

## MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS EXPOSTOS AO ENDOSULFAN: MODELO TOXICOLÓGICO *IN VITRO*

Raiane Cristina Fratini de Castro<sup>1</sup>; Giovanna Rafael Fernandes da Silva<sup>2</sup>; Patrícia Campos Paolozzi<sup>3</sup>; Guilherme Barizão<sup>4</sup>; Isabelle Picada Emanuelli<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Campus Maringá /PR. Universidade Cesumar – UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/CNPq-UNICESUMAR. raianecfratini@gmail.com

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Campus Maringá /PR. Universidade Cesumar - UNICESUMAR. giovannarfs1@gmail.com

<sup>3</sup>Mestranda pelo Programa em Tecnologias Limpas, UNICESUMAR, Maringá/PR. patriciacampos07@gmail.com

<sup>4</sup>Mestrando pelo Programa em Tecnologias Limpas, UNICESUMAR, Maringá/PR. guilherme.zao@gmail.com

<sup>5</sup>Docente do Programa de Mestrado em Tecnologias Limpas da UNICESUMAR. Bolsista Produtividade e Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação - ICETI. isabelle.emanuelli@docentes.unicesumar.edu.br

### RESUMO

O uso de pesticidas possui abrangência mundial, evidenciando carência de estudos que demonstrem seus riscos toxicológicos. Desta maneira o presente estudo teve como objetivo desenvolver um modelo *in vitro* para teste de toxicidade de pesticida utilizando 212 oócitos de ovários de abatedouro e validar o modelo toxicológico desenvolvido durante o processo de maturação oocitária para prever riscos químicos na fertilidade feminina de mamíferos. O grupo controle negativo será de oócitos maturados na ausência de pesticidas e os grupos tratamentos serão constituídos por três tipos diferentes de diluições do agrotóxico, sendo expostos nas 24h de maturação *in vitro*. A presente metodologia, apresenta-se nas seguintes seções: (1) Protocolo de maturação; (2) Caracterização do modelo toxicológico; (3) Maturação nuclear do oócito; (4) Análises estatísticas. Evidenciou-se que na análise da presença de corpúsculo polar a dose reduzida do Endosulfan (0,01µG/ML) não interferiu significativamente no processo quando comparado ao grupo controle, respectivamente 77,50% (31/40) e 88,10% (37/42). Doses superiores interferiram consideravelmente na extrusão corpuscular (0,1 µG/ML - 31,11% e 1µG/ML - 20,00%). A concentração de 10µG/ML impediu totalmente a conclusão deste evento. Não houve diferença entre a expansão dos COCs maturados em meio contendo as diferentes concentrações de Endosulfan (0; 0,01; 0,1; 1,0 µg/mL) com exceção da concentração de 10,0 µg/mL que impediu completamente. Dessa forma o modelo toxicológico com ovários de abatedouro bovino viabilizou determinar os danos morfológicos dos oócitos expostos a pesticida podendo ser utilizado como método avaliativo de ensaios *in vitro*. Os resultados obtidos indicaram a alteração morfológica dose-resposta para os eventos de maturação do complexo cumulus oócitos declínio dependente para extrusão corpuscular e expansão do cumulus.

**PALAVRAS-CHAVE:** Agrotóxico; Fertilidade feminina; Maturação *in vitro*; Modelo animal.

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional contínuo e o consumismo impulsionam a demanda global por alimentos, e concomitantemente a necessidade de crescimento da produção. Este crescimento deve vir obrigatoriamente baseado em pressupostos de sustentabilidade dos objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) introduzidos no ano 2015 pela agenda da ONU (FAO, 2018). O grande desafio é promover a segurança alimentar sustentável dentro dos sistemas produtivos, impactando minimamente ao ambiente, a saúde humana e a biodiversidade como um todo.

A demanda alimentar principalmente de grãos e proteínas no Brasil é muito grande, em que a introdução de novas variedades de alto rendimento de culturas alimentares e a implantação de tecnologias agrícolas resultaram em ganhos, principalmente em países em desenvolvimento (DONLEY, 2019). Esse sistema produtivo levou a conversão de campos e matas nativas em áreas agricultáveis induzindo a mudanças nos padrões globais, regionais e locais de ecossistemas e populações animais (MEDAN *et al.*, 2011). Associado a isso, o uso de pesticidas tornou-se essencial para o controle de pragas contribuindo significativamente para aumentar a produtividade (SILVA *et al.*, 2019).

O uso exacerbado de pesticidas fez com que a produtividade de alguns grãos aumentasse muito mais, quando comparado ao uso de fertilizantes e irrigações nas plantações (OERKE, 2006). Este aumento na produção de grãos levou o Brasil a se tornar um dos quatro maiores consumidores mundiais de pesticidas juntamente aos Estados Unidos, Europa e China (DONLEY, 2019).

Os pesticidas são ferramentas essenciais à produção agrícola brasileira e à manutenção do seu alto nível produtivo. Combatem pragas, ervas daninhas e outros patógenos que causam prejuízos e reduzem a produtividade de lavouras e criações (ANVISA, 2019; WHO, 2019). Em contrapartida, podem causar efeitos indesejáveis tanto no meio ambiente físico quanto no homem (BRASIL, 2016).

O uso e aplicação dessas substâncias químicas para o controle de pragas deve ser de maneira adequada, seguindo as recomendações da ANVISA (ANVISA, 2020) e orientações estabelecidas pelo laboratório fabricante. Com base nessas informações, intensificam-se as discussões a respeito do real alcance dos efeitos sobre o homem, das contaminações de alimentos e água potável por pesticidas (VASCONCELOS, 2020; REID, 2017; GONÇALVES, 2019). De acordo com alguns estudos, o uso indiscriminado de pesticidas pode causar intoxicações agudas, subagudas ou crônicas na população. As mais significativas são as intoxicações crônicas, que podem ocorrer em baixas doses durante anos (HENDGES, *et al.*, 2019). Estas substâncias, quando acumuladas no organismo, podem induzir a formação de diversas patologias.

Sabe-se, que a exposição aos pesticidas pode causar alterações celulares e, conseqüentemente, pode estar associada a alguns tipos de câncer, doenças crônicas (diabetes e Alzheimer) e ainda afetar diferentes sistemas (VASCONCELOS, 2020; COSTA, 2017; SABARWAL, 2018). Estudos indicam que os pesticidas podem atuar no organismo como disruptores endócrinos, interferindo nas funções dos hormônios, com grande ênfase no sistema reprodutor (DUTRA, 2019). A maioria dos estudos sobre as alterações hormonais são relacionadas ao sistema reprodutor masculino e avaliam as associações a exposição aos pesticidas (QUEIROZ, 2006; PAPARELLA, 2017; DE OLIVEIRA, 2014). Já os problemas reprodutivos femininos de infertilidade têm aumentado de forma alarmante, particularmente nos países desenvolvidos. Entretanto existe uma escassez de estudos sobre a atuação dos pesticidas como disruptores endócrinos contribuindo para o aparecimento de distúrbios hormonais femininos (LH, FSH e Estrógeno) envolvidos no processo de maturação folicular e oocitária (DAVILA, 2017).

As gonadotrofinas FSH e LH são os hormônios mais comumente utilizados nos sistemas de maturação *in vitro*. (Sutton, M. L. *et al.*, 2003). FSH e LH são suplementados para induzir a expansão das células do Cumulus e a maturação nuclear e citoplasmática (Caixeta *et al.*, 2013). À medida que o oócito matura em resposta à onda pré-ovulatória de gonadotrofinas, as células do Cumulus secretam ácido hialurônico, um glicosaminoglicano não sulfatado que se liga às células do Cumulus por proteínas de ligação. Quando o ácido hialurônico se torna hidratado, os espaços entre as células do Cumulus ficam aumentados e as células ficam embebidas em uma matriz pegajosa, mucificada; este processo é denominado expansão ou mucificação do Cumulus. A expansão do Cumulus também depende de fatores de capacitação da expansão do Cumulus (CEEFs) produzidos pelo oócito (Dragovic *et al.*, 2005).

Além de todos esses efeitos já apresentados, os agrotóxicos podem, também, estar relacionados a alterações no binômio mãe-feto, como malformações congênitas entre as crianças de mães expostas aos agrotóxicos durante o período próximo à concepção em relação às demais, nascimentos prematuros, índices de APGAR insatisfatórios e micro pênis em recém-nascidos (LARSEN, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Outro fator agravante é que a maioria das investigações estão voltadas para os efeitos agudos da exposição a essas substâncias e ao tipo de exposição ocupacional, não

contemplando as consequências crônicas dos contaminantes sobre crianças, fetos humanos (ou animais) em gestação, mulheres em idade fértil, adolescentes etc. (LARSEN 2017; LOPES *et al.*, 2018; TAVEIRA & ALBUQUERQUE, 2018).

Frente às recentes medidas de liberação pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do uso de pesticidas pelo governo nacional e internacional, entre eles, alguns banidos na União Europeia ou com rigorosas restrições, torna-se visível a carência de estudos aprofundados a respeito do risco toxicológico reprodutivo nas fêmeas. Pesquisas demonstram a urgência na atenção ambiental, que, invariavelmente, impacta também o viés econômico da atividade agrícola (FAO, 2018).

Alguns pesticidas como o Endosulfan são ainda classificados como um poluente orgânico persistente, permanecendo no ambiente por longos períodos de tempo podendo afetar tanto a saúde humana como a biodiversidade animal. Mesmo proibido em vários países como o Brasil, este pesticida ainda é utilizado como pesticida agrícola e foi detectado em águas doces de abastecimento da região de Maringá (diagnóstico realizado em 2019 pelo nosso grupo de pesquisa). Uma revisão de literatura demonstrou ausência de estudos sobre possíveis interferências endócrinas do Endosulfan no processo de maturação oocitária (MENEZES *et al.* 2017).

Como consequência há uma necessidade de entender os riscos celulares e a toxicidade dos pesticidas sem utilizar modelos animais vivos sendo essenciais para testes de toxicidade reprodutiva feminina. Devido à preocupação com a saúde humana e o meio-ambiente, e a necessidade de utilizar modelos toxicológicos alternativos aos que utilizam cobaias, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um modelo *in vitro* para teste de toxicidade de pesticida utilizando oócitos de ovários de abatedouro e validar o modelo toxicológico desenvolvido durante o processo de maturação oocitária para prever riscos químicos na fertilidade feminina de mamíferos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa trata-se de um estudo de desenvolvimento metodológico que explora, observa, e descreve um modelo de teste toxicológico *in vitro* para exposição assistida a pesticida durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. O estudo descreveu o modelo e identificou as possíveis variáveis morfofuncionais referente a maturação oocitária que podem ser utilizadas para detectar danos toxicológicos de pesticidas.

Para obtenção dos oócitos foram utilizados ovários bovinos coletados em abatedouro (Abatedouro de Florai, Florai-PR). As produções de embriões *in vitro* foram realizadas no BIOCELGEN, localizado na fazenda Unicesumar, Maringá, no Paraná (23°25'S, 51°57'W e altitude de 550m).

A presente metodologia, encontra-se apresentada nas seguintes seções: (1) Protocolo de maturação; (2) Caracterização do modelo toxicológico; (3) Maturação nuclear do oócito; (4) Análises estatísticas.

## 3 PROTOCOLO DE MATURAÇÃO IN VITRO

Para coleta de COCs, os ovários de abatedouro foram colocados em solução salina (NaCl a 0,9%) aproximadamente 35°C, e transportado para o laboratório dentro de 2h após o abate (coleta). Chegando ao laboratório, os ovários foram aspergidos com álcool 70° e lavados em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS). Em seguida, os COCs foram puncionados de folículos com diâmetro de 2-8 mm usando uma agulha calibre 18G e uma seringa de 10m. Para o estudo foram selecionados apenas os COCs com qualidade boa, ou seja, com o ooplasma homogêneo e com mais de uma camada de células compacta do cumulus.

A maturação foi realizada em TCM199 com sais de Earles (Gibco®), glutamina (Sigma® cod: G8540) e NaHCO<sub>3</sub> (Mallinckrodt®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®), 22µg/mL piruvato (Biochemical® cod: 44094), 50µg/mL de gentamicina (Sigma® cod: G1272), 0,5µg de FSH/mL (Bioniche®), 50µg de LH/mL (Bioniche®) e 1µg de estradiol/mL (Sigma® cod: E2758), mantidos em estufa, a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar com máxima umidade durante 22-24 horas.

#### 4 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO TOXICOLÓGICO IN VITRO

O modelo de maturação in vitro utilizado foi na espécie bovina e foi testado e validado por Luciano *et al.* (2010) e Van Woudenberg *et al.* (2012). Para o desenvolvimento do modelo toxicológico in vitro da maturação oocitária foi utilizado como grupo controle negativo oócitos bovinos maturados na ausência de pesticidas. Os grupos tratamentos serão constituídos por três tipos diferentes de diluições do agrotóxico selecionado.

A exposição ao pesticida será realizada nos grupos tratamentos apenas durante as 24h de maturação in vitro.

##### 4.1 SELEÇÃO DOS PESTICIDAS

O pesticida utilizado no modelo foi selecionado dos compostos identificados por análises cromatográficas, ao longo do rio Pirapó (Paraná - Brasil), no período entre outubro/2017 e janeiro/2019. A escolha do composto Endosulfan para estudo de risco de fertilidade feminina foi feita por três motivos: risco toxicológico, proibição pela legislação brasileira, detecção elevada nas análises de água; e principalmente por ser escasso ou ausente na literatura trabalhos que verifiquem riscos toxicológicos reprodutivos femininos destes compostos, principalmente no que se refere a interferência na maturação e desenvolvimento embrionário pré-implantacional. O ingrediente ativo do endosulfan (AI; razão isômero  $\alpha$ :  $\beta$  70: 30; pureza cromatográfica 95%).

Para avaliar o efeito do pesticida no processo de maturação os oócitos foram expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de endosulfan (0; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 µg/mL) por 24 horas à 38,3 ° C. Diluições foram feitas em dimetilsulfóxido (DMSO) de forma que o controle negativo dos experimentos consistiu em DMSO sozinho na incubação.

#### 5 MATURAÇÃO NUCLEAR DO OÓCITO

Para avaliação do modelo toxicológico da maturação oocitária foi utilizado o parâmetro de maturação nuclear (configuração cromossômica de extrusão do primeiro corpúsculo polar). Para tanto os oócitos de cada grupo foram avaliados quanto a presença do corpúsculo polar (Figura 1) e quanto a ausência de corpúsculo polar (Figura 2). Foi observado também a expansão do cumulus do oócito: expandiu ou não expandiu.

A avaliação foi mediante análise da morfologia do núcleo dos 212 oócitos maturados como já descrito, no grupo controle e nos tratamentos com pesticidas. Os oócitos foram desnudados e observados sob microscopia óptica sendo classificados como: Vesícula Germinativa inicial (VG) – núcleo definido e Metáfase II (MII) – parte dos cromossomos formando o 1º corpúsculo polar já exteriorizado.

#### 6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste Qui-quadrado foi utilizado para comparar as taxas de maturação nuclear. As análises foram realizadas utilizando o software SAS, versão 9.1. As variáveis



independentes testadas no experimento foram as diferentes concentrações de pesticidas. As variáveis dependentes testadas foram as taxas de maturação nuclear.



**Imagem 1:** Oócito bovino com a presença de corpúsculo polar



**Imagem 2:** Oócito bovino com a ausência de corpúsculo polar

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O protocolo desenvolvido para teste de toxicidade de pesticida utilizando oócitos de ovários de abatedouro foi validado como um modelo para prever riscos químicos na fertilidade feminina de mamíferos. O protocolo foi baseado no processo de exposição ao pesticida durante a maturação *in vitro*, mediante as análises dos efeitos do Endosulfan sobre os oócitos cultivados em sua presença, realizando a avaliação dos eventos de extrusão do 1º corpúsculo polar e expansão do complexo do cumulus oócito.

Os resultados obtidos indicaram a alteração morfológica dose-resposta para os eventos de maturação do complexo cumulus oócitos declínio dependente para as variáveis observadas (Tabela 1). Estes dados corroboraram com os resultados apresentados em oócitos de búfalo onde o endosulfan inibiu o crescimento e desenvolvimento de oócitos *in vitro* diretamente (Nandi et al., 2011).

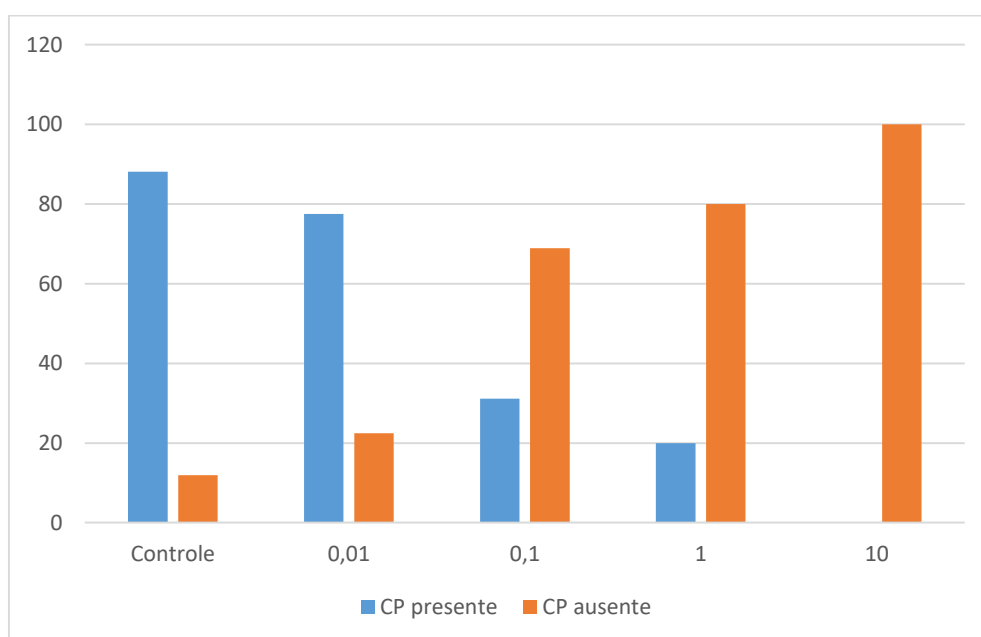
A partir da análise da presença de corpúsculo polar (Tabela 1) foi possível perceber que doses reduzidas do Endosulfan (0,01 µG/ML) não interferiram significativamente no processo quando comparados ao grupo controle, respectivamente 77,50% (31/40) e 88,10% (37/42). Doses superiores induziram consideravelmente a extrusão corpuscular para índices inferiores a 50%, ou seja 0,1 µG/ML (31,11%) e 1 µG/ML (20,00%). A concentração de 10 µG/ML impediu totalmente a conclusão deste evento (Gráfico 1).

Não houve diferença entre a expansão dos COCs maturados em meio contendo as diferentes concentrações de Endosulfan (0; 0,01; 0,1; 1,0 µg/mL). Os COCs maturados em todas estas concentrações tiveram a morfologia do cumulus expandida (Figura 3) com exceção da concentração de 10,0 µg/mL que impediu completamente a expansão do cumulus (Figura 4). Estes resultados indicam que níveis elevados do pesticida inviabilizou o processo de maturação dos complexos pela falta de expansão do cumulus mediante ausência de produção de ácido hialurônico. Dados semelhantes foram encontrados em um estudo na maturação de oócitos com os pesticidas Atrazina e fenoxaprop-etil realizados em suínos (CASAS *et al.*, 2010). A literatura não apresenta dados do Endosulfan relativos a maturação em bovinos.

**Tabela 1:** Avaliação da exposição ao pesticida durante o processo de maturação in vitro, mediante avaliação dos eventos de extrusão do 1º corpúsculo polar e expansão do complexo do cumulus oócito

TRATAMENTO (µG/ML)	OÓCITOS TOTAIS (n)	PRESENÇA DE CORPÚSCULO POLAR (n) %	AUSÊNCIA DE CORPÚSCULO POLAR (n) %	PRESENÇA DE EXPANSÃO
0	42	37 88,10 <sup>a</sup>	5 11,90 <sup>a</sup>	SIM
0,01	40	31 77,50 <sup>a</sup>	9 22,50 <sup>a</sup>	SIM
0,1	45	14 31,11 <sup>b</sup>	31 68,89 <sup>b</sup>	SIM
1	45	9 20,00 <sup>b</sup>	36 80,00 <sup>b</sup>	SIM
10	40	0 0,00 <sup>c</sup>	40 100,00 <sup>c</sup>	NÃO
TOTAL	212	-	-	-

a,b Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (valor  $p \leq 0,05$ ) entre os grupos da mesma coluna.



**Gráfico 1:** Efeito dose-resposta do Endosulfan na viabilidade da maturação nuclear oocitária pela avaliação quanto a ausência ou presença do corpúsculo polar (CP).



**Figura 3:** Oócito bovino apresentando a expansão das células do cumulus



**Figura 4:** Oócito bovino apresentando ausência da expansão das células do cumulus.

## 8 CONCLUSÃO

O modelo toxicológico com ovários de abatedouro bovino viabilizou determinar os danos morfológicos dos oócitos expostos a pesticida podendo ser utilizado como método avaliativo de ensaios *in vitro*.

Os resultados obtidos indicaram a alteração morfológica dose-resposta para os eventos de maturação do complexo cumulus oócitos declínio dependente para extrusão corpuscular e expansão do cumulus.

A execução deste método alternativo *in vitro* possibilitou elucidar os riscos ao gameta feminino sem utilizar modelos animais vivos, seguindo assim os princípios de Russell-Burch (1959) de “redução, substituição e refinamento” sugerido como método padrão pela União Europeia desde 2016.

## REFERÊNCIAS

ANVISA. **Agência nacional de vigilância sanitária**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/agencia>. Acesso em: 23 jun. 2019.

BRASIL, 2016. Pesticidas. **Ministério do Meio Ambiente**. Brasília. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em: 02 jan. 2020.

CASAS, E.; BONILLA, E.; DUCOLOMB, Y.; BETANCOURT, M. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes *in vitro*. **Toxicol in Vitro**. 2010 Feb;24(1):224-30. doi: 10.1016/j.tiv.2009.09.004. Epub 2009, sep 9. PMID: 19747538.

COSTA, Cristina Amaro da. *et al.* Impacto das práticas agrícolas e do uso de pesticidas em proteção integrada, agricultura biológica e agricultura convencional, em vinha e pomóideas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. SPE, p. 101-110, 2017.

DAVILA, Juanmahel; LI, Quanxi; BAGCHI, Indrani C. Genetic Mouse Models for Female Reproductive Toxicology Studies. In: Reproductive and Endocrine Toxicology. **Elsevier Inc.**, 2017. p. 470-494.

DONLEY, Nathan. The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. **Environmental Health**, v. 18, n. 1, p. 44, 2019.

DUTRA, Lidiane Silva; FERREIRA, Aldo Pacheco. Tendência de malformações congênitas e utilização de agrotóxicos em commodities: um estudo ecológico. **Saúde em Debate**, v. 43, p. 390-405, 2019.

FAO. 2018. World Livestock: Transforming the livestock sector through the Sustainable Development Goals. Rome. 222 pp.

GONÇALVES, J. E. *et al.* Water quality assessment: hydrosanitary design of the campo river basin, Paraná, Brazil. In: 7TH LATIN AMERICAN PESTICIDE RESIDUE WORKSHOP, 2019, Foz do Iguaçu. **Anais...** 2019.

HENDGES, Camila *et al.* Human intoxication by agrochemicals in the region of South Brazil between 1999 and 2014. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, n. 4, p. 219-225, 2019.

LARSEN, A.E.; GAINES, S. D.; DESCHÊNES, O. Agricultural pesticide use and adverse birth outcomes in the San Joaquin Valley of California. **Nat Commun**, 8, 302, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00349-2>. Acesso em: 19 fev. 2020.

LOPES, CARLA VANESSA ALVES; ALBUQUERQUE, GUILHERME SOUZA CAVALCANTI DE. Pesticidas e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, p. 518-534, 2018.

MEDAN, D. *et al.* Effects of agriculture expansion and intensification on the vertebrate and invertebrate diversity in the Pampas of Argentina. **Biodiversity and Conservation**, [S. l.], v. 20, n. 13, p.3077-3100, 24 jul. 2011. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-011-0118-9>. Acesso em: 05 abr. 2020.

MENEZES RG, QADIR TF, MOIN A, et al. Endosulfan poisoning: An overview. **J Forensic Leg Med**. 2017;51: 27-33. Doi:10.1016/j.jflm.2017.07.008.

NANDI, S.; GUPTA, P. S. P.; ROY, S. C.; SELVARAJU, S.; RAVINDRA, J. P. O clorpirifós e o endosulfan afetam a maturação, a fertilização e o desenvolvimento embrionário do oócito de búfalo, diretamente e por meio de células do cumulus. **Toxicologia Ambiental**, 26 (1), 57-67, 2011. Doi: 10.1002 / tox.20529.

OERKE, E. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, [S. l.], v. 144, n. 1, p.31-43, 9 dez. 2006. **Cambridge University Press (CUP)**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1017/s0021859605005708>. Acesso em: 17 mar. 2020.

OLIVEIRA J., Andréia *et al.* Effects of exposure to glyphosate in male and female mice behavior in pubertal period. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 194-203, 2014.

PAPARELLA, Cecilia *et al.* Infertilidad masculina. Exposición laboral a factores ambientales y su efecto sobre la calidad seminal. **Revista Uruguaya de Medicina Interna**, v. 2, n. 2, p. 10-21, 2017.

QUEIROZ, Erika Kaltenecker Retto de; WAISSMANN, William. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 485-493, 2006.

REID, V. Food, agriculture and biodiversity, **Biodiversity**, 18:2-3, 43-44, 2017. DOI: 10.1080/14888386.2017.1366874.

SABARWAL, Akash; KUMAR, Kunal; SINGH, Rana P. Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 63, p. 103-114, 2018.



SILVA, V. *et al.* Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 653, p.1532-1545, fev. 2019. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.441>. Acesso em: 13 fev. 2020.

TAVEIRA, Bruna Letícia Souza; ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti de. Análise das notificações de intoxicações agudas, por agrotóxicos, em 38 municípios do estado do Paraná. **Saúde debate**, Rio de Janeiro, v. 42, n. spe4, p. 211-222, dec. 2018. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-11042018000800211&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-11042018000800211&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 12 abr. 2020.

VASCONCELLOS, Paula Renata Olegini *et al.* Condições da exposição a agrotóxicos de portadores da doença de Parkinson acompanhados no ambulatório de neurologia de um hospital universitário e a percepção da relação da exposição com o adoecimento. **Saúde em Debate**, v. 43, p. 1084-1094, 2020.