



Efeitos reprodutivos da exposição oral crônica ao glifosato em condições ambientalmente relevantes: um estudo experimental

Jamile Silveira Tomiazzi Simões

Doutora, UNOESTE, Brasil.
jamilе.tomiazzi@gmail.com

Mariana Esperendi Bastianini

Doutoranda, UNOESTE, Brasil.
marianaesperendi@gmail.com

Jaqueline Nascimento Silva

Doutora, UNESP, Brasil.
jaqueline.nascimento@unesp.br

Renata Calciolari Rossi

Professora Doutora, UNOESTE, Brasil.
renata@unoeste.br

Ana Paula Alves Favareto

Professora Doutora, UNOESTE, Brasil.
anafavareto@unoeste.br

RESUMO

O herbicida glifosato está entre os mais utilizados no mundo. Assim, tornou-se crescente a preocupação com seus possíveis efeitos adversos sobre a saúde. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos reprodutivos do consumo crônico de ração contaminada com o herbicida glifosato em ratos. Ratos receberam ração nebulizada com solução de glifosato em diferentes concentrações: 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), durante 180 dias. A qualidade dos espermatozoides foi prejudicada pelo glifosato. A porcentagem de espermatozoides com movimentação progressiva e não progressiva e contagem de espermatozoides no testículo foram reduzidos nos dois grupos de maior concentração de exposição (GMC e GAC). Houve aumento de alterações de cabeça com curvatura em forma de alfinete e anormal e cauda isolada e enrolada nos três grupos expostos com redução significativa no número de espermatozoides normais. A integridade de membrana plasmática do espermatozoide não foi afetada pelo herbicida. A exposição crônica oral ao herbicida glifosato em diferentes concentrações causou alterações na morfologia de espermatozoides de ratos adultos. Tais achados são cruciais, pois sugerem que a exposição prolongada ao glifosato pode ter implicações prejudiciais na fertilidade masculina, ressaltando a necessidade de constantes revisões nas práticas de uso do herbicida e na avaliação dos seus riscos à saúde.

PALAVRAS-CHAVE: Herbicida. Reprodução. Saúde Ambiental.

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 et al., 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, 2022).

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 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 dose 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; YAHIA et al., 2019), 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).

Desta forma, este estudo propõe-se a avaliar os efeitos da exposição oral crônica ao glifosato sobre a morfofisiologia reprodutiva masculina de ratos adultos, em concentrações ambientalmente relevantes e ajustadas às recomendações agronômicas de uso do herbicida. Além disso, propõe para a via de exposição oral, a nebulização da ração dos animais, um modelo de pulverização de alimentos para posterior consumo, como ocorre na exposição humana real.

2 OBJETIVOS

Este estudo avaliou os efeitos causados ao sistema reprodutor masculino pela exposição crônica oral ao herbicida glifosato, por meio de um modelo experimental.

3 METODOLOGIA

3.1 Agentes Químicos

Para a exposição ao glifosato, a formulação comercial à base de glifosato (Roundup®), registrada sob o número 09106, foi utilizada, contendo 480 g/L (360 g/L equivalente ácido) de sal de isopropilamina de glifosato. A formulação foi diluída em 10 mL de solução salina 0,9% (solução de cloreto de sódio – NaCl) nas concentrações prescritas para cada grupo experimental.

3.2 Modelo Animal de Estudo

Ratos Wistar machos adultos (total de n = 40) foram adquiridos junto ao Biotério Central da Universidade do Oeste de São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil. Ao longo do experimento, esses animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (43 cm x 30 cm x 15 cm) contendo maravalha de qualidade laboratorial como substrato. As condições de manutenção envolveram um ambiente controlado, com temperatura mantida a 22 ± 2 °C e um ciclo de iluminação de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Alimentação à base de ração para ratos (Supralab®, Alisul, Brasil) e acesso irrestrito a água filtrada foram providos. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UNOESTE (Protocolos nº5684-CEUA), e estritamente seguiu as diretrizes de bem-estar animal estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.3 Grupos Experimentais e Protocolo de Exposição ao Herbicida

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 agrônoma. 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).

Para a exposição dos ratos, foi adotado um sistema composto por duas caixas plásticas (32 x 24 x 32 cm) conectadas a um nebulizador ultrassônico (PulmosonicStar®, Brasil), seguindo a metodologia de Mello et al. (2018). A ração foi submetida a um período de exposição de 180 dias. A duração da exposição diária foi de aproximadamente 15 minutos. Esse intervalo de tempo assegurou a completa nebulização da solução. 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.

3.4 Coleta de Materiais Biológicos

Ao término do período de exposição, os ratos de cada grupo experimental foram anestesiados e eutanaziados por administração intraperitoneal de tiopental sódico a uma dose de 100 mg/kg. O testículo direito e os epidídimos foram coletados para as análises espermáticas.

3.5 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).

3.6 Contagens espermáticas

Os testículos direitos, permaneceram congelados até serem descapsulados e pesados, foram homogeneizados, segundo método descrito por Robb et al. (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.

3. 7 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).

3.8 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 $p < 0,05$.

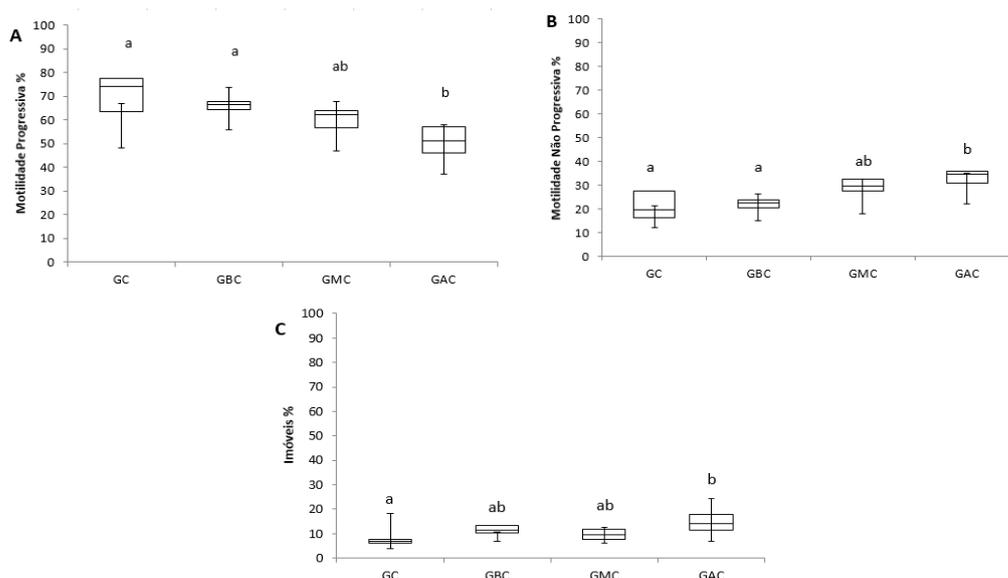
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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, 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), correlacionando algumas alterações a exposição a agrotóxicos (MANN et al., 2020) e também sobre a utilização direta ao glifosato (DALLEGRAVE et al., 2007).

A porcentagem de espermatozoides com movimentação progressiva (Figura 1A) foi reduzida ($p < 0,05$), com conseqüente 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 dos quatro grupos experimentais: Controle (GC) e expostos ao glifosato por via oral em diferentes concentrações (GBC, GMC e GAC).



Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelos autores.

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 72 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 (MUTWEDU 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).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) sobre a 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 anormalidades 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 na cabeça espermática foram cabeça em forma de alfinete e com curvatura anormal e, enquanto que na cauda foram observadas principalmente cauda isolada e enrolada.

Mutwedu et al. (2021) também 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 a redução em grupos expostos ao glifosato.

Tabela 1 - Morfologia espermática (mediana (1º quartil - 3º quartil)) em ratos dos quatro grupos experimentais: Controle (GC) e expostos ao glifosato por via oral em diferentes concentrações (GBC, GMC e GAC).

Morfologia	CG	GBC	GMC	GAC
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 (%)	5,15 (1,00-10,00)a	9,50 (3,00-13,50)ab	10,00 (6,00-14,00)b	11,25 (7,00-16,50)b
Anormalidades de cauda (%)	0,50 (0,00-1,50)a	1,00 (0,50-1,50)a	1,75 (0,00-3,50)ab	2,25 (1,50-6,00)b

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelos autores.

Houve alteração das contagens espermáticas neste órgão. Os números absoluto e relativo de espermatozoides no testículo e produção diária total e por grama de testículo foram reduzidos nos três grupos expostos em relação ao GC (Tabela 2).

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 a diferentes concentrações de glifosato têm sido observadas de forma semelhante ao presente estudo (DAI et al., 2016). Romano et al., (2012) também observaram decréscimo no número de espermatozoides, na produção diária de espermatozoides e aumento da porcentagem 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 espermatozoide (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.

Tabela 2 - Contagem de espermatozoides no testículo (média \pm desvio padrão) em ratos dos quatro grupos experimentais: Controle (GC) e expostos ao glifosato por via oral em diferentes concentrações (GBC, GMC e GAC).

Contagens no testículo	CG	GBC	GMC	GAC
Nº de espermatozoides ($\times 10^6$)	236,15 \pm 10,43a	209,08 \pm 17,98b	197,49 \pm 10,31bc	190,70 \pm 8,18c
Nº de espermatozoides/g ($\times 10^6$ /g)	50,86 \pm 2,78a	43,89 \pm 4,34b	40,76 \pm 3,49b	41,00 \pm 3,09b
PDE ($\times 10^6$ /testículo/dia)	38,71 \pm 1,70a	34,27 \pm 2,94b	32,37 \pm 1,69bc	31,26 \pm 1,34c
PDE relativa ($\times 10^6$ /g/dia)	8,33 \pm 0,45a	7,19 \pm 0,71b	6,68 \pm 0,57b	6,72 \pm 0,50b

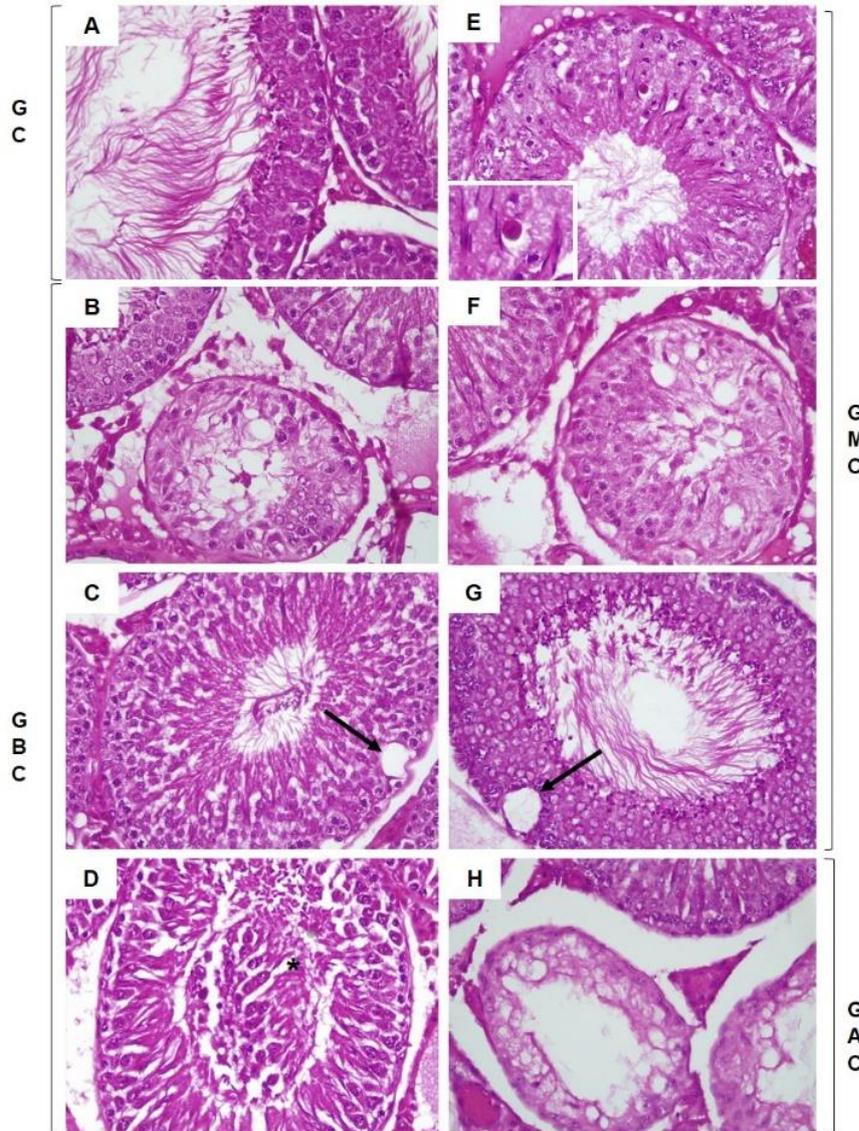
Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

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 se miníferos com intensa perda de células germinativas e atróficos (Figura 2F e 2H) e de vacuolização intraepitelial (Figura 2G).

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 camundongos expostos ao glifosato apresentaram alterações semelhantes. Tais achados são indicativos de uma possível disfunção reprodutiva e atrofia testicular, condições que poderiam comprometer severamente a fertilidade masculina.

Figura 2. Análise histológica do testículo de ratos dos quatro grupos experimentais: Controle (GC) e expostos ao glifosato por via oral em diferentes concentrações (GBC, GMC e GAC).

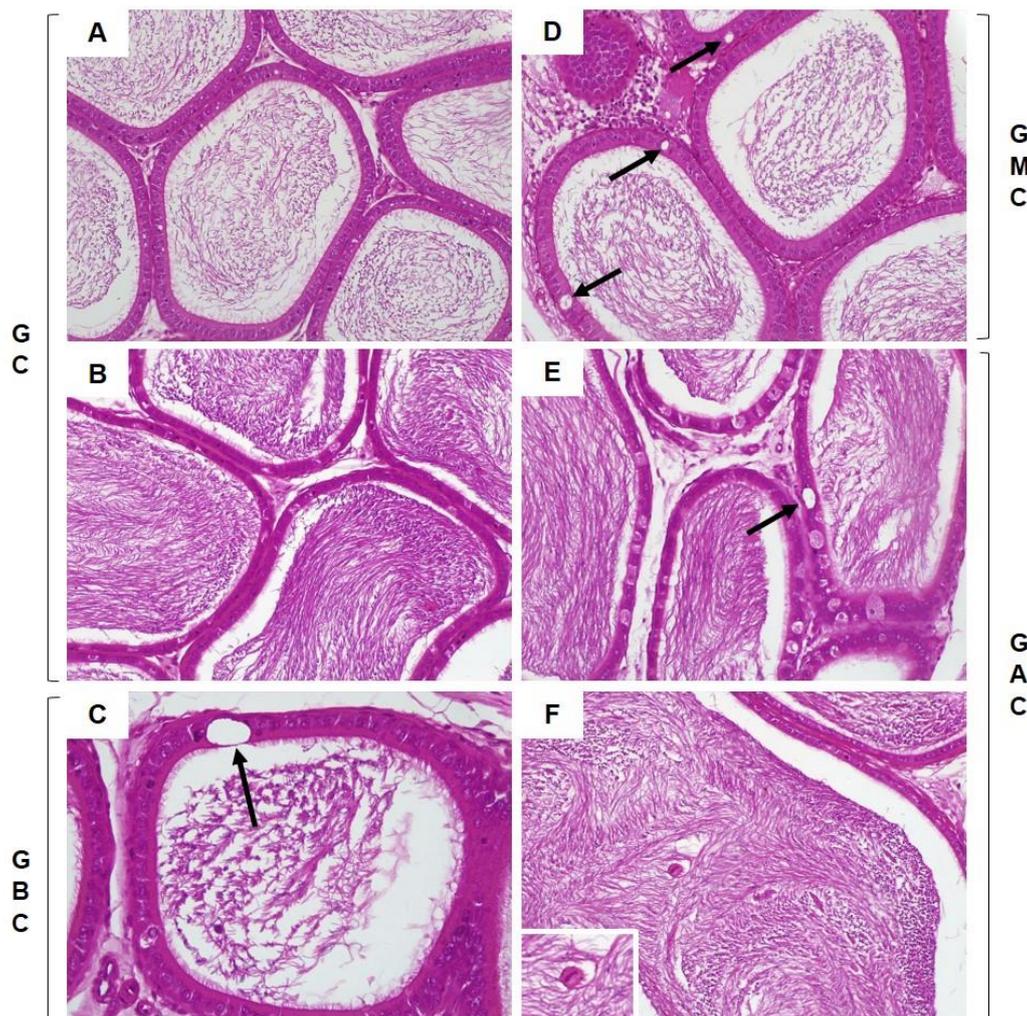


A - Estrutura normal dos túbulos seminíferos e tecido intersticial. B, F e H - Perda de integridade estrutural do epitélio seminífero, com focos de intensa perda de células germinativas e atrofia tubular. C e G - Presença de túbulos seminíferos com vacuolização intraepitelial (setas). D - Presença de 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 germinativas imaturas esfoliadas no lúmen juntamente com os espermatozoides (Figura 3F).

Figura 3. Análise histológica do epidídimo de ratos dos quatro grupos experimentais: Controle (GC) e expostos ao glifosato por via oral em diferentes concentrações (GBC, GMC e GAC).



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.

A presença de células germinativas acidófilas e a intensa perda de células germinativas nos grupos de alta exposição também sugerem uma resposta tóxica grave ao herbicida, o que é consistente com os estudos anteriores (DAI et al., 2016, VANLAEYS et al. 2018) que reportam os

efeitos adversos de contaminantes ambientais, incluindo o glifosato, sobre a morfologia e a função dos órgãos reprodutivos.

Estes resultados reforçam a necessidade de considerar os impactos biológicos do glifosato não apenas em níveis celulares ou moleculares isolados, mas como um indicativo de alterações fisiopatológicas mais amplas que afetam sistemas orgânicos complexos. Portanto, a continuidade de estudos focados na toxicidade reprodutiva do glifosato é crucial para elucidar plenamente os riscos associados ao seu uso, apoiando assim a formulação de políticas mais seguras de manejo e exposição a herbicidas.

5 CONCLUSÃO

Os resultados revelaram alterações significativas na qualidade dos espermatozoides, especialmente nos grupos submetidos a médias e altas concentrações do herbicida, evidenciando uma redução na motilidade e na morfologia espermática normal. A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, por outro lado, não mostrou diferenças significativas, sugerindo que os efeitos do glifosato são mais pronunciados na funcionalidade do que na viabilidade celular.

As análises histológicas dos testículos e epidídimos confirmaram a presença de alterações morfológicas e estruturais nas células germinativas, reforçando os achados sobre a toxicidade reprodutiva do glifosato. Estes resultados são consistentes com estudos anteriores que documentam a toxicidade reprodutiva de herbicidas à base de glifosato, e levantam sérias preocupações sobre o uso contínuo e generalizado deste composto, particularmente em relação às recomendações atuais de segurança e exposição.

Portanto, este estudo contribui para a compreensão dos efeitos biológicos do glifosato no sistema reprodutivo masculino e sublinha a necessidade de reavaliação das práticas regulatórias e de uso do herbicida, considerando os potenciais riscos à saúde humana e ambiental. Futuras investigações deverão focar na exploração de mecanismos subjacentes aos efeitos observados e na avaliação de exposições em condições mais próximas das humanas, para melhor contextualizar os riscos associados ao glifosato.

6 AGRADECIMENTOS

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

7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ANIFANDIS, G. et al. 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>> doi: 10.3390/ijerph15061117.

ARAB, S. A. et al. 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.

- ARL, R. **Toxicidade reprodutiva do glifosato e herbicidas à base de glifosato: uma abordagem bibliográfica.** Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Farmácia). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2021.
- BETANCOURT, M.; RESÉNDIZ, A. Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 508-512, 2006.
- CAI, W. et al. 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>> doi: 10.1016/j.etap.2017.07.015.
- COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB. **Ficha de Informação Toxicológica, Glifosato.** Divisão de Toxicologia Humana e Saúde Ambiental, 2022. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wpcontent/uploads/sites/24/2022/02/Glifosato.pdf>>
- 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.
- DAI, P. et al. Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 5, p. 519-526, 2016.
- DALLEGRAVE, E. et al. 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>>. doi: 10.1007/s00204-006-0170-5.
- FILLER, R. Methods for evaluation of rat epididymal sperm morphology. **Methods in Toxicology**, v. 3, p. 334-343, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6033125/pdf/epj-10-6789.pdf>>. doi: 10.19082/6789.
- IARC, Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **Some Organophosphate Insecticides and Herbicides.** v. 112, 2017.
- JARDIM, I. C. S. F. et al. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, n. 32, v. 4, 2009. doi: 10.1590/S0100-40422009000400031
- JARREL, Z. R.; AHAMMAD, M. U.; BENSON, A. P. Glyphosate-based herbicide formulations and reproductive toxicity in animals. **Veterinary and animal science**, v. 10, 100126, 2020.
- KANG, D. et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to trifluralin in the Agricultural Health Study. **Environ Res**, v. 107, n. 2, p. 271-276, 2008. doi: 10.1016/j.envres.2008.01.010.
- KEMPINAS, W.D.G.; KLINEFELTER, G.R. Interpreting histopathology in the epididymis. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 2, p. 1-12, 2014. doi: 10.4161/21565562.2014.979114.
- LEVINE, S. L.; WEBB, E. G.; SALTIRAS, D. A. Review and analysis of the potential for glyphosate to interact with the estrogen, androgen and thyroid pathways. **Pesticides Management Science**, v. 76, n. 9, p. 2886-2906, 2020.
- MACHADO, M. O. **Glifosato: a emergência de uma controvérsia científica global.** 315f. Tese (Doutorado em Ciências Humanas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/169662>>.
- MANN, U. et al. Reasons for worldwide decline in male fertility. **Curr Opin Urol**, v. 30, n. 3, p. 296-301, 2020. doi: 10.1097/MOU.0000000000000745.
- MELLO, F. A. et al. 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. doi: 10.11606/issn.2176-7262.v51i4p247-253.
- MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SÉRALINI, G. E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology**, v. 313, n. 2-3, p. 122-128, 2018.

MUTWEDU, V. B. et al. Growth performance and reproductive function impairment of glyphosate-based herbicide in male guinea pig (*Cavia porcellus*). **Veterinary Medicine and Science**, v. 7, n. 3, p. 1047-1055, 2021.

NAJAFI, T.F. et al. Air pollution and quality of sperm: a meta-analysis. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 15, n.4, e26930, 2015. doi: 10.5812/ircmj.17(4)2015.26930.

NEROZZI, C. et al. Effects of Roundup and its main component, glyphosate, upon mammalian sperm function and survival. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020.

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.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Superintendência de Vigilância em Saúde. Centro Estadual de Saúde do Trabalhador. **Protocolo de avaliação das intoxicações crônicas por agrotóxicos**, p. 66, 2013.

PARIZI, J.L.S. et al. Oral mucosa changes associated with chronic oral and inhalation exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in Wistar rats. **Toxicol Res (Camb)**, v. 9, n. 6, p. 746-757, 2020. doi: 10.1093/toxres/tfaa085.

PEREIRA, V. R. et al. 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**, v. 26, n. 34, p. 35253-35265, 2019. doi: 10.1007/s11356-019-06407-0.

PEROBELLI, J. E. et al. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. **Reproductive toxicology**, v. 33, n. 3, p. 308-315, 2012. doi: 10.1016/j.reprotox.202011.12.011.

PEROBELLI, J.E. et al. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. **Reprod Toxicol**, v. 33, p. 308–315, 2012. doi: 10.1016/j.reprotox.202011.12.011.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, 3281-3293, 2017.

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: 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.

SEED, J. et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI risk science institute expert working group on sperm evaluation. **Reprod Toxicol**, v. 10, n. 3, p. 237–244, 1996. doi: 10.1016/0890-6238(96)00028-7.

US EPA. **Reregistration eligibility decision (RED)**: glyphosate. Office of Prevention, Pesticides And Toxic Substances, setembro 1993. Disponível em: <<http://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/glyphosate.pdf>>

VANLAEYS, A.; DUBUISSON, F.; SERALINI, G. E.; TRAVERT, C. Formulants of glyphosate-based herbicides have more deleterious impact than glyphosate on TM4 Sertoli cells. **Toxicology in Vitro**, v. 52, p. 14-22, 2018.

YAHIA, D.; EL-AMIR, Y. O.; RUSHDI, M. Mancozeb fungicide-induced genotoxic effects, metabolic alterations, and histological changes in the colon and liver of Sprague Dawley rats. **Toxicology and industrial health**, v. 35, n. 4, p. 265-276, 2019. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0748233719834150>>. doi: 10.1177/0748233719834150.

ZHANG, J. W.; XU, D. Q.; FENG, X. Z. The toxic effects and possible mechanisms of glyphosate on mouse oocytes. **Chemosphere**, v. 237, 124435, 2019.