

A EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO PROVOCA ATRESIA EM FOLÍCULOS OVARIANOS DE CAMUNDONGOS ADULTOS E NEONATOS

(Glyphosate exposition induce atresia in ovarian follicles of adult mice and neonates)

Israel Levi Nascimento SILVA¹; Carla Larissa de Castro Vieira CARNEIRO²; Fabrícia da Cunha Jácome MARQUES³; Rosilene AMORIM⁴; Gislei Frota ARAGÃO^{2,5}; Valdevane Rocha ARAÚJO^{2,6*}

¹Pós-Graduação em Ciências Veterinária (UECE). Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Itaperi, Fortaleza/CE. CEP: 60.714-903; ²Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (UECE); ³SEDUC/CE; ⁴Especialização em Fisiologia Humana (UECE); ⁵Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (UFC); ⁶Curso de Ciências Biológicas (UFDPar). *E-mail: valdevane.araujo@gmail.com

RESUMO

Herbicidas a base de glifosato causam impactos negativos sobre o desenvolvimento do sistema reprodutivo de fêmeas e são escassas as informações sobre os efeitos em diferentes estágios da vida reprodutiva das fêmeas, especialmente sobre a integridade dos folículos ovarianos. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo determinar se o glifosato afeta a morfologia de folículos ovarianos de camundongos gestantes e de sua prole. Camundongos fêmeas (n=6), com 8 semanas de idade, acasalaram com camundongos machos (n=3). Após confirmação da gestação, as fêmeas foram divididas igualmente em 2 grupos: Controle (CTRL) e Glifosato na concentração de 30mg/kg (M30). Filhotes fêmeas advindas do grupo M30 também foram avaliadas para observação de possíveis alterações decorrentes da exposição ao herbicida (M30f). Mediante histologia clássica, os folículos foram quantificados e classificados em relação à integridade morfológica e a categoria folicular. Os dados foram expressos em média±erro padrão da média e submetidos ao teste *t* de Student para comparação entre os grupos (CTRL e M30). A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$. Os resultados demonstraram um aumento significativo no número de folículos degenerados nos ovários de animais do grupo M30 em comparação ao grupo CTRL ($p < 0,05$). Na prole exposta ao herbicida durante a fase embrionária (M30f), foram contados no total 302 folículos, dos quais 41,39% estavam degenerados. Conclui-se que camundongos fêmeas expostas a concentração de 30mg/kg de glifosato durante a vida adulta ou intrauterina afeta a integridade morfológica ovariana, levando a um aumento na quantidade de folículos atrésicos, tanto nas matrizes, quanto em suas proles.

Palavras-chave: Herbicida, toxicidade reprodutiva, efeito teratogênico, degeneração folicular, exposição embrionária.

ABSTRACT

*Glyphosate-based herbicides have negative impacts on the development of the female reproductive system and there is little information on the effects at different stages of the female reproductive life, especially on the integrity of ovarian follicles. Thus, the present study aimed to determine whether glyphosate affects the morphology of ovarian follicles in pregnant mice and their offspring. Female mice (n=6), 8 weeks old, mated with male mice (n=3). After confirmation of pregnancy, the females were equally divided into two groups: Control (CTRL) and Glyphosate at a concentration of 30 mg/kg (M30). Female offspring from the M30 group were also evaluated to observe potential alterations resulting from herbicide exposure (M30f). Follicles were quantified and classified based on morphological integrity and follicular category by classical histology analyses. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean and subjected to the Student's *t*-test for comparison between groups (CTRL and M30). Differences were considered significant at $p < 0.05$. The results showed a significant increase in the number of degenerated follicles in the ovaries of animals from the M30 group compared to the CTRL group ($p < 0.05$). In offspring exposed to the herbicide during the embryonic phase (M30f), 302 follicles were counted, of which 41.39% were degenerated. It is concluded that female mice exposed to a concentration of 30 mg/kg of glyphosate during adulthood or intrauterine life experience compromised ovarian morphological integrity, leading to an increase in the number of atretic follicles, both in the mothers and their offspring.*

Keywords: Herbicide, reproductive toxicity, teratogenic effect, follicular degeneration, embryonic exposure.

INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são insumos agrícolas utilizados no mundo inteiro, os quais foram introduzidos nos Estados Unidos na década de 1950, durante um movimento conhecido como “Revolução Verde”. Nesse período, o emprego de novas técnicas, máquinas e produtos químicos que aperfeiçoaram a produção no campo teve grande destaque. Nas décadas seguintes, esse movimento despontou no Brasil e, desde então, o uso desses produtos químicos tem sido prática característica da agricultura brasileira (LOPES e ALBUQUERQUE, 2018).

Mundialmente, o Brasil é considerado um dos maiores produtores de alimentos, devido ao fato de ser também um dos maiores consumidores de agrotóxicos (CARNEIRO *et al.*, 2022). Embora o uso de agrotóxicos garanta o aumento da produtividade nas pastagens pelo mundo, seu uso massivo está relacionado a impactos negativos diretos no meio ambiente e na saúde humana (GHISI *et al.*, 2020), uma vez que são considerados produtos perigosos.

Os principais agrotóxicos são herbicidas que têm como base ativa o glifosato ou *N*-(fosfonometil) glicina, também comercialmente conhecido como “Roundup®” (GHISI *et al.*, 2020). Essas substâncias são utilizadas em campos agrícolas, mas também em jardins domésticos para o controle de plantas indesejáveis. Sua vasta aplicação nas pastagens, por exemplo, resultou em espécies invasoras mais resistentes e tolerantes e, consequentemente, em aumento na frequência de uso e disseminação do produto, além da necessidade de aumentar suas concentrações para garantia do efeito (GHISI *et al.*, 2020; CARNEIRO *et al.*, 2022). Assim, além de contaminarem o meio ambiente, podem causar riscos à saúde humana (ALARCÓN *et al.*, 2019), uma vez que o consumo de alimentos e água contaminados são a principal forma de exposição ao glifosato.

Vento, partículas de poeira e água de erosão também podem ser fontes contaminantes, elevando a probabilidade de incidência de indivíduos expostos aos herbicidas (GILLEZEAU *et al.*, 2019). A exposição crônica ao glifosato tem demonstrado relação com o desenvolvimento de diversos problemas de saúde, por ser um potencial agente cancerígeno e desencadeador de irregularidades em sistemas fisiológicos completos, como o sistema reprodutivo (PANIS *et al.*, 2024). Recentemente, o glifosato foi considerado um desregulador endócrino, uma vez que sua exposição e consequente absorção pelo organismo simula ou bloqueia efeitos hormonais, o que prejudica processos fisiológicos (JARREL *et al.*, 2020).

Estudos *in vitro* com células da granulosa de suínos demonstraram que diferentes doses de glifosato diminuem a proliferação celular e a produção de estrogênio, além de aumentar a produção de progesterona e de marcadores de estresse oxidativo (GIGANTE *et al.*, 2018). Em bovinos, células do tecido ovariano exposto ao glifosato ou a herbicidas a base de glifosato (HBG) demonstraram secreção dos esteroides ovarianos alterados e, especificamente, o Roundup® foi responsável por uma redução acentuada no número de células da granulosa (PEREGO *et al.*, 2017). Tais resultados ressaltam o potencial desregulador endócrino do glifosato e de seus derivados sobre a fisiologia reprodutiva feminina, impactando sobre maneira a função ovariana (INGARAMO *et al.*, 2020).

Em camundongos machos descendentes de fêmeas expostas durante a gestação e lactação (TELEKEN *et al.*, 2019), o glifosato desregulou o eixo-hipotalâmico-hipofisário, levando ao aumento de liberação de hormônio luteinizante (LH) e das concentrações de

testosterona. Além disso, mesmo em linhagens de células cancerígenas, herbicidas a base de glifosato foram capazes de danificar o DNA dessas células, acumulando mutações, causar desequilíbrio oxidativo, e alterar a função dos receptores de estrogênio no câncer de mama, confirmando seus efeitos carcinogênicos (SERRA *et al.*, 2021).

No tocante ao sexo feminino, estudos demonstraram efeitos prejudiciais de HBG diretamente sobre a organização das estruturas do sistema reprodutivo de fêmeas de peixes-zebra (DAVICO *et al.*, 2021), alterações na atividade proliferativa de ovários e útero de cordeiros (ALARCÓN *et al.*, 2019) e no surgimento de anomalias congênitas e problemas com o desenvolvimento fetal na segunda geração da prole de ratos (MILESI *et al.*, 2018). Pesquisas *in vitro* ainda demonstraram efeitos negativos sobre a proliferação das células da granulosa, diminuição da viabilidade destas células em suínos e que a exposição de células foliculares bovinas ao glifosato causou alterações diretas no sistema reprodutivo por meio do efeito sobre a função ovariana (PEREGO *et al.*, 2016; SERRA *et al.*, 2021).

Mesmo que os efeitos nocivos à saúde causados pelo uso de defensivos agrícolas seja objeto de pesquisa de diversos estudos ainda há uma escassez de informações sobre os impactos específicos do herbicida glifosato, em diferentes estágios da vida reprodutiva, sobre a morfologia ovariana. Até o momento, não foram encontrados estudos que avaliem os efeitos da exposição ao glifosato em fêmeas de camundongos prenhes, com foco na integridade dos folículos ovarianos, tanto nas matrizes quanto na prole. Assim, o presente estudo teve como objetivo determinar se o glifosato afeta diretamente a integridade morfológica das estruturas ovarianas de camundongos que tiveram esse contato durante a fase embrionária, bem como identificar possíveis alterações na morfologia da prole feminina.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e princípios éticos

Foram utilizadas como matrizes (n=6), camundongos *Swiss* com 8 semanas de idade e peso corporal entre 25 e 30 gramas. Os animais foram mantidos a 26±2 °C com um ciclo 12/12 horas de luz/escuro, com água e ração *ad libitum*, durante todo período do experimento. Além das matrizes foram utilizados 3 camundongos machos adultos para o acasalamento com as matrizes. Após confirmação da prenhez, em todas as fêmeas, e suas subsequentes partições, nasceram 68 filhotes, sendo 32 eram fêmeas. Vale ressaltar que cada fêmea gestante pariu apenas uma vez. Posteriormente ao período de desmame, matrizes e prole foram eutanasiadas, com 14 e 5 semanas de idade, respectivamente.

Os animais foram manipulados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal após aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o número CEUA - UFC: 4067310818.

Desenho experimental

Após 24h do acasalamento e confirmação da gestação (D0), as fêmeas foram separadas em 2 grupos, Grupo Controle (CTRL) (n=3) e Grupo Glifosato (M30) (n=3). O Grupo Controle recebeu água destilada por via oral (VO); enquanto as fêmeas do Grupo

Glifosato foram submetidas ao contato com 30 mg/kg deste defensivo agrícola, VO, desde o primeiro dia (D1) após a confirmação da gestação até o último dia de gestação (D18-22).

A dose escolhida para administração do herbicida foi baseada na ingestão diária aceitável (IDA) que, para camundongos, é equivalente a dose de 0,3mg/kg (TESSARI, 2006). Entretanto, tendo em vista a necessidade de avaliação da exposição crônica ao herbicida, neste estudo foi utilizada uma dose cem vezes maior que a IDA, ou seja, 30mg/kg. É importante salientar que, a fim de minimizar o risco de degradação do herbicida, já que sua meia vida é curta (49 dias; MERCURIO, 2014), o produto foi diariamente diluído em água.

Prole

Dentre os filhotes, as fêmeas de ambos os grupos de matrizes expostas ao glifosato e do grupo controle foram avaliadas. O parto de todas as matrizes ocorreu de maneira natural. No dia 21, após o parto, foi realizado o desmame. Os filhotes do sexo masculino e feminino foram separados e a identificação foi verificada por meio da diferença visual da distância anogenital, que é maior nos machos que nas fêmeas. Dentre estes filhotes nasceram 32 fêmeas das quais 21 foram utilizadas neste estudo, 7 pertenciam ao grupo Controle (CTRLf) e 14 ao grupo de filhotes expostos ao glifosato (M30f).

Histologia clássica

Após a eutanásia, os ovários coletados foram fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas. Posteriormente, foram conservados em solução de etanol a 70% à temperatura ambiente até o processamento histológico. Durante o processamento, os ovários foram desidratados em uma série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol, incluídos em parafina e seccionados a 5µm em micrótomo rotativo. Finalmente, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). A análise da morfologia dos ovários foi realizada a partir da contagem de 30 folículos por tratamento através do microscópio óptico (40x).

Os folículos foram quantificados e classificados qualitativamente em relação a integridade morfológica do oócito e das células da granulosa. Os folículos foram considerados morfolologicamente normais quando apresentavam um oócito íntegro, rodeado por células da granulosa organizadas em um ou mais camadas e sem núcleo picnótico. Foram considerados degenerados os folículos que apresentavam retração oocitária, núcleo picnótico e/ou células foliculares desorganizadas e destacadas da membrana basal (JIMENEZ *et al.*, 2016). A partir destes parâmetros, folículos degenerados foram classificados em: tipo I, quando apenas o oócito apresentou sinais de degeneração e tipo II quando oócito e células da granulosa estavam degeneradas (SILVA *et al.*, 2002).

A classificação dos estágios dos folículos ovarianos foi realizada, considerando os folículos como: primordiais (oócito imaturo circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso), intermediários (uma camada de células pavimentosas e cuboidais), e folículos em desenvolvimento, os quais incluem os estágios primário (uma camada de células cuboidais), secundário (duas ou mais camadas de células cuboidais) e antral (presença da cavidade antral entre múltiplas camadas de células da granulosa) (FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk e o teste t de Student não paramétrico para comparação entre os grupos (Controle e M30). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando a probabilidade de ocorrência da hipótese nula foi menor que 5% ($p < 0,05$).

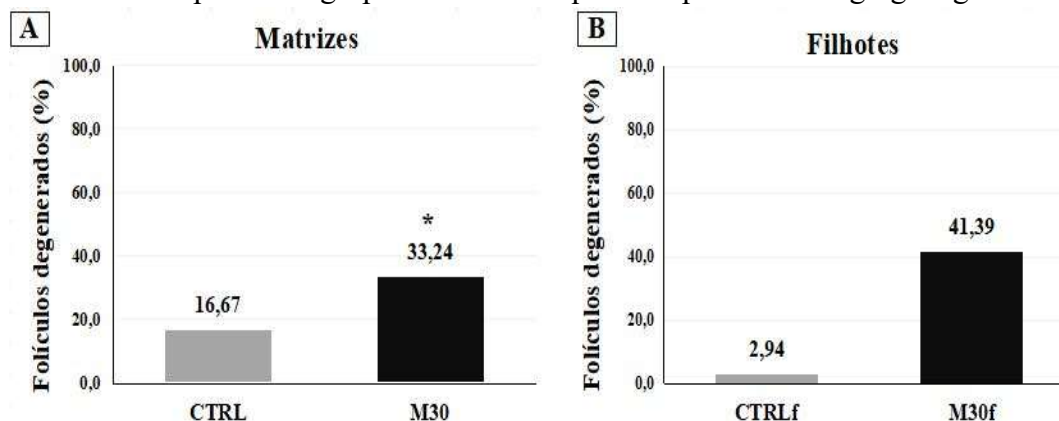
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Implicações do HBG na morfologia ovariana das matrizes e de suas proles

A partir da análise histológica, foram contabilizados 508 e 336 folículos nos ovários das matrizes e filhotes, respectivamente. Nos ovários das matrizes foram observados 346 folículos nas fêmeas expostas a 30mg/kg de glifosato (M30) e 162 folículos nas fêmeas não expostas, ou seja, nas fêmeas do grupo controle. Já em relação aos filhotes foram observados um total de 336, sendo 302 no grupo tratado (M30) e 34 folículos no grupo controle. Considerando os baixos números de folículos encontrados nos filhotes do grupo controle, para esta idade, os dados foram apresentados de forma numérica e/ou descritiva e considerados dados qualitativos.

Observa-se na Fig. 01 o percentual de folículos degenerados nos ovários das matrizes (Fig. 01A) e de seus filhotes fêmeas (Fig. 01B) em ambos os grupos testados. Em relação as matrizes, 33,24% dos folículos do grupo glifosato apresentaram algum sinal de degeneração, sendo este percentual significativamente superior ($p < 0,05$) ao observado no grupo controle (Fig. 01A). De forma semelhante, a exposição da prole ao glifosato durante o período pré-natal também provocou degeneração folicular, sendo observada uma taxa da ordem de 41,39% (Fig. 01B).

Figura 01: Total de folículos morfologicamente degenerados presentes nos ovários de matrizes e de suas proles do grupo CTRL ou daquelas expostas a 30mg/kg de glifosato.



Obs.: (*) Diferença significativa entre o grupo controle e o tratado com glifosato ($p < 0,05$).

Quando os folículos degenerados foram categorizados, observou-se que, em relação as matrizes, no grupo M30, a maior parte dessas estruturas pertenciam a categoria de folículos pré-antrais em desenvolvimento, ou seja, folículos primários (23,47%) e secundários (37,39%), ou ainda, a categoria de folículos antrais (23,47%). Por outro lado, dos 16,66% de

folículos que apresentavam sinais de degeneração nos ovários das matrizes do grupo controle, a maior parte pertencia a categoria de folículos secundários (40,74%) (Tab. 01).

Tabela 01: Folículos morfologicamente degenerados separados em diferentes categorias presentes nos ovários de matrizes do grupo controle ou tratados com 30mg/kg de glifosato.

Tratamento (n)	Folículos primordiais (%)	Folículos primários (%)	Folículos secundários (%)	Folículos antrais (%)
Controle (27)	1/27 (3,70)	0/27 (0,0)	11/27 (40,74)	6/27 (22,22)
M30 (115)	18/115 (15,65)	0/115 (0,0)	43/115 (37,39)	27/115 (23,48)

Conforme mencionado anteriormente, os dados dos folículos degenerados nos filhotes de fêmeas expostas ao glifosato foram apresentados de forma descritiva, sendo observados que mais da metade (51,2%) dessas estruturas foram classificados como folículos secundários (Tab. 02).

Tabela 02: Folículos morfologicamente degenerados (%) separados em diferentes categorias presentes nos ovários das proles do grupo controle ou tratado com 30mg/kg de glifosato.

Tratamento (n)	Folículos primordiais	Folículos intermediários	Folículos primários	Folículos secundários	Folículos antrais
Controle (1)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	1/1 (100)	0/1 (0,0)
M30 (125)	10/125 (8,00)	2/125 (1,60)	32/125 (25,6)	64/125 (51,2)	17/125 (13,6)

Grau de degeneração dos folículos ovarianos em matrizes e de suas proles

A Fig. 02 demonstra o percentual de folículos degenerados de acordo com o grau e/ou tipo de degeneração. Foi observado que a percentagem de folículos degenerados do tipo II foi significativamente superior no grupo M30 quando comparado ao percentual de folículos degenerados do tipo I ($p < 0,05$). Entretanto, isto não foi observado para o grupo controle, no qual a proporção de folículos degenerados dos tipos I e II foi semelhante ($p > 0,05$).

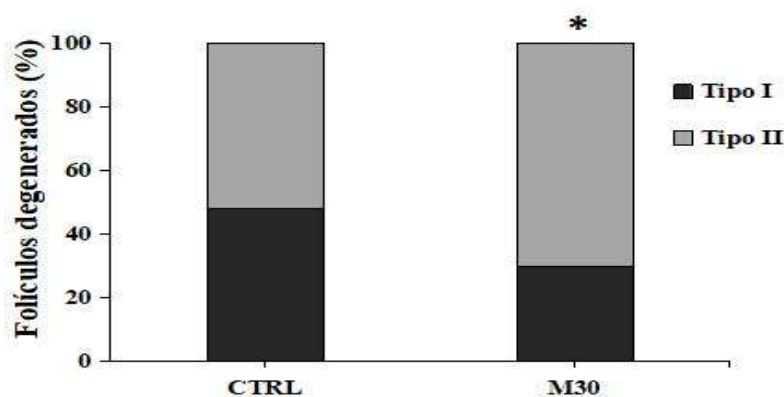


Figura 02: Folículos degenerados dos tipos I e II nos grupos controle e em matrizes expostas a 30mg/kg de glifosato. *Diferença significativa entre graus de degeneração dentro do grupo ($p < 0,05$)

Dentre os 125 folículos degenerados contados nos filhotes do grupo exposto ao herbicida durante a gestação, cerca de 30,4% foram classificados em degeneração do tipo I, enquanto 69,6% foram classificados como do tipo II. Portanto, é possível sugerir que, neste grupo, houve uma predominância no comprometimento de toda a estrutura folicular, ou seja, presença de degeneração tanto no oócito quanto nas células da granulosa.

No presente trabalho foram verificadas alterações histológicas na estrutura de folículos ovarianos de matrizes de camundongos expostas ao glifosato durante a gestação, bem como de suas proles. Essas análises foram realizadas através de histologia clássica, método importante na avaliação de vários tecidos, inclusive para avaliação de folículos presentes no tecido ovariano. As técnicas histológicas permitem verificar, dentre outras coisas, as alterações na morfologia e integridade de todos os compartimentos foliculares, ou seja, oócitos, células da granulosa e células da teca (ARAÚJO *et al.*, 2014).

Neste estudo, a exposição de fêmeas gestantes ao glifosato aumentou o número de folículos atresícos tanto nos ovários das matrizes, quanto nos ovários de suas proles. Corroborando com estes achados, a exposição de camundongos prenhes (REN *et al.*, 2018) e ratas (HAMDAOUI *et al.*, 2017) a herbicidas a base de glifosato também induziu atresia folicular. Além disso, em ovários de peixe-zebras, essa exposição provocou danos tanto nas células foliculares quanto uma redução na espessura do envelope vitelínico (DAVICO *et al.*, 2021). Destaca-se que o envelope vitelínico seria a estrutura equivalente a zona pelúcida em mamíferos e tal estrutura é fundamental para a diferenciação das células da granulosa, sucesso da fertilização e proteção inicial do embrião (LITSCHER e WASSARMAN, 2018; MOROS-NICOLÁS *et al.*, 2021).

A exposição das matrizes ao glifosato (grupo M30) aumentou a degeneração folicular do tipo II, ou seja, houve danos em todos os compartimentos foliculares (oócito e células da granulosa e da teca) de todas as categorias foliculares, sendo predominante em folículos primários, secundários e antrais, tanto de matrizes quanto de suas proles. Corroborando com estes resultados, Milesi *et al.* (2018) verificaram retardo no crescimento e anomalias congênitas na prole de ratas prenhes e expostas ao glifosato (200mg/kg).

Tendo em vista que ao longo do desenvolvimento folicular, os compartimentos foliculares aumentam sua atividade metabólica, estas células tornam-se cada vez mais suscetíveis a alterações. As células foliculares são responsáveis pela produção dos esteroides gonadais, fatores de crescimento e citocinas que regulam e mantêm o desenvolvimento dos folículos ovarianos (COLLADO-FERNANDEZ *et al.*, 2012; MATSUDA *et al.*, 2012).

Assim, considerando que a proliferação e a sobrevivência dos gametas estão diretamente relacionadas a atividade de suas células, as alterações morfológicas (HAMDAOUI *et al.*, 2017) e na dinâmica folicular ovariana (ALARCÓN *et al.*, 2019), causadas pela exposição ao glifosato, levam a um prejuízo da atividade ovariana, tanto na vida adulta quanto na vida pré-natal.

Os efeitos da exposição ao glifosato na vida adulta de ratas foram demonstrados por Milesi *et al.* (2018) que verificaram que não houve alterações morfológicas no início da puberdade da primeira geração (F1) da prole exposta ao HBG durante o período perinatal. Contudo, nestes animais foi observada uma maior perda de embriões pré-implantação. Com base nos resultados, os pesquisadores sugeriram que tal evento pode ter sido ocasionado por

uma falha no desenvolvimento uterino das ratas F1 expostas ao HBG no útero e durante a lactação, o que tornou o ambiente para a implantação do embrião menos receptivo durante a fase adulta. No mesmo estudo, foi observado que a prole F2, descendente das ratas expostas ao herbicida no útero e durante a lactação, apresentaram redução no peso e tamanho corporal, indicando um comprometimento cumulativo entre as gerações.

Trabalhos recentes têm demonstrado que a exposição a herbicidas altera a secreção de hormônios reprodutivos e outras substâncias importantes para o desenvolvimento dos gametas. Popoola e Sakpa (2018) verificaram em ratos machos que doses de 400 e 2000mg/kg de HBG reduziram os níveis de FSH e testosterona. De maneira semelhante, em ovelhas jovens, Alarcón *et al.* (2019) demonstraram diminuição na expressão dos RNAm para GDF-9 (growth and differentiation fator-9) e para o receptor de FSH. Tais achados podem ser devido aos prejuízos causados pela exposição a esses herbicidas nas gônadas de indivíduos adultos ou jovens, levando a uma alta taxa de degeneração folicular, especialmente durante a fase antral.

Os resultados do presente estudo ressaltam o efeito prejudicial às estruturas reprodutivas de fêmeas murinas quando expostas ao glifosato e ainda garantem evidências do potencial efeito teratogênico deste herbicida, haja vista que a exposição durante o período embrionário resultou em maior número de folículos degenerados na prole. Assim, novas pesquisas podem ser realizadas a fim de detalhar o impacto do glifosato sobre a estrutura morfofuncional ovariana, bem como um possível efeito negativo sobre a fertilidade feminina.

CONCLUSÕES

A exposição de camundongos prenhes a concentração de 30mg/kg de glifosato afeta negativamente a integridade morfológica ovariana, resultando em um maior número de folículos atrésicos, nos ovários de matrizes e filhotes. Entretanto, ainda são necessárias mais pesquisas para avaliar os possíveis prejuízos da exposição neonatal a este herbicida.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro por meio da bolsa que viabilizou esta pesquisa. Agradecimentos especiais ao Laboratório Laborocha Filho por sua assistência para realização do processamento histológico ao longo do estudo.

REFERÊNCIAS

ALARCÓN, R.; INGARAMO, P.I.; RIVERA, O.E.; DIOGUARDI, G.H.; REPETTI, M.R.; DEMONTE, L.D.; MILESI, M.M.; VARAYOUD, J.; MUÑOZ-DE-TORO, M.; LUQUE, E.H. Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the histofunctional differentiation of the ovaries and uterus in lambs. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v.482, p.45-56, 2019.

ARAÚJO, V.R.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.12, n.1, p.1-14, 2014.

CARNEIRO, C.L.C.V.; CHAVES, E.M.C.; NEVES, K.R.T.; BRAGA, M.D.M.; ASSREUY, A.M. S.; MORAES, M.E.A.; ARAGÃO, G.F. Behavioral and neuroinflammatory changes caused by glyphosate: base herbicide in mice offspring. **Birth Defects Research**, v.4, n.115, p.488-497, 2022.

COLLADO-FERNANDEZ, E.; PICTON, H.M.; DUMOLLARD, R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. **The International Journal of Developmental Biology**, v.56, n.10/11/12, p.799-808, 2012.

DAVICO, C.E.; PEREIRA, A.G.; NEZZI, L.; JARAMILLO, M.L.; MELO, M.S.; MÜLLER, Y.M. R.; NAZARI, E. M. Reproductive toxicity of Roundup WG® herbicide: impairments in ovarian follicles of model organism danio rerio. **Environmental Science and Pollution Research**, v.28, n.12, p.15147-15159, 2021.

FIGUEIREDO, J.R.; LIMA, L.F.; SILVA, J.R.V.; SANTOS, R.R. Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. **Animal Reproduction**, v.15, n.1, p.648-659, 2018.

GHISI, N.C.; ZUANAZZI, N.R.; FABRIN, T. M.C.; OLIVEIRA, E.C. Glyphosate and its toxicology: a scientometric review. **Science of the Total Environment**, v.733, p.1-15, 2020.

GIGANTE, P.; BERNI, M.; BUSSOLATI, S.; GRASSELLI, F.; GROLLI, S.; RAMONI, R.; BASINI, G. Glyphosate affects swine ovarian and adipose stromal cell functions. **Animal Reproduction Science**, v.195, p.185-196, 2018.

GILLEZEAU, C.; VAN GERWEN, M.; SHAFFER, R.M.; RANA, I.; ZHANG, L.; SHEPPARD, L.; TAIOLI, E. The evidence of human exposure to glyphosate: a review. **Environmental Health**, [S.L.], v.18, n.1, p.1-14, 2019.

HAMDAOUI, L.; NAIFAR, M.; RAHMOUNI, F.; HARRABI, B.; AYADI, F.; SAHNOUN, Z.; REBAI, T. Subchronic exposure to kalach 360 SL-induced endocrine disruption and ovary damage in female rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v.124, n.1, p.27-34, 2017.

INGARAMO, P.; ALARCÓN, R.; MUÑOZ-DE-TORO, M; LUQUE, E.H. Are glyphosate and glyphosate-based herbicides endocrine disruptors that alter female fertility? **Molecular And Cellular Endocrinology**, v.518, n.1-12, 2020.

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.1-9, 2020.

JIMENEZ, C.R.; ARAÚJO, V.R.; PENITENTE-FILHO, J.M.; AZEVEDO, J.L.; SILVEIRA, R.G.; TORRES, C.A.A. The base medium affects ultrastructure and survival of bovine preantral follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v.85, n.6, p.1019-1029, 2016.

LITSCHER, E.S.; WASSARMAN, P.M. The Fish Egg's Zona Pellucida. **Current Topics in Developmental Biology**, n.275/305, p.275-305, 2018

LOPES, C.V.A.; ALBUQUERQUE, G.S.C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v.42, n.117, p.518-534, 2018.

MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA, S. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. **Journal Of Reproduction and Development**, v.58, n.1, p.44-50, 2012.

MERCURIO, P.; FLORES, F.; MUELLER, J.F.; CARTER, S.; NEGRI, A.P. Glyphosate persistence in seawater. **Mar Pollut Bull**, v.85, n.2, p.385-390, 2014.

MILESI, M.M.; LORENZ, V.; PACINI, G.; REPETTI, M.R.; DEMONTE, L.D.; VARAYOUD, J.; LUQUE, E.H. Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide impairs female reproductive outcomes and induces second-generation adverse effects in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, v.92, n.8, p.2629-2643, 2018.

MOROS-NICOLÁS, C.; CHEVRET, P.; JIMÉNEZ-MOVILLA, M.; ALGARRA, B.; COTS-RODRÍGUEZ, P.; GONZÁLEZ-BRUSI, L.; AVILÉS, M.; IZQUIERDO-RICO, M.J. New Insights into the Mammalian Egg Zona Pellucida. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.6, p.1-20, 2021.

PANIS, C.; CANDIOTTO, L.Z.P.; GABOARDI, S.C.; TEIXEIRA, G.T.; ALVES, F.M.; SILVA, J.C.; SCANDOLARA, T.B.; RECH, D.; GURZENDA, S.; PONMATTAM, J. Exposure to Pesticides and Breast Cancer in an Agricultural Region in Brazil. **Environmental Science & Technology**, v.58, n.24, p.10470-10481, 2024.

PEREGO, M.C.; SCHUTZ, L.F.; CALONI, F.; CORTINOVIS, C.; ALBONICO, M.; SPICER, L.J. Evidence for direct effects of glyphosate on ovarian function: glyphosate influences steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa but not theca cells in vitro. **Journal of Applied Toxicology**, v.37, n.6, p.692-698, 2016.

PEREGO, M.C.; CALONI, F.; CORTINOVIS, C.; SCHUTZ, L.F.; ALBONICO, M.; TSUZUKIBASHI, D.; SPICER, L.J. Influence of a Roundup formulation on glyphosate effects on steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa cells in vitro. **Chemosphere**, v.188, p.274-279, 2017.

POPOOLA, S.O.; SAKPA, C.L. Hormones of Pituitary-Gonadal Axis and Histology of Pituitary Gland Following Oral Treatment of Male Wistar Rats with Glyphosate. **Journal of Biomedical Research and Clinical Practice**, v.1, p.164-169, 2018.

REN, X.; LI, R.; LIU, J.; HUANG, K.; WU, S.; LI, Y.; LI, C. Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses. **Environmental Pollution**, v.243, p.833-841, 2018.

SERRA, L.; ESTIENNE, A.; VASSEUR, C.; FROMENT, P.; DUPONT, J. Review: mechanisms of glyphosate and glyphosate-based herbicides action in female and male fertility in humans and animal models. **Cells**, v.10, n.11, p.3079-3087, 2021.

SILVA, J.R.V.; FERREIRA, M.A.L.; COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; CARVALHO, F.C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v.43, n.3, p.203-209, 2002.

TELEKEN, J.L.; GOMES, E.C.Z.; MARMENTINI, C.; MOI, M.B.; RIBEIRO, R.A.; BALBO, S.L.; AMORIM, E.M.P.; BONFLEUR, M.L. Glyphosate-based herbicide exposure during pregnancy and lactation malprograms the male reproductive morphofunction in F1 offspring. **Journal Of Developmental Origins of Health and Disease**, v.11, n.2, p.146-153, 2019.

TESSARI, C.S. **Efeito da exposição sub-crônica de camundongos BALB/c ao herbicida Glifosato-Biocarb sobre a resposta imune humoral e o comportamento**, 2006. 82p. (Dissertação Mestrado em Neurociências). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.