



ALTERAÇÕES MORFOLOGICAS DE OÓCITOS MATURADOS IN VITRO NA PRESENÇA DE ENDOSULFAN

Raiane Cristina Fratini de Castro¹
Giovanna Rafael Fernandes da Silva²
Patrícia Campos Paolozzi³
Geovana Izabela do Monte⁴
Isabelle Picada Emanuelli⁵

Promoção da Saúde

Resumo

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

Palavras-chave: Agrotóxico; Fertilidade feminina; Modelo animal.

¹Aluna de Medicina Veterinária/ Unicesumar, bolsista PIBIC/CNPq/ Unicesumar.
raianecfratini@gmail.com

²Aluna de Medicina Veterinária/ Unicesumar. giovannafs1@gmail.com

³Aluna do Mestrado em Tecnologias Limpas/ Unicesumar. patriciacamposp07@gmail.com

⁴Aluna do Mestrado em Tecnologias Limpas/ Unicesumar, bolsista PIBIC/ICETI/ Unicesumar.
geovanaizabela19@gmail.com

⁵Docente do Mestrado de Tecnologias Limpas/ Unicesumar/ ICETI. isabele.emanuelli@unicesumar.edu.br.

INTRODUÇÃO

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

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

O uso exacerbado de pesticidas fez com que a produtividade de alguns grãos aumentasse muito mais, quando comparado ao uso de fertilizantes e irrigações nas plantações (OERKE, 2006). Os pesticidas são ferramentas essenciais à produção agrícola brasileira e à manutenção do seu alto nível produtivo. Combatem pragas, ervas daninhas e outros patógenos que causam prejuízos e reduzem a produtividade de lavouras e criações (ANVISA, 2019). Em contrapartida, podem causar efeitos indesejáveis tanto no meio ambiente físico quanto no homem (BRASIL, 2016).

O uso e aplicação dessas substâncias químicas para o controle de pragas deve ser de maneira adequada, seguindo as recomendações da ANVISA (ANVISA, 2020) e orientações estabelecidas pelo laboratório fabricante. De acordo com alguns estudos, o

Realização



Apoio



uso indiscriminado de pesticidas pode causar intoxicações agudas, subagudas ou crônicas na população. As mais significativas são as intoxicações crônicas, que podem ocorrer em baixas doses durante anos (HENDGES, *et al.*, 2019). Estas substâncias, quando acumuladas no organismo, podem induzir a formação de diversas patologias.

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

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

Realização

Apoio

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

Outro fator agravante é que a maioria das investigações estão voltadas para os efeitos agudos da exposição a essas substâncias e ao tipo de exposição ocupacional, não contemplando as consequências crônicas dos contaminantes sobre crianças, fetos humanos (ou animais) em gestação, mulheres em idade fértil, adolescentes etc. (LARSEN 2017; LOPES *et al.*, 2018; TAVEIRA & ALBUQUERQUE, 2018).

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

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

Como consequência há uma necessidade de entender os riscos celulares e a toxicidade dos pesticidas sem utilizar modelos animais vivos sendo essenciais para testes de toxicidade reprodutiva feminina. Devido à preocupação com a saúde humana e o meio-ambiente, e a necessidade de utilizar modelos toxicológicos alternativos aos que utilizam cobaias, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um modelo *in vitro* para teste

Realização



Apoio



de toxicidade de pesticida utilizando oócitos de ovários de abatedouro e validar o modelo toxicológico desenvolvido durante o processo de maturação oocitária para prever riscos químicos na fertilidade feminina de mamíferos.

METODOLOGIA

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

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

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

1. PROTOCOLO DE MATURAÇÃO IN VITRO

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

Realização



Apoio



A maturação foi realizada em TCM199 com sais de Earles (Gibco®), glutamina (Sigma® cod: G8540) e NaHCO₃ (Mallinckrodt®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®), 22µg/mL piruvato (Biochemical® cod: 44094), 50µg/mL de gentamicina (Sigma® cod: G1272), 0,5µg de FSH/mL (Bioniche®), 50µg de LH/mL (Bioniche®) e 1µg de estradiol/mL (Sigma® cod: E2758), mantidos em estufa, a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar com máxima umidade durante 22-24 horas.

2. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO TOXICOLÓGICO IN VITRO

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

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

2.1 SELEÇÃO DOS PESTICIDAS

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

Para avaliar o efeito do pesticida no processo de maturação os oócitos foram

Realização

Apoio

expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de endossulfan (0; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 µg/mL) por 24 horas à 38,3 ° C. Diluições foram feitas em dimetilsulfóxido (DMSO) de forma que o controle negativo dos experimentos consistiu em DMSO sozinho na incubação.

3. MATURAÇÃO NUCLEAR DO OÓCITO

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

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



Figura 1: Oócito bovino com a presença de corpúsculo polar
Fonte: CASTRO et al., 2021

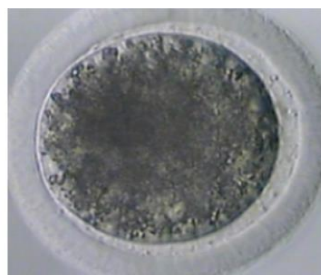


Figura 2: Oócito bovino com a ausência de corpúsculo polar
Fonte: CASTRO et al., 2021

4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste Qui-quadrado foi utilizado para comparar as taxas de maturação nuclear. As análises foram realizadas utilizando o software SAS, versão 9.1. As variáveis independentes testadas no experimento foram as diferentes concentrações de pesticidas.

Realização

Apoio

As variáveis dependentes testadas foram as taxas de maturação nuclear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

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

Tratamento (µG/ML)	Oócitos totais (n)	Presença de corpúsculo polar		Ausência de corpúsculo polar		Presença de expansão
		(n)	%	(n)	%	
0	42	37	88,10 ^a	5	11,90 ^a	SIM
0,01	40	31	77,50 ^a	9	22,50 ^a	SIM
0,1	45	14	31,11 ^b	31	68,89 ^b	SIM
1	45	9	20,00 ^b	36	80,00 ^b	SIM
10	40	0	0,00 ^c	40	100,00 ^c	NÃO
TOTAL	212	-	-	-	-	

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

Fonte: CASTRO *et al.*, 2021

A partir da análise da presença de corpúsculo polar (Tabela 1) foi possível

Realização

Apoio



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

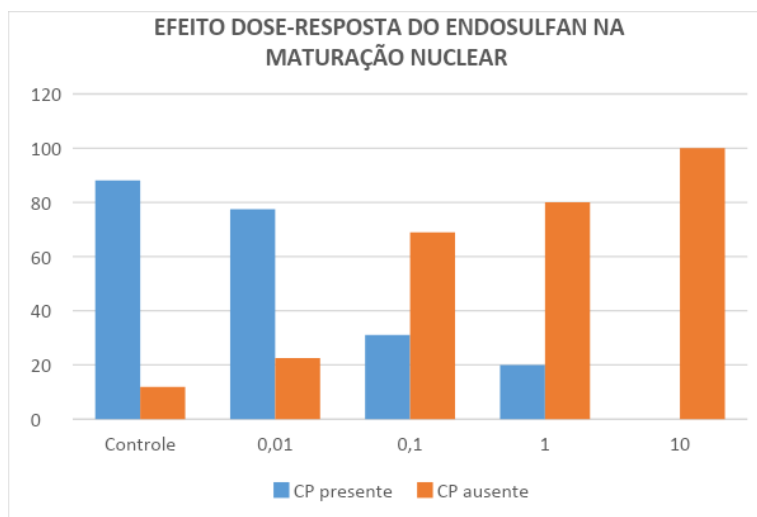


Gráfico 1: Efeito dose-resposta do Endosulfan na viabilidade da maturação nuclear oocitária pela avaliação quanto a ausência ou presença do corpúsculo polar (CP).

Fonte: CASTRO et al., 2021

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

Realização

Apoio

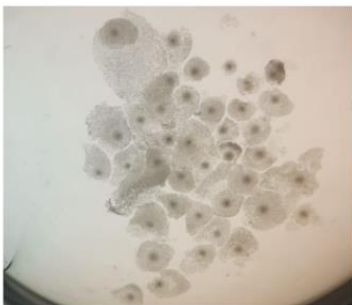


Figura 3: Oócito bovino apresentando a expansão das células do cumulus
Fonte: CASTRO et al., 2021

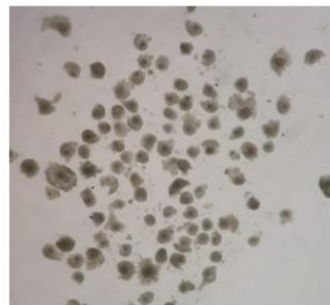


Figura 4: Oócito bovino apresentando ausência da expansão das células do cumulus.
Fonte: CASTRO et al., 2021

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo toxicológico com ovários de abatedouro bovino viabilizou determinar os danos morfológicos dos oócitos expostos a pesticida podendo ser utilizado como método avaliativo de ensaios in vitro. Os resultados obtidos indicaram a alteração morfológica dose-resposta para os eventos de maturação do complexo cumulus oócitos declínio dependente para extrusão corpuscular e expansão do cumulus.

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

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação (ICETI/UNICESUMAR) pelo apoio financeiro na forma de bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS

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

Realização

Apoio



- BRASIL, 2016. Pesticidas. **Ministério do Meio Ambiente**. Brasília. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 02 Jan 2020.
- CASAS, E.; BONILLA, E.; DUCOLOMB, Y. B. M. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. **Toxicol In Vitro**. 2010 Feb;24(1):224-30. doi:10.1016/j.tiv.2009.09.004. Epub 2009 Sep 9. PMID: 19747538.
- CAIXETA, E. S.; MACHADO, M. F.; RIPAMONTE, P.; et al. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 6, p. 890, 2013
- COSTA, C. A. *et al.* Impacto das práticas agrícolas e do uso de pesticidas em proteção integrada, agricultura biológica e agricultura convencional, em vinha e pomóideas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. SPE, p. 101-110, 2017.
- DAVILA, J.; LI, Q.; BAGCHI, I. C. Genetic Mouse Models for Female Reproductive Toxicology Studies. In: Reproductive and Endocrine Toxicology. **Elsevier Inc.**, 2017. p. 470-494.
- DE OLIVEIRA, J. A. *et al.* Effects of exposure to glyphosate in male and female mice behavior in pubertal period. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 194-203, 2014.
- DONLEY, N. The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. **Environmental Health**, v. 18, n. 1, p. 44, 2019.
- DRAGOVIC, REBECCA A.; RITTER, LESLEY J.; SCHULZ, SAMANTHA J.; et al. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. **Endocrinology**, v. 146, n. 6, p. 2798–2806, 2005
- DUTRA, L. S.; FERREIRA, A. P. Tendência de malformações congênitas e utilização de agrotóxicos em commodities: um estudo ecológico. **Saúde em Debate**, v. 43, p. 390-405, 2019.
- FAO. 2018. World Livestock: Transforming the livestock sector through the Sustainable Development Goals. Rome. 222 pp.
- HENDGES, C. *et al.* Human intoxication by agrochemicals in the region of South Brazil between 1999 and 2014. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, n. 4, p. 219-225, 2019.
- LARSEN, A. E.; GAINES, S. D.; DESCHÊNES, O. Agricultural pesticide use and adverse birth outcomes in the San Joaquin Valley of California. **Nat Commun** 8, 302 (2017). Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00349-2>>. Acesso em: 19 Fev 2020
- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Pesticidas e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, p. 518-534, 2018.
- MEDAN, D. *et al.* Effects of agriculture expansion and intensification on the vertebrate and invertebrate diversity in the Pampas of Argentina. **Biodiversity And Conservation**, [s.l.], v. 20, n. 13, p.3077-3100, 24 jul. 2011. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10531-011-0118-9>>. Acesso em: 05 Abr

Realização

Apoio



2020.

MENEZES, R. G.; QADIR, T. F.; MOIN, A. *et al.* Endosulfan poisoning: An overview. **J Forensic Leg Med.** 2017;51:27-33. doi:10.1016/j.jflm.2017.07.008

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

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

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

QUEIROZ, E. K. R.; WAISSMANN, W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 485-493, 2006.

SABARWAL, A.; KUMAR, K.; SINGH, R. P. Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 63, p. 103-114, 2018.

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

SUTTON, M. L.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; *et al.* Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. **Reproduction**, v. 126, n. 1, p. 27–34, 2003.

TAVEIRA, B. L. S.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Análise das notificações de intoxicações agudas, por agrotóxicos, em 38 municípios do estado do Paraná. **Saúde debate**, Rio de Janeiro, v. 42, n. spe4, p. 211-222, Dec. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010311042018000800211&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 12 Abr 2020.

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

Realização

Apoio