

Como citar este artigo:

Barbosa A, Oliveira MC, Kuhn-Fraga C, Ribeiro LF, Balbo SL, Torrejais MM. Estudo das fibras musculares dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de fêmeas C57BL/6 expostas ao glifosato durante a prenhez e a lactação. *einstein* (São Paulo). 2021;19:eAO5657.

Autor correspondente:

Ariadne Barbosa
Rua Universitária, 1.619 – Jardim Universitário
CEP: 85819-110 – Cascavel, PR, Brasil
Tel.: (45) 3220-3194
E-mail: ariadne_barbosa@hotmail.com

Data de submissão:

28/2/2020

Data de aceite:

25/11/2020

Conflitos de interesse:

não há.

Copyright 2021

Esta obra está licenciada sob
uma Licença *Creative Commons*
Atribuição 4.0 Internacional.

ARTIGO ORIGINAL

Estudo das fibras musculares dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de fêmeas C57BL/6 expostas ao glifosato durante a prenhez e a lactação

Study of muscle fibers of the extensor digitorum longus and soleus muscles of C57BL/6 females exposed to glyphosate during pregnancy and lactation

Ariadne Barbosa¹, Mylena Campos Oliveira¹, Camila Kuhn-Fraga¹,
Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro¹, Sandra Lucinei Balbo¹, Márcia Miranda Torrejais¹

¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil.

DOI: [10.31744/einstein_journal/2021A05657](https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2021A05657)

RESUMO

Objetivo: Avaliar a morfologia e a morfometria dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de fêmeas C57BL/6 expostas ao glifosato durante a prenhez e lactação. **Métodos:** Foram utilizados 12 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6. Após detecção da prenhez, foram separadas em Grupo Controle, que recebeu somente água, e Grupo Glifosato, que recebeu água com 0,5% de glifosato durante a prenhez e lactação. Ambos os grupos receberam dieta padrão *ad libitum*. Após o desmame, as fêmeas foram eutanasiadas e pesadas; o comprimento nasoanal foi mensurado, e as gorduras foram coletadas e pesadas. Os músculos extensor longo dos dedos e sóleo foram coletados, e seu comprimento e peso foram mensurados. Em seguida, os músculos foram fixados em *Methacarn* para a realização do estudo histológico das fibras musculares. **Resultados:** O Grupo Glifosato apresentou menor ganho de peso durante a prenhez e também menor peso corporal final e comprimento nasoanal, entretanto os demais parâmetros corporais avaliados não apresentaram diferença significativa em relação ao Grupo Controle. Na análise das fibras musculares e do tecido conjuntivo, também não foram observadas diferenças significativas. **Conclusão:** A exposição a 0,5% de glifosato durante a prenhez e lactação resultou em menor ganho de peso na gestação, peso final e comprimento nasoanal, o que pode indicar que, apesar de não alterar a morfologia do tecido muscular diretamente, a exposição foi suficiente para interferir no metabolismo dos animais.

Descritores: Glifosato; Praguicidas; Toxicidade; Exposição materna; Fibras musculares esqueléticas; Camundongos endogâmicos C57BL

ABSTRACT

Objective: To evaluate the morphology and morphometry of the muscles extensor digitorum longus and soleus of C57BL/6 females, who were exposed to glyphosate during pregnancy and lactation. **Methods:** Twelve female mice from the C57BL/6 lineage were used. After detection of pregnancy, they were divided into a Control Group, which received only water, and a Glyphosate Group, which received water with 0.5% glyphosate during pregnancy and lactation. Both groups received *ad libitum* standard diet. After weaning, the females were euthanized and weighed; nasoanal length was measured, and fats were collected and weighed. The muscles extensor digitorum longus and soleus were collected, and their length and weight were measured. Then, the muscles were fixed in *Methacarn* to perform the histological study of muscle fibers. **Results:** Glyphosate Group presented lower weight gain during pregnancy and also lower final body weight and naso-

anal length; however, the other body parameters evaluated did not present a significant difference in relation to the Control Group. Significant differences were also not observed in the analysis of muscle fibers and connective tissue. **Conclusion:** Exposure to 0.5% glyphosate during pregnancy and lactation resulted in lower weight gain during pregnancy, final weight, and naso-anal length. Despite not directly altering the morphology of muscle tissue, these results may indicate enough exposure to interfere with animal metabolism.

Keywords: Glyphosate; Pesticidas; Toxicity; Maternal exposure; Muscle fibers, skeletal; Mice, inbred C57BL

INTRODUÇÃO

O glifosato (N-(fosfonometil)glicina) é um composto organofosforado que ocupou o primeiro lugar na lista dos dez ingredientes ativos mais vendidos no Brasil, em 2018.⁽¹⁾ Está presente na formulação do Roundup® Original DI (Monsanto do Brasil LTDA., São Paulo, SP, Brasil), um dos herbicidas mais utilizados no mundo,⁽²⁾ que correspondeu a quase 72% do uso global de pesticidas em 2016.⁽³⁾ Seu mecanismo de ação consiste na inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase da via do chiquimato, responsável pela produção do intermediário corismato, composto necessário na síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais para o desenvolvimento da planta.⁽⁴⁾

Embora essa via não esteja presente nos mamíferos, estudos já demonstraram que o herbicida possui toxicidade em ratos⁽⁵⁾ e camundongos,⁽⁶⁾ bem como em humanos,⁽⁷⁾ estando associado à gênese de diversas doenças.⁽⁸⁾

No Brasil, ainda não há limite estabelecido de glifosato ou qualquer outro herbicida na água ou solo pelas agências controladoras. De acordo com a *Environmental Protection Agency* (EPA), agência norte-americana, o limite de glifosato em água potável compreende 700µg/L, com dose diária aceitável de 0,05mg/kg por massa corpórea.⁽⁹⁾

É, porém, comum que a dose estipulada seja ultrapassada, o que, por sua vez, reflete no aumento da concentração desse composto no ambiente,⁽¹⁰⁾ promovendo a contaminação de rios e águas superficiais,⁽¹¹⁾ tornando-se, assim, uma potencial fonte de exposição a seres humanos.⁽¹²⁾ Com relação à saúde humana, estudos demonstram que a exposição ao glifosato tem sido recorrentemente associada a problemas de saúde, como câncer, desregulação endócrina,⁽¹²⁾ depressão, mal de Parkinson, doença de Alzheimer,⁽¹³⁾ dentre outros.

Em roedores, estudos experimentais demonstraram que a exposição a pesticidas aumenta a incidência de tumores⁽⁶⁾ e promove anormalidades no funcionamento do fígado, coração e cérebro,⁽¹⁴⁾ assim como danos nas junções celulares de células intestinais, que levaram à

maior permeabilidade de membrana.⁽¹⁵⁾ Ainda, foi observado que pesticidas organofosforados promovem a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)⁽¹⁶⁾ e levam à degeneração⁽¹⁷⁾ e à necrose das fibras musculares.⁽¹⁸⁾

Sabe-se que a gestação é um período de numerosas alterações fisiológicas, o que promove a vulnerabilidade, tanto da mãe quanto do feto. Dessa forma, é estritamente importante a redução da exposição a quaisquer toxinas nesse período. Entretanto, a exposição materna a pesticidas torna-se cada vez mais comum, uma vez que pode ocorrer por meio do contato com o ar, a água, a comida contaminada, no ambiente de trabalho, durante a mistura de compostos químicos, na aplicação de pesticidas, na limpeza de equipamentos ou até de maneira indireta, durante o manuseio de plantações ou alimentos contaminados.⁽¹⁹⁾

Embora alguns estudos experimentais relatem que a exposição ao glifosato promova alterações em alguns tecidos, e no metabolismo da prole de ratos e camundongos,^(2,20) ainda não são conhecidos os efeitos da exposição a esse herbicida na musculatura esquelética de fêmeas expostas durante a prenhez e lactação. Com isso, a realização deste estudo torna-se de grande importância para o entendimento das possíveis alterações musculoesqueléticas promovidas pela exposição ao glifosato.

OBJETIVO

Avaliar a morfologia e a morfometria dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de fêmeas C57BL/6 expostas ao glifosato durante a prenhez e lactação.

MÉTODOS

Obtenção dos animais

Inicialmente, foram utilizados 30 camundongos C57BL/6 em idade reprodutiva, sendo 20 fêmeas e dez machos, com idade entre 60 e 90 dias de vida, e média de peso corporal de 20g a 25g. Os animais foram mantidos em condições de temperatura (28±2°C) e luminosidade (12 horas claro/escuro) controladas, e receberam ração padrão para roedores (Supralab, São Leopoldo, RS, Brasil) e água filtrada *ad libitum* durante todo o experimento.

Todas as experiências relatadas neste estudo foram conduzidas de acordo com a legislação nacional e internacional, norteadas pelas diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela *Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals* (PHS Policy), sob aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais

da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), portaria 3.730, de 16 de setembro de 2016, em Cascavel (PR).

Cruzamentos

Passados 7 dias de aclimação, foi realizado o esfregaço vaginal para acompanhamento do ciclo estral das fêmeas, que foram alocadas para realização dos cruzamentos quando se encontravam em fase de proestro, na proporção de duas fêmeas para um macho, durante o período noturno. Na manhã do dia seguinte, foi realizado novamente o esfregaço vaginal, para identificação de espermatozoides, e foi feita determinação do ciclo estral, para confirmação da prenhez. As fêmeas consideradas prenhas apresentaram presença de espermatozoides ou permanência de 4 dias na fase de diestro após o cruzamento. As fêmeas que não estavam prenhas passavam novamente pelo processo de cruzamento, até a confirmação da prenhez.

Administração do glifosato

Confirmada a prenhez, as fêmeas foram alocadas em caixas individuais, sendo separadas em Grupo Controle (CTL, n=6), que recebeu água filtrada durante todo o período de prenhez (21 dias) e lactação (30 dias), e Grupo Glifosato (GF, n=6), que recebeu a adição de 0,5% do herbicida glifosato Roundup® Original DI na água de beber, a partir do quarto dia de prenhez até o fim da lactação. Essa dosagem já tinha sido utilizada em estudo prévio,⁽²⁰⁾ e foi escolhida por mimetizar a contaminação direta de águas subterrâneas, uma vez que se aproxima da quantidade de pesticida encontrada na água após práticas agrícolas.⁽²¹⁾ A fórmula comercial do glifosato Roundup® Original DI utilizada continha 445g/L de sal de diamônio de N-(fosfometil)glicina, equivalentes a 370g/L (37,0% m/v) do componente ativo glifosato N-(fosfometil)glicina.

Eutanásia das fêmeas

Após 30 dias de amamentação, ocorreu o desmame, e a eutanásia das fêmeas foi realizada, depois de completados dois ciclos estrais. Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (Anasedan®, Vetbrands, Axxon Group, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e cloridrato de cetamina (Dopalen®, Vetbrands, Axxon Group, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em concentração de 9mg/kg e 90mg/kg, respectivamente, tendo sido, por fim, eutanasiados.

Após a eutanásia, as fêmeas foram pesadas. O comprimento nasoanal (CNA) foi mensurado, bem como

foram coletadas e pesadas as gorduras retroperitoneal e perigonadal.

Coleta dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo

Para a coleta do músculo extensor longo dos dedos (ELD), a pele foi rebatida, e o músculo tibial anterior foi removido, para a dissecação e a remoção do músculo ELD. Já o músculo gastrocnêmio foi retirado para a dissecação e a remoção do músculo sóleo (SOL). Os músculos ELD e SOL foram pesados (g) em balança analítica (Shimadzu UX620H, São Paulo, SP, Brasil) e seu comprimento (mm) foi mensurado com o auxílio de paquímetro digital (Digimess®, São Paulo, SP, Brasil).

Estudo histológico

Para o estudo das fibras musculares, os músculos ELD e SOL do antímero direito dos membros pélvicos foram retirados e armazenados em recipiente de vidro com fixador Methacarn. Após 24 horas, foram transferidos para álcool 70% e incluídos em parafina, com protocolo de emblocamento em álcool n-butílico.

Os músculos ELD e SOL foram seccionados transversalmente e submetidos à coloração de hematoxilina-eosina,⁽²²⁾ para a análise morfológica das fibras musculares, quantificação dos números de núcleos e fibras, relação núcleo e fibra, área, diâmetro maior e diâmetro menor de cada fibra muscular, a partir da análise de dez campos microscópicos (objetiva de 40x) para cada animal. O mesmo procedimento de corte foi realizado para coloração de tricrômico de Masson,⁽²³⁾ que permite a quantificação do tecido conjuntivo, por meio da análise de dez campos microscópicos para cada animal (objetiva de 20x).

As imagens das fibras musculares foram obtidas por meio do microscópio Olympus BX60® acoplado à câmera Olympus DP71 (Tóquio, Japão), com auxílio do programa DP Controller 3.2.1 276. Foi utilizado o programa Image-Pro Plus 6.0® (Media Cybernetics, Maryland, Estados Unidos) para a análise morfológica e morfométrica dos materiais.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism® (La Jolla, CA, Estados Unidos), levando-se em consideração os resultados dos testes de normalidade. Para os dados encontrados em normalidade, o teste estatístico empregado foi o teste *t* de Student, enquanto para os dados que não estavam em normalidade, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Dados do período de prenhez e lactação

O Grupo GF apresentou menor ganho de peso durante a gestação ($p=0,0327$) quando comparado ao Grupo CTL (Tabela 1). Porém, os dados relativos à perda de peso durante lactação, ao tempo de gestação e ao tamanho da ninhada não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados aos do Grupo CTL (Tabela 1).

Tabela 1. Dados do período de prenhez e lactação de camundongos dos Grupos Controle e Glifosato

	Grupos	
	CTL	GF
Ganho de peso gestação, g	12±1,4	9,5±1,9*
Perda de peso lactação, g	1,8±1,9	1,3±2,4
Tempo de gestação, dias	19±1,4	20±0,82
Tamanho da ninhada	6,7±1,6	5,0±1,5

Valores expressos como média±desvio padrão.

* $p<0,05$. Teste *t* de Student.

CTL: Grupo Controle; GF: Grupo Glifosato.

Dados corporais

Os animais do Grupo GF apresentaram menor peso corporal ($p=0,0103$) e CNA ($p=0,0002$) quando comparados aos do Grupo CTL (Tabela 2). Em contrapartida, os parâmetros de pesos das gorduras retroperitoneal e perigonadal foram semelhantes entre os grupos (Tabela 2). Os dados de peso e comprimento dos músculos ELD e SOL também não apresentaram diferenças estatísticas quando realizada a comparação entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros corporais de camundongos dos Grupos Controle e Glifosato

Parâmetros corporais	Grupos	
	CTL	GF
Peso corporal final, g	23±1,3	22±0,79*
CNA, cm	9,7±0,5	9,2±0,38*
Peso das gorduras, mg	469±42	602±173
Peso do músculo ELD, mg	7,2±1,8	10±4,9
Comprimento do músculo ELD, mm	7,3±0,98	7,9±1,0
Peso do músculo sóleo, mg	6,1±0,81	6,2±2,2
Comprimento do músculo sóleo, mm	6,1±1,3	6,3±1,2

Valores expressos como média±desvio padrão.

* $p<0,05$. Teste *t* de Student. Teste Mann-Whitney.

CTL: Grupo Controle; GF: Grupo Glifosato; CNA: comprimento nasoanal; ELD: extensor longo dos dedos.

Análise morfológica e morfométrica das fibras musculares

A avaliação das fibras musculares dos músculos ELD e SOL demonstrou fibras com morfologia preservada, mantendo o aspecto poligonal, a presença de núcleos periféricos e a eventual presença de núcleos centrais nos dois grupos estudados (Figura 1).

Quanto à análise morfométrica das fibras musculares dos músculos ELD e SOL, nenhum dos parâmetros avaliados apresentou diferenças significativas entre os Grupos CTL e GF (Tabela 3).

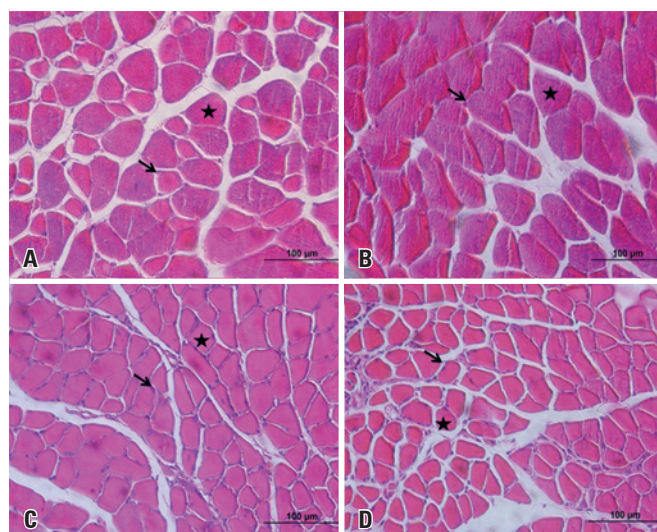


Figura 1. Fotomicrografias dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de camundongos C57BL/6 dos Grupos Controle e Glifosato. Corte transversal, hematoxilina-eosina. Fibras poligonais (estrelas) e núcleos periféricos (setas). (A) Músculo extensor longo dos dedos do Grupo Controle (A) e do Grupo Glifosato (B). Músculo sóleo do Grupo Controle (C) e do Grupo Glifosato (D)

Tabela 3. Análise morfométrica das fibras musculares e tecido conjuntivo dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de camundongos dos Grupos Controle e Glifosato

	Músculo ELD		Músculo SOL	
	Grupo CTL	Grupo GF	Grupo CTL	Grupo GF
Área, μm^2	115±34	152±86	157±24	187±69
Diâmetro maior, μm	15±1,8	17±4,8	18±1,4	19±3,1
Diâmetro menor, μm	9,6±1,4	11±3,2	11±0,83	12±2,7
Densidade de fibras	536±131	578±243	414±123	430±175
Número de núcleos periféricos	617±109	707±195	927±237	827±265
Número de núcleos centrais	1,0±0,71	0,80±1,3	2,2±2,4	1,8±2,5
Relação núcleo/fibra	1,2±0,16	1,3±0,22	2,3±0,34	1,9±0,15

Valores expressos como média±desvio padrão.

Teste *t* de Student. Teste de Mann-Whitney.

ELD: extensor longo dos dedos; SOL: sóleo; CTL: Grupo Controle; GF: Grupo Glifosato.

Análise da quantidade de tecido conjuntivo

A coloração com tricrômico de Masson evidenciou a presença de tecido conjuntivo entre as fibras musculares, principalmente no perímio envolvendo os fascículos (Figura 2). Quanto à estimativa da quantidade de tecido conjuntivo nos dois músculos estudados, não foram observadas diferenças estatísticas entre os Grupos CTL e GF (Figura 3).

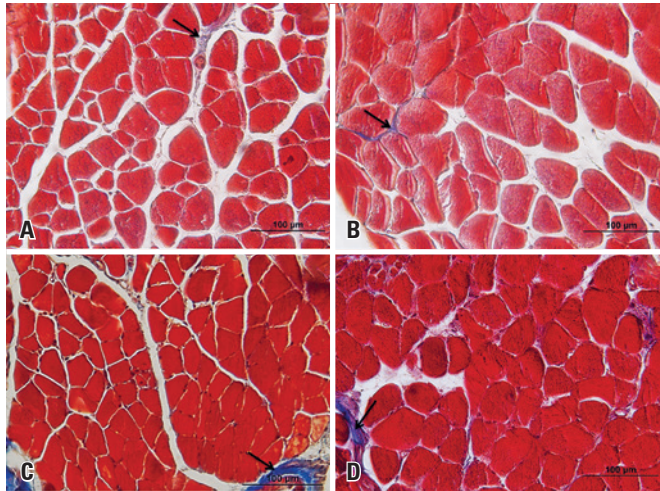
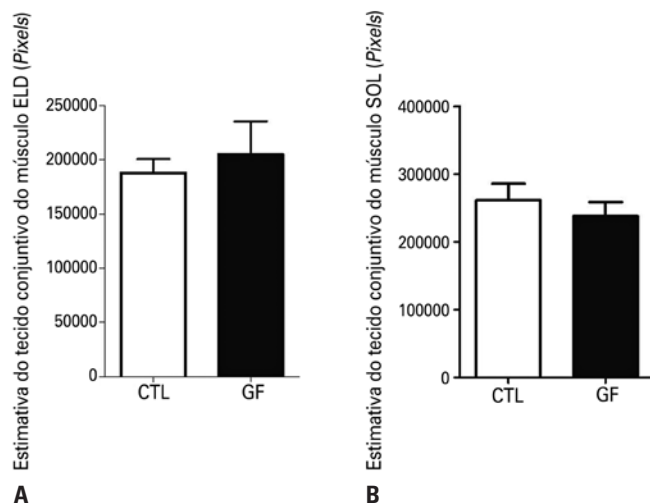


Figura 2. Fotomicrografias dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de camundongos C57BL/6 dos Grupos Controle e Glifosato. Corte transversal corado com tricrômico de Masson. Tecido conjuntivo (setas). Músculo extensor longo dos dedos do Grupo Controle (A) e do Grupo Glifosato (B). Músculo sóleo do Grupo Controle (C) e do Grupo Glifosato (D)



ELD: extensor longo dos dedos; SOL: sóleo; CTL: Grupo Controle; GF: Grupo Glifosato.

Figura 3. Gráfico da estimativa de tecido conjuntivo encontrado nas fibras musculares dos músculos extensor longo dos dedos e sóleo de camundongos C57BL/6, dos Grupo Controle e Grupo Glifosato, representado em pixels

DISCUSSÃO

O estudo demonstrou que a exposição das fêmeas ao glifosato durante o período de prenhez e lactação promoveu menor ganho de peso na gestação, o que também foi observado em outros trabalhos que expuseram ratas prenhas às concentrações de 1%^(14,24) e 0,5%⁽²⁾ de glifosato. Além disso, a exposição ao glifosato também resultou em menor peso corporal final e CNA dos animais expostos, o que corrobora os achados de Teleken et al.,⁽²⁰⁾ que também expuseram camundongos à concentração de 0,5% de glifosato durante essas fases de seu ciclo de vida.

Embora o presente estudo não tenha verificado realizado o consumo hídrico e alimentar dos animais, Beuret et al.,⁽²⁴⁾ e McKenna et al.,⁽²⁵⁾ demonstram que animais expostos ao glifosato apresentaram menor consumo hídrico e alimentar comparados aos não expostos, o que justifica o menor ganho de peso e os menores peso corporal final e CNA do Grupo GF, uma vez que a administração do glifosato pode refletir na redução da palatabilidade da água ingerida, ou promover alterações nos centros reguladores da sede, devido aos efeitos do herbicida e seus metabólitos.⁽¹⁴⁾

Quanto às fibras musculares, Bright et al.,⁽¹⁷⁾ demonstraram que ratos expostos a doses subletais de sarin apresentaram degeneração nas fibras musculares e infiltrado mononuclear no músculo diafragma, quando eutanasiados 24 horas e 3 dias após a exposição, respectivamente. Já De Bleecker et al.,⁽¹⁸⁾ notaram que a exposição ao composto paraoxon promoveu necrose nas fibras de diversos grupos musculares de ratos, com predominância no músculo diafragma. Entretanto, músculos mistos, como o masseter e o SOL, também foram afetados. Diante dos resultados, os autores observaram correlação entre a capacidade oxidativa dos músculos e sua suscetibilidade à necrose, sendo os músculos mistos com predominância de fibras oxidativas mais propensos à necrose.

Embora os achados da literatura demonstrem que a exposição a compostos organofosforados promovam a degeneração e a necrose das fibras musculares, bem como a relação entre predominância do tipo de fibra e suscetibilidade à necrose, o mesmo não foi observado nas fibras dos músculos ELD e SOL na exposição ao glifosato. Isso pode ser justificado por achados recentes, segundo os quais o potencial tóxico desse herbicida durante a exposição direta é mínimo, apesar da corrente associação da exposição ao glifosato com a ocorrência de doenças.⁽²⁶⁾ Assim, as ausências de alterações nos parâmetros morfológicos e morfométricos dos músculos ELD e SOL das fêmeas, e de quaisquer processos necróticos que apontem possíveis degeneração das fibras, podem estar associadas à baixa toxicidade do herbicida nessa primeira exposição.

Entretanto, mesmo que demonstrada a baixa toxicidade do glifosato na exposição direta, estudo demonstra que, apesar de não causar efeitos na primeira geração, esse herbicida promove aumento na ocorrência de doenças nos descendentes dos ratos expostos. Daí sua capacidade de promover alterações epigenéticas, que serão transmitidas para as gerações seguintes.⁽²⁷⁾ Devido aos efeitos promovidos pela exposição, o glifosato tem sido investigado como potencial disruptor endócrino químico,⁽²⁸⁾ que consiste em uma substância capaz de alterar o ambiente materno, e influenciar na trajetória do desenvolvimento intrauterino, bem como aumentar o risco de doenças crônicas na vida adulta.⁽²⁹⁾

Apesar de apresentar baixa toxicidade durante a exposição direta, a potencial ação do glifosato como disruptor endócrino pode promover alterações nos descendentes expostos, sendo estritamente necessário levar tal fato em consideração na etiologia das doenças nas futuras gerações.

CONCLUSÃO

Exposição a 0,5% de glifosato, durante a prenhez e lactação, promoveu menor ganho de peso durante a gestação e menores peso e tamanho corporal das fêmeas. Embora as características morfológicas do tecido muscular não tenham sido alteradas, a mudança nos parâmetros corporais indica que o glifosato pode interferir no metabolismo do animal, promovendo alterações em seu ciclo de obtenção e reserva de energia.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de bolsas Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da pesquisa, pelo Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP), número 817693/2015.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Ariadne Barbosa: curadoria de dados, investigação, edição e metodologia. Mylena de Campos Oliveira: curadoria de dados e metodologia. Camila Kuhn-Fraga: Metodologia. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro: revisão e supervisão. Sandra Lucinei Balbo: metodologia. Márcia Miranda Torrejais: metodologia, revisão da escrita e supervisão.

INFORMAÇÃO DOS AUTORES

Barbosa A: <http://orcid.org/0000-0002-1814-215X>
 Oliveira MC: <http://orcid.org/0000-0002-1850-9353>
 Kuhn-Fraga C: <http://orcid.org/0000-0003-4124-4311>
 Ribeiro LF: <http://orcid.org/0000-0001-5174-7399>
 Balbo SL: <http://orcid.org/0000-0002-2866-3928>
 Torrejais MM: <http://orcid.org/0000-0001-9129-2675>

REFERÊNCIAS

- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil. Boletins anuais 2018. Brasília (DF): IBAMA; 2018 [citado 2021 Mar 22]. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/#boletinsanuais>
- Ren X, Li R, Liu J, Huang K, Wu S, Li Y, et al. Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses. *Environ Pollut*. 2018;243(Pt B):833-41.
- Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur*. 2016;28(1):3.
- Steinrücken HC, Amrhein N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980;94(4):1207-12.
- Varayoud J, Durando M, Ramos JG, Milesi MM, Ingaramo PI, Muñoz-de-Toro M, et al. Effects of a glyphosate-based herbicide on the uterus of adult ovariectomized rats. *Environ Toxicol*. 2017;32(4):1191-201.
- George J, Prasad S, Mahmood Z, Shukla Y. Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin: a proteomic approach. *J Proteomics*. 2010;73(5):951-64.
- Thakur DS, Khot R, Joshi PP, Pandharipande M, Nagpure K. Glyphosate poisoning with acute pulmonary edema. *Toxicol Int*. 2014;21(3):328-30.
- Ubessi LD, Ubessi C, Kirchner RM, Jardim VM, Stumm EM. Uso de equipamentos de proteção por agricultores que utilizam agrotóxicos na relação com problemas de saúde. *Rev Enferm UFPE On line*. 2015;9(4):7230-8.
- Barceló D. Environmental protection agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water. *J Chromatogr A*. 1993;643(1-2):117-43. Review.
- Van Bruggen AH, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ*. 2018;616-17:255-68. Review.
- Cox C. Glyphosate (Roundup). *J Pest Reform*. 1998;18:3-17.
- Amaral EI. Avaliação da exposição ambiental ao glifosato na área agrícola da Serrinha do Mendanha [tese]. [Rio de Janeiro]: Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; 2009. 59 f.
- Hess SC, Nodari RO. Parecer técnico n.º 01/2015 [parecer técnico]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 2015. 9 f. [citado 2020 Nov 22]. Disponível em: <http://noticias.ufsc.br/files/2015/07/parecer-t%C3%A9cnico-N.-01.pdf>
- Daruich J, Zirulnik F, Gimenez MS. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ Res*. 2001;85(3):226-31.
- Vasiluk L, Pinto LJ, Moore MM. Oral bioavailability of glyphosate: studies using two intestinal lines. *Environ Toxicol Chem*. 2005;24(1):153-60.
- Barboza HT, Nascimento XP, Freitas-Silva O, Soares AG, DaCosta JB. Compostos organofosforados e seu papel na agricultura. *Rev Virtual Quim*. 2018;10(1):172-93.
- Bright JE, Inns RH, Tuckwell NJ, Griffiths GD, Marrs TC. A histochemical study of changes observed in the mouse diaphragm after organophosphate poisoning. *Hum Exp Toxicol*. 1991;10(1):9-14.
- De Bleecker JL, van den Abeele KG, De Reuck JL. Variable involvement of rat skeletal muscles in paraoxon-induced necrotizing myopathy. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1992;75(3):309-22.
- Makelarski JA, Romitti PA, Rocheleau CM, Burns TL, Stewart PA, Waters MA, Lawson CC, Bell EM, Lin S, Shaw GM, Olney RS; National Birth Defects Prevention Study. Maternal periconceptional occupational pesticide exposure and neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2014;100(11):877-86.
- Teleken JL, Gomes EC, Marmellini C, Moi MB, Ribeiro RA, Balbo SL, et al. Glyphosate based herbicide exposure during pregnancy and lactation malprograms the male reproductive morphofunction in F1 offspring. *J Dev Orig Health Dis*. 2020;11(2):146-53.

21. Cassault-Meyer E, Gress S, Séralini GÉ, Galeraud-Denis I. An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;38(1):131-40.
22. Junqueira LC, Junqueira LM. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. 1a ed. São Paulo: Santos; 1983. p. 13-48.
23. Bancroft JD, Steven A. *Theory and practice of histological techniques*. 3rd ed. Churchill Livingstone: Edinburg; 1990. p. 740.
24. Beuret CJ, Zirulnik F, Giménez MS. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reprod Toxicol*. 2005;19(4):501-4.
25. McKenna K, Thompson C. Osmoregulation in clinical disorders of thirst appreciation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;49(2):139-52. Review.
26. Mesnage R, Antoniou MN. Facts and fallacies in the debate on glyphosate toxicity. *Front Public Health*. 2017;5:316.
27. Kubsad D, Nilsson EE, King SE, Sadler-Riggelman I, Beck D, Skinner MK. Assesment of glyphosate induced epigenetic transgenerational inheritance of pathologies and sperm epimutations: generational toxicology. *Sci Rep*. 2019;9(1):6372.
28. Padmanabhan V, Cardoso RC, Puttabatappa M. Developmental programming, a pathway to disease. *Endocrinol*. 2016;157(4):1328-40. Review.
29. de Souza JS, Kizys MM, da Conceição RR, Glebocki G, Romano RM, Ortiga-Carvalho TM, et al. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. *Toxicology*. 2017;377:25-37.