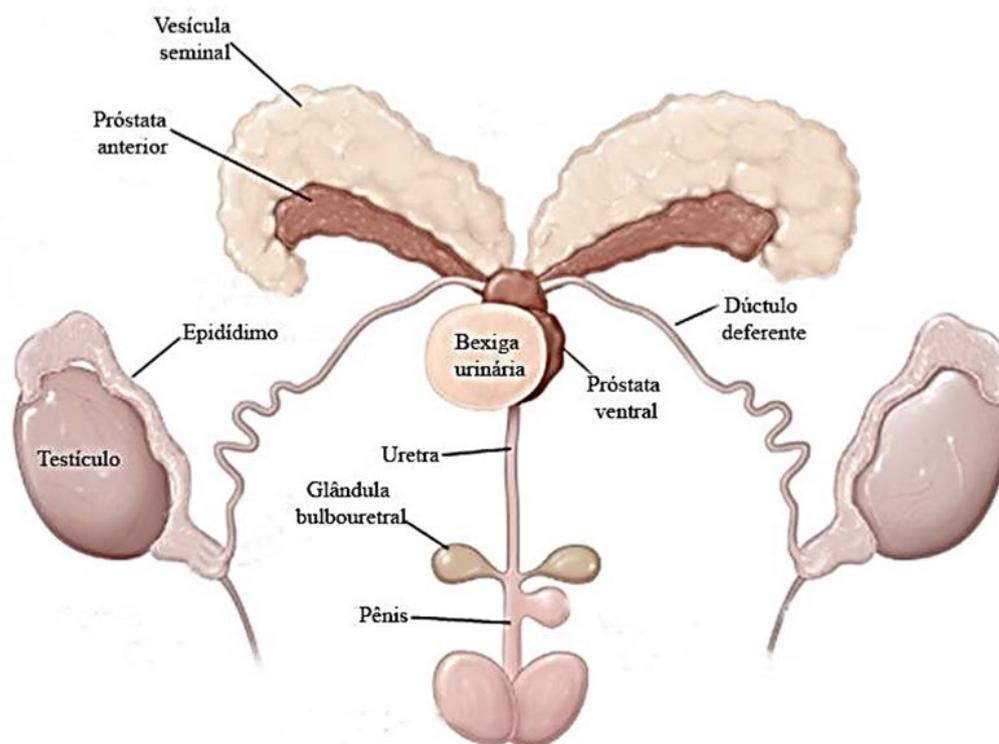
Outros efeitos de toxicidade reprodutiva que podem ser citados sobre a exposição ao 2,4-D, são anomalias na cabeça de espermatozoides de camundongos e diversas alterações testiculares em ratos, com redução da produção espermática e da motilidade (Amer; Aly, 2001; Marouani *et al.*, 2017). O 2,4-D também pode causar decréscimo do número de espermatócitos e espermátides, degeneração das células intersticiais e de espermatogônias, danos às células de Sertoli e células de Leydig (Joshi *et al.*, 2012 *apud* Marouani *et al.*, 2017, p. 7). Além disso, também têm sido relatadas alterações morfológicas no parênquima prostático e aumento nos níveis de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (Marouani *et al.*, 2017).

Apesar da importância em termos de saúde pública, os dados sobre os efeitos reprodutivos do 2,4-D são escassos. Muitos aspectos precisam ser esclarecidos para se estimar com maior precisão os riscos da contaminação humana e ambiental. Assim, torna-se extremamente relevante e necessária a investigação dos seus efeitos, especialmente em exposições crônicas e em concentrações ambientalmente relevantes.

2.6 Sistema reprodutor masculino

O sistema genital masculino dos ratos (Figura 7) é composto pelas gônadas, os testículos, pelas vias genitais intra e extratesticulares - rede testicular, ductos eferentes, epidídimo, ductos deferentes e uretra, pelas glândulas sexuais acessórias - próstata, glândula vesicular e glândula bulbouretral, e pelo órgão copulador, o pênis (Lee *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2015).

Figura 7 - Anatomia do sistema genital masculino de roedores.



Fonte: Knoblauch *et al.* (2017).

Os testículos apresentam-se envolvidos por uma cápsula grossa de tecido conjuntivo denso, denominada túnica albugínea. Esta é espessada na superfície dorsal do testículo, onde forma o mediastino, do qual partem septos, que dividem os testículos em lóbulos. Cada lóbulo é ocupado por túbulos seminíferos altamente enovelados, envolvidos por um tecido conjuntivo frouxo, o tecido intersticial (Setchell; Breed, 2006).

No testículo, o tecido intersticial e os túbulos seminíferos são responsáveis pela esteroidogênese e pela espermatogênese, respectivamente (Rodrigues; Favaretto, 1999). Os túbulos seminíferos são constituídos pelo tecido peritubular e pelo epitélio seminífero, que é composto pelas células de Sertoli e células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides, em animais adultos) (Clermont, 1972).

De acordo com Monteiro, Bicudo e Toma (2010), a célula de Sertoli tem como função:

Controle da maturação e da migração das células germinativas, estão envolvidas na síntese de proteínas e esteróides, fagocitam células germinativas em degeneração, bem como, corpos citoplasmáticos residuais

deixados por espermátides adultas quando na espermatogênese, estão envolvidas no controle da passagem das secreções entre compartimentos tubulares e intersticiais, além de formarem a barreira hemato-testicular.

A célula de Sertoli é o membro ativo que favorece a movimentação das células germinativas por intermédio das junções de oclusão, na qual, esta divide o epitélio seminífero em dois compartimentos principais: o adluminal onde estão alocadas as células germinativas mais avançadas e o basal onde estão os espermatócitos primários jovens e as espermatogônias (Junqueira; Carneiro, 2004). Além disso, a célula de Sertoli é responsável por secretar uma diversidade de fatores reguladores, como moduladores de divisão celular, proteínas, prostaglandinas, citocinas, fator de crescimento, entre outros (Tissue, 2008; Weinbauer *et al.*, 2010). Aliás, são esses fatores que coordenam o ciclo espermatogênico dos ratos.

A espermatogênese na maioria dos mamíferos chega a durar em média 40 a 60 dias (Dettin *et al.*, 2003) e em ratos dura aproximadamente, 51 a 53 dias (Weinbauer *et al.*, 2010). Diante das características funcionais e morfológicas, a espermatogênese é dividida em 3 fases: fase proliferativa e meiótica, onde ocorre a duplicação do DNA, a recombinação gênica e duas divisões reducionais que dão origem, sequentemente aos espermatócitos II e às espermátides arredondadas; por fim a fase de diferenciação em que as espermátides arredondadas passam por drásticas alterações morfológicas e funcionais, como a formação do acrossoma e do flagelo, e condensação nuclear, resultando em uma célula altamente especializada, o espermatozóide. Segundo Schillo (1997), a cabeça dos espermatozoides dos roedores é em forma de gancho. No entanto, a composição básica e a função não difere de outros mamíferos.

O epidídimo é um túbulo bastante convoluto e efetua variadas funções, incluindo armazenamento e transporte de espermatozoides, maturação, proteção do esperma e concentração (Kirchhoff, 1999; Rodríguez; Kirby; Hinton, 2002).

Na maior parte das espécies, incluindo roedores e humanos, o epidídimo conta com divisão em quatro regiões anatômicas: o segmento inicial, cabeça (*caput*), corpo (*corpus*) e cauda (*cauda*) (Cornwall, 2009). Segundo Joseph, Shur e Hess (2011), ainda segue subdivididos pelo tecido conjuntivo em segmentos intra-regionais separados.

A propósito, Costa *et al.* (2015) afirma que:

O ducto epididimário é revestido por epitélio simples colunar pseudoestratificado apresentando células principais, basais, apicais e de “halo claro”. As células principais são predominantes e apresentam características morfológicas e histoquímicas que diferem ao longo do ducto, possibilitando a caracterização de nove diferentes zonas epididimárias.

O epidídimo desempenha variadas funções, incluindo o transporte de espermatozoides provenientes do testículo, proteção, maturação, concentração e estocagem dos gametas (Cosentino; Cockett, 1986; Hermo; Robaire, 2002; Rodríguez; Kirby; Hinton, 2002).

O ducto deferente de rato é um órgão par, pertencente à genitália acessória masculina e possui forma alongada e cilíndrica. Sua principal função é conduzir os espermatozoides provenientes dos ductos seminíferos. Está localizado entre a glândula prostática (porção distal) e a cauda do epidídimo (porção proximal) (Kennedy; Heidger Jr, 1979).

CAPÍTULO 2

O presente estudo deu origem a um artigo intitulado “Chronic consumption of contaminated feed with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide in rodents: effects on male reproductive health”, submetido e aceito pelo periódico Medicina (Ribeirão Preto), ISSN 2176-7262 - Qualis A3 pela CAPES).

CONSUMO CRÔNICO DE RAÇÃO CONTAMINADA COM HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) EM ROEDORES: EFEITOS NA SAÚDE REPRODUTIVA MASCULINA

Jamile Silveira Tomizzi Simões¹, Douglas Gonçalves², Viviane Ribas Pereira¹, Gisele Alborghetti Nai³, Renata Calciolari Rossi¹, Ana Paula Alves Favareto^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

²Faculdade de Ciências, Letras e Educação - FACLEPP, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

³Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

*Autor para correspondência:

Dr. Ana Paula Alves Favareto

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

CEP. 19.067-175.

E-mail:: anafavareto@unoeste.br (A.P.A. Favareto)

Título abreviado: Efeitos da exposição oral ao 2,4-D na reprodução masculina

Resumo

Introdução: O herbicida 2,4- ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos agrotóxicos mais utilizados no mundo. Há evidências de que este herbicida pode induzir efeitos deletérios em organismos não-alvo, incluindo prejuízo na função reprodutiva. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos reprodutivos do consumo crônico de ração contaminada com 2,4-D em ratos, utilizando simulação de pulverização ambiental de alimentos. **Métodos:** Animais expostos oralmente receberam ração nebulizada com solução de 2,4-D em diferentes concentrações por 180 dias: 0 (controle - GC), 20,69 (GBC), 34,63 (GMC) ou 51,66 ppm dia⁻¹ (GAC). **Resultados:** A qualidade espermática foi prejudicada pelo 2,4-D. A porcentagem de espermatozoides com movimento progressivo, número de espermatozoides no testículo e produção diária de espermatozoides foram menores em todos os grupos expostos ao herbicida, quando comparados ao GC. A contagem de espermatozoides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foi reduzida em GMC e GAC, e o tempo de trânsito espermático atrasou no epidídimo em GBC. Houve impacto negativo na morfologia espermática e na integridade da membrana plasmática em GMC e GAC, respectivamente. Esfoliação de células germinativas no lúmen dos túbulos seminíferos e vacuolização epitelial no epidídimo foram encontradas em GAC. **Conclusão:** Este é o primeiro estudo a descrever o impacto negativo na morfofisiologia reprodutiva masculina após exposição crônica ao 2,4-D, utilizando nebulização de alimentos em concentrações ambientalmente relevantes, com base no uso agrônomico do herbicida. As lesões reprodutivas identificadas levantam preocupações sobre os impactos da ampla exposição da população ao 2,4-D.

Palavras-chave: Exposição a pesticidas, Espermatozoides, Reprodução, Exposição ambiental, Ratos.

3.1 INTRODUÇÃO

A projeção de uma população mundial de nove bilhões de pessoas até 2050 (FAO, 2006) e o desperdício global de alimentos (Parfitt *et al.* 2010) indicam perspectiva de aumento na demanda por produção agrícola. A produção de alimentos continua crescendo em vários países devido a necessidade de uma nutrição melhorada, mesmo com o cessar do crescimento populacional (FAO, 2006). Diante desse cenário, fica difícil diminuir o uso dos agrotóxicos e manter a produção e rendimento das culturas (McLaughlin; Kinzelbach, 2015).

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos herbicidas mais utilizados no mundo. É um herbicida sistêmico pré-emergente e pós-emergente que controla plantas daninhas de folha larga em lavouras de cana-de-açúcar, trigo, soja, milho, arroz, frutas e hortaliças, gramados, florestas e ambientes aquáticos (Song, 2014).

Este herbicida pode causar efeitos negativos em organismos não-alvo (Islam *et al.* 2018). Estudos de consumo crônico de ração contaminada com 2,4-D em ratos, seguindo o mesmo protocolo de exposição usado no presente estudo, mostrou cardiotoxicidade (De Oliveira Mantovani *et al.*, 2021), alterações das propriedades mecânicas da tibia (Rocha *et al.*, 2020) e estímulo da proliferação do epitélio da língua e inflamação resposta na mucosa oral (Parizi *et al.*, 2020).

A exposição ao 2,4-D pode alterar o metabolismo das células de Sertoli, alterando metabolismo da glicose e prejudica a espermatogênese em ratos (Guerrero-Bosagna *et al.*, 2013). Além disso, o herbicida pode atuar como um possível desregulador endócrino. O 2,4-D diminui os níveis de colesterol nas células de Leydig com conseqüente redução na testosterona e degeneração de células germinativas e células de Sertoli (Harada *et al.*, 2016). Embora alguns mecanismos de toxicidade reprodutiva sejam conhecidos, a maioria dos estudos foca na exposição aguda ou subaguda e doses que não mimetizam a exposição real.

O maior nível de exposição ao 2,4-D ocorre devido ao contato ocupacional por fabricação e aplicação em silvicultura e agricultura. No entanto, a população em geral também pode ser afetada pelo consumo de água e alimentos contaminados ou contato com solo e ar contendo resíduos de herbicidas (IARC, 2018). Este estudo avaliou os efeitos reprodutivos do consumo crônico de ração contaminada com 2,4-D em ratos machos. O método de exposição (nebulização de alimentos) em diferentes concentrações (adaptadas conforme prescrições agronômicas) que simulam a pulverização ambiental e são o grande destaque deste estudo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Agentes Químicos

Para exposição dos animais, foi utilizada a formulação comercial de (2,4-diclorofenoxi) ácido acético (2,4-D; Nortox S.A., Arapongas, Paraná, Brasil, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento nº 03009). A formulação foi constituída por 806 g/L (80,6% m/v) de sal dimetilamina de ácido (2,4-diclorofenoxi)acético (2,4-D); 670g/L (67,0% m/v) de ácido equivalente de 2,4-D e 424g/L (42,4% m/v) de ingredientes inertes. A formulação 2,4-D foi diluída em 10 mL de solução salina 0,9% (solução de cloreto de sódio – NaCl) nas concentrações preconizadas para cada grupo experimental.

3.2.2 Animais

Ratos Wistar machos adultos (n = 40) foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Oeste de São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil. Durante o experimento, os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno (43 cm x 30 cm x 15 cm) com maravalha de qualidade laboratorial como cama. Os ratos foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e iluminação (12L, fotoperíodo 12D). Ração para ratos (Supralab®, Alisul, Brasil) e água filtrada da torneira foram fornecidas à vontade aos animais. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UNOESTE (Protocolo nº 4868-CEUA). Também atende aos princípios de cuidados com animais de laboratório formulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2.3 Desenho experimental

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n = 10 animais por grupo):

- Grupo controle (GC): os ratos consumiram diariamente ração previamente nebulizada com soro fisiológico 0,9% (veículo);

- Grupo de baixa concentração (GBC): os ratos consumiram diariamente ração previamente nebulizada com 2,4-D na concentração de 20,69 ppm (187,17 mg m⁻³ correspondendo a $3,71 \times 10^{-3}$ g de ingrediente ativo por hectare).

- Grupo de média concentração (GMC): os ratos consumiram diariamente ração previamente nebulizada com 2,4-D na concentração de 34,63 ppm (313,31 mg m⁻³ correspondendo a $6,19 \times 10^{-3}$ g de ingrediente ativo por hectare).

- Grupo de alta concentração (GAC): os ratos consumiram diariamente ração previamente nebulizada com 2,4-D na concentração de 51,66 ppm (467,93 mg m⁻³ correspondendo a $9,28 \times 10^{-3}$ g de ingrediente ativo por hectare).

As diferentes concentrações do herbicida 2,4-D utilizadas consideram concentrações ambientalmente relevantes, de acordo com a aplicação do produto e sua prescrição agrônômica. As concentrações de 2,4-D utilizadas na agricultura (em gramas de ingrediente ativo por hectare - g.i.a) foram ajustadas às dimensões das caixas de exposição, conforme Parizi *et al.* (2020).

3.2.4 Protocolo de exposição ao herbicida 2,4-D

Duas caixas plásticas (32 x 24 x 32 cm) conectadas a um nebulizador ultrassônico (Pulmosonic Star®, Brasil) foram utilizadas para exposição, segundo Mello *et al.* (2018). A ração foi exposta nas caixas conectadas ao nebulizador, por 15 minutos (tempo necessário para que toda a solução (10 mL) fosse nebulizada) à solução 2,4-D na concentração de cada grupo experimental.

A exposição ocorreu um dia antes da ração ser oferecida aos animais e a ração foi trocada a cada dois dias. A ração residual foi pesada a cada troca para avaliar a quantidade ingerida. Os animais foram expostos por um período de 180 dias.

3.2.5 Coleta de tecidos e órgãos

Ao final do período de exposição, os ratos de cada grupo experimental foram anestesiados e eutanasiados pela administração de 100mg⁻¹kg pc de tiopental sódico (ip., Syntec, EUA). O testículo direito, epidídimo e ducto deferente, próstata ventral, vesícula seminal (sem a glândula coagulante e cheia de secreção), foram removidos e seus pesos determinados.

3.2.6 Motilidade e morfologia espermática e integridade da membrana plasmática

Imediatamente após a eutanásia, o ducto deferente esquerdo foi coletado para obtenção dos espermatozoides em 1,0mL de solução salina tamponada com fosfato a 34°C. A câmara de contagem de Neubauer aquecida foi carregada com uma pequena alíquota de solução espermática. A avaliação da motilidade espermática foi realizada por estimativa visual (200 espermatozoides por animal, em duplicata) sob um microscópio (Leica DMLS) com aumento de 200X. Os espermatozoides foram classificados em imóveis, móveis sem progressão e móveis com progressão, segundo Perobelli *et al.* (2012).

O ducto deferente direito foi coletado para obtenção de espermatozoides que foram fixados em 1,0mL de formol salina. A análise da morfologia espermática foi realizada ao microscópio (ampliação de 400x) (Seed *et al.*, 1996). Os espermatozoides foram classificados de acordo com Filler (1993).

A vitalidade espermática (integridade da membrana plasmática) foi avaliada usando o teste de coloração de eosina-nigrosina (OMS 1999). Duzentos espermatozoides foram contados em microscópio de luz (ampliação de 1000x), e classificados em não corados (espermatozoides vivos) e corados em vermelho (espermatozoides mortos).

3.2.7 Produção diária de espermatozoides por testículo, número de espermatozoides e tempo de trânsito no epidídimo

Os testículos direitos foram descapsulados e os segmentos cabeça/corpo e cauda do epidídimo direito foram separados. Os tecidos foram congelados até a contagem de espermatozoides. As espermátides no estágio 19 da espermiogênese e os espermatozoides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram contados conforme descrito anteriormente por Robb *et al.* (1978), com adaptações de Fernandes *et al.* (2007). O número de espermátides no estágio 19 foi dividido por 6,1 (que é o número de dias do ciclo seminífero em que essas espermátides estão presentes no epitélio seminífero) para calcular a produção diária de espermatozoides (PDE). O tempo de trânsito dos espermatozoides pelos segmentos do epidídimo foi determinado pela divisão do número de espermatozoides em cada segmento pela PDE (Robb *et al.*, 1978).

3.2.8 Histologia do testículo e epidídimo

O testículo esquerdo e epidídimo (n = 10 por grupo) foram coletados e fixados em formalina tamponada (10%) por 24 horas. Após esse período, o testículo e o epidídimo foram seccionados ao longo de seus eixos transversal e longitudinal, respectivamente, e devolvidos à formalina tamponada por mais 24 horas. As peças foram embebidas em parafina e seccionadas a 5µm. Os cortes de tecidos utilizados para avaliação histológica foram corados com hematoxilina e eosina (HE), examinados e fotografados por microscopia de luz.

A organização da citoarquitetura do tecido intersticial e epitélio seminífero e a ocorrência de alterações como presença de vacuolização intraepitelial, células acidófilas com núcleo picnótico, células germinativas multinucleadas, descamação de células germinativas, perda de células germinativas, atrofia tubular e parada da espermatogênese foram examinadas. No epidídimo, foi investigada a presença de alteração cribriforme no epitélio, vacuolização epitelial, infiltrados inflamatórios no tecido intersticial, quantidade e aspecto dos espermatozoides no lúmen (Kempinas; Klinefelter, 2014).

3.2.9 Análise estatística

Para comparação dos parâmetros foram realizados ANOVA com teste de Tukey a posteriori ou teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com teste de Dunn a posteriori. Um teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar as distribuições normais antes das análises estatísticas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.3 RESULTADOS

Os pesos do testículo, epidídimo, ducto deferente, próstata ventral e vesícula seminal foram semelhantes entre os grupos experimentais (Tabela 1).

A porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva foi reduzida ($p < 0,05$) nos grupos das três concentrações do herbicida em relação ao GC (Figura 1A). Além disso, a porcentagem de espermatozoides imóveis foi aumentada ($p < 0,05$) no GAC em relação ao GC (Figura 1C). No entanto, a porcentagem de espermatozoides sem progressão do movimento foi semelhante entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (Figura 1B).

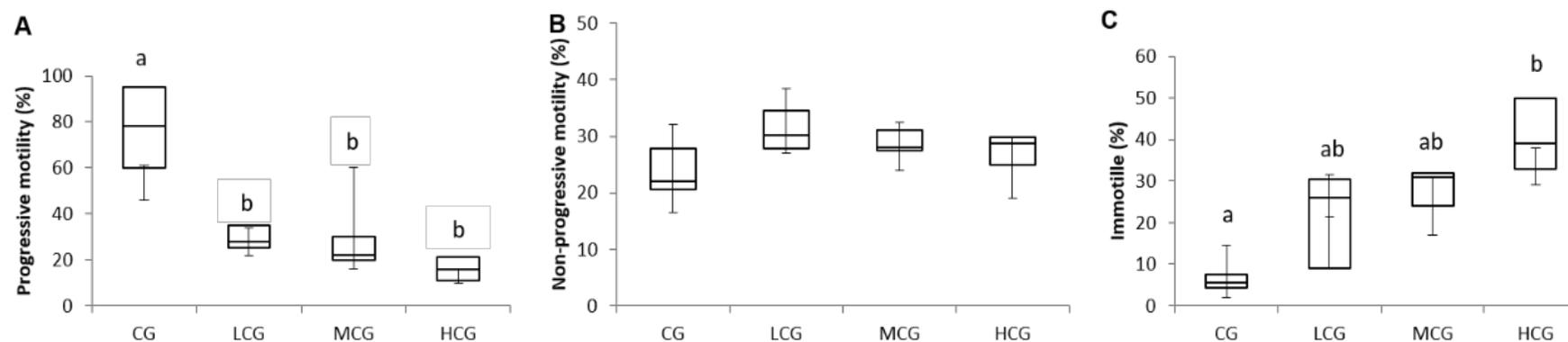
Houve redução significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais, com consequente aumento de anormalidades do flagelo no GMC, quando comparado ao GC (Tabela 2). Além disso, as anormalidades morfológicas da cabeça do espermatozóide foram maiores no GMC em relação ao GC. A integridade da membrana plasmática estava diminuída no GAC em comparação ao GC (Tabela 2).

Os números absoluto e relativo de espermatozoides no testículo e PDE absoluta e relativa foram reduzidas ($p < 0,05$) em todos os grupos expostos ao herbicida, quando comparados ao GC. (Tabela 3). Os números absolutos e relativos de espermatozoides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram reduzidos ($p < 0,05$) no GMC e GAC quando comparados ao GC e GBC após exposição oral (Tabela 3). Além disso, houve um atraso significativo ($p < 0,05$) no tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo e cauda do epidídimo no GBC em comparação ao GC (Tabela 3).

Tabela 1 - Peso dos órgãos de ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D

Parâmetro	GC	GBC	GMC	GAC
Testículo (g)	1.67±0,09	1.65±0,12	1.60±0,06	1.63±0,09
Epidídimo (mg)	702.70±26,99	676.70±60,57	699.10±106,83	730.66±93,72
Vaso deferente (mg)	145.10±11,94	157.70±17,48	158.90±23,33	159.37±20,41
Próstata ventral (mg)	647.90±107,63	622.70±169,07	561.80±172,62	578.00±149,15
Vesícula seminal cheia (g)	1.43±0,26	1.24±0,36	1.12±0,33	1.37±0,24
Vesícula seminal vazia (mg)	692.70±109,35	655.10±172,40	611.30±104,33	767.00±122,02

Valores expressos em média DP. ANOVA com teste de Tukey a posteriori ($p > 0,05$). GC= Grupo Controle. GBC= Grupo Baixa Concentração. GMC= Grupo Média Concentração. GAC= Grupo Alta Concentração. Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 1 - Motilidade espermática em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D.

A) móvel com movimento progressivo. B) móvel sem progressão. C) imóvel. Valores expressos em mediana (Q1 – Q3). Teste de Kruskal-Wallis, com teste de Dunn a posteriori. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). GC = Grupo controle. GBC = Grupo de baixa concentração. GMC = Grupo de média concentração. GAC = Grupo de alta concentração. Fonte: Elaborado pelos autores.

Tabela 2 - Morfologia espermática e integridade de membrana plasmática em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D.

Parâmetro	GC	GBC	GMC	GAC
Espermatozoides normais (%)	96,25 (95,25-97,50)a	94,50 (93,50-97,00)a	88,50 (86,25-89,25)b	92,75 (91,50-96,25)ab
Anormalidades morfológicas de cabeça do espermatozoides (%)	4,03 (1,00-11,00)a	5,03 (1,00-14,00)a	5,73 (1,00-17,00)ab	8,96 (2,00-19,00)b
Anormalidades morfológicas de cauda de espermatozoides (%)	2,25 (1,5-3,5)a	2,50 (2,00-4,00)ab	6,00 (3,50-8,50)b	3,75 (3,37-4,12)ab
Integridade de membrana plasmática (%)	94,70 (92,00-98,00)a	92,70 (90,50-94,50)a	89,45 (86,50-91,50)b	89,00 (86,50-93,00)b

Valores expressos em mediana (Q1 – Q3). Kruskal-Wallis com test *a posteriori* Dunn. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). GC= Grupo Controle. GBC= Grupo Baixa Concentração. GMC= Grupo Média Concentração. GAC= Grupo Alta Concentração. Fonte: Elaborado pelos autores.

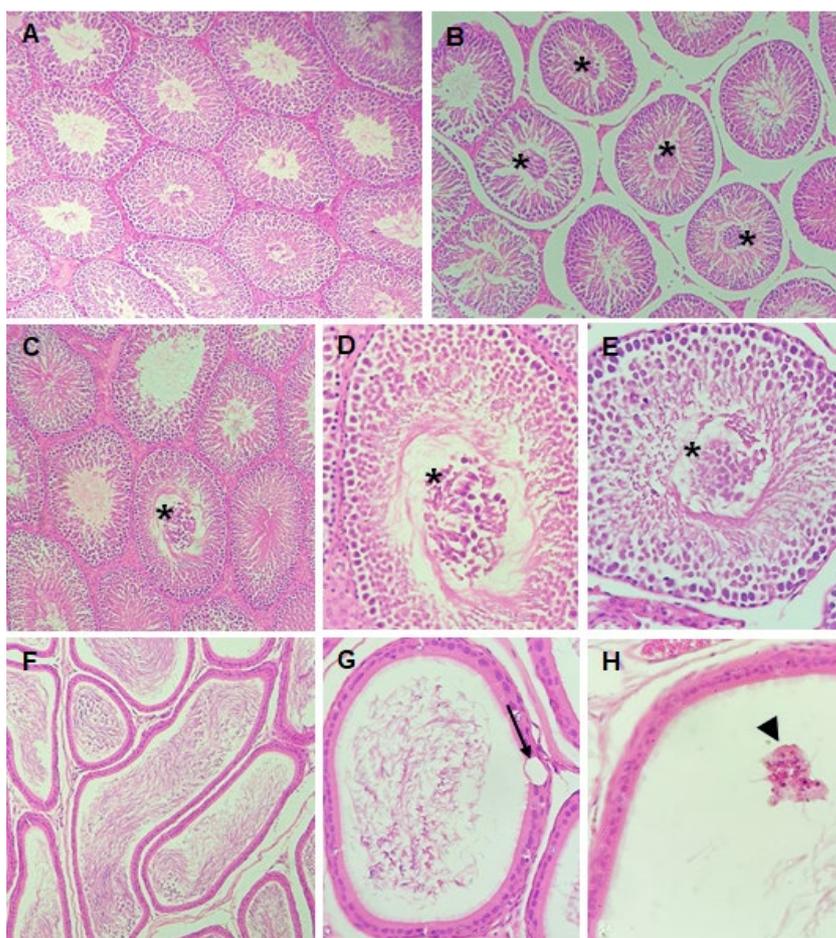
Tabela 3 - Contagem de espermatozoides no testículo e epidídimo em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D.

Parâmetro	GC	GBC	GMC	GAC
Testículo				
Número de espermatozoides (x10 ⁶ /g)	206,89±24,68a	150,82±15,56b	143,86±20,32b	146,53±9,89b
Número de espermatozoides por grama de órgão (x10 ⁶ /g)	138,94±13,92a	110,84±10,65b	103,10±16,13b	104,30±8,59b
Produção diária de espermatozóide (x10 ⁶ /testículo/dia)	33,91±4,04a	24,33±2,89b	23,57±3,33b	24,05±1,59b
Produção diária relativa de espermatozoides (x10 ⁶ /g/dia)	22,78±2,27a	17,73±1,97b	17,10±2,56b	17,12±1,46b
Cabeça/corpo do epidídimo				
Número de espermatozoides (x10 ⁶)	133,96±12,28a	139,94±9,42a	96,56±12,63b	96,33±11,98b
Número de espermatozoides por grama de órgão (x10 ⁶ /g)	365,33±23,17a	365,32±19,95a	295,85±19,14b	287,08±16,7b
Tempo de trânsito (dias)	3,96±0,76a	5,85±0,67b	4,17±0,8a	4,07±0,58a
Cauda epidídimo				
Número de espermatozoides (x10 ⁶)	227,33±27,22a	213,01±30,50a	177,86±14,92b	174,97±22,22b
Número de espermatozoides por grama de órgão (x10 ⁶ /g)	934,00±41,82a	915,33±45,13a	756,66±31,30b	756,00±24,42b
Tempo de trânsito (dias)	6,78±1,15a	8,75±1,16b	7,82±1,18ab	7,25±1,15a

Valores expressos em média ± Desvio Padrão (DP). ANOVA com *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05). GC= Grupo Controle. GBC= Grupo Baixa Concentração. GMC= Grupo Média Concentração. GAC= Grupo Alta Concentração. Fonte: Elaborado pelos autores.

Na análise histológica do testículo, os túbulos seminíferos apresentaram 14 estágios do ciclo espermatogênico e morfologia normal nos ratos controle (GC) (Figura 2A). As alterações histopatológicas testiculares observadas foram focais e mostraram variabilidade interindividual. Observou-se esfoliação de células germinativas imaturas e restos celulares no interior do lúmen dos túbulos seminíferos em 60% dos ratos do GAC (Figura 2B – 2E). No entanto, essas alterações aparecem em apenas 2% dos cortes dos túbulos seminíferos ($p > 0,05$).

Figura 2 - Histologia do testículo (A – E) e do epidídimo (F – H) dos animais do grupo controle e expostos ao 2,4-D.



A) Grupo controle (GC). Observe a morfologia normal dos túbulos seminíferos e do tecido intersticial. B, C, D) Grupo exposto a alta concentração de 2,4-D (GAC). E) Grupo exposto a baixa concentração de 2,4-D (GBC).

Observar a presença de esfoliação de células germinativas imaturas e restos celulares dentro do lúmen dos túbulos seminíferos (*) em B – E. F) Aspecto normal do epitélio epididimal e lúmen no grupo controle (GC). G) Observe a vacuolização epitelial no epidídimo (seta) em GAC. H) Observar a presença de

células germinativas imaturas e detritos no lúmen do epidídimo (cabeça de seta) em GAC. A, B, C e F: 100X; D, E, G e H: 400X. coloração H&E. Fonte: Elaborado pelos autores.

Os epidídimos do grupo controle apresentam aspecto normal de epitélio e lúmen (Figura 2F). Vacuolização epitelial no epidídimo (Figura 2G) e células germinativas imaturas no lúmen do epidídimo (Figura 2H) foram encontradas em 20% dos animais do GAC e em 2% das secções do ducto epidimário ($p > 0,05$).

3.4 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, vários estudos apontam um declínio na qualidade seminal com consequente impacto nas taxas de fecundidade (Grant *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2010; Rolland *et al.*, 2013). Não há consenso sobre a diminuição dos parâmetros do sêmen ao longo do tempo entre os homens. No entanto, dados relevantes suscitam preocupação sobre este assunto. Embora as possíveis causas não tenham sido estabelecidas, vários fatores podem estar associados, incluindo a exposição a contaminantes ambientais (Mann *et al.*, 2020).

O herbicida 2,4-D é um dos mais utilizados no mundo, por isso é fundamental entender seus possíveis impactos na reprodução masculina, principalmente em exposições crônicas e concentrações ambientalmente relevantes. No presente estudo, a exposição oral crônica ao 2,4-D através do consumo de ração contaminada causou efeitos deletérios na morfofisiologia reprodutiva masculina, principalmente na qualidade espermática.

Os pesos dos órgãos reprodutivos não foram afetados pela exposição ao herbicida. A alteração testicular que causou diminuição no número de espermatozoides no testículo e na produção diária de espermatozoides não foi suficiente para reduzir a massa do órgão. No entanto, Marouani *et al.*, (2017) observaram redução nos pesos de testículos, vesículas seminais e próstata de ratos após alimentação forçada oral com 100 e 200 mg de 2,4-D/kg durante 30 dias. Uma diminuição no peso dos testículos e glândulas acessórias sexuais também foi encontrada após exposição oral a 50, 100 e 150 mg/kg durante 30 e 45 dias (Joshi *et al.*, 2012).

Um dos mecanismos de toxicidade testicular sugeridos para o 2,4-D está relacionado à interrupção da homeostase do colesterol/testosterona nas células de Leydig (Harada *et al.*, 2016). Os níveis de testosterona estão correlacionados com os

pesos dos testículos, vesículas seminais e próstata (Prins *et al.*, 1991). Assim, os resultados dos pesos dos órgãos no presente estudo sugerem ausência ou alteração reversível da testosterona durante a exposição crônica com adaptações fisiológicas. A homeostase adaptativa descreve mudanças transitórias na faixa homeostática que ocorrem em resposta à exposição subtóxica. Também pode ocorrer em exposições a xenobióticos em níveis tóxicos, desde que não haja danos irreparáveis (Davies, 2016).

A qualidade espermática dos grupos expostos a todas as concentrações de 2,4-D foi prejudicada. A redução na motilidade progressiva dos espermatozoides observados nos grupos de exposição ao herbicida esteve relacionada principalmente ao aumento dos espermatozoides imóveis. No GBC a alteração na motilidade foi concordante com a mudança no tempo de trânsito cabeça/corpo do epidídimo. No entanto, outros mecanismos envolvidos na maturação espermática ou na fisiologia espermática também podem ter sido afetados. A intensa progressão da motilidade espermática é gerada através da energia produzida pelas mitocôndrias. O herbicida 2,4-D tem sido relatado como agente nocivo às mitocôndrias (Tuschl; Schwab, 2003), o que pode ter causado redução na motilidade espermática e morte celular, observada com o aumento de espermatozoides imóveis e diminuição da vitalidade (integridade da membrana plasmática).

De acordo com Tan *et al.*, (2016), espermatozoides humanos ejaculados expostos *in vitro* ao 2,4-D podem apresentar inibição da motilidade total e progressiva, capacidade de penetração em meio viscoso, capacitação e taxas de reação acrossômica, aumentando o risco de infertilidade. Lerda e Rizzi (1991) observaram maiores números de espermatozoides mortos, anormais e imóveis em homens expostos ocupacionalmente ao 2,4-D. Além disso, vários estudos identificaram comprometimento da motilidade espermática após exposição ao 2,4-D em roedores (Joshi *et al.*, 2012, Marouani *et al.*, 2017). Joshi *et al.*, (2012) observaram grave comprometimento na motilidade espermática com impacto na fertilidade. Marouani *et al.*, (2017) mostraram diminuição da motilidade com aumento da anormalidade do espermatozóide em ratos expostos ao 2,4-D. No presente estudo, a morfologia espermática também foi alterada na cabeça e no flagelo.

O herbicida 2,4-D afetou a histologia testicular. Descamação de células germinativas e presença de células germinativas imaturas e restos celulares no lúmen dos túbulos seminíferos foram observados no grupo exposto a maior concentração. A descamação de células germinativas foi detectada no lúmen do epidídimo. Este

resultado foi concordante com os estudos de Marouani *et al.* (2017) e Zhang *et al.*, (2017).

Marouani *et al.*, (2017) identificaram que a exposição ao 2,4-D causou redução do número de espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos e desaparecimento das células de Sertoli em ratos. A exposição oral (gavagem) a 100 e 200 mg/kg/dia de 2,4-D durante 14 dias causou interrupção da espermatogênese com comprometimento da histologia testicular em camundongos. Dentre as alterações encontradas, destacam-se atrofia de túbulos seminíferos, epitélio, depleção e descolamento de células germinativas e ruptura de células de Leydig (Zhang *et al.*, 2017). Esses autores sugeriram possível envolvimento do estresse oxidativo e apoptose na toxicidade testicular.

3.5 CONCLUSÃO

O consumo crônico de ração contaminada com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em diferentes concentrações causou efeitos deletérios na espermatogênese e na qualidade espermática em ratos machos adultos.

Este é o primeiro estudo a descrever o impacto negativo na morfofisiologia reprodutiva masculina após exposição crônica ao 2,4-D, utilizando nebulização de alimentos em concentrações ambientalmente relevantes, com base no uso agrônomo do herbicida. O método de exposição que simula a pulverização ambiental é mais relevante quando comparado aos estudos encontrados na literatura, que geralmente utilizam a exposição oral por gavagem (alimentação forçada) em exposições agudas ou subcrônicas e doses irreais.

As mudanças reprodutivas identificadas levantam preocupações sobre os impactos da ampla exposição global ao 2,4-D. Além disso, geram a necessidade de estudos epidemiológicos abrangentes, que considerem e correlacionem a distribuição geográfica dos efeitos reprodutivos e a contaminação ambiental local.

3.6 CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

3.7 FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Bolsa: Universidade do Oeste de São Paulo (UNOESTE).

3.8 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Citopatologia da UNOESTE, Carlos Alexandre Santana de Oliveira, Mariana Fonseca Motta Borges e Talita Rizo Pereira, pelo processamento histológico. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

3.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cipullo, S. et al., 2019. Prediction of bioavailability and toxicity of complex chemical mixtures through machine learning models. *Chemosphere* 215,388-395.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.056>.

Cooper, T.G. et al., 2010. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 16(3),231-245.

<https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048>.

Davies, K.J., 2016. Adaptive homeostasis. *Mol Aspects Med* 49,1-7.

<https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.007>.

de Azevedo Mello, F. et al., 2020. Evaluation of genotoxicity after acute and chronic exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide (2,4-D) in rodents using machine learning algorithms. *J Toxicol Sci* 45(12),737-750.

<https://doi.org/10.2131/jts.45.737>.

de Oliveira Mantovani, R. et al., 2021. Effect of different doses of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on cardiac parameters in male Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 28(3),3078-3087. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10699-y>.

FAO., 2006. World agriculture: towards 2030/2050 – Interim report. Rome.
(http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/esag/docs/Interim_report_AT2050web.pdf)

Fernandes, G.S. et al, 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron.
Reprod Toxicol 23(1),106–112. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.09.002>

Grant, J., et al., 2006. Trends in European fertility: should Europe try to increase its fertility rate or just manage the consequences? *Int J Androl* 29,17–24.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00634.x>.

Guerrero-Bosagna, C. et al., 2013. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of altered Sertoli cell transcriptome and epigenome: molecular etiology of male infertility. *PLoS One* 8, e59922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059922>.

Habboub, G. et al., 2020. The embedded biases in hypothesis testing and machine learning. *Neurosurg Focus* 48(5),E8. <https://doi.org/10.3171/2020.2.FOCUS191016>.

Harada, Y. et al., 2016. PPAR α -dependent cholesterol/testosterone disruption in Leydig cells mediates 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced testicular toxicity in mice. *Arch Toxicol* 90(12),3061-3071. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1669-z>.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. DDT, Lindane, and 2,4-D. IARC. Lyon (FR), IARC, 2018 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, n^o 113) <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/mono113.pdf> Accessed May 2021.

Islam, F. et al., 2018. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environ Int* 111,332-351.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.020>.

Joshi, S.C. et al., 2021. Evaluation of toxic effect of 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) on fertility and biochemical parameters of male reproductive system of albino rats. *Int J Pharm Pharm Sci* 4(3)338-342.

Kempinas, W.D.G., Klinefelter, G.R., 2014. Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis* 4(2)1-12 <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979114>.

Lerda, D., Rizzi, R. 1991. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Mutat Res* 262,47–50. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(91\)90105-d](https://doi.org/10.1016/0165-7992(91)90105-d).

Li, F. et al., 2017. In silico prediction of pesticide aquatic toxicity with chemical category approaches. *Toxicol Res (Camb)* 6(6),831–842. <https://doi.org/10.1039/c7tx00144d>.

McLaughlin, D., Kinzelbach, W., 2015. Food security and sustainable resource management. *Water Resour Res* 51(7),4966-4985. <https://doi.org/10.1002/2015WR017053>

Mann, U. et al., 2020. Reasons for worldwide decline in male fertility. *Curr Opin Urol* 30(3),296-301. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000745>.

Marouani, N. et al., 2017. Effects of oral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on reproductive parameters in male Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 4(1),519-526. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7656-3>.

Parfitt, J. et al., 2010. Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1554),3065-81. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0126>.

Pereira, V.R. et al., 2019. Sperm quality of rats exposed to difenoconazole using classical parameters and surface-enhanced Raman scattering: classification performance by machine learning methods. *Environ Sci Pollut Res Int* 26(34), 35253-35265. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06407-0>.

Prins, S.G. et al., 1991. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* 129, 3187–3199. <https://doi.org/10.1210/endo-129-6-3187>.

Robb, G.W. et al., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 54(1),103–107. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540103>

Rolland, M. et al., 2013. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod* 28(2),462–470. <https://doi.org/10.1093/humrep/des415>.

Song, Y., 2014. Insight into the mode of action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) as an herbicide. *J Integr Plant Biol* 56, 106–113. <https://doi.org/10.1111/jipb.12131>.

Tan, Z. et al., 2016. Toxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human sperm function in vitro. *J Toxicol Sci* 41(4),543-9. <https://doi.org/10.2131/jts.41.543>.

Tomiazzi, J.S. et al., 2019. Performance of machine-learning algorithms to pattern recognition and classification of hearing impairment in Brazilian farmers exposed to pesticide and/or cigarette smoke. *Environ. Sci Pollut Res Int* 26(7),6481-6491. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-04106->.

Vieira, K.C.M.T. et al., 2019. Experimental exposure to gasohol impairs sperm quality with recognition of the classification pattern of exposure groups by machine learning algorithms. *Environ Sci Pollut Res Int* 26(4),3921-3931. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3901-2>.

WHO., 1999. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th edn. Cambridge University Press, United Kingdom. 128p. <https://www.aab.org/images/WHO%204th%20manual.pdf>. Accessed May 2019.

Zhang, D. et al., 2017. Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces oxidative stress and apoptosis in mouse testis. *Pestic Biochem Physiol* 141:18-22.

<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.10.006>.

CAPÍTULO 3

O presente estudo deu origem a um artigo intitulado “Exposição oral crônica ao herbicida glifosato em concentrações ambientalmente relevantes: efeitos sobre a saúde reprodutiva em modelo experimental”, que será submetido ao periódico *Environmental Science and Pollution Research* (fator de impacto 4,2, Qualis A2 pela CAPES).

**EXPOSIÇÃO ORAL CRÔNICA AO HERBICIDA GLIFOSATO EM
CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES: EFEITOS SOBRE A
SAÚDE REPRODUTIVA EM MODELO EXPERIMENTAL**

Jamile Silveira Tomiazzi Simões¹, Laura Alencar Naccaro², Gabriela Moreira de Jesus³, Jaqueline Nascimento da Silva⁴ Gisele Alborghetti Nai⁵, Renata Calciolari Rossi^{1,2}, Ana Paula Alves Favareto^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

²Faculdade de Medicina, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

³Faculdade de Artes, Ciências e Letras de Presidente Prudente (FACLEPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia De Materiais, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Presidente Prudente, SP, Brasil.

⁵Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

*Autor para correspondência:

Dr. Ana Paula Alves Favareto

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.CEP. 19.067-175.

E-mail:: anafavareto@unoeste.br (A.P.A. Favareto)

RESUMO

O herbicida glifosato está entre os mais utilizados no mundo e tornou-se preocupante devido potenciais efeitos adversos sobre a saúde. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos reprodutivos em ratos após consumo crônico de ração contaminada com o herbicida glifosato em diferentes concentrações, durante 180 dias. A qualidade dos espermatozoides foi prejudicada pelo glifosato. As porcentagens de espermatozoides com movimentação progressiva e não progressiva foram reduzidas e aumentadas, respectivamente, em GAC. A integridade de membrana plasmática do espermatozóide não foi afetada pelo herbicida. No entanto, houve aumento de alterações de cabeça e cauda nos espermatozoides de GMC e GAC. A contagem de espermatozoides no testículo e a histologia testicular e epididimária foram alteradas nos três grupos expostos ao herbicida. No testículo apresentou túbulos seminíferos com desorganização estrutural e perda de células germinativas, células germinativas esfoliadas na luz e vacuolização intraepitelial. No epidídimo, foram observadas alterações pontuais, como vacuolização do epitélio, células germinativa imatura esfoliada no lumen. Assim, a exposição crônica oral ao herbicida glifosato gerou danos à espermatogênese e qualidade espermática.

Palavras chave: Espermatogênese; Agroquímicos; Espermatozóide, Reprodução

4.1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são substâncias químicas muito utilizadas pela agroindústria com o objetivo de facilitar e aumentar a produção de alimentos. Embora essa utilização cumpra seu papel no aumento da produção agrícola, seu uso pode gerar consequências negativas à saúde e ao meio ambiente (Arl, 2021).

Diversas substâncias utilizadas na agricultura podem apresentar ação teratogênica, mutagênica e carcinogênica, além de alterações reprodutivas (Kang, 2008; Mesnage *et al.*, 2018; Levine *et al.*, 2020). A exposição a essas substâncias, em especial aos herbicidas, ocorre não somente por trabalhadores rurais e agricultores que manipulam diretamente estes compostos (exposição ocupacional), mas também, pela população em geral, por meio da ingestão de água e alimentos contaminados (exposição acidental). Esta exposição pode desencadear problemas de saúde, além de causar impactos no meio ambiente, pela degradação de recursos não renováveis, desequilíbrio da fauna e flora e poluição do solo, ar e águas (Paraná, 2013; Iarc, 2018).

Um dos herbicidas mais utilizados em todo o mundo é o glifosato N-(fosfometil-Glicina). Ele pertence a classe química dos organofosforados, de amplo espectro, hidrossolúvel, sistêmico, não seletivo e pós-emergente, sendo constituído de mais de 750 formulações (Cunha, 2011). É o principal ingrediente ativo em herbicidas da marca Roundup® (Cunha, 2011; Machado, 2016; Pignati *et al.*, 2017) e utilizado em lavouras de algodão, amendoim, arroz, café, cana-de-açúcar, mandioca, soja, trigo e também em pastagens e florestas de pinus e eucalipto (Cetesb, 2018).

A utilização de agrotóxicos nas plantações, a geração de resíduos e seu acúmulo nos compartimentos ambientais, faz com que estes produtos necessitem de estudos aprofundados para identificação de seus comportamentos no meio ambiente e seus impactos sobre homens e animais (Jardim *et al.*, 2009).

Embora o glifosato seja classificado na categoria de herbicida praticamente não tóxico e não irritante pela Agência de Proteção Ambiental Americana (*EPA - US Environmental Protection Agency*) (EPA, 1993), estudos tem demonstrado efeitos tóxicos da exposição ao glifosato puro e a herbicidas a base de glifosato (HBGs) a saúde e ao meio ambiente (Vanlaeys *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019).

O glifosato pode desempenhar o papel de desregulador endócrino levando ao atraso na instalação da puberdade, redução significativa na espermatogênese e na

esteroidogênese de ratos expostos durante a pré-puberdade, mesmo em baixa dose (5 mg/kg) (Romano *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2016; Jarrell *et al.*, 2020).

Estudos experimentais sobre a exposição oral a agroquímicos frequentemente utilizam a gavagem, períodos curtos de exposição e doses que não se assemelham à exposição humana (Arab *et al.*, 2018), que pode ocorrer através da contaminação direta (inalatória, dérmica e oral) ou indireta por meio da ingestão de alimentos e/ou água contaminados (Pereira *et al.*, 2019).

Sendo assim, este estudo avaliou os efeitos da exposição crônica oral ao herbicida glifosato sobre a morfofisiologia reprodutiva masculina de ratos adultos em concentrações e modo de exposição ambientalmente relevantes, ajustadas conforme a utilização recomendada do herbicida.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Herbicida

Para exposição dos animais, foi utilizada a formulação comercial à base de glifosato (Roundup®), registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento nº 09106), com a seguinte composição: sal de Isopropilamina de Glifosato 480 g/L (360 g/L equivalente ácido). O veículo para diluição do herbicida foi em 10 mL de solução salina 0,9% (solução de cloreto de sódio – NaCl) nas concentrações preconizadas para cada grupo experimental.

4.2.2 Animais

Ratos Wistar machos adultos (150-200g, n = 40) foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Oeste de São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil. Durante o experimento, os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno (43 cm x 30 cm x 15 cm) com cama de maravalha de qualidade laboratorial. Os ratos foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e iluminação (12L, fotoperíodo 12D). Ração para ratos (Supralab®, Alisul, Brasil) e água filtrada da torneira foram fornecidas à vontade aos animais. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UNOESTE (Protocolo nº 5684-CEUA). Também atende aos princípios de cuidados com animais

de laboratório formulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2.3 Desenho experimental

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n = 10 animais por grupo):

- Grupo controle (GC): ratos consumiram diariamente ração previamente nebulizada com soro fisiológico 0,9% (veículo);

- Grupo de baixa concentração (GBC): os ratos consumiram diariamente ração previamente nebulizada com glifosato na concentração de $3,71 \times 10^{-3}$ g de ingrediente ativo por hectare (correspondente a 20,69 ppm).

- Grupo de concentração média (GMC): os ratos consumiram diariamente ração previamente nebulizada com glifosato na concentração de $6,19 \times 10^{-3}$ g de ingrediente ativo por hectare (correspondente a 34,63 ppm).

- Grupo de alta concentração (GAC): os ratos consumiram diariamente ração previamente nebulizada com glifosato na concentração $9,28 \times 10^{-3}$ g de ingrediente ativo por hectare (correspondente a 51,66 ppm).

As diferentes concentrações do herbicida glifosato utilizadas, consideram as concentrações ambientalmente relevantes, de acordo com a aplicação do produto e sua prescrição agrônômica. As concentrações de glifosato utilizadas na agricultura (em gramas de ingrediente ativo por hectare - g.i.a) foram ajustadas às dimensões das caixas de exposição, conforme Parizi *et al.* (2020).

4.2.4 Protocolo de exposição ao herbicida Glifosato

Foram utilizadas duas caixas plásticas (32 x 24 x 32 cm) conectadas a um nebulizador ultrassônico (Pulmosonic Star®, Brasil) (Mello *et al.* 2018). A ração foi exposta nas caixas conectadas ao nebulizador, por 15 minutos (tempo necessário para que toda a solução (10 mL) fosse nebulizada) à solução glifosato na concentração de cada grupo experimental. A exposição ocorreu um dia antes da ração ser oferecida aos animais, sendo trocada a cada dois dias. Os animais foram expostos por um período de 180 dias.

4.2.5 Coleta de tecidos e órgãos

Ao final do período de exposição, os ratos de cada grupo experimental foram anestesiados e eutanasiados pela administração de 100mg -1kg pc de tiopental sódico (ip., Syntec, EUA). O testículo direito, epidídimo e ducto deferente, próstata ventral, vesícula seminal (sem a glândula coagulante e cheia de secreção), foram coletados.

4.2.6 Motilidade e morfologia espermática e integridade da membrana plasmática

Imediatamente após a eutanásia, o ducto deferente esquerdo foi coletado para obtenção dos espermatozoides em 1,0mL de solução salina tamponada com fosfato a 34°C. A câmara de contagem de Neubauer aquecida foi carregada com uma pequena alíquota de solução de esperma. A avaliação da motilidade espermática foi avaliada por estimativa visual (200 espermatozoides por animal, em duplicata) sob um microscópio (Leica DMLS) com aumento de 200X. Os espermatozoides foram classificados em imóveis, móveis sem progressão e móveis com progressão, segundo Perobelli *et al.* (2012).

O ducto deferente direito foi coletado para obtenção de espermatozoides que foram fixados em 1,0mL de formol salino. A análise da morfologia do esperma foi realizada ao microscópio (ampliação de 400x) (Seed *et al.*, 1996). Os espermatozoides foram classificados de acordo com Filler (1993).

A viabilidade espermática (integridade da membrana plasmática) foi avaliada usando o teste de coloração de eosina-nigrosina (OMS 1999). Duzentos espermatozoides foram contados em microscópio de luz (ampliação de 1000x), e classificados em não corados (espermatozoides vivos) e corados em vermelho (espermatozoides mortos).

4.2.7 Cálculo da produção diária de espermatozoides por testículo

Os testículos direitos, permaneceram congelados até serem descapsulados e pesados, foram homogeneizados, segundo método descrito por Robb, Amann e Killian (1978) com as adaptações descritas a seguir. O parênquima testicular foi descongelado e homogeneizado numa mistura de NaCl (9g), Triton X100 (0,5ml).

Após diluição de 10 vezes na mistura contendo Triton X100, uma pequena amostra foi transferida para câmaras de Neubauer (4 campos por animal), procedendo-se a contagem das espermátides resistentes ao processo de homogeneização (estágio 19 da espermiogênese). Para o cálculo da produção diária de espermatozoides (PDE) a concentração de espermatozoides por testículo foi dividida por 6,1, que é o número de dias em que as espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) estão presentes no epitélio seminífero.

4.2.8 Análise histológica

Testículos esquerdos foram coletados, limpos e imersos em solução fixadora formalina tamponada a 10%. Após uma pré-fixação de 24 horas, os órgãos foram removidos do fixador e recortados, retornando em seguida ao fixador. Após 24 horas, as peças foram lavadas e a solução substituída por álcool 70%, onde as peças permaneceram até o processamento, que consistiu na inclusão do material em Paraplast, obtenção de cortes com espessura de 5µm e coloração com hematoxilina e eosina, para avaliação histopatológica em microscópio óptico.

Cortes transversais de túbulos seminíferos foram avaliados quanto à presença de alterações como: presença de células acidófilas, células multinucleadas, espermátides retidas, degeneração de tipos celulares, depleção de células, vacuolização do epitélio ou esfoliação de células na luz.

Cortes longitudinais dos segmentos cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram examinados quanto à presença de hiperplasia cribriforme no epitélio, vacuolização epitelial, infiltrado inflamatório no tecido intersticial, quantidade e aspecto dos espermatozoides no lúmen e de células claras no epitélio (Kempinas; Klinefelter, 2014). As fotomicrografias foram obtidas usando microscópio acoplado à sistema de captura de imagens (Leica Microsystems, Switzerland).

4.2.9 Análise estatística

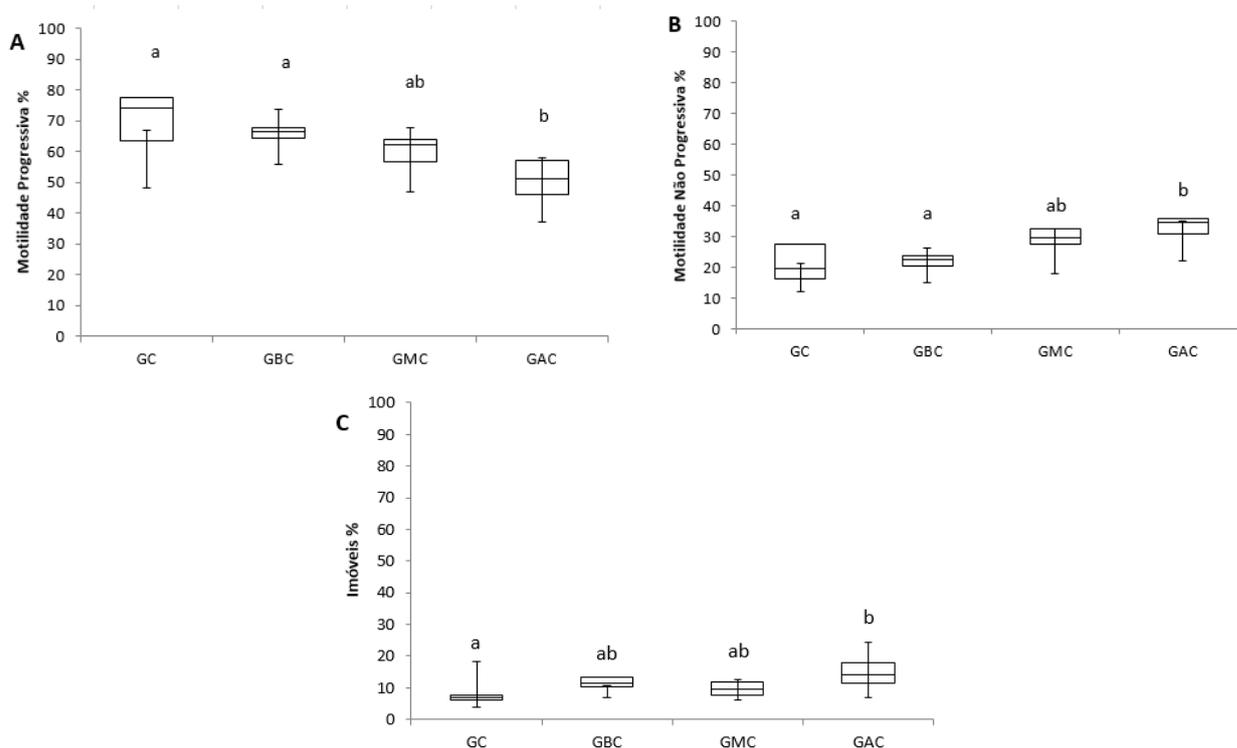
O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar distribuições normais antes das análises estatísticas. Para comparação dos parâmetros foram realizados ANOVA com teste de Tukey a posteriori ou teste não paramétrico de Kruskal-Wallis

com teste de Dunn a posteriori. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.3 RESULTADOS

A porcentagem de espermatozoides com movimentação progressiva (Figura 1A) foi reduzida ($p < 0,05$), com consequente aumento ($p < 0,05$) da porcentagem de espermatozoides com motilidade não progressiva e imóveis em GAC em relação a GC (Figura 1B e 1C). Houve semelhança ($p > 0,05$) entre os grupos GBC GMC e GC e entre GMC e GAC, quanto à motilidade progressiva e não progressiva (Figura 1A e 1B). Além disso, GBC e GMC foram semelhantes ($p > 0,05$) a GC e a GAC, quanto a porcentagem de espermatozoides imóveis (Figura 1C).

Figura 1 - Motilidade espermática em ratos do grupo controle e expostos ao glifosato.



A) porcentagem de espermatozoides móveis com movimento progressivo. B) porcentagem de espermatozoides móveis sem progressão. C) porcentagem de espermatozoides imóveis. Valores expressos em mediana (Q1 – Q3). Teste de Kruskal-Wallis, com teste de Dunn a posteriori. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). GC = Grupo controle. GBC = Grupo de baixa concentração. GMC = Grupo de concentração de média. GAC = Grupo de alta concentração. Fonte: Elaborado pelos autores.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na integridade de membrana plasmática dos espermatozoides expostos às diferentes concentrações de glifosato (Tabela 1). Entretanto, foi observada redução significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais e aumento das anormalidade de cabeça nos grupos GMC e GAC quando comparados ao GC. GBC manteve semelhança ($p > 0,05$) tanto ao GC como aos demais grupos expostos. A porcentagem de alterações de cauda aumentou ($p > 0,05$) em GMC e GAC, no entanto, GMC também manteve semelhança ($p > 0,05$) entre GC e GBC (Tabela 1). As principais alterações morfológicas observadas foram cabeça em forma de alfinete e com curvatura anormal e cauda isolada e enrolada.

Apesar do peso testicular ser semelhante ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais, houve alteração das contagens espermáticas neste órgão. Os números absoluto e relativo de espermatozoides no testículo e epidídimo e produção diária total e por grama de testículo e epidídimo foram reduzidos nos três grupos expostos em relação ao GC (Tabela 2).

Tabela 1- Morfologia espermática e integridade da membrana plasmática em ratos dos grupos controle e expostos ao glifosato.

Parâmetro	GC	GBC	GMC	GAC
Morfologia normal (%)	93,50 (89,00-99,00)a	89,75 (85,00-96,00)ab	88,00 (84,00-94,00)b	86,75 (81,00-91,50)b
Anormalidades de cabeça (%)	4,03 (1,00-11,00)a	5,03 (1,00-14,00)a	5,73 (1,00-17,00)ab	8,96 (2,00-19,00)b
Anormalidades de cauda (%)	2,25 (1,5-3,5)a	2,50 (2,00-4,00)ab	6,00 (3,50-8,50)b	3,75 (3,37-4,12)ab
Integridade da membrana (%)	94,70 (92,00-98,00)a	92,70 (90,50-94,50)a	89,45 (86,50-91,50)b	89,00 (86,50-93,00)b

Valores expressos em mediana (Q1 – Q3). Teste de Kruskal-Wallis com Dunn *a posteriori*. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). GC = Grupo controle. GBC = Grupo de baixa concentração. GMC = Grupo de média concentração. GAC = Grupo de alta concentração. Fonte: Elaborado pelos autores.

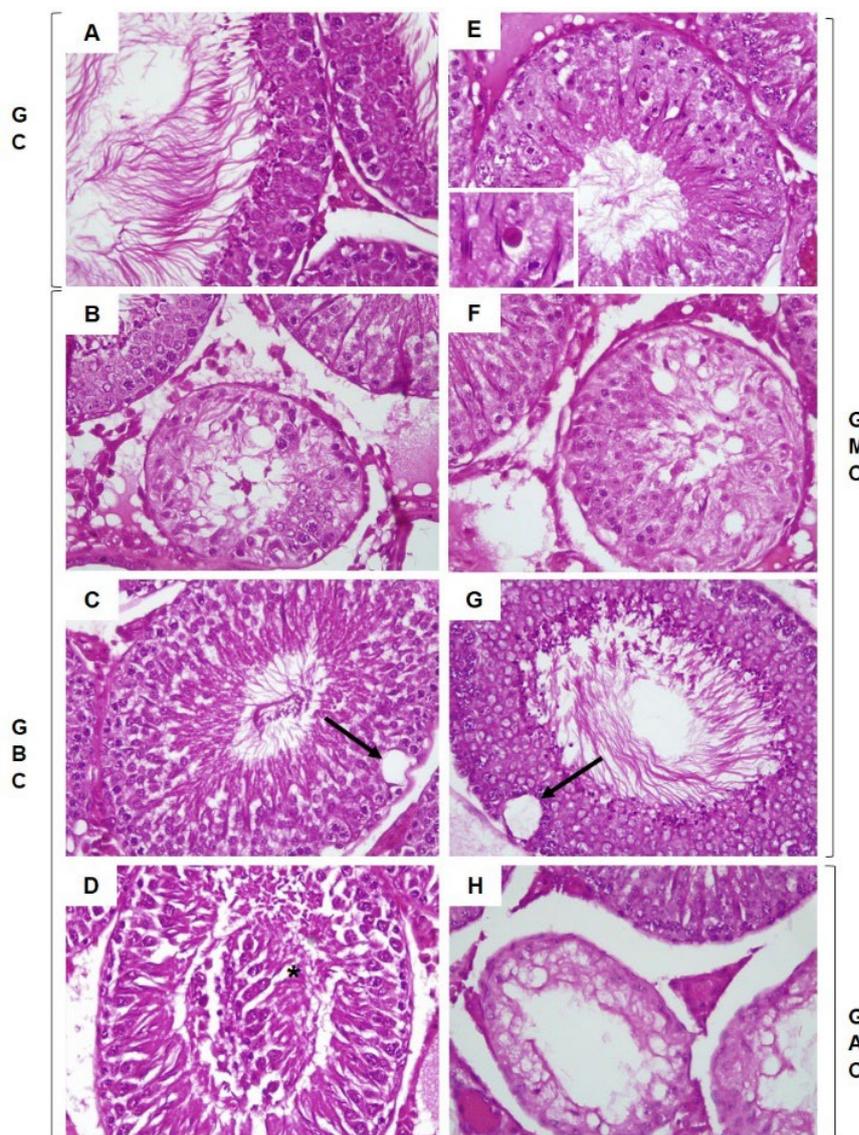
Tabela 2- Contagem de espermatozoides no testículo e epidídimo em ratos do grupo controle e expostos ao glifosato.

Parâmetro	GC	GBC	GMC	GAC
Testículo				
Peso do testículo (g)	1,66±0,38	1,64±0,82	1,65±0,50	1,66±0,46
Número de espermatozoides (x10 ⁶ /g)	236,15±10,43a	209,08±17,98b	197,49±10,31bc	190,70±8,18c
Número de espermatozoides por grama de órgão (x10 ⁶ /g)	50,86±2,78a	43,89±4,34b	40,76±3,49b	41,00±3,09b
PDE (x10 ⁶ /testículo/dia)	38,71±1,70a	34,27±2,94b	32,37±1,69bc	31,26±1,34c
PDEr (x10 ⁶ /g/dia)	8,33±0,45a	7,19±0,71b	6,68±0,57b	6,72±0,50b
Cabeça/corpo do epidídimo				
Número de espermatozoides (x10 ⁶)	129,85±11,43a	137,84±9,21a	94,32±11,23b	94,73±11,98b
Número de espermatozoides por grama de órgão (x10 ⁶ /g)	362,13±21,27a	362,39±19,63a	294,71±19,02b	285,11±15,71b
Tempo de trânsito (dias)	3,86±0,72a	5,24±0,63b	4,84±0,82a	4,14±0,56a
Cauda epidídimo				
Número de espermatozoides (x10 ⁶)	225,31±26,41a	212,10±31,02a	176,42±13,71b	174,21±21,14b
Número de espermatozoides por grama de órgão (x10 ⁶ /g)	927,02±39,81a	913,41±44,72a	754,68±32,84b	755,42±23,72b
Tempo de trânsito (dias)	6,43±1,17a	7,89±1,29b	7,74±1,06ab	7,23±1,14a

Peso do testículo em gramas sem a túnica albugínea. Valores expressos em média ± DP. ANOVA com teste de Tukey *a posteriori*. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). GC = Grupo controle. GBC = Grupo de baixa concentração. GMC = Grupo de média concentração. GAC = Grupo de alta concentração. PDE = Produção Diária de Espermatozoides. PDEr = Produção Diária de Espermatozoides por grama de testículo. Fonte: Elaborado pelos autores.

Com relação á análise histopatológica, o testículo dos animais do grupo GC (Figura 2A) apresentaram morfologia normal, com epitélio germinativo organizado e preservado. Já os testículos dos animais expostos ao glifosato nas diferentes concentrações apresentaram alterações. Em GBC, foram observados túbulos seminíferos com desorganização estrutural e perda de células germinativas (Figura 2B), presença de células germinativas esfoliadas na luz (Figura 2D) e de vacuolização intraepitelial (Figura 2C). Em GMC e GAC foi identificada presença de células germinativas acidólicas (Figura 2E), presença de túbulos seminíferos com intensa perda de células germinativas e atróficos (Figura 2F e 2H) e de vacuolização intraepitelial (Figura 2G).

Figura 2 - Análise histológica do testículo de ratos do grupo controle e expostos ao glifosato.

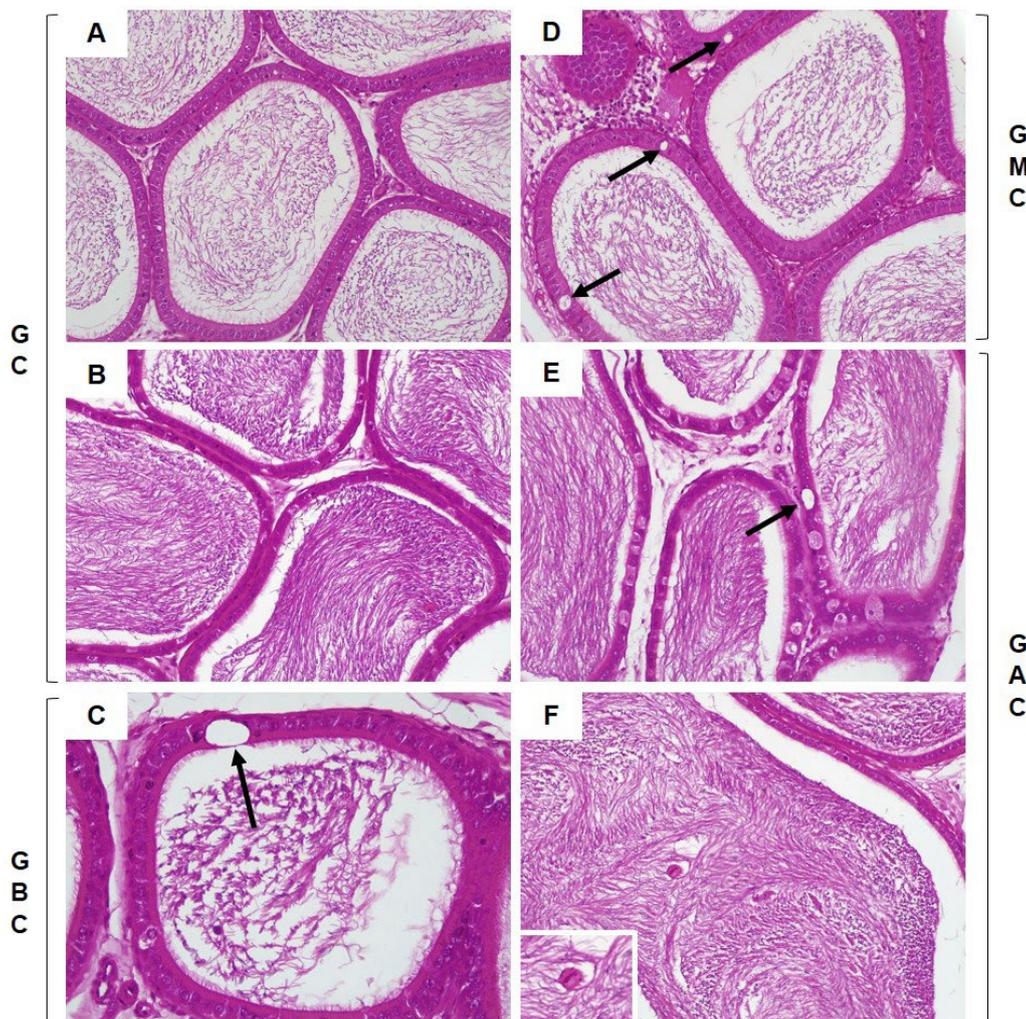


A - Estrutura normal dos túbulos seminíferos e tecido intersticial. B, F e H - Perda de integridade estrutural do epitélio seminífero, com focos de intensa perda de células germinativas e atrofia tubular. C e G - Presença de túbulos seminíferos com vacuolização intraepitelial (setas). D - Presença de intensa esfoliação de células germinativas na luz de vários túbulos seminíferos. E - Presença de célula acidófila. GC = Grupo controle. GBC = Grupo de baixa concentração. GMC = Grupo de média concentração. GAC = Grupo de alta concentração. B, F, H: Aumento de 200x. A, C-E, G: Aumento de 400x. Hematoxilina - eosina (HE). Fonte: Elaborado pelos autores.

Na análise histopatológica do epidídimo, observou-se que GC apresentou epitélio do ducto epididimário com integridade morfológica normal, interstício e lúmen com espermatozoides nos segmentos cabeça (Figura 3A) e cauda (Figura 3B). Entretanto, os grupos expostos ao glifosato apresentaram alterações focais. Foi observada vacuolização do epitélio do ducto epididimário nos três grupos expostos ao

herbicida (Figura 3C, 3D e 3E), células germinativa imatura esfoliada no lumen juntamente com os espermatozoides (Figura 3F).

Figura 3 - Análise histológica do epidídimo de ratos do grupo controle e expostos ao glifosato.



A e B - Integridade morfológica do epitélio do ducto epididimário, interstício e lúmen com espermatozoides nos segmentos cabeça (A) e cauda (B). C – E Presença de vacuolização intraepitelial (seta). E - Epitélio da região da cauda epididimária com grande número de células claras. A, B, D e E: Aumento de 200x. C e F: Aumento de 400x. Hematoxilina - eosina (HE). Fonte: Elaborado pelos autores.

4.4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, cada vez mais atenção tem sido dada à toxicidade reprodutiva induzida pelo glifosato e sua formulação comercial, como o Roundup® (Cai *et al.*, 2017; Jarrel *et al.* 2020). O glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo (Nerozzi *et al.*, 2020), sendo assim, torna-se necessário compreender sobre seus

possíveis efeitos tóxicos e impactos sobre o sistema reprodutor masculino mediante exposição crônica.

Estudos tem abordado sobre a redução de fertilidade e parâmetros espermáticos recorrentes em humanos. Anifandis *et al.* (2018) realizaram um estudo com amostras de espermatozoides expostos a 1mg/L de glifosato após 1 hora e observaram a diminuição na motilidade progressiva.

Dai *et al.*, (2016) observaram alterações das contagens espermáticas e redução do número absoluto e relativo de espermatozoides no testículo e produção diária total e por grama de testículo de ratos expostos as concentrações de 5, 50 e 500mg/kg do herbicida glifosato. Os resultados assemelham-se aos encontrados nesse estudo. Sinais de toxicidade reprodutiva também foram encontrados no estudo de Romano (2012), onde foram observados o decréscimo no número de espermatozoides, na produção diária de espermatozoides e aumento da percentagem de espermatozoides anormais.

Assim como a redução na produção de espermatozoides, a motilidade dos espermatozoides também está diretamente ligada a fertilização, visto que apenas os espermatozoides móveis chegam ao ovócito para fecundação. Ao reduzir a motilidade espermática, conseqüentemente se reduz a capacidade reprodutiva desse espermatozóide (Cai *et al.*, 2017). Segundo Betancourt *et al.*, (2006), essa redução pode ocorrer pela ação adversa sobre a cadeia respiratória da bainha mitocondrial, essencial para o fornecimento de energia para a sobrevivência espermática.

Nesse estudo, houve uma redução na motilidade espermática, caracterizada pelo grande número de espermatozoides imóveis e com movimentação não progressiva nos grupos expostos ao glifosato. Estudos *in vivo* também mostram o efeito tóxico do glifosato sobre a motilidade de espermatozoides. Em porquinhos da Índia expostos a 186, 280 e 560 mg/kg de herbicidas a base de glifosato (HBG) (WILLOSATE®), equivalente a 67, 103 e 202 mg/kg de glifosato, respectivamente, por via oral durante 60 dias, foi observada redução significativa na motilidade, na viabilidade e concentração dos espermatozoides, de maneira dependente da dose (Mutweddu *et al.*, 2021). Resultados semelhantes foram também relatados anteriormente por Owagboriaye *et al.*, (2017) em ratos albinos machos expostos oralmente por 12 semanas a (0,01, 0,14 e 0,69 mL/kg/dia) de Roundup® correspondendo a uma dose de glifosato de (3,6, 50,4 e 248,4 mg/kg/dia), respectivamente).

A avaliação da morfologia espermática também é um fator importante não só para avaliação do funcionamento do testículo, mas também serve como indicador de estresse causado pelo meio. Os defeitos espermáticos podem refletir alterações ocorridas durante a espermatogênese ou maturação espermática e interferir diretamente na capacidade de fertilização (Najafi, 2015). Mutwedu *et al.* (2021) encontraram alterações de cabeça dos espermatozoides com curvatura em forma de alfinete e cauda isolada. A qualidade espermática dos grupos expostos ao glifosato foi prejudicada, assim como no estudo de Nerozzi *et al.*, (2020) que também observou alterações de cabeça com curvatura em forma de alfinete e alterações de cauda enrolada e isolada nos grupos expostos ao glifosato.

O herbicida glifosato também afetou a histologia testicular. Houve uma desorganização estrutural e perda de células germinativas, presença de células germinativas esfoliadas na luz e vacuolização intraepitelial nos grupos de baixa exposição. A identificação de túbulos seminíferos atróficos, células germinativas acidólicas e vacuolização do epitélio e intraepitelial e do ducto epididimário condizem com o estudo de Vanlaeys *et al.* (2018) onde também foi identificada a redução no número de espermatozoides e desaparecimentos das células de sertoli em ratos. No estudo de Gorga *et al.*, (2020), a exposição ao glifosato em ratos de forma intraperitoneal, levou ao comprometimento da histologia testicular. Foram identificadas alterações de atrofia de túbulos seminíferos, epitélio, descolamento de células germinativas.

Este é um estudo inédito, onde observamos efeitos negativos da exposição crônica ao herbicida glifosato sobre a morfofisiologia reprodutiva masculina utilizando a nebulização de alimentos. Esse método simula o método de exposição humana por meio da pulverização, sendo ambientalmente relevante quando comparado a outros estudos que utilizam exposições agudas por meio de gavagem.

4.5 CONCLUSÃO

A exposição crônica oral por meio de ração contaminada com o herbicida glifosato em diferentes concentrações alterou a espermatogênese e qualidade espermática em ratos machos adultos.

As alterações encontradas sobre a morfofisiologia reprodutiva masculina devido a exposição ao glifosato, devem ser levadas em consideração pelas agências

reguladoras, para que assim se estabeleçam melhores critérios sobre o uso seguro deste herbicida, avaliar novos métodos de produção e adaptar estratégias de prevenção dos possíveis impactos do agrotóxico para a saúde.

Embora muitos efeitos tóxicos já foram demonstrados em modelos experimentais, mais estudos são necessários para esclarecer os possíveis efeitos do glifosato na saúde reprodutiva humana.

4.6 CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

4.7 FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Bolsa: Universidade do Oeste de São Paulo (UNOESTE).

4.8 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Citopatologia da UNOESTE, Carlos Alexandre Santana de Oliveira, Mariana Fonseca Motta Borges e Talita Rizo Pereira, pelo processamento histológico. Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

4.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anifandis, G., Katsanaki, K., Lagodonti, G., Messini, C., Simopoulou, M., Dafopoulos, K., & Daponte, A. (2018). The effect of glyphosate on human sperm motility and sperm DNA fragmentation. *International journal of environmental research and public health*, 15(6), 1117.

Betancourt, M., & Reséndiz, A. (2006). Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. *Reproductive Toxicology*, 22(3), 508-512.

Cai, W., Ji, Y., Song, X., Guo, H., Han, L., Zhang, F., & Xu, M. (2017). Effects of glyphosate exposure on sperm concentration in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Environmental toxicology and pharmacology*, 55, 148-155.

Dai, P., Hu, P., Tang, J., Li, Y., & Li, C. (2016). Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. *Acta Histochemica*, 118(5), 519-526.

Gorga, A., Rindone, G. M., Centola, C. L., Sobarzo, C., Pellizzari, E. H., del Carmen Camberos, M., ... & Meroni, S. B. (2020). In vitro effects of glyphosate and Roundup on Sertoli cell physiology. *Toxicology in Vitro*, 62, 104682.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2017). Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. V. 112, 2017.

Jarrell, Z. R., Ahammad, M. U., & Benson, A. P. (2020). Glyphosate-based herbicide formulations and reproductive toxicity in animals. *Veterinary and animal science*, 10, 100126.

Levine, S. L., Webb, E. G., & Saltmiras, D. A. (2020). Review and analysis of the potential for glyphosate to interact with the estrogen, androgen and thyroid pathways. *Pest Management Science*, 76(9), 2886-2906.

MACHADO, M. O. (2017). *Glifosato: a emergência de uma controvérsia científica global*. 2016. 315 f (Doctoral dissertation, Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. Disponível em:< <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/169662>>. Acesso em: 07 de novembro de).

Mesnage, R., Bernay, B., & Séralini, G. E. (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, 313(2-3), 122-128.

Mutwedu, V. B., Nyongesa, A. W., Azine, P. C., Chiregereza, D. K., Ngoumtsop, V. H., Mugumaarhahama, Y., & Ayagirwe, R. B. B. (2021). Growth performance and reproductive function impairment of glyphosate-based herbicide in male guinea pig (*Cavia porcellus*). *Veterinary Medicine and Science*, 7(3), 1047-1055.

Nerozzi, C., Recuero, S., Galeati, G., Bucci, D., Spinaci, M., & Yeste, M. (2020). Effects of Roundup and its main component, glyphosate, upon mammalian sperm function and survival. *Scientific reports*, 10(1), 1-9.

Owagboriaye, F. O., Dedeke, G. A., Ademolu, K. O., Olujimi, O. O., Ashidi, J. S., & Adeyinka, A. A. (2017). Reproductive toxicity of Roundup herbicide exposure in male albino rat. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 69(7), 461-468.

Pereira, V.R. et al., 2019. Sperm quality of rats exposed to difenoconazole using classical parameters and surface-enhanced Raman scattering: classification performance by machine learning methods. *Environ Sci Pollut Res Int* 26(34), 35253-35265. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06407-0>.

Pignati, W. A., Lima, F. A. N. D. S., Lara, S. S. D., Correa, M. L. M., Barbosa, J. R., Leão, L. H. D. C., & Pignatti, M. G. (2017). Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, 22, 3281-3293.

Romano, M. A., Romano, R. M., Santos, L. D., Wisniewski, P., Campos, D. A., de Souza, P. B., ... & de Oliveira, C. A. (2012). Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Archives of toxicology*, 86(4), 663-673.

Vanlaeys, A., Dubuisson, F., Seralini, G. E., & Travert, C. (2018). Formulants of glyphosate-based herbicides have more deleterious impact than glyphosate on TM4 Sertoli cells. *Toxicology in Vitro*, 52, 14-22.

Zhang, J. W., Xu, D. Q., & Feng, X. Z. (2019). The toxic effects and possible mechanisms of glyphosate on mouse oocytes. *Chemosphere*, 237, 124435.

CAPÍTULO 4

Análise da exposição crônica inalatória aos herbicidas glifosato e 2,4-D

Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussão referentes às avaliações reprodutivas após exposição inalatória aos herbicidas glifosato e 2,4-D.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Agentes químicos

Para exposição dos animais, foi utilizada a formulação comercial de (2,4-diclorofenoxi) ácido acético (2,4-D; Nortox S.A., Arapongas, Paraná, Brasil, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento nº 03009 e A formulação foi constituída por 806 g/L (80,6% m/v) de sal dimetilamina de ácido (2,4-diclorofenoxi)acético (2,4-D); 670g/L (67,0% m/v) de ácido equivalente de 2,4-D e 424g/L (42,4% m/v) de ingredientes inertes. Para a exposição ao glifosato, foi utilizada a formulação comercial à base de glifosato (Roundup®), registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento nº 09106), com a seguinte composição: sal de Isopropilamina de Glifosato 480 g/L (360 g/L equivalente ácido). As formulações de 2,4-D e glifosato foram diluídas em 10 mL de solução salina 0,9% (solução de cloreto de sódio – NaCl) nas concentrações preconizadas para cada grupo experimental.

5.1.2 Animais

Ratos Wistar machos adultos (n = 80), foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Oeste de São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil. Durante o experimento, os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno (43 cm x 30 cm x 15 cm) com maravalha de qualidade laboratorial como cama. Os ratos foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e iluminação (12L, fotoperíodo 12D). Ração para ratos (Supralab®, Alisul, Brasil) e água filtrada da torneira foram fornecidas à vontade aos animais. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UNOESTE (Protocolo nº 4868

e 6063-CEUA). Também atende aos princípios de cuidados com animais de laboratório formulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.1.3 Desenho experimental

Para cada agrotóxico, os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n = 10 animais por grupo) (Tabela 1):

- Grupo controle (GC): os ratos foram expostos diariamente a solução de soro fisiológico 0,9% (veículo) previamente nebulizada.

- Grupo de baixa concentração (GBC): os ratos foram expostos diariamente ao herbicida na concentração de 20,69 ppm (187,17 mg m⁻³ correspondendo a 3,71 × 10⁻³ g de ingrediente ativo por hectare), previamente nebulizada.

- Grupo de média concentração (GMC): os ratos foram expostos diariamente ao herbicida na concentração de 34,63 ppm (313,31 mg m⁻³ correspondendo a 6,19 × 10⁻³ g de ingrediente ativo por hectare), previamente nebulizada.

- Grupo de alta concentração (GAC): os ratos foram expostos diariamente ao herbicida na concentração de 51,66 ppm (467,93 mg m⁻³ correspondendo a 9,28 × 10⁻³ g de ingrediente ativo por hectare), previamente nebulizada.

Tabela 1 - Desenho experimental

Grupo experimental (n=10/grupo)	Sigla do grupo	Concentração de exposição aos agrotóxicos (g.i.a/ha)	Concentração de exposição aos agrotóxicos (ppm)**
Grupo controle inalatório	GC	0 (apenas veículo)	0 (apenas veículo)
Grupo de baixa concentração	GBC	3,71 × 10 ⁻³	20,69
Grupo de média concentração	GMC	6,19 × 10 ⁻³	34,63
Grupo de alta concentração	GAC	9,28 × 10 ⁻³	51,66

Fonte: Elaborado pelos autores.

As diferentes concentrações do herbicida utilizadas consideram concentrações ambientalmente relevantes, de acordo com a aplicação do produto e sua prescrição agrônoma. As concentrações de 2,4-D e glifosato utilizadas na agricultura (em gramas de ingrediente ativo por hectare - g.i.a) foram ajustadas às dimensões das caixas de exposição, conforme Parizi *et al.* (2020).

5.1.4 Protocolo de exposição ao herbicida

Duas caixas plásticas (32 x 24 x 32 cm) conectadas a um nebulizador ultrassônico (Pulmosonic Star®, Brasil) foram utilizadas para exposição, segundo Mello *et al.* (2018). Os animais foram expostos por um período de 180 dias. O tempo de exposição foi de aproximadamente 15 minutos para os animais expostos à inalação. Este foi o tempo necessário para que toda a solução fosse nebulizada.

5.1.5 Coleta de tecidos e órgãos

Ao final do período de exposição, os ratos de cada grupo experimental foram anestesiados e eutanasiados pela administração de 100mg⁻¹kg pc de tiopental sódico (ip., Syntec, EUA). O testículo direito, epidídimo e ducto deferente, próstata ventral, vesícula seminal (sem a glândula coagulante e cheia de secreção), foram removidos e seus pesos determinados.

5.1.6 Motilidade e morfologia espermática e integridade da membrana plasmática

Imediatamente após a eutanásia, o ducto deferente esquerdo foi coletado para obtenção dos espermatozoides em 1,0mL de solução salina tamponada com fosfato a 34°C. A câmara de contagem de Neubauer aquecida foi carregada com uma pequena alíquota de solução espermática. A avaliação da motilidade espermática foi realizada por estimativa visual (200 espermatozoides por animal, em duplicata) sob um microscópio (Leica DMLS) com aumento de 200X. Os espermatozoides foram classificados em imóveis, móveis sem progressão e móveis com progressão, segundo Perobelli *et al.* (2012).

O ducto deferente direito foi coletado para obtenção de espermatozoides que foram fixados em 1,0mL de formol salina. A análise da morfologia espermática foi realizada ao microscópio (ampliação de 400x) (Seed *et al.*, 1996). Os espermatozoides foram classificados de acordo com Filler (1993).

A vitalidade espermática (integridade da membrana plasmática) foi avaliada usando o teste de coloração de eosina-nigrosina (OMS, 1999). Duzentos espermatozoides foram contados em microscópio de luz (ampliação de 1000x), e

classificados em não corados (espermatozoides vivos) e corados em vermelho (espermatozoides mortos).

5.1.7 Produção diária de espermatozoides por testículo, número de espermatozoides e tempo de trânsito no epidídimo

Os testículos direitos foram descapsulados e os segmentos cabeça/corpo e cauda do epidídimo direito foram separados. Os tecidos foram congelados até a contagem de espermatozoides. As espermátides no estágio 19 da espermiogênese e os espermatozoides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram contados conforme descrito anteriormente por Robb, Amann e Killian (1978), com adaptações de Fernandes *et al.* (2007). O número de espermátides no estágio 19 foi dividido por 6,1 (que é o número de dias do ciclo seminífero em que essas espermátides estão presentes no epitélio seminífero) para calcular a produção diária de espermatozoides (PDE). O tempo de trânsito dos espermatozoides pelos segmentos do epidídimo foi determinado pela divisão do número de espermatozoides em cada segmento pela PDE (Robb; Amann; Killian, 1978).

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação dos parâmetros foram realizados ANOVA com teste de Tukey a posteriori ou teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com teste de Dunn a posteriori. Um teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar as distribuições normais antes das análises estatísticas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os herbicidas 2,4-D e glifosato são amplamente utilizados na agricultura para facilitar e aumentar a produção de alimentos. Embora a utilização desses agrotóxicos cumpra o seu papel no aumento da produção agrícola, o seu uso intensivo gera muitas consequências negativas a saúde (Arl, 2011). Estudos recentes detectaram a presença de resíduos do 2,4-D e do glifosato em alimentos e também em água potável contaminada por chuva, escoamento superficial e lixiviação em águas subterrâneas,

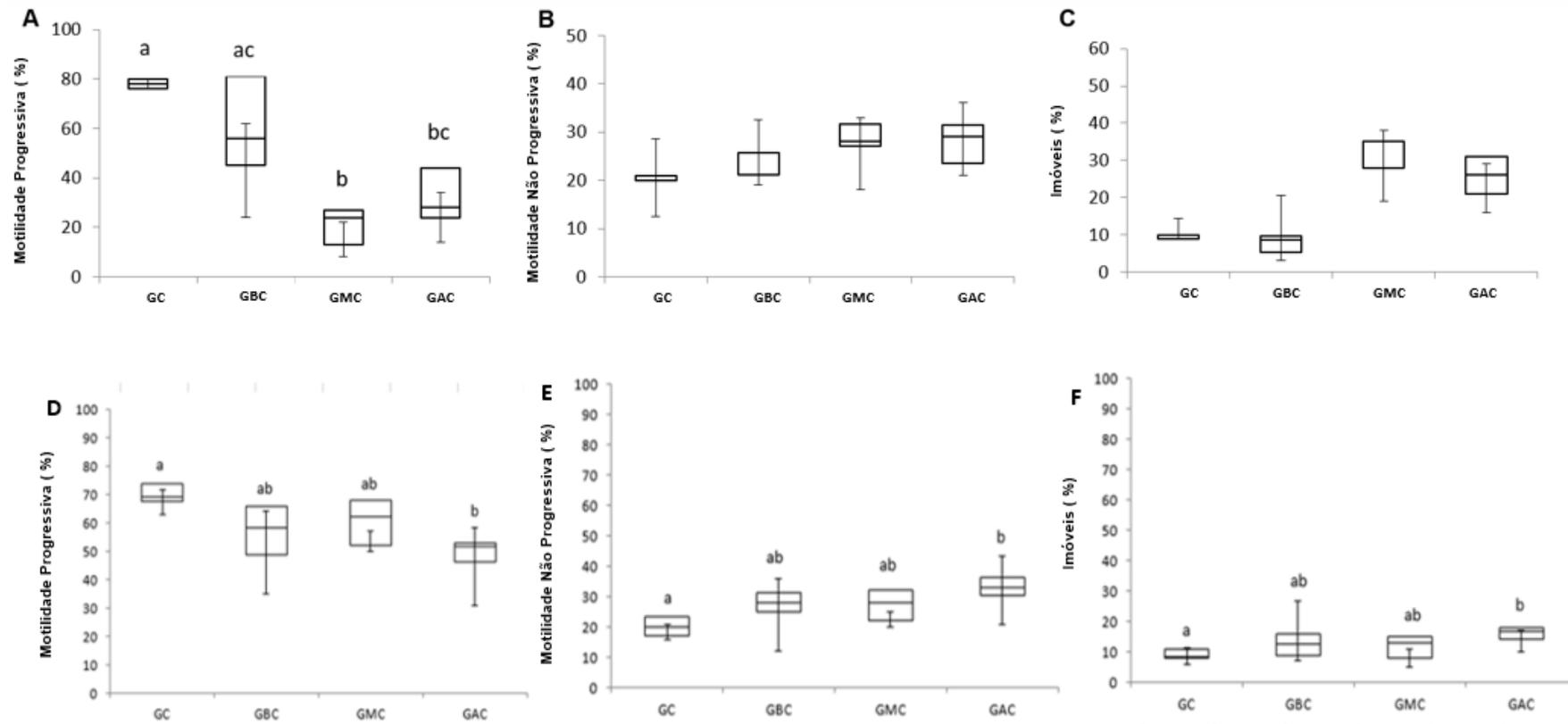
podendo assim, aumentar as prováveis rotas de exposição em animais e humanos (Bohn et al., 2013, Efsa, 2014).

Quanto aos efeitos a saúde, nos últimos anos, observou-se uma diminuição progressiva da função reprodutiva masculina (Gorga et al., 2020). A exposição aos herbicidas 2,4-D e glifosato foram associadas a efeitos adversos relacionados a função reprodutiva em humanos e roedores. Os efeitos tóxicos mais encontrados incluem a redução do volume de ejaculação, redução da concentração de testosterona, redução na produção de espermatozoides do epitélio seminífero, redução na concentração espermática, alteração na morfologia espermática, redução na motilidade espermática e aumento na taxa de aberração espermática (Anifandis et al., 2018; Bwana Mutwedu et al., 2021; Cai et al., 2017; Dai et al., 2016; de Liz Oliveira Cavalli et al., 2013; Gorga et al., 2020; Jarrell; Ahammad; Benson, 2020; Owagboriaye et al., 2017; Pham et al., 2019; Romano et al., 2012; Vanlaeys et al., 2018) o que corrobora com os resultados encontrados em nosso estudo, onde obtivemos redução significativa na qualidade e morfologia dos espermatozoides, aumento de anormalidades de cabeça e cauda e integridade de membrana plasmática.

A motilidade dos espermatozoides é um dos principais aspectos em relação à fertilização, visto que apenas os espermatozoides móveis chegam ao óvulo para a fecundação. Ao reduzir a motilidade conseqüentemente se reduz a capacidade reprodutiva desse espermatozoide (Cai et al., 2017). Diversas pesquisas têm demonstrado o efeito do 2,4-D e do glifosato sob esse parâmetro.

No presente estudo, a porcentagem de espermatozoides com movimentação progressiva dos grupos expostos ao 2,4-D, reduziu ($p < 0,05$) em GMC e GAC em relação ao GC (Figura 1A), de espermatozoides imóveis aumentou ($p < 0,05$) no GAC em comparação ao GC (Figura 1B) e sem progressão do movimento foi semelhante entre os grupos experimentais ($p < 0,05$) (Figura 1C). Já os espermatozoides com movimentação progressiva (Figura 1D), não progressiva (Figura 1E) e imóveis (Figura 1F) apresentaram-se reduzidos significativamente no GAC quando comparados ao GC e semelhantes entre os grupos exposto ao glifosato.

Figura 1- Motilidade espermática em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D e glifosato.



Figuras (A e D) Classificação móvel com movimento progressivo. (B e F) móvel sem progressão. (C e F) imóvel. Figuras (A, B e C -exposição ao 2,4-D). Figuras (D, E e F - exposição ao glifosato). Valores expressos em mediana (Q1 – Q3). Teste de Kruskal-Wallis, com teste de Dunn a posteriori. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). GC = Grupo controle. GBC = Grupo de baixa concentração. GMC = Grupo de média concentração. GAC = Grupo de alta concentração.

Um estudo realizado por Joshi *et al.*, 2021 com ratos expostos ao 2,4-D demonstrou uma redução significativa na motilidade progressiva dos espermatozoides expostos em comparação aos do grupo controle. Já no estudo de Owagboriaye *et al.*, (2017), onde os ratos foram expostos ao glifosato, houve a redução na motilidade não progressiva e imóveis.

Em nosso estudo, a taxa de espermatozoides com movimentação progressiva, não progressiva e imóveis também foram reduzidos significativamente quando comparados ao grupo controle, onde não houve exposição a nenhum dos agrotóxicos. Os grupos de média e alta concentração de exposição foram os que mais apresentaram alterações, sendo um indicativo de que a dose de exposição está diretamente relacionada aos danos na morfologia espermática conforme estudo de Joshi *et al.*, 2022.

Houve redução significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais, com consequente aumento de anormalidades de cabeça e cauda nos grupos expostos, quando comparados ao GC (Tabela 2). Enquanto a integridade da membrana plasmática diminuiu nos tres grupos expostos ao 2,4-D e nos grupos GMC e GAC expostos ao glifosato em comparação com o GC (Tabela 2).

Tabela 2- Morfologia espermática e integridade de membrana plasmática em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D e Glifosato.

Parâmetro Herbicida		GC	GBC	GMC	GAC
Morfologia normal (%)	2,4-D	96.00 (93.50-96.50)a	93.50 (89.25-94.50)ab	89.75 (84.62-90.62)b	92.00 (91.12-93.12)ab
	GLI	96.50 (94.00-99.00)a	90.00 (83.00-95.00)b	88.60 (78.00-94.00)b	86.30 (76.00-91.00)b
Anormalidades de cabeça (%)	2,4-D	2.00 (1.50-4.00)a	5.50 (1.50-8.00)b	3.50 (2.12-5.25)ab	4.50 (1.75-6.12)b
	GLI	2.00 (1.00-11.00)a	4.50 (1.00-14.00)a	5.50 (1.00-17.00)ab	8.00 (2.00-19.00)b
Anormalidades de cauda (%)	2,4-D	2.25 (1.25-3.25)a	3.00 (2.62-4.50)ab	7.00 (3.62-10.87)b	3.50 (2.87-5.12)ab
	GLI	0.27 (0.00-1.00)a	0.70 (0.00-3.00)ab	1.07 (0.00-3.00)b	1.72 (0.00-8.00)bc
Integridade de membrana Plasmática (%)	2,4-D	75.50 (71.62-79.75)a	63.50 (58.12-72.62)ab	58.50 (49.87-67.50)b	59.00 (47.50-73.50)ab
	GLI	94.25 (92.00-98.00)a	93.00 (90.50-94.50)a	89.50 (86.50-91.50)b	88.75 (86.50-93.00)b

Valores expressos em mediana (Q1 – Q3). Kruskal-Wallis com test *a posteriori* Dunn. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). GC= Grupo Controle. GBC= Grupo Baixa Concentração. GMC= Grupo Média Concentração. GAC= Grupo Alta Concentração. Exposição: 2,4-D= ácido 2,4-Diclorofenoxiacético; GLI = Glifosato). Fonte: Elaborado pelos autores.

A redução de espermatozoides morfológicamente normais e o aumento de anormalidades de cabeça e cauda de espermatozoides se assemelham as alterações encontradas no estudo de Owagboriaye *et al.* (2017). Os autores observaram uma redução significativa no número de espermatozoides morfológicamente normais em ratos expostos ao glifosato. Os autores propõem que tais alterações tenham um impacto negativo sobre a saúde reprodutiva dos ratos resultantes a exposição ao herbicida. Romano *et al.*, (2010) também encontraram uma redução significativa nas concentrações de testosterona e alterações na morfologia testicular de ratos machos Wistar tratados com Roundup em 5 mg/kg de peso corporal, 50 mg/kg de peso corporal e 250 mg/kg de glifosato. Assim como nesse estudo, a ocorrência de alterações morfológicas e a redução de espermatozoides normais com aumento de anormalidades de cabeça e cauda nos grupos expostos indicam que a utilização dos agrotóxicos 2,4-D e também do glifosato pode alterar a qualidade espermática.

Com relação ao peso dos testículos, não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 3). Os números absoluto e relativo de espermatozoides no testículo e PDE absoluta e relativa foram reduzidas ($p < 0,05$) em todos os grupos expostos aos herbicidas 2,4-D e glifosato, quando comparados ao GC. (Tabela 3).

Tabela 3- Contagem de espermatozoides no testículo em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D e glifosato

Parâmetro	Exposição	GC	GBC	GMC	GAC
Peso do Testículo (g)	2,4-D	1.59±0.12	1.60±0.14	1.61±0.10	1.61±0.15
	GLI	1.58±0.10	1.59±0.11	1.59±0.13	1.60±0.12
Número de espermatozoides (x10 ⁶)	2,4-D	199.10±24.49a	178.50±38.09 b	172.14±17.04b	180.04±24.54b
	GLI	196.15±20.43a	181.08±19.98b	178.49±11.31b	176.70±18.18b
Número de espermatozoides por grama de órgão (x10 ⁶ /g)	2,4-D	128.20±18.89a	117.84±24.40b	112.91±15.89b	110.90±13.57b
	GLI	127.11±12.71a	118.55±19.20b	117.00±13.77b	116±15.77b
Produção diária de espermatozoides (x10 ⁶ /Testículo/dia)	2,4-D	33.35±4.01a	24.61±6.24b	23.22±2.79b	22.51±4.02b
	GLI	31.44±3.12a	22.12±2.67b	22.10±1.89b	21.91±1.76b
Produção diária relativa de espermatozoides (x10 ⁶ /g/dia)	2,4-D	22.82±3.09a	18.41±3.86b	17.29±2.60b	17.30±2.22b
	GLI	21.88±2.44a	17.01±2.52b	16.23±2.61b	16.68±2.30b

Valores expressos em média ± Desvio Padrão (DP). ANOVA com *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05). GC= Grupo Controle. GBC= Grupo Baixa Concentração. GMC= Grupo Média Concentração. GAC= Grupo Alta Concentração. Exposição: 2,4-D= ácido 2,4-Diclorofenoxiacético; GLI = Glifosato).

Os números absolutos e relativos de espermatozoides na cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram reduzidos (p < 0,05) no GMC e GAC quando comparados ao GC e GBC após exposição inalatória (Tabela 4). Não houve atraso significativo (p < 0,05) no tempo de trânsito espermático na cabeça/corpo e cauda do epidídimo em comparação ao GC (Tabela 4).

Tabela 4- Contagem de espermatozoides no epidídimo em ratos do grupo controle e expostos ao 2,4-D e glifosato

Parâmetro	Exposição	GC	GBC	GMC	GAC
Cabeça/corpo do epidídimo					
Número de espermatozoides ($\times 10^6$)	2,4-D	135.91 \pm 24.06a	117.10 \pm 21.27b	112.41 \pm 15.04b	109.45 \pm 21.69b
	GLI	136.74 \pm 22.60a	114.19 \pm 19.97b	109.78 \pm 21.09b	107.50 \pm 22.06b
Número de espermatozoides por grama de órgão ($\times 10^6$ /g)	2,4-D	347.92 \pm 23.56a	328.14 \pm 34.84b	322.18 \pm 28.93b	321.46 \pm 23.91b
	GLI	345.39 \pm 22.70a	321.30 \pm 29.82b	319.31 \pm 22.83b	318.76 \pm 21.81b
Tempo de trânsito (dias)	2,4-D	4.47 \pm 1.25	4.27 \pm 1.51	4.33 \pm 0.85	4.13 \pm 1.05
	GLI	4.95 \pm 1.14	4.87 \pm 1.01	4.73 \pm 1.05	4.11 \pm 1.04
Cauda epidídimo					
Número de espermatozoides ($\times 10^6$)	2,4-D	226.52 \pm 43.23a	204.08 \pm 35.90b	200.36 \pm 53.34b	198.09 \pm 37.08b
	GLI	224.25 \pm 41.33a	202.06 \pm 32.90b	198.37 \pm 42.34b	197.04 \pm 32.08b
Número de espermatozoides por grama de órgão ($\times 10^6$ /g)	2,4-D	980.03 \pm 84.02a	974.93 \pm 67.93a	932.30 \pm 104.99b	926.75 \pm 78.18b
	GLI	984.06 \pm 89.01a	976.93 \pm 68.77a	921.83 \pm 102.97b	922.97 \pm 77.24b
Tempo de trânsito (dias)	2,4-D	6.67 \pm 1.55	7.72 \pm 2.76	7.62 \pm 1.47	7.19 \pm 2.43
	GLI	6.56 \pm 1.57	7.52 \pm 2.46	7.72 \pm 1.62	7.09 \pm 2.03

Valores expressos em média \pm Desvio Padrão (DP). ANOVA com *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). GC= Grupo Controle. GBC= Grupo Baixa Concentração. GMC= Grupo Média Concentração. GAC= Grupo Alta Concentração. Exposição: 2,4-D= ácido 2,4-Diclorofenoxiacético; GLI = Glifosato).

Os avanços nas pesquisas sobre os efeitos tóxicos do 2,4-D e do glifosato são de grande interesse para a população mundial, visto que são os herbicidas mais utilizados em todo o mundo. De acordo com a literatura, tanto o 2,4-D como o glifosato atuam no sistema reprodutivo masculino e seus efeitos deletérios à saúde devem ser levados em consideração pelas agências reguladoras, para que assim se estabeleçam melhores critérios sobre o uso seguro destes herbicidas, avaliando novos métodos de produção e adaptando estratégias de prevenção dos possíveis impactos do agrotóxico para a saúde.

5.4 CONCLUSÃO

A exposição crônica inalatória aos herbicidas 2,4-D e ao glifosato em diferentes concentrações causou efeitos deletérios na espermatogênese e qualidade espermática em ratos machos adultos.

Este é o primeiro estudo que utilizou o método de exposição inalatória crônica utilizando os agrotóxicos em doses ambientalmente relevantes, com base no uso agrônomo dos herbicidas. Esse método de exposição simula a pulverização ambiental.

Embora muitos efeitos tóxicos já foram demonstrados em modelos experimentais, mais estudos são necessários para esclarecer os possíveis efeitos do glifosato na saúde reprodutiva humana utilizando o mesmo método utilizado neste estudo, visto que os estudos encontrados na literatura utilizam o método de exposição por gavagem em doses agudas ou subcrônicas de agrotóxicos.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERNANDES, G. S. A. et al. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 106-112, 2007. DOI <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.09.002>

GORGA, A. et al. In vitro effects of glyphosate and Roundup on Sertoli cell physiology. **Toxicology in Vitro**, v. 62, p. 104682, 2020. DOI [_](#).

JARRELL, Z. R.; AHAMMAD, M. U.; BENSON, A. P. Glyphosate-based herbicide formulations and reproductive toxicity in animals. **Veterinary and animal science**, v. 10, p. 100126, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.vas.2020.100126>.

JOSHI, S. C. et al. Evaluation of toxic effect of 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) on fertility and biochemical parameters of male reproductive system of albino rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 338-342, 2012.

OWAGBORIAYE, F. O. et al. Reproductive toxicity of Roundup herbicide exposure in male albino rat. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 69, n. 7, p. 461-468, 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.04.007>.

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 103-107, 1978. DOI <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540103>

ROMANO, M. A. et al. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 4, p. 663-673, 2012. DOI <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0788-9>.

VANLAEYS, A. et al. Formulants of glyphosate-based herbicides have more deleterious impact than glyphosate on TM4 Sertoli cells. **Toxicology in Vitro**, v. 52, p. 14-22, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.002>.

WHO (World Health Organization). Chemical safety: Pesticides. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/chemical-safety-pesticides>. Acesso em: 18/02/2023

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição oral e inalatória aos herbicidas glifosato e 2,4-D em ratos machos em diferentes concentrações levou a alterações nos parâmetros espermáticos, produção de espermatozoides e histologia testicular. Os resultados indicam que a exposição a esses agrotóxicos podem levar a impactos sobre a fertilidade e alterações na morfofisiologia reprodutiva de ratos machos.

Este é o primeiro estudo a utilizar o método de nebulização de alimentos em concentrações ambientalmente relevantes com base no uso agrônomo dos herbicidas, simulando a pulverização ambiental para avaliação reprodutiva. Esse método se mostra mais relevante quando comparado a outros experimentos que utilizam o método de exposição por meio de gavagem e em exposições agudas ou subcrônicas, não sendo semelhantes a real exposição humana.

A ampla utilização desses agrotóxicos é preocupante, visto os impactos que tem sido identificados na saúde reprodutiva e o possível comprometimento da morfofisiologia reprodutiva e danos a produção espermática.

É necessário a realização de mais estudos que utilizem o método de exposição crônica e com doses que se assemelham a doses reais, utilizando o método de

pulverização de alimentos, visto a importância em se identificar os danos que esses agrotóxicos podem causar ao sistema reprodutor e a saúde em geral, bem como, seus possíveis mecanismos de toxicidade.

Por fim, é importante que a informação gerada com este estudo seja disseminada para a sociedade e principais atores envolvidos na regulação desses produtos. Assim, buscando fortalecer políticas públicas em relação ao uso desses herbicidas, que visem práticas agrícolas sustentáveis e o uso consciente de agroquímicos, para garantir o equilíbrio entre a produção e a proteção da saúde humana e ambiental.

REFERÊNCIAS

- ABARIKWU, S. O.; AKIRI, O. F.; DUROJAIYE, M. A.; ADENIKE, A. Combined effects of repeated administration of Bretmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on testosterone, oxidative stress and sperm quality of Wistar rats. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 25, n. 1, p. 70-80, 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/15376516.2014.989349?journalCode=itxm20>. Acesso em: 19 jun. 2022.
- ABUBAKAR, Y.; TIJJANI, H.; EGBUNA, C.; ADETUNJI, C. O.; KALA, S.; KRYEZIU, T. L.; IFEMEJE, J. C.; PATRICK-IWUANYANWU, K. C. Pesticides, history, and classification. *In: Natural remedies for pest, disease and weed control*. [S. l.]: Academic Press, 2020. p. 29-42. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128193044000038>. Acesso em: 28 mai. 2022.
- ACAYABA, R. D. **Ocorrência de agrotóxicos usados na cana-de-açúcar em corpos d'água do Estado de São Paulo**. 2017. 83 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia, Limeira, SP, 2017. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/293>. Acesso em: 2 dez. 2023.
- AGRAWAL, A.; PANDEY, R.; SHARMA, B. Water Pollution with Special Reference to Pesticide Contamination in India. **Journal of Water Resource and Protection**, v. 2, n. 5, p. 432-448, 2010. Disponível em: https://www.scirp.org/html/6-9401050_1793.htm?pagespeed=noscript. Acesso em: 18 jun. 2022.
- ALMEIDA, T. D. P.; MACENA, D. A.; SIMÕES, J. S. T.; MARECO, E. A.; ROSSI, R. C.; FAVARETO, A. P. A. Análise de parâmetros de qualidade da água e teste de genotoxicidade em peixes da bacia hidrográfica do rio Pirapozinho-SP, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e46711319309-e46711319309, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/19309/23426>. Acesso em: 08 jun. 2022.
- AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R. dos; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química nova**, v. 25, p. 589-593, 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/Z9DJG6fy8ZQR79ch8cdxwVP/?lang=pt>. Acesso em: 19 jun. 2022.
- AMER, S. M.; ALY, F. A. E. Genotoxic effect of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2, 4-dichlorophenol in mouse. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 494, n. 1-2, p. 1-12, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383571801001462>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- 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. **International journal of environmental**

research and public health, v. 15, n. 6, p. 1117, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/15/6/1117>. Acesso em: 20 jun. 2022.

ARAB, S. A.; NIKRAVESH, M. R.; JALALI, M.; FAZEL, A. Evaluation of oxidative stress indices after exposure to malathion and protective effects of ascorbic acid in ovarian tissue of adult female rats. **Electronic physician**, v. 10, n. 5, p. 6789, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6033125/pdf/epj-10-6789.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2022.

ARANTES, P. B. **Influência do herbicida Glifosato (N-Fosfometil) Glicina) na formação de biomassa da alga Pseudokirchneriella subcapitata (Chlorophyceae)**. 2010. 79 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ecologia)- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2010. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/5b73cb01-8050-4c47-bf5e-db6c5a449fc9/content>.

ARBUCKLE, T. E.; SCHRADER, S. M.; COLEC, D.; HALL, C.; BANCEJ, C. M.; TURNER, L. A.; CLAMAN, P. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid residues in semen of Ontario farmers. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 6, p. 421-429, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S089062389900057X>. Acesso em: 20 jun. 2022.

Augusto, L. G. D. S., Tambellini, A. T., Miranda, A. C. D., Carneiro, F. F., Castro, H., Porto, M. F. D. S., Schütz, G. E. Desafios para a construção da "Saúde e Ambiente" na perspectiva do seu Grupo Temático da Associação Brasileira de Saúde Coletiva. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, p. 4081-4089, 2014.

BAJWA, U.; SANDHU, K. S. Effect of handling and processing on pesticide residues in food-a review. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 2, p. 201-220, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-011-0499-5>. Acesso em: 18 jun. 2022.

BARONE, L. A.; MELAZZO, E. S.; SILVA, A. A. Célula do Pontal do Paranapanema – SP. Acompanhamento e Informação para o desenvolvimento rural. **Ministério do Desenvolvimento Agrário**, Presidente Prudente, n 5, p. 1-116, 2011.

BARRETO, M. J. Dinâmica Geográfica da Expansão da agroindústria canavieira no Pontal do Paranapanema e os desdobramentos para o trabalho: os casos da Usina Alvorada do Oeste e da Destilaria Decasa. **Revista Pegada**, v. 9, n. 1, jun. 2008.

BEDOS, C.; LOUBET, B.; BARRIUSO, E. Gaseous deposition contributes to the contamination of surface waters by pesticides close to treated fields. A process-based model study. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 24, p. 14250-14257, 2013. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bk-2017-1249.ch001#>. Acesso em: 18 jun. 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de agrotóxicos em alimentos (PARA)**. Relatório de Atividades de 2012. Brasília: ANVISA, 2014. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt->

br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3785json-file-1. Acesso em: 06 dez. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Marco Regulatório – Reclassificação toxicológica de agrotóxicos**. Brasília: ANVISA, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos>. Acesso em: 07 dez. 2023.

BRASIL. Casa Civil. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm. Acesso em: 27 out. 2020.

BOULAKOUD, M. S.; MOSBAH, R.; ABDENNOUR, C.; KHELILI, K. The toxicological effects of the herbicide 2, 4-DCPA on progesterone levels and mortality in Wistar female rats. **Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)**, v. 66, n. 2b, p. 891-895, 2001. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/12425117>. Acesso em: 20 jun. 2022.

BURNS, C. J.; SWAEN, G. M. H. Review of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biomonitoring and epidemiology. **Critical reviews in toxicology**, v. 42, n. 9, p. 768-786, 2012. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/10408444.2012.710576?needAccess=true>. Acesso em: 20 jun. 2022.

CAI, W.; JI, Y.; SONG, X.; GUO, H.; HAN, L.; ZHANG, F.; LIU, X.; ZHANG, H.; ZHU, B.; XU, M. Effects of glyphosate exposure on sperm concentration in rodents: A systematic review and meta-analysis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 55, p. 148-155, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668917302041>. Acesso em: 20 jun. 2022.

CAMPOS, S. X. D.; VIEIRA, E. M. Estudo da degradação do herbicida ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) por meio da radiação gama do cobalto-60 em solução aquosa contendo ácido húmico. **Química Nova**, v. 25, p. 529-532, 2002.

CHARLES, J. M.; HANLEY JR., T. R.; WILSON, R. D.; RAVENZWAAY, B. V.; BUS, J. S. Developmental toxicity studies in rats and rabbits on 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and its forms. **Toxicological Sciences**, v. 60, n. 1, p. 121-131, 2001. Disponível em: <https://academic.oup.com/toxsci/article/60/1/121/1686519?login=false>. Acesso em: 20 jun. 2022.

CHOMA, D.; WESTEEL, V.; DUBIEZ, A.; GORA, D.; MEYER, V.; PERNET, D.; POLIO, J. C.; MADROSZYK, A.; GIBEY, R.; LAPLANTE, J. J.; DEPIERRE, A.; DALPHIN, J. C. Respective influence of occupational and personal factors on respiratory function in dairy farmers. **Revue des Maladies Respiratoires**, v. 15, n. 6,

p. 765-772, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9923031/>. Acesso em: 19 jun. 2022.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological reviews**, v. 52, n. 1, p. 198-236, 1972.

CORCINO, C. O.; TELES, R. B. A.; ALMEIDA, J. K. G. S.; LIRANI, L. S.; ARAÚJO, C. R. M.; GONSALVES, A.A.; MAIA, G. L. A. Avaliação do efeito do uso de agrotóxicos sobre a saúde de trabalhadores rurais da fruticultura irrigada. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, p. 3117-3128, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.org/article/csc/2019.v24n8/3117-3128/pt/>. Acesso em: 14 jun. 2022.

CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human reproduction update**, v. 15, n. 2, p. 213-227, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/humupd/article/15/2/213/626677?login=false>. Acesso em: 27 jun. 2022.

COSENTINO, M. J.; COCKETT, A. T. K. Structure and function of the epididymis. **Urological research**, v. 14, p. 229-240, 1986.

COSTA, S. F.; NOGUEIRA, J. C.; SOARES, B. A.; AMBRÓSIO, N. A.; CHAVES, A. S.; MELO, L. Q. DE; ZANGERONIMO, M. G. Morfologia do escroto, do testículo e das vias espermáticas de *Metachirus nudicaudatus* (Geoffroy, 1803), Didelphidae-Marsupialia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 69-83, 2015. Disponível em: <http://old.scielo.br/pdf/pvb/v35s1/1678-5150-pvb-35-s1-00069.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2022.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 15, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/yNyGrTWjHPzFMhRxSYFwtSz/?lang=pt>. Acesso em: 19 jun. 2022.

CUNHA, F. L. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. **Rio de Janeiro: AS-PTA-Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa**, v. 1, p. 190, 2011.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; OLIVEIRA, R. T.; ANDRADE, A. J. M.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of toxicology**, v. 81, n. 9, p. 665-673, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-006-0170-5>. Acesso em: 19 jun. 2022.

DALLEGRAVE, E.; SEBEN, V. C. Toxicologia clínica: aspectos teórico-práticos. *In*: Gonzáles, F. H. D.; Silva, S. C. **Patologia clínica veterinária: texto introdutório**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 206-289, 2008. Disponível em: https://www.ufrgs.br/lacvet/site/wp-content/uploads/2013/05/patol_clin.pdf#page=211. Acesso em: 11 jun. 2022.

DE ASSUNÇÃO, T. D. O. G., THONI, L. S., GOMES, F. B. R., BOTTREL, S. E. C., DE OLIVEIRA PEREIRA, R. VI-1724 - Comercialização de agrotóxicos no Brasil. **31º Congresso da ABES**. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Taciane-Assuncao/publication/369998577_COMERCIALIZACAO_DE_AGROTOXICOS_NO_BRASIL/links/64389620609c170a1313490e/COMERCIALIZACAO-DE-AGROTOXICOS-NO-BRASIL.pdf. Acesso em 07 dez. 2023.

DE MELO AGGIO, C., LEITE, A., MALAQUIAS, T. D. S. M., HADDAD, M. D. C. F. L. Caracterização das notificações de intoxicações por agrotóxicos na 5ª Regional de Saúde do Paraná (PR). **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 2, p. e5816-e5816, 2021.

DE MORAES, R. F. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**: texto para Discussão. Rio de Janeiro: Ipea, 2019. Disponível em: <https://www.econstor.eu/bitstream/10419/211457/1/1677273127.pdf>. Acesso em: 27 out. 2020.

DE OLIVEIRA SILVA, S. L.; COSTA, E. A. Intoxicações por agrotóxicos no estado do Tocantins: 2010–2014. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 6, n. 4, p. 13-22, 2018. Disponível em: <https://www.redalyc.org/journal/5705/570561761003/570561761003.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2022.

DE SIQUEIRA, D., DE MOURA, R. M., LAURENTINO, G. E. C., DE ARAÚJO, A. J., CRUZ, S. L. Análise da exposição de trabalhadores rurais a agrotóxicos. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 182-191, 2013.

DETTIN, L.; RAVINDRANATH, N.; HOFMANN, M. C.; DYM, M. Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 5, p. 1565-1571, 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/69/5/1565/2712818?login=false>. Acesso em: 29 jun. 2022.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Aquatic environment contamination by pesticides. Case study: Water used for human consumption in Primavera do Leste, Mato Grosso-Preliminary analyses. **Química Nova**, v. 24, p. 27-36, 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/MCZvWhHnCkvKNH4srCpVDBS/abstract/?format=html&lang=en>. Acesso em: 18 jun. 2022.

DUTRA, R. M. S.; DA SOUZA, M. M. O. Impactos negativos do uso de agrotóxicos à saúde humana. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 13, n. 24, p. 127, 2017.

EGLER, M., BUSS, D. F., MOREIRA, J. C., BAPTISTA, D. F. Influence of agricultural land-use and pesticides on benthic macroinvertebrate assemblages in an agricultural river basin in southeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, p. 437-443, 2012.

FAREED, M.; PATHAK, M. K.; BIHARI, V.; KAMAL, R.; SRIVASTAVA, A. K. Adverse respiratory health and hematological alterations among agricultural workers occupationally exposed to organophosphate pesticides: a cross-sectional study in North India. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69755, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069755>. Acesso em: 17 jun. 2022.

FILLER, R. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. **Methods in Toxicology**, v. 3, p. 334-343, 1993.

GERAGE, J. M.; MEIRA, A. P. G.; DA SILVA, M. V. Food and nutrition security: pesticide residues in food. **Nutrire**, v. 42, n. 1, p. 1-9, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s41110-016-0028-4.pdf>. Acesso em: 27 out. 2020. DOI 10.1186/s41110-016-0028-4.

GORGA, A.; RINDONE, G. M.; CENTOLA, C. L.; SOBARZO, C.; PELLIZZARI, E. H.; CAMBEROS, M. D. C.; CIGORRAGA, S. B.; RIERA, M. F.; GALARDO, M. N.; MERONI, S. B. In vitro effects of glyphosate and Roundup on Sertoli cell physiology. **Toxicology in Vitro**, v. 62, p. 104682, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233319304588>. Acesso em: 20 jun. 2022.

HAJŠLOVÁ, J.; ZROSTLIKOVA, J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 181-197, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967303005399>. Acesso em: 18 jun. 2022.

HAMILTON, D.; AMBRUS, A.; DIETERLE, R.; FELSOT, A.; HARRIS, C.; PETERSEN, B.; RACKE, K.; WONG, S. S.; GONZALEZ, R.; TANAKA, K.; EARL, M.; ROBERTS, G.; BHULA, R. Pesticide residues in food—acute dietary exposure. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 60, n. 4, p. 311-339, 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ps.865>. Acesso em: 18 jun. 2022.

HASSANIN, N. M.; AWAD, O. M.; EL-FIKI, S.; ABOU-SHANAB, R. A.; ABOU-SHANAB, A. R. A.; AMER, R.A. Association between exposure to pesticides and disorder on hematological parameters and kidney function in male agricultural workers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 31, p. 30802-30807, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-8958-9>. Acesso em: 17 jun. 2022.

HERMO, L.; ROBAIRE, B. Epididymal cell types and their functions. The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice: A Comprehensive Survey of the Efferent Ducts, **The Epididymis and the Vas Deferens**, p. 81-102, 2002.

HOPPIN, J. A.; UMBACH, D. M.; KULLMAN, G. J.; HENNEBERGER, P. K.; LONDON, S. J.; ALAVANJA, M. C. R.; SANDLER, D. P. Pesticides and other agricultural factors associated with self-reported farmer's lung among farm residents in the Agricultural Health Study. **Occupational and environmental medicine**, v. 64,

n. 5, p. 334-341, 2007. Disponível em: <https://oem.bmj.com/content/64/5/334>. Acesso em: 19 jun. 2022.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2017**. Rio de Janeiro: IBGE, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>. Acesso em: 30 mai. 2022.

JALLOW, M. F. A.; AWADH, D. G.; ALBAHO, M. S.; DEVI, V.; THOMAS, B. T. Pesticide knowledge and safety practices among farm workers in Kuwait: results of a survey. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 4, p. 340, 2017.

JOSEPH, A.; SHUR, B. D.; HESS, R. A. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 2, p. 207-217, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/84/2/207/2530270?login=false>. Acesso em: 27 jun. 2022.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAYA, Y.; BAS, O.; HANCI, H.; CANKAYA, S.; NALBANT, I.; ODACI, E.; UYDU, H. A.; ASLAN, A. Acute renal involvement in organophosphate poisoning: histological and immunochemical investigations. **Renal failure**, v. 40, n. 1, p. 410-415, 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/0886022X.2018.1489289?needAccess=true>. Acesso em: 20 jun. 2022.

KENNEDY, S. W.; HEIDGER JR, P. M. Fine structural studies of the rat vas deferens. **The Anatomical Record**, v. 194, n. 1, p. 159-179, 1979. Disponível em: <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ar.1091940111>. Acesso em: 29 jun. 2022.

KIM, K.; KABIR, E.; JAHAN, S. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the total environment**, v.575, p. 525-535, 2016.

KIRCHHOFF, C. Gene expression in the epididymis. **International review of cytology**, v. 188, p. 133-202, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0074769608615673>. Acesso em: 25 jun. 2022.

KNOBLAUGH, S. E.; ADISSU, H. A.; MCKERLIE, C.; CARDIFF, R. D. Male reproductive system. *In: Comparative Anatomy and Histology*. 2017. 2. ed. p. 335-363.

LAZZARI, F. M.; SOUZA, A. S. **Revolução Verde: impactos sobre os conhecimentos tradicionais**. Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, 2017.

LEE, K.; PARK, J. H.; BUNICK, D.; LUBAHN, D. B.; BAHR, J. M. Morphological comparison of the testis and efferent ductules between wild-type and estrogen

receptor α knockout mice during postnatal development. **Journal of anatomy**, v. 214, n. 6, p. 916-925, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1469-7580.2009.01080.x>. Acesso em: 20 jun. 2022.

LIMA, F. A. N. S.; PIGNATI, W. A.; PIGNATTI, M. G. A extensão do 'agro'e do tóxico: saúde e ambiente na terra indígena Marãiwatsédé, Mato Grosso. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 28, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cadsc/a/YMpNvxjbJqky6cmtFJCVfty/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 18 jun. 2022.

MAGALHÃES, A. F. A.; CALDAS, E. D. Exposição e intoxicação ocupacional a produtos químicos no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 72, p. 32-40, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/reben/a/CDGyFY9g6qNSq4ywcRsGhff/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 14 jun. 2022.

MALHAT, F. M.; LOUTFY, N. M.; GREISH, S. S.; AHMED, M. T. A review of environmental contamination by organochlorine and organophosphorus pesticides in Egypt. **J. Toxicol. Risk Assess**, v. 4, p. 13, 2018. Disponível em: https://web.archive.org/web/20190427183702id_/https://www.clinmedjournals.org/articles/ijtra/international-journal-of-toxicology-and-risk-assessment-ijtra-4-013.pdf?jid=ijtra. Acesso em: 18 jun. 2022.

MAROUANI, N.; TEBOURBI, O.; CHERIF, D.; HALLEGUE, D.; YACOUBI, M. T.; SAKLY, M.; BENKHALIFA, M.; BEN RHOUMA, K. 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, n. 1, p. 519-526, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-016-7656-3>. Acesso em: 20 jun. 2022.

MARTY, M. S.; NEAL, B. H.; ZABLOTNY, C. L.; YANO, B. L.; ANDRUS, A. K.; WOOLHISER, M. R.; BOVERHOF, D. R.; SAGHIR, S. A.; PERALA, A. W.; PASSAGE, J. K.; LAWSON, M. A.; BUS, J. S.; LAMB, J. C.; HAMMOND, L. An F1-extended one-generation reproductive toxicity study in Crl: CD (SD) rats with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **toxicological sciences**, v. 136, n. 2, p. 527-547, 2013. Disponível em: <https://academic.oup.com/toxsci/article/136/2/527/1682186?login=false>. Acesso em: 20 jun. 2022.

MAURYA, P. K.; MALIK, D. S. Bioaccumulation of xenobiotics compound of pesticides in riverine system and its control technique: a critical review. **Journal of Industrial Pollution Control**, v. 32, n. 2, 2016. Disponível em: <https://www.icontrolpollution.com/articles/bioaccumulation-of-xenobiotics-compound-of-pesticides-in-riverine-system-and-its-control-technique-a-critical-review-.php?aid=82747>. Acesso em: 19 jun. 2022.

MELLO, F. A.; QUINALLIA, G.; MARION, A. L.; JORGE, F. C.; MARINELLI, L. M.; SALGE, A. K. M.; ROSSI E SILVA, R. C. Evaluation of the nasal cavity mice

submitted to the inhalation exposure to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **Medicina (Ribeirão Preto, Online)**, v. 51, n. 4, p. 247-253, 2018.

MONQUERO, P. A.; INÁCIO, E. M.; SILVA, A. C. Levantamento de agrotóxicos e utilização de equipamento de proteção individual entre os agricultores da região de Araras. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 135-139, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/c9fJGQbVGGDJRxffHTyZmDk/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 20 jun. 2022.

MONTEIRO, C. D.; BICUDO, S. D.; TOMA, H. S. O papel das células de Sertoli na espermatogênese. **Pubvet**, v. 4, p. 1-17, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/141236>.

MURAKAMI, Y.; PINTO, N. F.; ALBUQUERQUE, G. S. C.; PERNA, P. O.; LACERDA, A. Intoxicação crônica por agrotóxicos em fumicultores. **Saúde em Debate**, v. 41, p. 563-576, 2017. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/sdeb/2017.v41n113/563-576/pt>. Acesso em: 20 jun. 2022.

MUSSY, M. H.; BRUCHA, G.; REIS, M. G.; USHIMARU, P. I.; YAMASHITA, M.; BASTOS, W. R. Identificação de microrganismos resistentes ao herbicida ácido 2, 4-diclorofenóxiacético (2,4-D) em solos de Rondônia, Brasil. **Interciencia**, v. 38, n. 5, p. 353-357, 2013. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33926990008.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2022.

NEVES, P. D. M.; MENDONÇA, M. R.; BELLINI, M.; PÔSSAS, I. B. Intoxicação por agrotóxicos agrícolas no estado de Goiás, Brasil, de 2005-2015: análise dos registros nos sistemas oficiais de informação. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, p. 2743-2754, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/WRmbBWrNHZVgKDbyBNMJjy/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 14 jun. 2022.

PALMA, D. C. A.; LOURENCETTI, C. Agrotóxicos em Água e Alimentos: Risco à Saúde Humana. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 7-21, 2011. Disponível em: <https://www.revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/108>. Acesso em: 19 jun. 2022.

PARIZI, J. L. S.; DE MELLO ODORIZZI, G. A. S.; SATO, G. M. R. H.; PATRÃO, I. B.; NAI, G. A. Oral mucosa changes associated with chronic oral and inhalation exposure to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) in Wistar rats. **Toxicology Research**, v. 9, n. 6, p. 746-757, 2020.

PATEL, O.; SYAMLAL, G.; HENNEBERGER, P. K.; ALARCON, W. A.; MAZUREK, J. M. Pesticide use, allergic rhinitis, and asthma among US farm operators. **Journal of agromedicine**, v. 23, n. 4, p. 327-335, 2018. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1059924X.2018.1501451>. Acesso em: 19 jun. 2022.

PEREIRA, J. N.; CORRÊA, J. A. J. Análise das intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola no Brasil entre 2009 e 2014. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 6, p. 159-168, 2018. Disponível em: <https://sustenere.co/index.php/rica/article/view/CBPC2179-6858.2018.006.0017>. Acesso em: 06 dez. 2023.

PEREIRA, V. R.; PEREIRA, D. R.; VIEIRA, K. C. M. T.; RIBAS, V. P.; CONSTANTINO, C. J. L.; ANTUNES, P. A.; FAVARETO, A. P. A. Sperm quality of rats exposed to difenoconazole using classical parameters and surface-enhanced Raman scattering: classification performance by machine learning methods. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 34, p. 35253-35265, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-019-06407-0>. Acesso em: 17 jun. 2022.

PERES, A. F.; SERRA, E. F.; PETER, C. M.; KRUMMENAUER, A.; ZANI, J. L. Atividade leiteira e mão de obra familiar: o trabalho e os riscos à saúde do homem do campo no sul do Brasil. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 9, n. 2, 2019. Disponível em: <https://desafioonline.ufms.br/index.php/sameamb/article/view/7751>. Acesso em: 17 jun. 2022.

PEROBELLI, J. E.; ALVES, T. R.; DE TOLEDO, F. C.; FERNANDEZ, C. D.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; KLINEFELTER, G. R.; KEMPINAS, W. DE G. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. **Reproductive toxicology**, v. 33, n. 3, p. 308-315, 2012.

PETARLI, G. B.; CATTAFESTA, M.; da LUZ, T. C.; ZANDONADE, E.; BEZERRA, O. M. P. A.; SALAROLI, L. B. Exposição ocupacional a agrotóxicos, riscos e práticas de segurança na agricultura familiar em município do estado do Espírito Santo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 44, 2019.

PHAM, T. H.; DERIAN, L.; KERVARREC, C.; KERNANEC, P. Y.; JÉGOU, B.; SMAGULOVA, F.; GELY-PERNOT, A. Perinatal exposure to glyphosate and a glyphosate-based herbicide affect spermatogenesis in mice. **Toxicological Sciences**, v. 169, n. 1, p. 260-271, 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/toxsci/article/169/1/260/5345574?login=false>. Acesso em: 20 jun. 2022.

PIGNATI, W. A.; SOUZA e LIMA, F. A. N. de; de LARA, S. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; COSTA LEÃO, L. H. da; PIGNATTI, M. G. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/grnBRDjmtcBhm6CLprQvN/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 20 jun. 2022.

RESPIRATORY HEALTH HAZARDS IN AGRICULTURE. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 158, n. 5 II, 1998. Disponível em: https://www.atsjournals.org/doi/epdf/10.1164/ajrccm.158.supplement_1.rccm1585s1?role=tab. Acesso em: 19 jun. 2022.

RISTOW, L. P.; BATTISTI, I. D. E.; STUMM, E. M. F.; MONTAGNER, S. E. D. Fatores relacionados à saúde ocupacional de agricultores expostos a agrotóxicos. **Saúde e Sociedade**, v. 29, p. e180984, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.org/article/sausoc/2020.v29n2/e180984/pt/>. Acesso em: 14 jun. 2022.

ROCHA, D. R.; NERY, J. F.; FURINI, L. N.; CONSTANTINO, C. J. L.; ELLER, L. K. W.; NAI, G. A.; NAKAGAKI, W. R. Effects of consumption of contaminated feed with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) on the rat tibia: analysis by Raman spectroscopy and mechanical properties. **Lasers in Medical Science**, v. 35, p. 1703-1709, 2020.

RODRIGUES, J. A.; FAVARETTO A. L. V. Sistema Reprodutor. *In*: Aires, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999.

RODRÍGUEZ-GIL, J. L.; PROSSER, R. S.; DUQUE, S. O.; SALOMÃO, K. R. Ecotoxicology of glyphosate, its formulants, and environmental degradation products. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 255, p. 129-205, 2021.

RODRÍGUEZ, C. M.; KIRBY, J. L.; HINTON, B.T. The development of the epididymis. *In*: **The epididymis: From molecules to clinical practice**. Boston, MA: Springer, 2002. p. 251-267. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-0679-9_14. Acesso em: 25 jun. 2022.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; BERNARDI, M.; FURTADO, P. V.; OLIVEIRA, C. A. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 4, p. 309-317, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-009-0494-z>. Acesso em: 19 jun. 2022.

ROMANO, M. A.; ROMANO, R. M.; SANTOS, L. D.; WISNIEWSKI, P.; CAMPOS, D. A.; de SOUZA, P. B.; VIAU, P.; BERNARDI, M. M.; NUNES, M. T.; DE OLIVEIRA, C. A. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 4, p. 663-673, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22120950/>. Acesso em: 19 jun. 2022.

SALATI, P. **Liberção de agrotóxicos em 2021 bate novo recorde na série histórica; maioria é genérico**. Globo.com, 2021. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2021/12/06/liberacao-de-agrotoxicos-em-2021-bate-novo-recorde-na-serie-historica-maioria-e-generico.ghtml>. Acesso em: 05 dez. 2023.

SANKHLA, M. S.; KUMARI, M.; SHARMA, K.; KUSHWAH, R. S.; KUMAR, R. Water contamination through pesticide & their toxic effect on human health. **International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology**, v. 6, n. 1, p. 967-970, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Mahipal-Singh-Sankhla/publication/322538146_Water_Contamination_through_Pesticide_Their_To

xic_Effect_on_Human_Health/links/5a5ed6ef458515c03ee0bf9e/Water-Contamination-through-Pesticide-Their-Toxic-Effect-on-Human-Health.pdf. Acesso em: 18 jun. 2022.

SCHILLO, K. K. Teaching animal science: education or indoctrination?. **Journal of animal science**, v. 75, n. 4, p. 950-953, 1997. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/75/4/950/4624962?login=false>. Acesso em: 29 jun. 2022.

SEED, J.; CHAPIN, R. E.; CLEGG, E. D.; DOSTAL, L. A.; FOOTE, R. H.; HURTT, M. E.; KLINEFELTER, G. R.; MAKRIS, S. L.; PERREAULT, S. D.; SCHRADER, S.; SEYLER, D.; SPRANDO, R.; TREINEN, K. A.; VEERAMACHANENI, D. N.; WISE, L. D. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. **Reproductive toxicology**, v. 10, n. 3, p. 237-244, 1996.

SETCHELL, B.; BREED, W. **Anatomy, Vasculature, and Innervation of the male reproductive tract**. Book Chapter, United States of America: Elsevier, 2006. p.771-825. DOI: 10.1016/B978-012515400-0/50022-1.

SILVA, A. M. C.; CAMPOS, P.H.N.; MATTOS, I.E.; HAJAT, S.; LACERDA, E.M.; FERREIRA, M.J.M. Environmental exposure to pesticides and breast cancer in a region of intensive agribusiness activity in Brazil: a case-control study. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 20, p. 3951, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/20/3951/htm>. Acesso em: 17 jun. 2022.

SILVA, J. N.; MONTEIRO, N. R.; ANTUNES, P. A.; FAVARETO, A. P. A. Maternal and developmental toxicity after exposure to formulation of chlorothalonil and thiophanate-methyl during organogenesis in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/xQ7YTG39NKLN8vQF5TB4bfr/?lang=en>. Acesso em: 15 jun. 2022.

SILVÉRIO, A. C. P.; MARTINS, I.; NOGUEIRA, D. A.; MELLO, M. A. S.; LOYOLA, E. A. C. DE; GRACIANO, M. M. C. Avaliação da atenção primária à saúde de trabalhadores rurais expostos a praguicidas. **Revista de Saúde Pública**, v. 54, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/dNrQ7V53n8gPdDdJNhLF3bJ/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 14 jun. 2022.

SOUZA, G. S.; COSTA, L. C. A. DA; MACIEL, A. C.; REIS, F. D. V.; PAMPLONA, Y. A. P. Presence of pesticides in atmosphere and risk to human health: a discussion for the Environmental Surveillance. **Ciencia & saude coletiva**, v. 22, p. 3269-3280, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/MgCbwzKQ6bYyWMKxhdCJGTg/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 20 jun. 2022.

SPRINCE, N. L.; LEWIS, M. Q.; WHITTEN, P. S.; REYNOLDS, S. J.; ZWERLING, C. Respiratory symptoms: associations with pesticides, silos, and animal confinement in

the Iowa Farm Family Health and Hazard Surveillance Project. **American journal of industrial medicine**, v. 38, n. 4, p. 455-462, 2000. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-0274\(200010\)38:4%3C455::AID-AJIM12%3E3.0.CO;2-L](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1097-0274(200010)38:4%3C455::AID-AJIM12%3E3.0.CO;2-L). Acesso em: 19 jun. 2022.

SWAN, S. H.; KRUSE, R. L.; LIU, F.; BARR, D. B.; DROBNIS, E. Z.; REDMON, J. B.; WANG, C.; BRAZIL, C.; OVERSTREET, J. W. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. **Environmental health perspectives**, v. 111, n. 12, p. 1478-1484, 2003. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/epdf/10.1289/ehp.6417>. Acesso em: 20 jun. 2022. DOI 10.1289/ehp.6417.

TAN, Z.; ZHOU, J.; CHEN, H.; ZOU, Q.; WENG, S.; LUO, T.; TANG, Y. Toxic effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on human sperm function in vitro. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 41, n. 4, p. 543-549, 2016. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/41/4/41_543/_pdf/-char/ja. Acesso em: 20 jun. 2022.

TARMURE, S.; ALEXESCU, T. G.; ORASAN, O.; NEGREAN, V.; SITAR-TAUT, A. V.; COSTE, S. C. Todea D.A.nfluence of pesticides on respiratory pathology-a literature review. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 27, n. 2, 2020. Disponível em: <https://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-afa88487-fbb6-4f04-8f28-b18ec18aa239>. Acesso em: 19 jun. 2022.

TAYEB, W.; NAKBI, A.; TRABELSI, M.; ATTIA, N.; MILED, A.; HAMAMI, M. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “Désormone lourde”. **Journal of hazardous materials**, v. 180, n. 1-3, p. 225-233, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389410004644>. Acesso em: 20 jun. 2022.

TEJERINA, G. R. L. Intoxicações e óbitos por agrotóxicos no Estado de Goiás, Brasil e inovações legislativas. **Cadernos Ibero-Americanos de Direito Sanitário**, v. 7, n. 1, p. 229-249, 2018. Disponível em: <https://www.cadernos.prodisa.fiocruz.br/index.php/cadernos/article/view/471>. Acesso em: 18 jun. 2022.

TISSUE, P. Inflammatory Networks in the Control of Spermatogenesis. **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**, v. 636. p. 92, 2008.

TOMIAZZI, J. S.; PEREIRA, D. R.; JUDAI, M. A.; ANTUNES, P. A.; FAVARETO, A. P. A. Performance of machine-learning algorithms to pattern recognition and classification of hearing impairment in Brazilian farmers exposed to pesticide and/or cigarette smoke. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 7, p. 6481-6491, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-018-04106-w>. Acesso em: 17 jun. 2022.

TUSCHL, H.; SCHWAB, C. Cytotoxic effects of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 385-393, 2003. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691502002387>. Acesso em: 20 jun. 2022.

TYAGI, S.; SIDDARTH, M.; MISHRA, B. K.; BANERJEE, B. D.; URFI, A. J.; MADHU, S. V. High levels of organochlorine pesticides in drinking water as a risk factor for type 2 diabetes: A study in north India. **Environmental Pollution**, v. 271, p. 116287, 2021. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749120369761>. Acesso em: 18 jun. 2022.

VENKOV, P.; TOPASHKA-ANCHEVA, M.; GEORGIEVA, M.; ALEXIEVA, V.; KARANOV, E. Genotoxic effect of substituted phenoxyacetic acids. **Archives of toxicology**, v. 74, n. 9, p. 560-566, 2000. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s002040000147>. Acesso em: 20 jun. 2022.

VERGES, N. M. Agroecologia: uma alternativa de desenvolvimento rural sustentável para os assentamentos rurais. **Caminhos de Geografia**, UFU, v. 14, p. 237-253, 2013.

WEINBAUER, G. F.; LUETJENS, C. M.; SIMONI, M.; NIESCHLAG, E. Physiology of testicular function. *In: Andrology*, Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. p. 11-59.

Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-78355-8_2. Acesso em: 29 jun. 2022.

WOOD, JOANNE N.; PECKER, L. H.; RUSSO, M. E.; HENRETIG, F.; CHRISTIAN, C. W. Evaluation and referral for child maltreatment in pediatric poisoning victims. **Child abuse & neglect**, v. 36, n. 4, p. 362-369, 2012.

YE, M.; BEACH, J.; MARTIN, J. W.; SENTHILSELVAN, A. Occupational pesticide exposures and respiratory health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6442-6471, 2013. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/10/12/6442/htm>. Acesso em: 19 jun. 2022.

YIGIT, N.; VELIOGLU, Y. S. Effects of processing and storage on pesticide residues in foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 21, p. 3622-3641, 2020. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2019.1702501>. Acesso em: 18 jun. 2022.

YOUNES, M.; GALAL-GORCHEV, H. Pesticides in drinking water—a case study. **Food and chemical toxicology**, v. 38, p. S87-S90, 2000. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691599001325>. Acesso em: 11 jun. 2022.

ANEXO A – PARECER FINAL 1

16/06/2022 16:31

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EXPOSIÇÃO CRÔNICA INALATÓRIA E ORAL AO HERBICIDA ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) E SEUS EFEITOS SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA DE RATOS ADULTOS", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPII) sob o número nº 4868 e tendo como participante(s) DOUGLAS GONCALVES (discente), GISELE ALBORGHETTI NAI (discente), DANILLO ROBERTO PEREIRA (discente), ANA PAULA ALVES FAVARETO (orientador responsável), foi avaliado e **APR. COM RECOMENDAÇÃO** pelo COMITÊ AESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido **APR. COM RECOMENDAÇÃO** em reunião realizada em 20/06/2018.

MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É duplo	Detalhes armazenamento
3761	17/05/2017	UNOESTE	NÃO	histórico

Presidente Prudente, 13 de Novembro de 2019.



Prof. Edmar Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPII



Prof. Ms. Adriano Fátima Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPII - 18 3309-0010 - cpil@unoeste.br
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18 3309-0010 - cep@unoeste.br
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - 18 3309-0010 - ceua@unoeste.br

veja este documento em www.unoeste.br/ceua Informante: código de segurança 8F494ac61f86d88e98760891c04e

ANEXO B – PARECER FINAL 2

16/06/2022 18:50

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EXPOSIÇÃO CRÔNICA INALATÓRIA E ORAL AO HERBICIDA GLIFOSATO EM CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES: EFEITOS SOBRE A MORFOFISIOLOGIA REPRODUTIVA DE RATOS MACHOS ADULTOS", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6962 e tendo como participante(s) JAMILK SILVEIRA TOMIAGZI SIMÕES (discente), GABRIELE MOREIRA DE JESUS (discente), RENATA CALCIOLARI ROSSI (discente), ANA PAULA ALVES FARARETO (orientador responsável), foi avaliado e APR. COM RECOMENDAÇÃO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.089, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APR. COM RECOMENDAÇÃO em reunião realizada em 06/04/2020.

MATERIAL ARMAZENADO/INDICADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	Êt de acesso	Detalhes armazenamento
5684	20/11/2019	UNOESTE	SIM	Biotério de experimentação

Presidente Prudente, 8 de Maio de 2020.


 Prof. Dr. Roberto Garcia Jr.
 Coordenador Científico da CPDI


 Prof. Ms. Adriana Falcão Dias
 Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPDI - 19.122-9070 - cpdi@unoeste.br
 Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 19.122-9070 - cep@unoeste.br
 Comissão de Ética em Uso de Animais - CEUA - 19.122-9070 - ceua@unoeste.br

Este documento está disponível em www.unoeste.br e possui o código de segurança 8381a216a888d8a00762827a16a8381

ANEXO C –ACEITE DE PUBLICAÇÃO DO ARTIGO I

27/06/2023, 12:05

Ana Paula Favareto, Consumo crônico de ração contaminada com herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em roed...

Notificações



[RMRP] Decisão editorial

2022-12-20 03:17

Ana Paula Favareto, Jamile Simões, Douglas Gonçalves, Gisele Nai, Renata Rossi:

Nós chegamos a uma decisão referente a sua submissão para o periódico Medicina (Ribeirão Preto), "Chronic consumption of contaminated feed with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide in rodents: effects on male reproductive health".

Nossa decisão é de: Aceitar a Submissão