



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**MARIANA LUIZA RODRIGUES DE MARINS**

**ESTUDO DA EXPOSIÇÃO MATERNA À FORMULAÇÃO  
COMERCIAL CONTENDO GLIFOSATO SOBRE A FUNÇÃO  
VASCULAR DE RATOS MACHOS ADULTOS**

**Feira de Santana, BA**  
**2022**

**MARIANA LUIZA RODRIGUES DE MARINS**

**ESTUDO DA EXPOSIÇÃO MATERNA À FORMULAÇÃO  
COMERCIAL CONTENDO GLIFOSATO SOBRE A FUNÇÃO  
VASCULAR DE RATOS MACHOS ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de  
Santana como requisito final para a obtenção do título de  
Mestra em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Souza Silva

Coorientador: Prof. Dr. Diego Barbosa de Queiroz

**Feira de Santana, BA  
2022**

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

M289

Marins, Mariana Luiza Rodrigues de

Estudo da exposição materna à formulação comercial contendo glifosato sobre a função vascular de ratos machos adultos / Mariana Luiza Rodrigues Marins. – 2022.

64 f.: il.

Orientador: Fabrício Souza Silva.

Coorientador: Diego Barbosa de Queiroz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2022.

1. Pesticidas. 2. Glifosato – efeitos. 3. Disfunção endotelial. 4. Estresse oxidativo. I. Título. II. Silva, Fabrício Souza, orient. III. Queiroz, Diego Barbosa de, coorient. IV. Universidade Estadual de Feira de Santana.

CDU 632.95.024

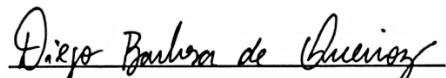
## BANCA EXAMINADORA



**Dr. Bruno Silva Andrade**  
(Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia)



**Dr. Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso**  
(Universidade de Pernambuco)



**Dr. Diego Barbosa de Queiroz**  
(Universidade de Pernambuco)  
Coorientador e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA  
2022**

*“Nada é mais forte do que alguém que se  
reconstrói.” (Autor Desconhecido)*

## **AGRADECIMENTOS**

A Jeová Deus, pelas bênçãos sobre a minha vida, pelo cuidado e amparo em dias difíceis e por ser a minha companhia celestial nos caminhos em que eu trilhar.

Aos meus pais e familiares, pelo incentivo, compreensão e amor. Em especial a minha Mãe, Wilma, por ser a minha parceira e amiga, por ser o meu maior exemplo de perseverança e força, por acreditar no meu potencial e não me deixar fraquejar, por se fazer presente na minha vida mesmo estando há mais de 2.000 km de distância.

A Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), a Universidade Do Vale do São Francisco (UNIVASF) e ao Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) pelo fornecimento de todas as ferramentas e estrutura necessárias a realização desse trabalho.

As Iniciantes Científicas, Rebeca e Nâmora pela parceria e pelos conhecimentos compartilhados no início da pesquisa, foram imprescindíveis nessa fase.

A Jeniffer e Vivian, que foram além do auxílio nos experimentos e em suas funções como iniciantes científicas. Vocês foram companhia, acalento, alegria, companheirismo, sinergia e fraternidade. Obrigada por terem tornado essa caminhada mais leve e por segurarem na minha mão nos momentos mais difíceis dentro daquele laboratório.

Aos auxiliares de Biotério, John Leno e Jéssica, por tornarem viável toda a logística com os animais para os experimentos, pela amizade e pelos momentos de alegria nos bastidores.

Ao orientador, Prof. Dr. Fabrício Silva e coorientador Prof. Dr. Diego Queiroz, pela oportunidade e pelos conhecimentos passados. Aos Professores Dr. Ricardo Santana e Dr. Palheta Junior pela contribuição e apoio na realização desse trabalho.

Aos amigos e colegas que, direta ou indiretamente, caminharam do meu lado, contribuíram e me incentivaram durante o processo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

## **RESUMO**

O consumo deliberado de agrotóxicos traz consequências preocupantes ao meio ambiente e a saúde humana. Uma potencial correlação entre a exposição materna ao glifosato durante a fase perinatal e pós-natal e os efeitos adversos em curto e longo prazo tem sido investigado. Este estudo analisou como a exposição ao glifosato no período gestacional afeta a função vascular na prole, observando a influência da idade e do estresse oxidativo. Ratas Wistar prenhas foram expostas a uma solução contendo uma formulação comercial de glifosato por gavagem. As análises de reatividade vascular, pressão arterial e histológica foram realizadas em seus descendentes machos com 6 e 12 meses de idade (O-GHB). O grupo controle (O-COM) recebeu igual volume de solução salina. Os grupos O-GHB não apresentaram alterações na pressão arterial e na análise histológica da aorta em relação ao grupo controle. Houve prejuízo no relaxamento dependente do endotélio e um aumento expressivo na contração induzida por fenilefrina na presença de L-NAME nos animais O-GHB. Este relaxamento melhorou nos ratos O-GHB com a presença do TEMPOL em ambas as idades e a indometacina provocou aumento na amplitude de relaxamento. Isso sugere que a exposição materna ao glifosato resulta em estresse oxidativo e aumento da síntese de fatores vasoconstritores. Os resultados reforçam que o estresse oxidativo durante o período perinatal e pós-natal contribui para o desenvolvimento de alterações vasculares da prole na idade adulta e revelam que os níveis atuais considerados seguros para exposição ao glifosato merecem maiores investigações, principalmente durante a gravidez.

**Palavras-chaves:** Glifosato. Programação fetal. Estresse oxidativo. Disfunção endotelial. Reatividade vascular.

## ABSTRACT

The deliberate consumption of pesticides has worrying consequences for the environment and human health. A potential correlation between maternal exposure to glyphosate during the perinatal and postnatal phase and short-term and long-term adverse effects was investigated. This study analyzed how exposure to glyphosate during pregnancy affects the vascular function of the offspring, observing the influence of age and oxidative stress. Pregnant female Wistar rats were exposed to a solution containing a commercial formulation of glyphosate by gavage. Vascular reactivity, blood pressure and histological analyzes were performed on their male pups at 6 and 12 months of age (O-GHB). The control group (O-COM) received an equal volume of saline solution. The O-GHB groups did not present alterations in blood pressure and in the histological analysis of the aorta in relation to the control group. There was impairment in endothelium-dependent relaxation and a significant increase in phenylephrine-induced contraction in the presence of L-NAME in O-GHB animals. This relaxation improved in O-GHB rats with the presence of TEMPOL at both ages and indomethacin caused an increase in the amplitude of relaxation. This suggests that maternal exposure to glyphosate results in oxidative stress and increased synthesis of vasoconstrictor factors. The results reinforce that oxidative stress during the perinatal and postnatal period contributes to the development of vascular alterations in offspring in adulthood and reveal that current levels considered safe for exposure to glyphosate deserve further investigation, especially during pregnancy.

**Keywords:** Glyphosate. Fetal programming. Oxidative Stress. Endothelial Dysfunction. Vascular reactivity.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
2.1 PESTICIDAS: UM BREVE HISTÓRICO	14
2.2 GLIFOSATO	16
2.3 GLIFOSATO E EFEITO NOS HUMANOS	20
2.4 AÇÃO EPIGENÉTICA DO GLIFOSATO	21
2.5 PROGRAMAÇÃO FETAL E GLIFOSATO	22
2.6 SISTEMA VASCULAR	24
2.6.1 <b>Contração e relaxamento da musculatura lisa vascular</b>	25
2.6.2 <b>Endotélio Vascular</b>	27
2.6.2.1 Fatores vasodilatadores derivados do endotélio	28
2.6.2.1.1 Óxido Nítrico	28
2.6.2.1.2 Prostaciclina (PGI <sub>2</sub> )	30
2.6.2.2 Fatores vasoconstritores derivados do endotélio	31
2.6.2.2.1 Prostaglandinas vasoconstritoras	32
2.6.2.2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	33
<b>3 MATERIAIS E MÉTODO</b>	35
3.1 ANIMAIS	35
3.2 OBTEÇÃO DO MODELO ANIMAL	35
3.3 PRESSÃO ARTERIAL	35
3.4 ANÁLISES DE CONTRATILIDADE E RELAXAMENTO	36
3.4.1 <b>Avaliação da resposta de relaxamento dependente e independente do endotélio em artérias aorta de ratos adultos</b>	37
3.4.2 <b>Investigação da modulação do endotélio e seus fatores vasoativos sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina</b>	37
3.4.3 <b>Análise dos efeitos do glifosato sobre a produção do óxido nítrico de origem vascular, sobre a ação da cicloxigenase e das espécies reativas de oxigênio sobre o relaxamento induzido por acetilcolina</b>	38
3.5 ANÁLISE HISTOLÓFCA NA AORTA TORÁCICA	38
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
<b>4 RESULTADOS</b>	40
4.1 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL	40
4.2 ANÁLISE DA RESPOSTA DE RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO	40
4.3 ANÁLISE DA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA	41
4.3.1 <b>Efeito da inibição da síntese de NO sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina</b>	42
4.4 PARTICIPAÇÃO DA INDOMETACINA NO RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO E NA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR FENILEFRINA	43
4.4.1 <b>Relaxamento dependente do endotélio</b>	43
4.4.2 <b>Contração induzida por fenilefrina</b>	44
4.5 ANÁLISE DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO SOBRE O RELAXAMENTO INDUZIDO POR ACETILCOLINA	45
4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA NA AORTA TORÁICA	46
<b>5 DISCUSSÃO</b>	48
<b>6 CONCLUSÃO</b>	53

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	54
<b>ANEXO A - Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIVASF</b>	64

## 1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos ou pesticidas são uma das poucas substâncias tóxicas liberadas no meio ambiente para matar organismos vivos, por exemplo, ervas daninhas (herbicidas), insetos (inseticidas), fungos (fungicidas) e roedores (rodenticidas) (WHO, 1990). Apresentam amplo uso podendo ser utilizados na saúde pública para o controle de vetores de doenças (malária e dengue), plantas indesejadas em paisagismo de parques e jardins, na indústria para suprimir ou evitar a proliferação de insetos, pragas, bactérias, fungos e algas em equipamentos elétricos e em materiais de embalagem de alimentos, e sobretudo, nas atividades agrícolas onde encontra-se o maior consumidor dessas substâncias, com cerca de 85% da produção mundial usando para controle químico das várias pragas que atingem as mais variadas culturas (GILDEN; HUFFLING; SATTLER, 2010).

No levantamento feito pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) em 2009, o Brasil aparece em sexto lugar como o país que mais consome agrotóxicos (SILVA, 2022). Nesse contexto, merece destaque o herbicida Glifosato Roundup®, como o mais consumido no Brasil com 195.056 toneladas comercializados em 2018, composto majoritariamente de glifosato (saís de isopropilamina de glifosato) como ingrediente ativo, polioxietilamina (POEA) como surfactante na fórmula comercial e outras substâncias usadas para auxiliar na estabilidade e penetração do pesticida na planta (RELYEA, 2005).

O glifosato pertence à classe dos organofosforados e ao grupo químico das glicinas substituídas, com o nome químico de N-(fosfonometil) glicina, seu mecanismo de ação é caracterizado pela inibição específica da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, essencial na biossíntese de aminoácidos aromáticos essenciais para as células vegetais, fungos e algumas bactérias (DE AMARANTE JUNIOR et al., 2002). Como essa via não é encontrada em insetos, aves, peixes, mamíferos, tornou-se uma das alegações para seu presumível baixo risco à saúde humana, e continuidade de sua utilização nas lavouras (ANADÓN et al., 2009).

Contudo, resultados de pesquisas realizadas com glifosato e/ou suas formulações e seus efeitos sobre a saúde humana, tem gerado controvérsias no meio científico (CATTANI et al., 2017; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013;

KIMMEL et al., 2013). Seus resíduos são frequentemente encontrados no meio ambiente (solo, água e alimentos), mas pouco se sabe sobre o impacto de doses subletais do glifosato na saúde humana e no meio ambiente e, embora haja medidas estabelecidas para seu uso seguro, seus padrões atuais de segurança têm sido questionados no mundo todo. Evidências científicas demonstram que a exposição a formulações comerciais a base de glifosato resulta em estresse oxidativo (CATTANI et al., 2017; MILIĆ et al., 2018), alteração no ciclo celular (MARC; MULNER-LORILLON; BELLÉ, 2004a), na cadeia transportadora de elétrons (PEREIRA et al., 2020), genotoxicidade (MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013a), dano hepático (LARSEN et al., 2014), desregulação endócrina (HASS et al., 2012a), além de correlação com doenças neurodegenerativas (WANG et al., 2011), excitotoxicidade glutamatérgica (CATTANI et al., 2017b) e alterações no comportamento (AIT-BALI et al., 2020; PU et al., 2020).

No sistema cardiovascular, é bem descrito na literatura que pesticidas pertencentes a mesma classe química do glifosato, os organofosforados, levam a alterações das propriedades mecânicas da artéria aorta devido a degeneração das fibras colágenas e de elastina da parede vascular (YAVUZ et al., 2005), aumento da pressão arterial sistólica e diastólica (WAREMBOURG et al., 2019), arritmias (GRESS et al., 2015a), peroxidação lipídica (LARSEN et al., 2012) e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) resultado do desbalanço REDOX pelo aumento de ânion superóxido e peróxido nitrito que implica em prejuízo da função endotelial pela predominância dessas espécies reativas de oxigênio (EROs) (CASARES; MANTIONE, 2006; YAVUZ et al., 2005).

No que se refere aos efeitos do glifosato poucos são os estudos. Song et al. (2012) demonstrou em células cardíacas de rato que a exposição ao glifosato em baixas doses promovia dano mitocondrial e induzia apoptose e necrose. Em outro estudo, Daruich, (2001) mostrou inativação de enzimas como o isocitrato desidrogenase e a glicose-6-fosfato desidrogenase em coração isolado de ratas wistar e de seus fetos após tratamento por 21 dias com glifosato na água de beber e Chan et al. (2007) demonstrou redução do relaxamento em aorta de ratos quando incubadas diretamente com o glifosato no banho de órgãos. Entretanto, não existem estudos que tenham avaliado especificamente os efeitos da exposição crônica ao glifosato sobre a reatividade vascular, alterações do balanço REDOX tecidual em artérias e sua possível relação com o surgimento de doenças cardiovasculares.

Adicionalmente, o conceito de fetal programming (“programação fetal”) sugere que o feto pode ser programado durante o desenvolvimento intrauterino para desenvolver doenças na vida adulta, e tem sido utilizado como uma das bases para o conhecimento da origem de algumas doenças crônicas, como é o caso das doenças cardiovasculares (LANGLEY-EVANS; GARDNER; WELHAM, 1998).

As alterações no ambiente intrauterino trazem consequências ao desenvolvimento fetal (FATIMA CAVANAL et al., 2007) e em seus mecanismos de regulação homeostática, que pode gerar em longo prazo, o desenvolvimento de doenças crônicas, como por exemplo, as doenças cardiovasculares. Encontra-se na literatura evidências científicas que demonstram os efeitos crônicos causados pela exposição ao glifosato em baixas doses no período gestacional: desordens neurocomportamentais (GALLEGOS et al., 2016), desregulações endócrinas e reprodutivas (HASS et al., 2012b) e alterações dos parâmetros hepáticos (BEURET; ZIRULNIK; GIMÉNEZ, 2005) são algumas consequências.

Uma potencial correlação entre a exposição materna ao glifosato durante a fase gestacional e efeitos adversos em curto e longo prazo tem sido investigado: aborto, más formações, baixo peso ao nascer e até alterações neurológicas e comportamentais na fase adulta são algumas das consequências (BALDI et al., 2011; KIM; KABIR; JAHAN, 2017; WICKERHAM et al., 2012). No sistema cardiovascular esses efeitos adversos também se expressam, com alterações eletrofisiológicas que resultam em arritmias do coração e presença de transposição de grandes artérias em crianças que foram submetidas a presença de herbicidas durante a fase uterina. Entretanto, no que se refere ao sistema cardiovascular são escassas as evidências na literatura que relacionem exposição in útero ao glifosato com o aparecimento de alterações cardiovasculares, principalmente que investiguem prováveis alterações em longo prazo da função e de seu equilíbrio oxidativo no leito vascular na fase adulta, mas ocorrem algumas alterações como fator de risco para doença arterial coronariana (PAN et al., 2017), alterações eletrofisiológicas diretas e arritmias em ratos e coelhos (GRESS et al., 2015a) e anormalidades estruturais no átrio e ventrículo (ROY et al., 2016).

Assim, esse estudo teve como objetivo investigar as possíveis alterações histológicas, da pressão arterial e da reatividade vascular em aorta torácica de ratos

adultos descendentes de ratas expostas ao herbicida glifosato-Roundup® durante a fase intrauterina e perinatal.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PESTICIDAS: UM BREVE HISTÓRICO

Os pesticidas são uma das poucas substâncias tóxicas são deliberadamente usadas no meio ambiente para matar organismos vivos (MATTHEWS, 2006). Apresentam amplo uso podendo ser utilizados na saúde pública para o controle de vetores de doenças (malária e dengue), plantas indesejadas em paisagismo de parques e jardins, úteis na indústria para suprimir ou evitar a proliferação de insetos, pragas, bactérias, fungos e algas em equipamentos elétricos, refrigeradores, tinta, carpetes, papel, papelão e materiais de embalagem de alimentos, e sobretudo, nas atividades agrícolas, usado para controle químico das várias pragas que atingem as mais variadas culturas(GILDEN; HUFFLING; SATTLER, 2010).

O uso de compostos químicos na luta contra pragas e doenças no setor agropecuário é uma prática habitual antiga, concomitantemente ao surgimento da agricultura. O acometimento de doenças nas plantas ocasionou uma grande perda no rendimento do cultivo, surgindo a necessidade de encontrar alternativas para vencer esse problema(GALDIANO et al., 2021). Desse modo, o emprego de compostos inorgânicos como compostos sulfurados, derivados do arsênio, cloreto de mercúrio e sais de cobre, além do uso de compostos orgânicos com propriedade pesticida como a nicotina, a rotenona ou o pyretrum foram inicialmente usados em meados do século XIX (NUNES; RIBEIRO, 1999).

Apenas no século seguinte, em 1930, houve a introdução no mercado dos primeiros pesticidas orgânicos sintéticos. Entretanto, foi em 1939 que o químico suíço Paul Müller percebeu que a substância diclorodifeniltricloroetano (DDT), sintetizada por um estudante de química alemão, era amplamente eficiente e o transformou em inseticida, sendo a substância pioneira no controle de pragas agrícolas, além de reduzir doenças como malária, febre amarela e tifo. Essa descoberta levou Müller a ganhar Prêmio Nobel de Medicina em 1949 (GALDIANO et al., 2021; NELDSON MARCOLIN, 2002).

Nos anos 1940, a síntese de pesticidas acelerou após a descoberta do DDT e de outros compostos como o hexacloro benzeno (BHC) e os organofosforados. Esses produtos tinham algumas características favoráveis para a produção agrícola, como uma atividade de amplo espectro, eficácia e baixo custo, e, para suprir a alta

demandas de consumo, a comercialização desses produtos aumentou de forma exponencial.

Durante a década de 50, a indústria e os consumidores não consideravam os possíveis riscos à saúde que o uso desses compostos poderia trazer, já que os ganhos estavam sendo positivos, a comida se tornou mais acessível e era possível atender as exigências de aumento da produtividade agrícola, parecendo impossível atingir isso sem o uso de pesticidas. Desse modo, com o conhecimento de que os pesticidas podem reduzir danos causados pelas pragas agrícolas e com a crescente formulação, produção e comercialização de novos agroquímicos, o seu consumo aumentou no mundo todo. Em 30 anos, a produção mundial de pesticidas passou de 0,13 milhão de toneladas para 1,8 milhões de toneladas, em 1975. Entre 1970 e 1980, o governo chinês generalizou o uso de pesticidas, para aumentar a produtividade agrícola e, como resultado, tornou-se um dos países mais afetados por contaminação (NUNES; RIBEIRO, 1999).

Infelizmente, o uso de agrotóxicos ocorre de modo indiscriminado e intensivo. É sabido que a aplicação de pesticidas nas atividades agrícolas traz benefícios imediatos sobre a produtividade. Por outro lado, há uma preocupação sobre os efeitos prejudiciais que estes produtos podem ocasionar a saúde humana e ao meio ambiente. O uso indiscriminado de pesticidas sintéticos, seja por falta de informação básica por parte dos agricultores ou pela utilização de equipamentos obsoletos durante a pulverização, traz consequências sérias (LOPES et al., 2021; TAVARES et al., 2020). Ainda, a falta ou a não utilização adequada dos equipamentos de proteção individual (EPI) e a precariedade dos mecanismos de vigilância sanitária também são responsáveis pelas intoxicações provocadas pelos agrotóxicos.

No entanto, a resistência das pragas aos pesticidas tem como consequência o aumento na frequência de aplicação desses produtos e esse uso generalizado e intensivo aumenta o risco de intoxicação. Com isso, danos a plantas e animais não-alvo, contaminação ambiental, “contaminação de mananciais, do solo, do ar, intoxicação de trabalhadores rurais e da população em geral” e dentre os efeitos na saúde humana, como a “infertilidade, impotência, abortos, malformações, neurotoxicidade, distúrbios cognitivos e comportamentais, neuropatia e desregulação hormonal” são cada vez mais frequentes (TAVARES et al., 2020a). Segundo o Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX), no Brasil a segunda causa de acidentes tóxicos registrados é por pesticidas, além de serem os maiores

responsáveis pela letalidade por intoxicações (BOCHNER, 2007; OLIVEIRA et al., 2005).

O relatório feito pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) em 2013 compara o valor investido em pesticidas pelos 20 maiores mercados globais atribuindo 3 rankings e o Brasil lidera um deles, o de números absolutos, sendo o país que mais gastou com agrotóxico no mundo (BOMBARDI, 2017). Em 2020, o Brasil encontra-se como o segundo maior consumidor de pesticidas em todo mundo, com 311 mil toneladas consumidas (FERNÁNDEZ, 2022).

O mercado mundial de agroquímicos movimentou cerca de 52 bilhões de dólares em 2010 e 7 bilhões de dólares no Brasil. Dos pesticidas, os herbicidas têm sido os mais comercializados, sendo 29% das vendas representado pelo glifosato. Em 2017, os estados de Mato Grosso e São Paulo comercializaram individualmente 100.638 e 77.232 toneladas, respectivamente. No total, 518.564 toneladas de agrotóxicos foram comercializadas em 2017, um aumento expressivo, visto que em 2014 as vendas não ultrapassaram as 400.000 toneladas (TAVARES et al., 2020b). O consumo do herbicida glifosato no Brasil tem aumentado consideravelmente e a sua venda no país corresponde a mais da metade do total de agrotóxicos comercializados.

## 2.2 GLIFOSATO

É um herbicida não seletivo, sistêmico e pós emergente – classificação segundo o modo de aplicação do agroquímico que é realizada após a emergência de plantas daninhas e antes que estas interfiram na cultura. Representa 60% do mercado mundial de herbicidas e é o princípio ativo presente em diversos defensivos agrícolas. Ficou conhecido em 1970, quando a Monsanto – empresa que hoje pertence à Bayer – desenvolveu um poderoso herbicida contendo o glifosato como principal ativo. Em 1990, as vendas do herbicida alavancaram após a empresa lançar uma linha de sementes transgênicas resistentes ao glifosato. O glifosato possui elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas, aquelas que nascem espontaneamente no meio da lavoura e prejudicam a produção agrícola. Além dessa função, também pode ser usado como dessecante quando o produtor deseja antecipar a colheita, pois tem ação de uniformização da lavoura ainda verde

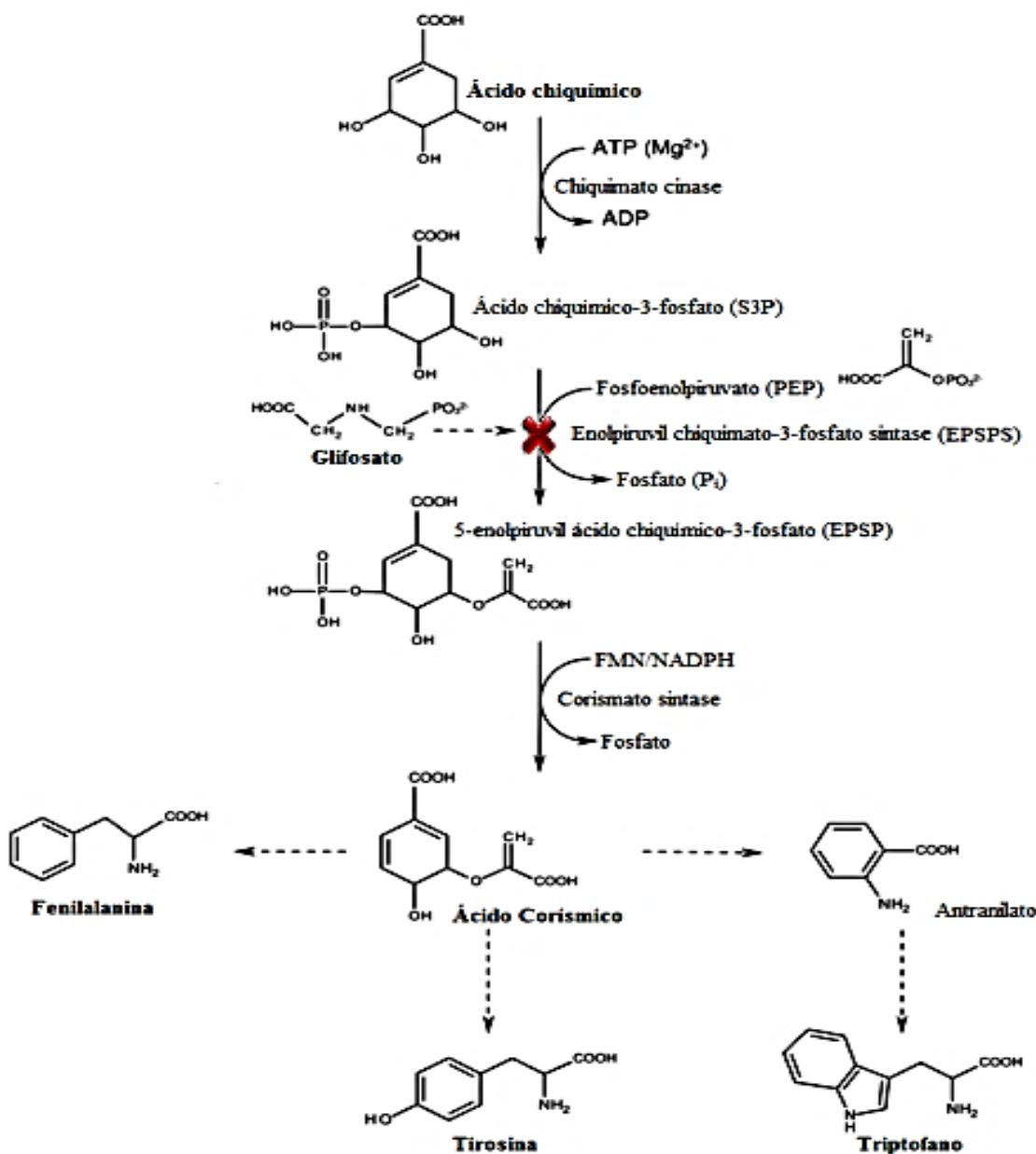
(CARNEIRO et al., 2015).

A molécula de glifosato foi sintetizada pela primeira vez por Henri Martin de Cilag em 1950 como sendo uma substância farmacêutica em potencial, mas somente em 1970 foi descoberta a sua atividade herbicida por John E. Franz (RIEG, 2016a). Três tipos de glifosatos são comercializados, o glifosato-isopropilamônio, o glifosato-sequisódio (patenteados pela Monsanto e vendidos como Roundup®) e o glifosato-trimesium (patenteado por ICI, atual Syngenta).

É um herbicida pertencente ao grupo dos aminoácidos fosfonados, com fórmula molecular  $C_3H_8NO_5P$  (m.m. = 169,1 g/mol) e, na forma de sal do isopropilamônio, tem acréscimo do grupo  $(CH_3)_2CHNH_3^+$  (m.m. = 228,2 g/mol). Possui alta solubilidade em água (12g/L, 25°C) e é pouco solúvel em solventes orgânicos, como acetona e etanol, entre outros. Em temperatura ambiente é apresentado sob forma de sais cristalinos, é incolor e inodoro (GOMES, 2020; POSSIDÔNIO DE AMARANTE JUNIOR; RODRIGUES; SANTOS, 2002)

O mecanismo de ação do glifosato é a inibição competitiva da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS) da via metabólica do ácido chiquímico, impedindo a síntese de alguns aminoácidos essenciais para o crescimento das plantas. A ação da enzima EPSPS é fundamental na produção do intermediário corismato, necessário para a biossíntese dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 1). Com a inibição da biossíntese desses aminoácidos aromáticos, provocado pelo uso do glifosato, a síntese proteica é afetada ocasionando morte das células vegetais (RIEG, 2016b).

O glifosato é utilizado como ingrediente ativo em mais de 750 diferentes herbicidas e pelo menos 91 empresas distribuídas em 20 países são responsáveis pela sua fabricação. A formulação Roundup® contém em sua composição o sal de isopropilamina de glifosato como ingrediente ativo e como surfactante predominante na fórmula comercial está o polioxietilamina (POEA), além de outros aditivos, como alguns conservantes. A preparação comercial Roundup® tem uma maior toxicidade e, estudos sugerem que, os aditivos na formulação desempenham um sinergismo na toxicidade do agrotóxico, podendo potencializar o seu efeito danoso às células (BENACHOUR; SÉRALINI, 2009).



**Figura 1.** Mecanismo de ação do glifosato.

**Fonte:** adaptado de RIEG, 2016.

Alguns estudos demonstram que a exposição a formulações contendo glifosato gera toxicidade para diversos tipos de células em diferentes espécies, incluindo as células humanas. Mendez, Ordoñez-Betancourth & Abrahams (2021) numa revisão de literatura sobre os efeitos da exposição ao glifosato na saúde reprodutiva, concluíram que houve toxicidade do glifosato na reprodução e no desenvolvimento, com consequências relevantes para a saúde de mães, fetos e filhos, em modelos animais e estudos *in vitro*, mesmo depois de várias gerações após a exposição.

Com relação aos aspectos toxicológicos do herbicida glifosato, ele é irritante

dérmico e ocular e pode causar danos hepáticos (RIEG, 2016b) e renais quando ingerido em doses elevadas. A toxicidade aguda do glifosato é considerada baixa. A dose letal mediana ( $LD_{50}$ ) oral do glifosato puro em ratos é de 4.230 mg/kg, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016). Já a Monsanto, atual fabricante do herbicida, classifica a  $LD_{50}$  oral em ratos em 5.000 mg/kg. A toxicidade baixa do glifosato em animais pode ser atribuída ao seu mecanismo de ação que ocorre na rota metabólica do ácido chiquímico apenas em células vegetais. Mas, estudos evidenciam a interferência do glifosato sobre as funções enzimáticas de animais, causando a diminuição de suas atividades. Além disso, os adjuvantes e conservantes presentes na formulação dos herbicidas podem contribuir para o efeito tóxico (DE AMARANTE JUNIOR et al., 2002; HAAS; HOEHNE; KUHN, 2018; WALSH et al., 2000).

Ainda que a toxicidade aguda do glifosato seja baixa, alguns estudos sugerem que o herbicida pode causar defeitos crônicos em ratos, como perda de peso, descarga nasal, morte de matrizes grávidas e distúrbios digestivos (DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013; WALSH et al., 2000). Em ratos Wistar houve retardo no desenvolvimento do esqueleto fetal causado pelo glifosato-Roundup®, comprovando o efeito tóxico sobre o desenvolvimento fetal em exposições agudas induzidas com doses orais diárias no período gestacional (DALLEGRAVE et al., 2003).

Observa-se a elevada dosagem do glifosato na pulverização das lavouras e, em consequência da resistência de ervas a esse agente químico, há a necessidade de tal aumento. Desse modo, ocorre o acúmulo do herbicida no solo e na própria cultura vegetal que o ser humano posteriormente irá ingerir (HAAS; HOEHNE; KUHN, 2018). O ácido aminometilfosfônico (AMPA) é o segundo metabólito do glifosato e este foi encontrado em alta concentração nas folhas e nos caules novos da planta (DE AMARANTE JUNIOR et al., 2002). A presença de resíduos na colheita resulta na exposição humana ao agrotóxico via alimentação. No ambiente, as concentrações mais altas são encontradas no solo e sua meia-vida é de aproximadamente 28 dias, chegando a 90% da biodegradação em 90 dias. Quando o glifosato entra em contato com solo, ele tende a ser inativado, pois apresenta alta capacidade de adsorção pelos minerais do solo. Assim, forma quelatos de ligação forte e é degradado pelos microrganismos presentes no solo (SANTOS, 2011).

## 2.3 GLIFOSATO E EFEITO NOS HUMANOS

Pouco se sabe sobre o impacto de doses subletais do glifosato na saúde humana e no meio ambiente e, embora haja medidas estabelecidas para seu uso seguro, seu padrão atual de segurança tem sido questionado no mundo todo. Myers et.al, (2016) demonstrou preocupações sobre o uso do glifosato e os riscos associados à sua exposição, onde foi relatado um número considerável de estudos epidemiológicos e em modelos experimentais publicados na última década demonstrando a toxicidade do glifosato. Corroboram com isso, uma quantidade ampla de evidências na literatura recente demonstrando que a etiologia de distúrbios cardiovasculares e outras alterações biológicas, principalmente de ordem endócrina, pode ser explicada pela exposição a formulação comercial Roundup®, devido ao efeito sinérgico entre o glifosato e os outros produtos contidos na fórmula (DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013; EL-SHENAWY, 2009; MARC; MULNER-LORILLON; BELLÉ, 2004b; SPINACI et al., 2022). Tais aditivos são considerados inertes pelo fabricante, mas a literatura demonstra que as formulações comerciais têm mais efeitos negativos em células humanas (MESNAGE; BERNAY; SÉRALINI, 2013b) do que quando expostas ao glifosato de maneira isolada (MALATESTA et al., 2008; TORRES-BADIA et al., 2021; VANLAEYS et al., 2018).

Foram observados em casos acidentais e suicidas, intoxicação aguda após a ingestão de formulações à base de glifosato. Em situações de envenenamento, os sintomas mais comuns observados foram ulcerações orofaríngeas, náuseas, vômitos, angústia respiratória, arritmia cardíaca, hipercalemia, insuficiência renal, toxicidade hepática e alterações no estado de consciência, além de morte em casos em que a exposição foi com uma maior dose do glifosato. Os sintomas acima foram registrados por Zouaoui et al. (2013) em seu estudo descritivo sobre as características clínicas da exposição ao glifosato, além da determinação das concentrações do herbicida no sangue e na urina. Num período de 7 anos, entre 2002 e 2009, eles atenderam 13 casos de intoxicação por glifosato e em registros observacionais clínicos e coletas de sangue e urina, classificou os pacientes de acordo com a gravidade da intoxicação.

Outras alterações biológicas são observadas após a exposição ao Roundup®, como estresse oxidativo (DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013) alterações no ciclo celular (MARC et al., 2002), na cadeia transportadora de elétrons (PEIXOTO, 2005;

SAMSEL; SENEFF, 2015), danos citogenéticos (LUEKEN et al., 2004), danos em células hepáticas (BENEDETTI et al., 2004), desregulação endócrina (CLAIR et al., 2012), fator de risco para autismo (SAMSEL; SENEFF, 2015), entre outros.

Song et al. (2012) demonstrou em células cardíacas de rato que a exposição ao glifosato em baixas doses promoveu dano mitocondrial e induziu a apoptose e necrose. Esses resultados foram relevantes para explicar a instabilidade cardiovascular em indivíduos que sofreram intoxicação aguda por glifosato. Daruich, Zirulnik & Sofía Gimenez (2001) demonstraram a inativação de enzimas como isocitrato desidrogenase e glicose-6-fosfato desidrogenase em coração isolado de ratas wistar e de seus fetos após tratamento por 21 dias com glifosato na água de beber.

No sistema cardiovascular, os efeitos da exposição a formulação Roundup® levam a alterações das propriedades mecânicas e um risco aumentado para o desenvolvimento de placas aterogênicas, como demonstra Maia (2020) em seu estudo com ratos para avaliar os efeitos cardiovasculares da exposição subcrônica por via oral e inalatória a um herbicida com glifosato em sua formulação. Ele observou um aumento na incidência de formação de estrias de colesterol, lesão inicial da atherosclerose, nos grupos expostos ao glifosato. Aumento das câmaras cardíacas de ratos (FERREIRA ROS et al., 2020), alterações eletrofisiológicas e arritmias em testes em ratos utilizando tecidos ventriculares direitos (GRESS et al., 2015b, 2015c) são alguns efeitos cardíacos descritos na literatura.

## 2.4 AÇÕES EPIGENÉTICAS DO GLIFOSATO

A epigenética estuda os mecanismos que envolvem a interação de fatores externos que modificam os genes e tais características são passadas para as próximas gerações. Essa modificação não altera a sequência do DNA, mas há alterações epigenéticas, como a metilação do DNA, modificação das histonas e empacotamento da cromatina. Por exemplo, um indivíduo que tem um estilo de vida saudável terá um epigenoma diferente de alguém com um estilo de vida ruim (BARBOSA et al., 2021; LOBO, 2021). Essas alterações epigenéticas são mediadoras da programação fetal, pois modificam a expressão gênica de proteínas essenciais e contribuem para alterações em órgãos e tecidos. Má nutrição, estresse materno e exposição a agentes tóxicos provocam alterações na expressão gênica (BARBOSA et al., 2021; MICHALAKIS et al., 2014).

Uma variedade de fatores ambientais pode promover herança transgeracional epigenética de doenças. A transmissão dessas alterações epigenéticas através de espermatozoide e óvulo é chamada de herança epigenética transgeracional, sem que haja exposição direta contínua do fator modulatório. Num estudo com ratas prenhas, o glifosato foi apontado como indutor de doença transgeracional em ratos de segunda e terceira geração, ocasionando alterações na puberdade, peso ao desmame, aumento da obesidade, presença de doença múltipla e doença de próstata em modelos masculinos e doença ovariana e anormalidade no parto em modelos femininos (BEN MAAMAR et al., 2021; ROSSETTI et al., 2021).

## 2.5 PROGRAMAÇÃO FETAL E GLIFOSATO

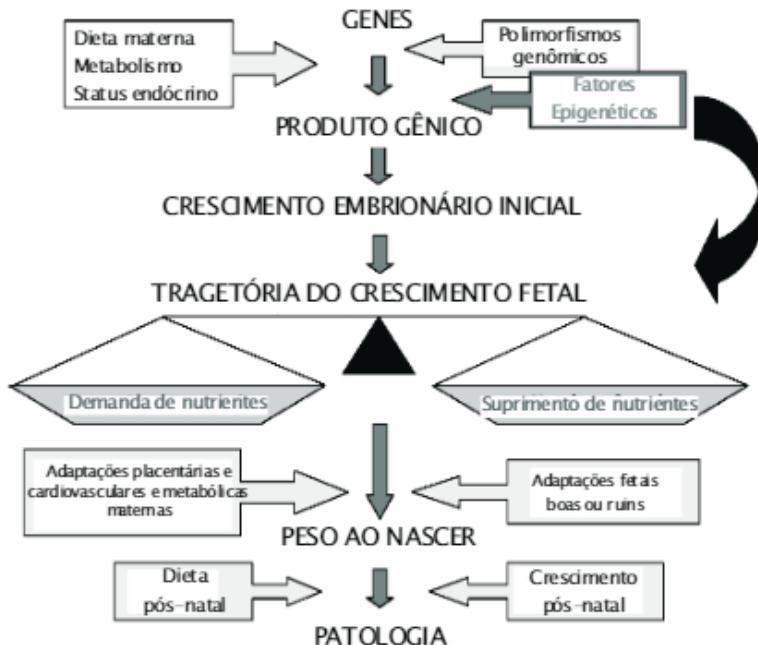
A programação fetal, também conhecida como programação metabólica, tem sido bastante estudada em vários países, tendo em vista o grande interesse em entender os mecanismos biológicos e moleculares no qual doenças humanas podem ser programadas no útero materno, já que eventos ocorridos durante o período gestacional podem gerar consequências na vida adulta (LEMKE et al., 2009). Fatores adversos durante a fase de preconcepção, fase intrauterina e pós-natal estimulam ou inibem vias metabólicas e expressão genética do feto. A dieta materna tem grande contribuição, pois a subalimentação ou superalimentação trazem consequências permanentes e prejudiciais à saúde (BARBOSA et al., 2021).

Durante a trajetória do crescimento fetal, a balança da demanda de nutrientes e do suprimento de nutrientes deve estar em equilíbrio. Com relação a nutrição, quando ocorre escassez, estresse ou excesso, haverá adaptações fetais em resposta ao ambiente intrauterino, que se modulam para aproveitar o máximo de nutriente disponível, sendo essa ação de caráter de sobrevivência, como demonstrado na figura 2. Hales & Barker (1992) afirmam que ao passar esse período adverso, o metabolismo terá maior propensão de desenvolvimento de doenças associadas à obesidade.

Trabalhos publicados pelo grupo do Dr. David Barker foram os primeiros a demonstrar, por exemplo, o envolvimento da má alimentação durante a fase intrauterina no desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta (BARKER, 1986; BARKER et al., 1989a, 1989b; HALES; BARKER, 1992), e outros estudos demonstraram a relação inversa entre peso corporal após o nascimento e a

hipertensão arterial (HUXLEY; SHIELL; LAW, 2000; LAW; SHIELL, 1996).

## Programação Fetal



**Figura 2:** Programação fetal.

**Fonte:** LEMKE, N. (2009)

Estudos epidemiológicos sugerem que muitas doenças cardiovasculares, dentre elas a hipertensão arterial, podem ser “programadas” a partir de fatores iniciados ainda durante a vida intrauterina. As doenças de origem cardiovascular são muito comuns como consequência da má alimentação, exposição a agentes tóxicos e estresse no período fetal e neonatal (ALEXANDER, 2006). Indivíduos que apresentaram baixo peso ao nascer e maior peso da placenta, quando adultos desenvolvem hipertensão. Potencial correlação entre exposição a pesticidas e malformação cardiovascular também têm sido identificados, com a presença de transposição de grandes artérias em crianças que foram submetidas a presença de herbicidas durante a fase uterina.

Experimentos de avaliação da perfusão placentária humana in vivo e in vitro demonstram que o glifosato possui capacidade de atravessar a placenta (MOSE et al., 2008)e os níveis de glifosato foram detectados tanto no soro de gestantes como nas amostras de cordão umbilical (KONGTIP et al., 2017)afirmando assim que o glifosato pode afetar a saúde fetal. Estudos clínicos e experimentais têm revelado

que a exposição ao glifosato aumenta consideravelmente o risco de morte na fase intrauterina e perinatal, de malformações congênitas do sistema nervoso, do aparelho reprodutor, do sistema digestório, cardiovascular e renal (COSTA et al., 2021; MILESI et al., 2021).

A literatura evidencia que distúrbios ocorridos durante do período gestacional geram impactos no desenvolvimento fetal e podem determinar, na vida adulta, alterações fisiológicas em órgãos e tecidos (ASHTON, 2000). Fatima Cavanal *et al.* (2007) observaram que a prole de ratas diabéticas teve hipertensão e redução na biodisponibilidade de óxido nítrico. Entretanto, os mecanismos envolvidos nesta resposta ainda não estão completamente elucidados, especialmente no que se refere à participação do sistema vascular. São escassos os trabalhos que relacionam a exposição ao glifosato com o aparecimento de distúrbios cardiovasculares (LEMKE et al., 2009; PAUMGARTTEN, 2017). Além disso, o número de publicação por EUA, Brasil e China são baixos e estes são os maiores consumidores de agrotóxicos. Dessa forma, mais estudos de investigação que buscam explicar os possíveis mecanismos envolvidos nas alterações vasculares contribuirá para o melhor entendimento das anomalias causadas por glifosato.

## 2.6 SISTEMA VASCULAR

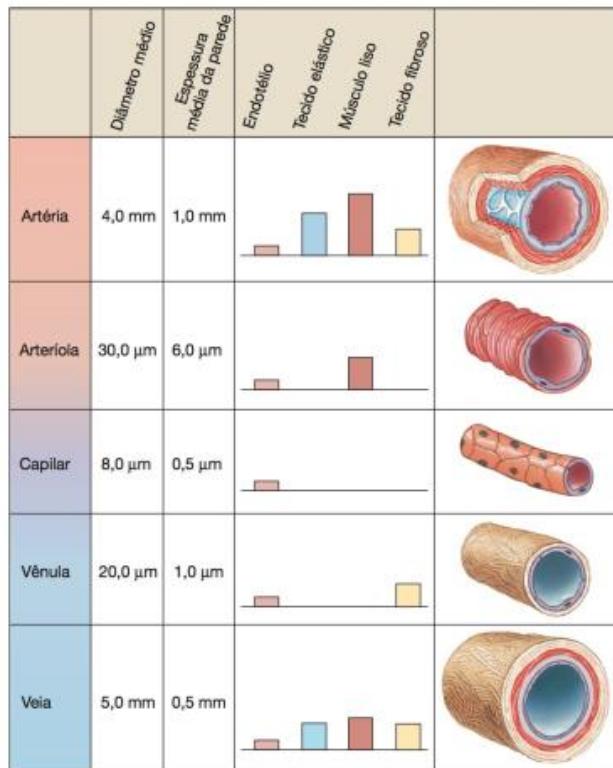
O sistema vascular sanguíneo é formado por uma rede de vasos, onde circula aproximadamente 10.000 L de sangue por dia. Compreende os vasos sanguíneos de baixa resistência – as veias e de alta resistência – as artérias. As artérias são vasos que transportam sangue oxigenado do coração para a periferia, e as veias são vasos que transportam sangue desoxigenado dos tecidos de volta ao coração. A pressão sanguínea dentro do vaso determinará a espessura da parede vascular, sendo as artérias os vasos com paredes mais espessas quando comparado com as veias.

Pode-se classificar os vasos sanguíneos segundo a sua estrutura e função. Estruturalmente são divididos em artéria, arteríola, capilares, vênulas e veias. As artérias têm maior teor de tecido elástico em suas paredes, singularmente a aorta. As arteríolas têm menos elastina e mais tecido muscular liso em suas paredes, devido a sua função de controle de fluxo sanguíneo. Das arteríolas se ramificam os capilares: são numerosos, apresentam apenas lâmina basal e uma fina camada de epitélio simples pavimentoso, o endotélio. Dos capilares, há conversão para formar

as vênulas e veias, vasos que transportam sangue venoso, rico em CO<sub>2</sub> e produtos provenientes do metabolismo. As vênulas possuem diâmetro vascular, espessura, quantidade de elastina, músculo liso e fibras de colágeno menores comparado as veias, que possuem diâmetro médio vascular de 5 mm e espessura média de 0,5 mm, mais tecido muscular liso e mais colágeno (Figura 3) (AIRES, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; SILVERTHORN, 2010).

#### 2.6.1 Contração e relaxamento da musculatura lisa vascular

O estudo do funcionamento dos vasos se tornou de grande importância para o entendimento e a elucidação dos mecanismos envolvidos na contração e no relaxamento dos vasos. Alguns fatores intrínsecos ao vaso influenciam a sua motricidade, são eles: fator miogênico, fator metabólico ou químico, fatores de ação parácrina, temperatura e o endotélio vascular.



**Figura 3:** Estrutura do Vaso Sanguíneo. A parede dos vasos varia em diâmetro e composição.

**Fonte:** Adaptado de SILVERTHORN, 2010.

Bayliss (1902) descreveu a Teoria Miogênica, que explica a contração transitória do vaso: o aumento da perfusão induz o aumento da tensão da parede

vascular, ocorrendo assim a vasoconstricção. Por outro lado, a queda da pressão de perfusão sanguínea reduz a tensão da parede vascular, gerando a vasodilatação. Desse modo, o músculo liso vascular tem a capacidade de regular o seu estado de contração num mecanismo conhecido como autorregulação miogênica. O tônus vascular é transitório e varia de acordo com a pressão de perfusão do sangue, gerando a resposta miogênica.

Todas as vezes que houver aumento do fluxo sanguíneo em determinado território vascular, devido ao aumento da pressão arterial, ocorrerá distensão da parede vascular. Os canais não-seletivos para cátions presentes na membrana das células do músculo liso são sensíveis ao estiramento da parede vascular. Essa distensão promove a abertura desses canais, com consequente entrada de cálcio e sódio para dentro da célula. Com isso, o meio intracelular fica com cargas positivas, despolarizando o meio intracelular e ocorrendo a abertura dos canais para cálcio sensíveis a voltagem. Com o influxo de cálcio para a célula, tem-se a contração do músculo liso vascular. O estiramento do vaso também estimula a fosfolipase C (PLC), responsável pela hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em inositol1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 liga-se ao receptor específico no retículo sarcoplasmático (RS) e estimula a liberação de cálcio ali estocado, havendo também contração do músculo liso vascular. Já o DAG ativa a enzima Proteína Quinase C (PKC), gerando fosforilação da cadeia leve de miosina, aumentando assim a mobilização de cálcio para o interior da célula, e como consequência disso, ocorre contração (AIRES, 2008b; DE QUEIROZ et al., 2010).

Já no processo de relaxamento da parede vascular, ocorre a retroalimentação negativa. A despolarização induzida pelo influxo de cálcio e pelo aumento no nível de cálcio intracelular ativa a abertura de dois canais para potássio, os canais para potássio sensíveis a voltagem e os canais para potássio sensíveis a cálcio. Com a abertura desses canais, ocorre um mecanismo hiperpolarizante duplo, que vão se contrapor ao processo de contração. O resultado será o somatório entre duas forças contráteis e as forças de relaxamento ativadas reflexamente.

A queda na pressão parcial de O<sub>2</sub> (ou hipóxia) tem sido responsável como um dos principais fatores de regulação local na vasodilatação. A hipóxia provoca redução dos níveis plasmáticos de ATP livre no tecido, ocasionando abertura dos canais para potássio sensíveis a ATP, gerando uma corrente efetiva de efluxo de potássio, hiperpolarizando a musculatura lisa vascular, reduzindo os níveis

intracelulares de cálcio e vasodilatação. O aumento do CO<sub>2</sub> induz o aumento da produção de íons H<sup>+</sup>, acidificando o meio, pois CO<sub>2</sub> reage com o H<sub>2</sub>O, formando H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O músculo liso vascular responde a essa acidificação do meio intracelular diminuindo a afinidade das proteínas contráteis ao cálcio, isso produz vasodilatação, queda da resistência vascular e aumento do fluxo sanguíneo.

O aumento da concentração extracelular de K<sup>+</sup>, causado pelas despolarizações sucessivas devido ao aumento da atividade muscular local, promove vasodilatação. Algumas hipóteses sugerem que a elevação extracelular do K<sup>+</sup> alteraria o potencial de repouso, reduzindo a atividade elétrica e o tônus basal do vaso, induzindo a vasodilatação (AIRES, 2008b; NELSON; QUAYLE, 1995).

### *2.6.2 Endotélio vascular*

O endotélio vascular é formado por uma monocamada de células e, quando intacto, desempenha uma série de funções sobre o vaso: barreiras semipermeável, metabólica, secretora e moduladora, além de revestir internamente todos os vasos sanguíneos (SILVA, 2020). Ajusta o calibre dos vasos diante das constantes alterações hemodinâmicas e humorais locais (BATLOUNI, 2001), permite a passagem livre de água, eletrólitos e pequenas moléculas, mas possui seletividade na passagem de proteínas plasmáticas e outras macromoléculas, colabora na formação do coágulo, como tentativa de reparar uma lesão vascular (CARVALHO et al., 2001) e tem a capacidade de controlar a metabolização de algumas substâncias vasoativas, como serotonina e adenosina, pela monoamino-oxidase (MAO) e adenosina deaminase (ADA), respectivamente. Também converte a angiotensina I em angiotensina II, por meio da enzima conversora de angiotensina (inibidores da ECA), além de inativar a bradicinina e possui receptores específicos para metabolização de lipoproteínas plasmáticas.

O endotélio íntegro é capaz de produzir biomoléculas que atuam sobre o tônus do músculo liso vascular (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989). São secretadas moléculas com função estrutural, como o colágeno do tipo 3 e 4, proteoglicanos e interleucina-1, que participam da manutenção da integridade do endotélio, e moléculas com função modulatória vasodilatadoras e vasoconstritoras, as prostaciclinas (PGI<sup>2</sup>), o óxido nítrico (NO), as prostaglandinas vasoconstritoras e os ânions superóxidos (LUSCHER; BARTON, 1997; SILVA, 2020a)

Desse modo, o endotélio deixa de ser apenas uma barreira semipermeável. Sua localização estratégica entre a circulação lhe confere o título de órgão endócrino, ativo e com excelente capacidade de modular a vasomotricidade, a coagulação do sangue e a proliferação vascular. Em resumo, sua localização na parede vascular lhe permite atuar como sensor de alterações hemodinâmicas, transmissor de sinais entre célula e matriz extracelular, produtor de mediadores químicos e conservador da homeostase (CARVALHO et al., 2001).

A disfunção endotelial pode ser conceituada como uma anormalidade na produção ou na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) derivado do endotélio e as consequentes alterações na reatividade vascular. Além disso, na disfunção endotelial há redução de fatores vasodilatadores e predominância da liberação de fatores vasoconstritores, fatores de crescimento, agregação plaquetária, adesão de leucócitos e risco aumentado para trombose (VANHOUTTE, 2009). O endotélio é um órgão importante para a regulação da função vascular e na separação dos compartimentos vasculares (FISHMAN, 1982) e a perda da sua função de barreira seletiva pode acarretar edema com migração de glóbulos brancos para a camada íntima do vaso, caracterizando assim uma manifestação clássica de inflamação (GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016). Quando exposto aos produtos da inflamação, o endotélio passa a responder de forma adaptativa aos estímulos nocivos, com consequências importantes na regulação homeostática, trombose e tônus vascular (MASON et al., 1977). Além disso, o endotélio danificado não funcionará de maneira efetiva na remoção dos agentes vasoativos, não contribuirá para a inibição da agregação plaquetária e será a chave para a gênese da aterosclerose, trazendo prejuízos à saúde cardiovascular.

O controle do tônus vascular acontece por meio da produção de mediadores químicos pelo endotélio. Esses mediadores são divididos em fatores vasodilatadores e fatores vasoconstritores, e sua liberação é feita de modo equilibrado. Mas é válido lembrar que a produção de fatores relaxantes é mais importante e seu efeito se sobrepõe sobre os agentes contráteis.

#### 2.6.2.1 Fatores vasodilatadores derivados do endotélio

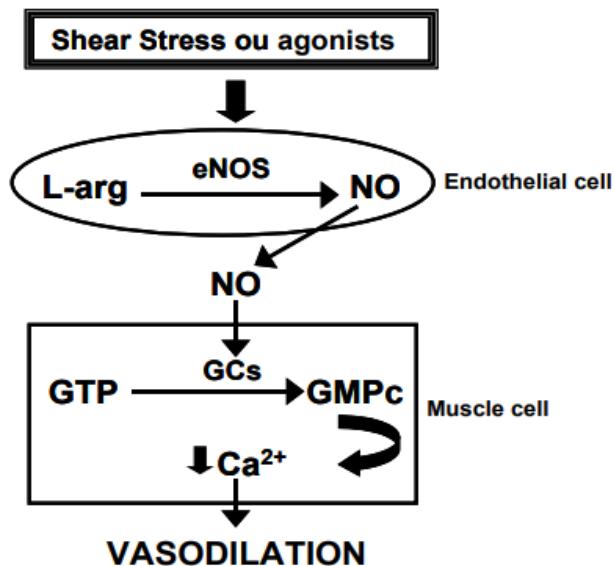
##### Óxido Nítrico (NO)

A descoberta de que o endotélio íntegro libera substâncias que se difundem para a musculatura lisa vascular e promove relaxamento foi uma contribuição memorável para o entendimento da fisiologia vascular. Em 1980, Furchtgott e Vanhoutte chegaram à conclusão de que esse fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) seria o próprio óxido nítrico (NO), devido as semelhanças dos mecanismos de relaxamento do músculo liso vascular causado pelo EDRF e pelos nitratos vasodilatadores (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989).

O NO é o principal fator vasodilatador liberado pelo endotélio e desempenha alguns papéis importantes no vaso: atua inibindo a trombose, promovendo angiogênese, aumentando o fluxo sanguíneo, regulando o crescimento da parede vascular, medeia a resposta imune e promove relaxamento vascular. É sintetizado por ação da enzima óxido nítrico sintase (eNOS), que catalisa a L-arginina em óxido nítrico (NO), numa reação de oxidação (AIRES, 2008a; FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; SANTOS-ROCHA et al., 2019a; SILVA, 2020a)

Sua biossíntese não é tão simples assim e envolve alguns mecanismos de ação. A síntese da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) pode ser ativada em condições onde há “shear stress” ou tensão de cisalhamento exercida na parede das células endoteliais que, por sua vez, estimula a abertura de canais de cálcio sensíveis à tensão de cisalhamento, há influxo de cálcio para células endoteliais, com consequente aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ou pode ser ativada pela secreção de alguns agonistas, como acetilcolina, catecolaminas, angiotensina II (LOUREIRO-SILVA; MOLINA; BORGES, 1999b).

Dentro do endotélio, a liberação de agonistas e o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  promove a liberação de L-arginina, que através de uma reação de oxidação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) há formação do óxido nítrico (NO) e ele se difunde para o músculo liso vascular. Dentro da musculatura vascular, sua principal função é ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que age como mediador para a produção de GMP cíclico (GMPc), o segundo mensageiro das ações do NO no músculo liso vascular. O GMPc estimula a quinase dependente de GMP cíclico (PKG), e esta promove relaxamento vascular por ativar canais de  $\text{K}^{+}$  induzindo hiperpolarização ou pela estimulação da saída de cálcio da matriz intracelular (figura 4) (AIRES, 2008a; BATLOUNI, 2001b; CARVALHO et al., 2001; ZAGO; ZANESCO, 2006).



**Figura 4:** Resumo ilustrativo da síntese de óxido nítrico e sua ação frente a vasodilatação.

**Fonte:** Adaptado de ZAGO, A. (2006)

A NOS pode ser classificada em *constitutiva* (NOSc, dependente da elevação dos níveis de cálcio intracelular em células endoteliais) ou *induzível* (NOSi, independe das elevações de cálcio e dependente de ativação via citocinas). A NOSc apresenta três isoformas, duas são expressas predominantemente no cérebro (bNOS) e a outra é expressa nas células endoteliais (eNOS) (AIRES, 2008a). Acredita-se que a eNOS seja responsável pela manutenção do tônus vascular basal, por gerar, em níveis baixos e intermitentes, o óxido nítrico. A inibição dessa enzima diminui drasticamente a dilatação dependente de endotélio vascular, principalmente nos vasos de condutância. O inibidor não seletivo de óxido nítrico sintase, o Nomega-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), além de inibir a eNOS, também inibe o GMP cíclico (KOPINCOVÁ; PÚZSEROVÁ; BERNÁTOVÁ, 2012).

### Prostaciclina ( $PGI_2$ )

A prostaciclina ou prostaglandina  $I_2$  ( $PGI_2$ ) é um eicosanoide derivado do ácido araquidônico, liberado pelo endotélio. Sua ação dentro do sistema vascular é múltipla e além de atuar como discreto vasodilatador local, a prostaciclina aumenta o fluxo sanguíneo da região, diminui a agregação plaquetária, estimula a neoformação

de vasos sanguíneos, aumenta a atividade enzimática relativa ao metabolismo dos ésteres do colesterol e, dessa maneira, se comporta como um agente antiaterogênico, antiagregante plaquetário e reparador tissular vascular.

A sua biossíntese depende da ação de uma enzima chave, a enzima cicloxigenase (COX). A COX possui duas isoformas: COX-1, constitutiva e presente em diversos eventos fisiológicos, dentre eles a homeostasia vascular, e COX-2 que está presente em reações inflamatórias (CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004). Em artérias saudáveis, a COX-1 catalisa a conversão do ácido araquidônico, lipídio proveniente da liberação dos fosfolipídios da membrana celular endotelial, em PGG<sub>2</sub>. O endoperóxido PGG<sub>2</sub> sofre uma reação de oxidação e incorporação de O<sub>2</sub> catalisada pela enzima peroxidase convertendo-se em prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Sob ação da enzima prostaciclina sintetase, a PGH<sub>2</sub> converte-se em prostaciclina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) (CUDABACK et al., 2014). Vale ressaltar, que em alguns casos os prostanoides podem ser produzidos pela COX-2 e estão associados ao desenvolvimento de complicações vasculares (RAMOS-ALVES, F. E., et al, 2012).

A PGI<sub>2</sub> age em receptores específicos na célula da musculatura lisa vascular e provoca ativação da enzima adenilato ciclase. Essa enzima cliva o ATP em monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), o segundo mensageiro que medeia os efeitos da PGI<sub>2</sub> e induz o seu aumento, além de estimular a proteinocinase dependente do AMPc (PKA) na musculatura lisa vascular. A PKA possui um efeito similar à PKG, causando o efluxo de Ca<sup>2+</sup> do citosol e inibindo a maquinária contrátil (AIRES, M. M., 2008; BATLOUNI, M., 2001). O bloqueio da ação vasodilatadora da prostaciclina ocorre por meio da presença de inibidores da COX. Pode-se citar a indometacina, um anti-inflamatório potente que inibe a ação da cicloxigenase.

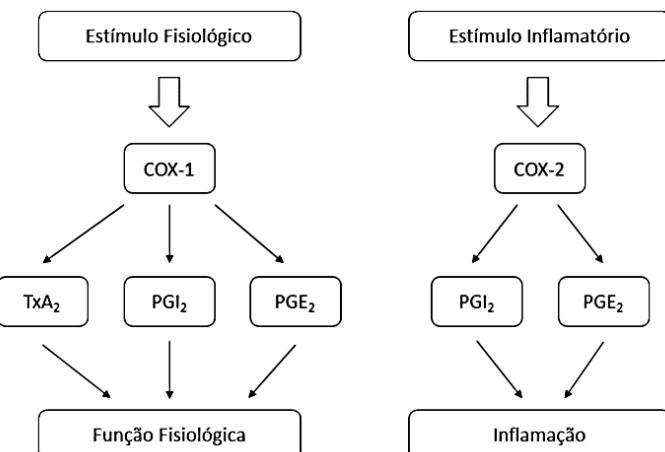
#### 2.6.2.2 Fatores vasoconstritores derivados do endotélio

##### *Prostaglandinas vasoconstritoras*

O endotélio apresenta uma capacidade de iniciar contrações no músculo liso vascular por meio da liberação de substâncias difusíveis denominadas fatores vasoconstritores derivados do endotélio (EDCF). Esses fatores são derivados da cicloxigenase (COX), enzima importante na gênese das prostaglandinas vasoconstritoras, responsável por catalisar duas reações de oxidação do ácido

araquidônico (GLUAIS et al., 2005). A primeira reação gera a prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) que é transformada em prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), através de uma reação com a peroxidase. A PGH<sub>2</sub> é uma substância precursora de todas as demais prostaglandinas.

A enzima COX possui duas isoformas, a COX-1, isoforma constitutiva, presente na maior parte das nossas células, como sistema gastrointestinal, circulação e rins; e a COX-2, isoforma induzida, está presente em tecido inflamados, pois é uma enzima responsável pela síntese de prostanóides que induzem inflamação, proliferação celular, angiogênese e restauração da integridade da mucosa (Figura 5) (GARCÍA-RAYADO; NAVARRO; LANAS, 2018). Como já citado acima, estímulos como a tensão de cisalhamento e agonistas, aumentam a concentração de cálcio no interior da célula endotelial e isso provoca a liberação de ácido araquistônico, que por sua vez, ativa a cascata para a síntese das prostaglandinas vasoconstritoras.



**Figura 5:** Isoformas da COX e seu mecanismo de ação.

**Fonte:** autor desconhecido

O Tromboxano A<sub>2</sub> (Tx A<sub>2</sub>) é uma prostaglandina encontrada no sangue, modulando a função das plaquetas como indutor da sua agregação no músculo liso vascular, através do receptor para tromboxano (receptor TP), apresentando um papel fisiológico importante como vasoconstritor, além de ser um potente agente hipertensivo. Sua biossíntese ocorre nas plaquetas, a partir da prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) por meio da enzima tromboxano-A sintase. Em geral, o Tx A<sub>2</sub> encontra-se em equilíbrio na circulação com as prostaciclinas (AIRES, 2008a; CAVARAPE et al., 2003). Sua liberação pelas células endoteliais ocorre por meio da ação de agonistas

vasoconstritores, como noradrenalina, serotonina, fenilefrina, angiotensina II etc., e agonistas vasodilatadores, como a acetilcolina, bradicinina etc., e por estímulos mecânicos, como o *shear stress*.

A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é resultado da ação da cicloxigenase sobre a PGH<sub>2</sub> e atua sobre receptores específicos (receptores EP). Quatro subtipos desses receptores estão presentes no organismo: EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>, e cada um deles desempenham um papel fundamental na vasomotricidade (BAYSTON et al., 2003; TANG et al., 2007a). Os subtipos EP<sub>1</sub> e EP<sub>3</sub> quando estimulados pela PGE<sub>2</sub> ativam a via do IP<sub>3</sub>/Ca<sub>2+</sub> (receptor EP<sub>1</sub>) ou a diminuição dos níveis de AMPc intracelulares (receptor EP<sub>3</sub>) por inibição da adenilato ciclase, gerando vasoconstrição. Já a ligação do PGE<sub>2</sub> nos receptores EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> provocam dilatação vascular, pois essa ligação molécula-receptor aumenta os níveis de AMPc via ativação da adenilato ciclase (BOS et al., 2004; VAN RODIJNEN et al., 2007). A estimulação dependente do endotélio mediada pelo subtipo 4 dos receptores EP foi demonstrada na aorta de camundongo (TANG et al., 2007b).

Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) é uma das mais importantes derivadas do ácido araquidônico e é sintetizada a partir da PGH<sub>2</sub> pela enzima PGF<sub>2α</sub>-sintetase. Sua ação constritora no músculo liso vascular ocorre via receptores para PGF<sub>2α</sub> (receptor FP), os quais são encontrados em vários tecidos, como também no tecido vascular. O receptor FP está acoplado na proteína G, e quando estimulado ativa a via do IP<sup>3</sup>/Ca<sup>2+</sup> causando a contração do músculo liso vascular (CRACOWSKI et al., 2002; TANG et al., 2007b). Os níveis dessa prostaglandina aumentam quando há estresse oxidativo.

### *Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)*

Fisiologicamente a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) ocorre em baixas concentrações e funcionam como moléculas sinalizadoras, regulando a vasomotricidade e o crescimento celular. São derivadas do metabolismo celular, onde diversas enzimas utilizam o oxigênio como acceptor de elétrons e essas reações possuem uma consequente formação de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), produzido a partir da redução da molécula de O<sub>2</sub>. A partir do O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, outras EROs também podem ser formadas: peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (HO<sup>·</sup>).

As EROs possuem um papel fisiológico chave para manutenção da integridade cardíaca e vascular. Na disfunção cardiovascular, como a hipertensão,

as EROs atuam como um dos causadores de sua gênese. A taxa de geração das EROs é equilibrada pela taxa de eliminação, mas em contrapartida, em condições patológicas como na hipertensão, a produção das espécies acontece em altos níveis, sendo impossível controlar tal produção pelos mecanismos antioxidantes protetores usados pelas células.

As EROs possuem um elétron desemparelhado e essa configuração lhe confere uma alta capacidade reativa. Por esse motivo, o NO, que também tem um elétron desemparelhado, quando em contato com ânions superóxidos produzem uma reação quimicamente espontânea e irreversível formando o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), considerado um tóxico com efeitos negativos na função celular, principalmente vascular, como aumento na contratilidade vascular, crescimento e apoptose de células do músculo liso vascular, peroxidação lipídica, inflamação e nitrosilação de proteínas. A regulação da geração de EROs é feita por meio de antioxidantes exógenos, por meio do consumo de alimentos ricos em vitaminas antioxidantes, e endógenos, que incluem o superóxido dismutase (SOD), catalase, tiorredoxina e glutationa (VIRDIS; DURANTI; TADDEI, 2011).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS**

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas. Esses animais foram fornecidos pelo biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade do Vale do São Francisco - UNIVASF e foram mantidos em gaiolas sob condições de controle de temperatura (média de 22°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e alimentação. Os procedimentos adotados no manejo dos animais seguiram as recomendações do COBEA. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da UNIVASF sob o registro nº0001/240919 (ANEXO A).

#### **3.2 OBTEÇÃO DO MODELO ANIMAL**

Ratas Wistar virgens ( $N = 6$ ) foram mantidas em gaiolas com ratos machos ( $N=2$ ) na proporção de 3:1 para serem acasaladas. A constatação da cópula foi realizada mediante a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal e 24h após esta constatação foi considerado o primeiro dia de gestação. Após a constatação da cópula, os ratos machos foram separados das fêmeas. As ratas foram pesadas e isoladas em gaiolas separadas, divididas aleatoriamente em dois grupos: o grupo controle (O-CON) recebeu solução salina e o grupo tratamento (O-GHB) receberam 1,3 g/L de glifosato oralmente por gavagem (0,4% formulação comercial de glifosato) equivalente a 200 mg Glifosato/kg/dia durante o período completo gestacional e de lactação. Essas doses foram selecionadas baseadas nos níveis não observáveis de efeitos adversos (NOAEL) de 1000 mg/kg/dia para toxicidade materna. Das proles dos grupos O-CON e O-GHB foram utilizados somente os ratos machos ( $N = 8-10$ ) que foram separados em gaiolas de acordo com o tratamento recebido, receberam água e comida ad libitum até os 24 e 48 semanas de idade. Essas proles foram utilizadas para os experimentos de medida da pressão arterial, análise histológica e de reatividade vascular.

#### **3.3 PRESSÃO ARTERIAL**

Após a vigésima quarta e quadragésima oitava semana de vida, a pressão

arterial e a frequência cardíaca foram analisadas com os animais acordados. Para a medida direta da pressão arterial e frequência cardíaca os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina 80 mg/kg, xilazina 2 mg/kg e tramadol 30 mg/kg via intramuscular e colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica. Em seguida foram submetidos à canulação da artéria carótida com um cateter de polietileno (PE-50) preenchido com solução salina heparinizada (100 U/mL). Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico foi realizada a medida dos parâmetros hemodinâmicos com os animais acordados. A cânula arterial dos ratos foi conectada ao transdutor de pressão (MLT 0699 – ADInstruments®) acoplado ao conversor digital PowerLab®. O programa LabChart® foi utilizado para os registros da pressão arterial.

Durante todo o período de registro os animais não sofreram nenhum tipo de manipulação e o silêncio foi mantido na sala para evitar os efeitos indesejáveis do estresse do animal.

### 3.4 ANÁLISES DE CONTRATILIDADE E RELAXAMENTO

Após a vigésima quarta e a quadragésima oitava semana de vida, os ratos foram anestesiados com uma mistura de ketamina, xilazina e acetopromazina (0,7, 0,2, 0,1 v/v – 0,08 mg/ Kg, i.m.) e em seguida, eutanasiados por decapitação e então exsangüinados. A artéria aorta torácica foi cuidadosamente removida e imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit, cuja composição (em mM): NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO<sub>3</sub> 25; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5; glicose 11; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2 e EDTA 0,01) gaseificada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) com pH de 7,4. As artérias foram divididas em segmentos de 3 mm de comprimento, livres dos tecidos conectivo e adiposo, para os segmentos sem endotélio a retirada se deu mecanicamente com raspagem do lúmen. Para obtenção do registro de tensão isométrica, cada anel vascular será colocado em um sistema para órgãos isolados. As cubas continham 10 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecidas a 37° C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de metal foram passados através do lúmen das artérias. Um fio metálico será fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica (LETICA Scientific Instruments,

TRI-210, Barcelona, Spain). A tensão isométrica foi registrada através de um transdutor de tensão isométrica conectado a um sistema de aquisição de dados (Powerlab, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e este a um computador. Os anéis de aorta torácica foram submetidos a uma tensão de repouso de 1 grama, a qual foi reajustada a cada 15 min, durante 45 min para estabilização.

Após 45 min de estabilização, as artérias foram pré contraídas com KCl 75 mM em dois momentos. No primeiro momento, 166 µl de solução de KCl foram incubados nos banhos de órgãos para que as artérias saíssem da tensão de repouso de 1 grama e atingissem 2 gramas. Após isso, as cubas foram lavadas com solução de Krebs-Henseleit e estabilizadas na tensão basal de 1 grama por 30 min. Após esse tempo, o KCl foi incubado novamente em cada banho de órgão por um período de 25 min.

#### 3.4.1 Avaliação da resposta de relaxamento dependente e independente do endotélio em artérias aorta de ratos adultos

O teste do endotélio foi realizado após um período de 30min, onde as artérias foram pré contraídas com dose única de 10 µl de fenilefrina ( $10^{-2}M$ ) até atingirem seu limiar de contração máximo. Tendo isso, foi incubado nos banhos de órgãos 10 µl de acetilcolina ( $10^{-3}M$ ) para induzir o relaxamento. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina ( $10^{-3}M$ ) induzir relaxamento. Após a confirmação da ausência do endotélio, as preparações foram lavadas e, após retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentração-resposta à Acetilcolina ( $10^{-9}M$  a  $10^{-4}M$ ), de maneira cumulativa.

#### 3.4.2 Investigação da modulação do endotélio e seus fatores vasoativos sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

A participação do endotélio nas possíveis alterações da resposta constritora à fenilefrina induzida pela exposição materna ao glifosato será avaliada através da sua remoção mecânica, com o uso de fios metálicos. Após o período de estabilização, as preparações foram pré contraídas com fenilefrina, e a ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina ( $10^{-3}M$ ) induzir relaxamento. Após a confirmação da ausência do endotélio, as preparações foram lavadas e, após

retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina ( $10^{-9}$ M a  $10^{-4}$ M), de maneira cumulativa.

**3.4.3 Análise dos efeitos do glifosato sobre a produção do óxido nítrico de origem vascular, sobre a ação da cicloxigenase e das espécies reativas de oxigênio sobre o relaxamento induzido por acetilcolina**

O efeito do óxido nítrico sobre a contração induzida por fenilefrina foi avaliado através da utilização do éster metílico de N-nitro-L-arginina (L-NAME) (10 µl), um inibidor não seletivo da síntese de óxido nítrico. A análise da ação da cicloxigenase sobre a artéria foi investigada incubando indometacina (10 µl), um bloqueador não seletivo da via mediada pelas cicloxigenases. A participação de radicais livres foi analisada incubando as artérias com um mimético do superóxido dismutase, o TEMPOL (10 µl). Cada fármaco foi incubado durante 30 minutos antes da realização das curvas de relaxamento à acetilcolina.

### **3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA NA AORTA TORÁCICA**

Anéis de aproximadamente 3mm de aorta torácica foram fixados em formol a 10%. Após isso, foram acondicionados em pequenas caixas perfuradas de plásticos (cassetes) e identificadas. O processamento em parafina tem como objetivo retirar a água do tecido e substituí-lo por parafina, tornando-o mais firme e passível de ser cortada em fatias delgadas. Esse processamento foi realizado imergindo os cassetes em banhos sucessivos de álcool, de xanol e em parafina aquecida (entre 55 e 60°C). Os anéis de aorta parafinizados foram incluídos em um pequeno bloco de parafina.

A microtomia foi realizada cortando os anéis de aorta em fatias muito delgadas. Esses cortes foram colocados em banho-maria histológico, que contém água aquecida e em seguida colocados em lâminas histológicas. Antes da coloração das lâminas, os cortes foram desparafinizados com imersões sucessivas em xanol. Em seguida foram submetidos a banhos em álcool até serem hidratados. A coloração foi feita com hematoxilina e eosina (HE). Após a coloração as lâminas foram analisadas em microscópio fotônico comum.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

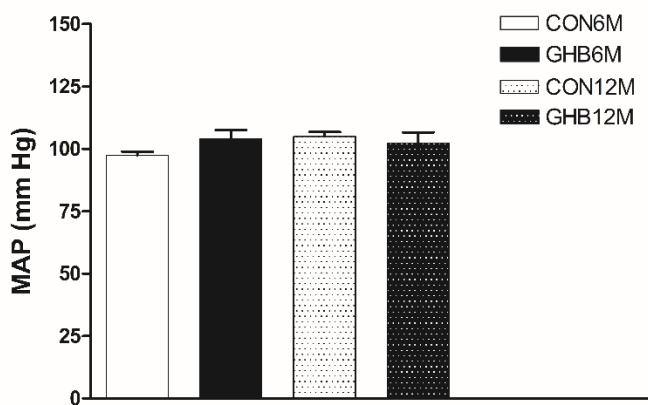
A análise estatística dos resultados foi realizada por teste t, pareado e/ ou não pareado, e análise de variância (ANOVA), duas vias, medidas repetidas ou completamente randomizadas. Quando a ANOVA apresentou significância estatística o teste post-hoc de Bonferroni foi realizado (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de P<0,05.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial foi mensurada com o objetivo de avaliar possíveis alterações nos parâmetros cardiovasculares nos ratos adultos provenientes de ratas expostas ao glifosato-Roundup®. A medida foi realizada com os animais acordados com 6 e 12 meses de idade e seus valores de pressão comparados com animais controle de mesma idade.

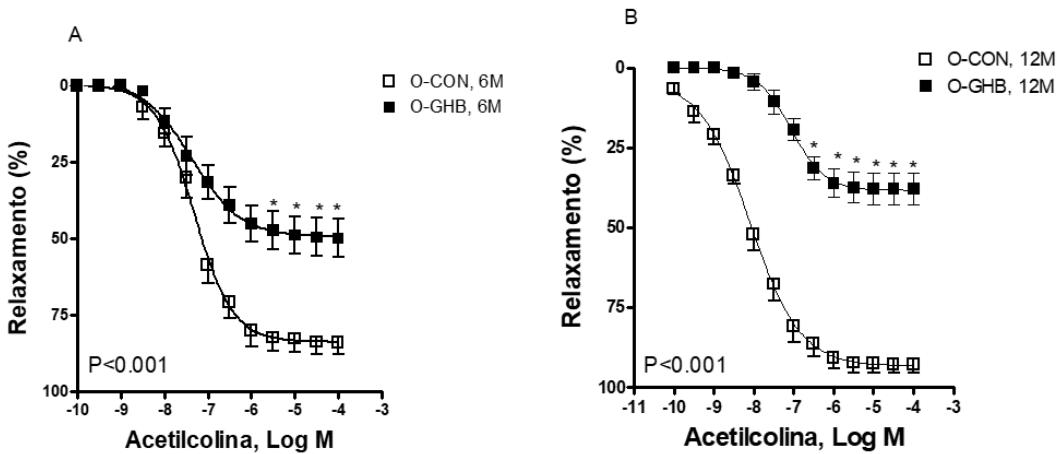
Neste estudo não foram observadas diferenças significativas da pressão arterial média entre os ratos provenientes de ratas controle (O-CON) e expostas ao glifosato-Roundup® (O-GHB) em ambas as idades (figura 6).



**Figura 6:** Pressão Arterial Média (MAP) de ratos provenientes de ratas controle (O-CON) e expostas ao glifosato-Roundup® (O-GHB) com 6 e 12 meses de idade. Os resultados são expressos como média ± EPM. N= 8-10 em cada grupo.

### 4.2 ANÁLISE DA RESPOSTA DE RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

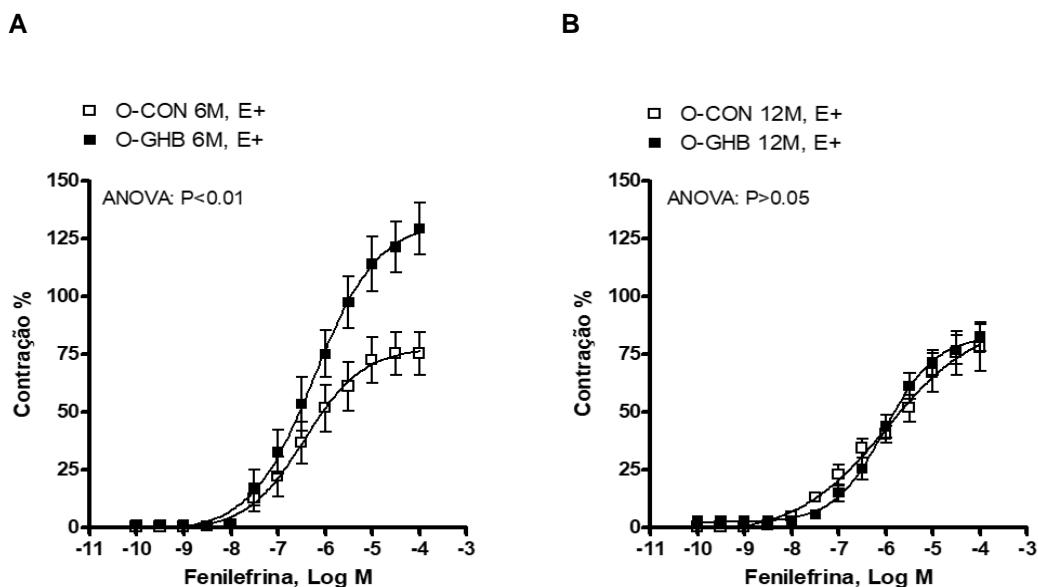
Com o intuito de avaliar a função endotelial através do relaxamento dependente do endotélio, curvas de concentração resposta à acetilcolina foram realizadas em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. Na aorta de animais do grupo tratamento (O-GHB) com 6 meses de idade (figura 7A) foi observada uma redução do relaxamento induzido pela acetilcolina quando comparado ao seu respectivo controle (CON) de mesma idade. Os animais com 12 meses de idade (figura 7B), apresentaram redução expressiva da resposta de relaxamento induzida por acetilcolina quando comparada ao seu respectivo controle (CON) de mesma idade.



**Figuras 7:** Curva de relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina em anéis de aorta torácica de ratos provenientes de ratas controle (CON) e expostas ao glifosato-Roundup® (GHB), com 6 e 12 meses de idade. N= 8-10 em cada grupo.

#### 4.3 ANÁLISE DA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

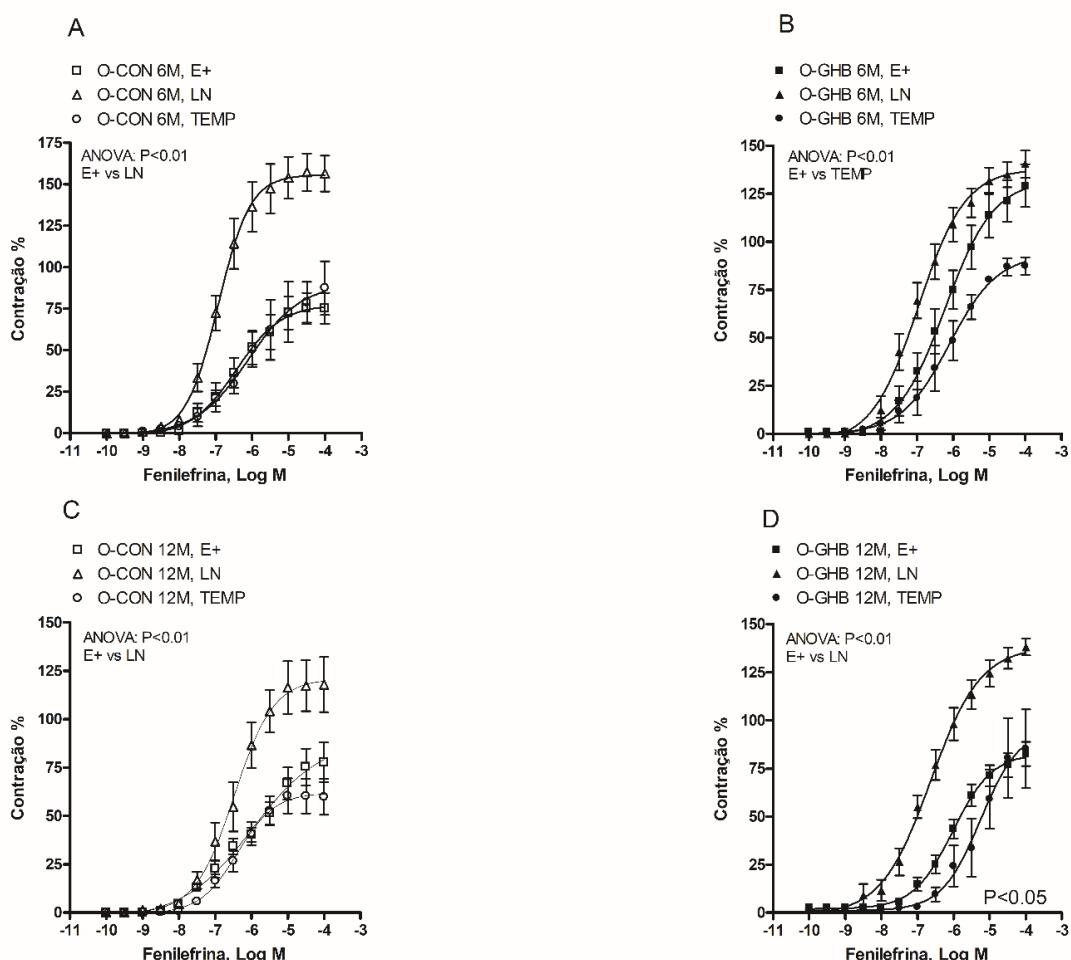
A fenilefrina aumentou, de maneira concentração-dependente, o tônus basal de anéis de aorta dos animais tratamento (O-GHB) com 6 meses de idade (figura 8A). Não houve alteração significativa na contração de animais tratamento (O-GHB) com 12 meses de idade quando comparado ao seu respectivo controle (O-CON) (figura 8B).



**Figura 8:** Curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos provenientes de ratas controle (O-CON) e expostas ao glifosato-Roundup® (O-GHB), com 6 e 12 meses de idade. N= 8-10 ratos em cada grupo.

#### 4.3.1 Efeito da inibição da síntese de NO e papel das EROs sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

A inibição da síntese de NO por meio da incubação de éster metílico de N-nitro-L-arginina (L-NAME) induziu um aumento significativo na contração à fenilefrina em aorta torácica no grupo controle (O-CON 6M e 12M) e tratado (O-GHB 12M) (figura 9 A, C e D). Entretanto, nos animais do grupo (O-GHB 6M) o L-NAME, não apresentou diferença significativa na amplitude de contração dos anéis de aorta quando comparado com seu respectivo controle (figura 9B). A presença do mimético da superóxido dismutase, o TEMPOL, reduziu a amplitude de contração induzida pela fenilefrina nos grupos O-GHB 6M e 12M (figuras 9B e D) para níveis comparáveis ao dos grupos controle O-CON6M e O-CON12M (figuras 9A e C).



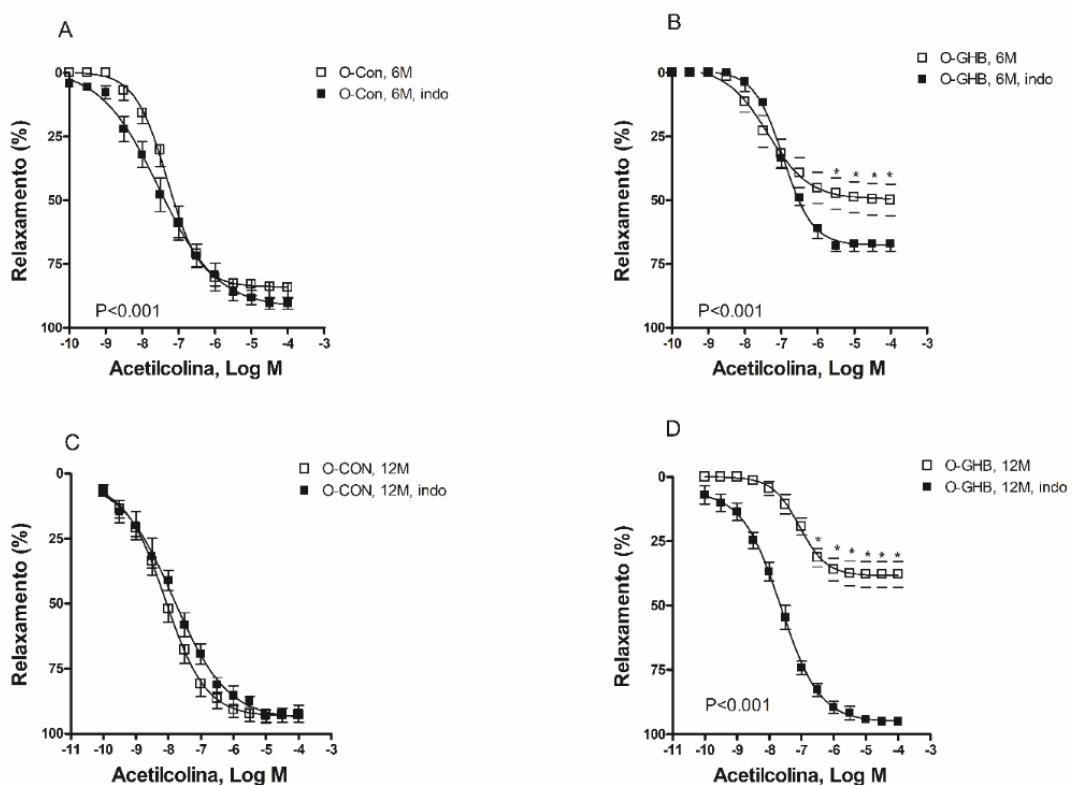
**Figura 9:** Efeito da inibição da síntese de NO (L-NAME, 100 µmol/L) sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em anéis de aorta de ratos com 6 e 12 meses de idade, provenientes de ratas controle (CON) e expostas ao glifosato-Roundup® (GHB). N= 8-10 ratos em cada grupo. E+: anel de aorta torácica com endotélio preservado sem adição de inibidores.

## 4.4 PARTICIPAÇÃO DA INDOMETACINA NO RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO E NA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR FENILEFRINA

### 4.4.1 Relaxamento dependente do endotélio

Para investigar a participação de metabólitos derivados do ácido araquidônico no relaxamento dependente do endotélio, curvas concentração-resposta à acetilcolina foram realizadas na presença de indometacina, um inibidor não seletivo da cicloxigenase.

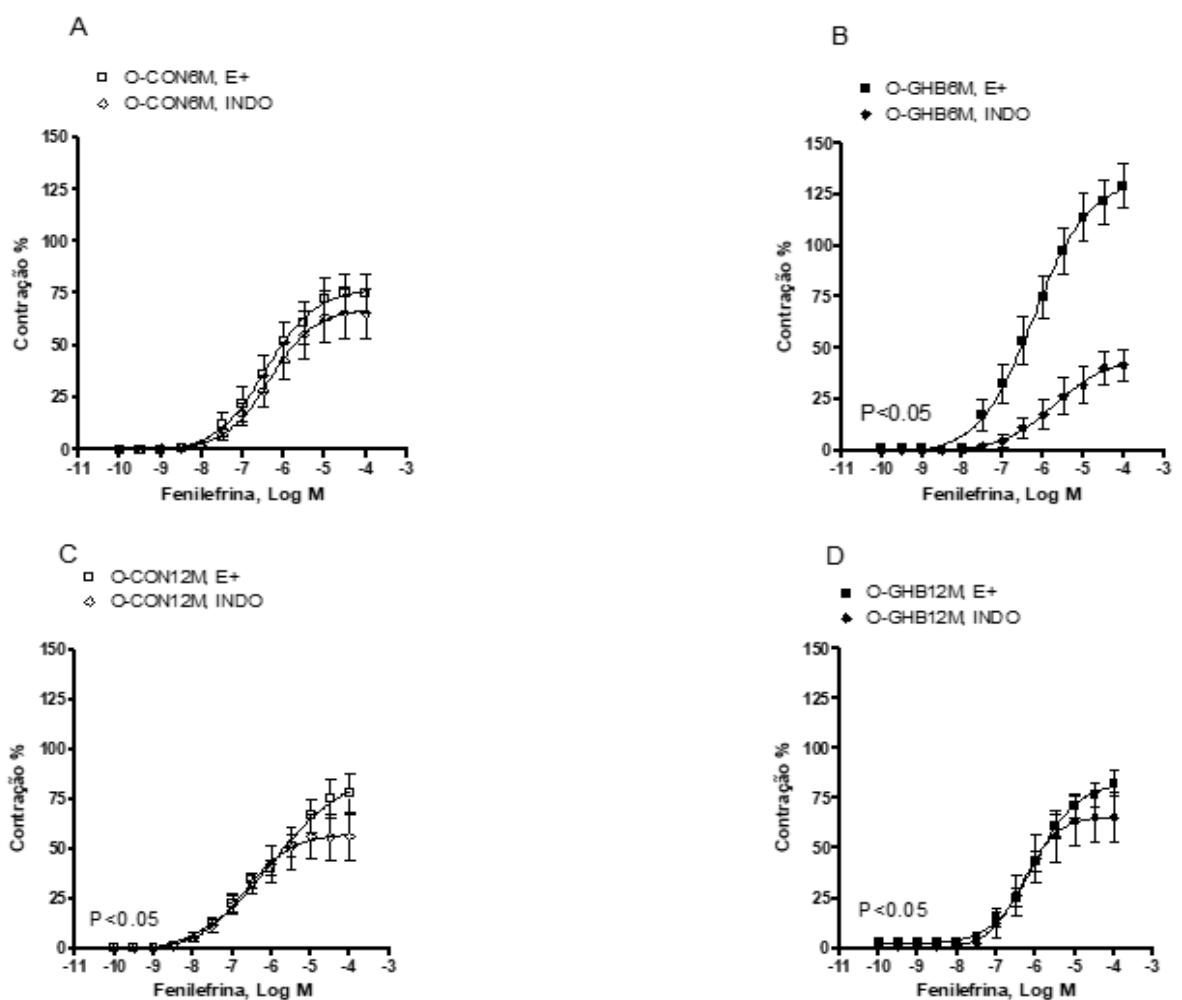
Na aorta torácica dos animais com 6 meses de idade do grupo tratamento (O-GHB), a indometacina aumentou a amplitude do relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina (figura 10B). Nos animais O-GHB com 12 meses de idade (figura 10D), o aumento do relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina foi maior, quando comparado com o grupo O-GHB com 6 meses de idade.



**Figura 10:** Efeito da indometacina na vasodilatação dependente do endotélio induzida pela acetilcolina em anéis de aorta de ratos com 6 e 12 meses de idade, provenientes de ratas controle (CON) e expostas ao glifosato-Roundup® (GHB). N= 8-10 ratos em cada grupo.

#### 4.4.2 Contração induzida por fenilefrina

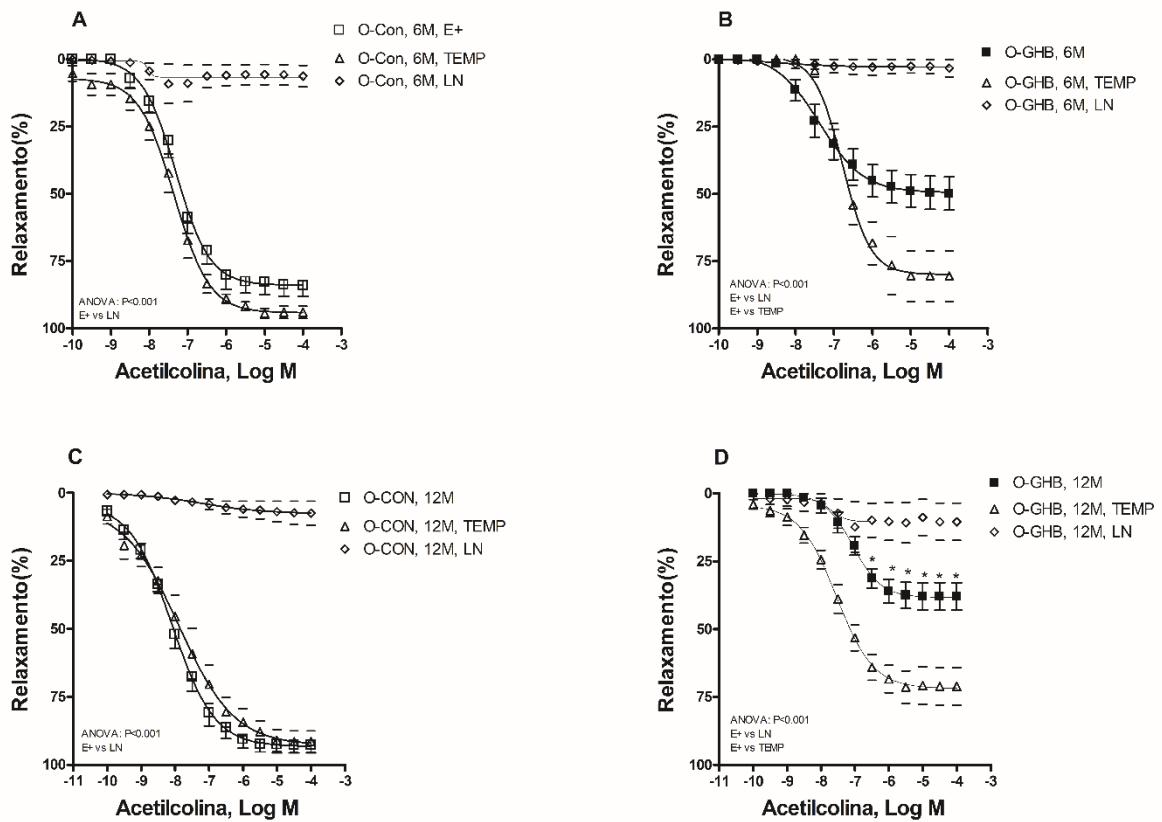
Com o objetivo de verificar a participação dos prostanóides na contração induzida pela fenilefrina, foram realizadas curvas concentração-dependente na presença do inibidor indometacina. Nos anéis de aorta torácica dos animais do grupo tratamento (O-GHB) com 6 meses de idade, a presença da indometacina diminuiu a vasoconstricção induzida pela fenilefrina (figura 11B). Já nos animais do grupo tratamento (O-GHB) com 12 meses de idade, a presença da indometacina não provocou diferença significativa na contração induzida por fenilefrina (figura 11D).



**Figura 11:** Efeito da indometacina na contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta de ratos com 6 e 12 meses de idade, provenientes de ratas controle (CON) e expostas ao glifosato-Roundup® (GHB). N= 8-10 ratos em cada grupo. E+: anel de aorta torácica com endotélio preservado sem adição de inibidores.

#### 4.5 ANÁLISE DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO SOBRE O RELAXAMENTO INDUZIDO POR ACETILCOLINA

A fim de avaliar a participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no relaxamento dependente do endotélio, curvas concentração-resposta a acetilcolina foram realizadas em anéis de aorta pré-incubadas com TEMPOL, um mimético do superóxido dismutase (SOD). O TEMPOL aumentou o relaxamento à acetilcolina em O-GHB aos 6 e 12 meses de idade (figuras 12 B e D) alcançando valores comparáveis aos dos grupos controle (figuras 12 A e C).

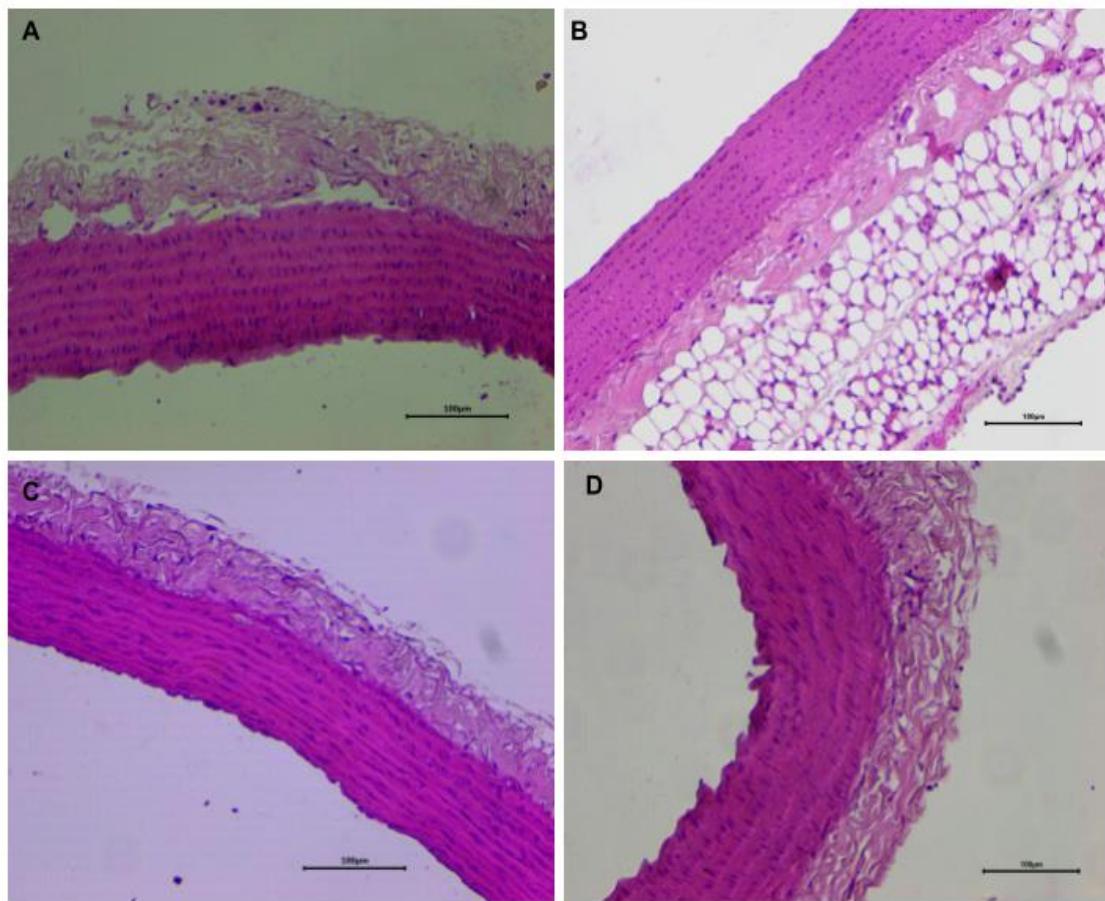


**Figura 12:** Efeito do TEMPOL sobre a vasodilatação dependente do endotélio induzida pela acetilcolina, em anéis de aorta de ratos com 12 meses de idade, provenientes de ratas controle (CON) e expostas ao glifosato-Roundup® (GHB). N= 8-10 ratos em cada grupo. E+: anel de aorta torácica com endotélio preservado sem adição de inibidores.

#### 4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA NA AORTA TORÁCICA

Após a eutanásia dos animais para o estudo de reatividade vascular, um fragmento aórtico adicional foi fixado em formol 10%. O material foi processado, cortado e corado em hematoxilina e eosina para análise histopatológica. Os cortes foram analisados em microscópio óptico, nas objetivas de 4 e 10x, para observação dos aspectos inflamatórios, degenerativos e de necrose tecidual, além de quaisquer outras observações que pudessem ser relatadas. Conforme a figura 13, não foram observadas alterações histopatológicas nos tecidos aórticos dos animais em ambos os grupos CON e GHB.

Animais nascidos de ratas tratadas, por via oral, com 0,3ml/animal com solução fisiológica de NaCl 0,9%, durante gestação e lactação (grupos controle – A e B). Animais nascidos de ratas tratadas, por via oral, com 0,3ml/animal com solução do herbicida Roundup®, 200mg/ml/kg de peso do animal, durante a gestação e lactação (grupos tratamento – C e D). Animais sacrificados após 6 meses (A e C) e 12 meses (B e D) para proceder às análises histológicas. Cortes histológicos com 4µm de espessura corados por hematoxilina e eosina. Todas as imagens foram adquiridas com um aumento de 100x. Não foram observadas alterações na estrutura das aortas dos animais, nenhuma infiltração inflamatória, necrose ou distúrbios degenerativos do tecido. Estas imagens são representativas da análise de secções de aorta de grupos que variam entre 5 e 8 animais por grupo. A imagem B, mostra um tecido adiposo adjacente a artéria, sendo achado fortuito, não consistente com lesão decorrente do tratamento por não ser repetidamente encontrada nos outros animais do mesmo grupo.



**Figura 13:** Análise histopatológica de aorta da prole de ratas expostas à solução do herbicida Roundup®.

**Fonte:** Próprio autor, 2022

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a exposição ao herbicida a base de glifosato durante a fase intrauterina e perinatal em doses abaixo do NOAEL não alterou os níveis pressóricos, mas foi capaz de induzir alterações sobre a reatividade vascular em aorta torácica de ratos adultos. Foram observados prejuízo no relaxamento dependente do endotélio em animais GHB em ambas as idades. Entretanto, em animais com 12 meses de idade observou-se uma piora no relaxamento, indicando que o fator idade contribuiu para tal resultado. Além disso, houve hiperreatividade à fenilefrina em animais GHB6M.

Tais resultados apontam que a exposição ao organofosforado promove dano endotelial e consequente prejuízo na resposta vasodilatadora. Os mecanismos presentes nessas alterações envolvem a participação da cicloxigenase-2 (COX-2), produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) de origem vascular o que acarreta um quadro de disfunção endotelial que pode contribuir para o aparecimento de doenças cardiovasculares.

Os resultados de pressão arterial aqui obtidos em ratos adultos provenientes de ratas expostas ao glifosato-Roundup® demonstram que não houve diferença no nível pressórico dos animais. A maior parte dos estudos descritos na literatura demonstram que há aumento da pressão arterial em modelos humanos e de animais expostos a poluentes, pesticidas, organofosforados e casos de privação de nutrientes no período intrauterino (ALEXANDER, 2006; CASTILLA et al., 2018; LEDDA et al., 2015; SALDANA et al., 2009). Entretanto, são escassos os estudos que envolvem a exposição materna e avaliação da pressão arterial na prole.

Os resultados presentes nesse estudo demonstram que em artéria aorta de ratos GHB o relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina foi reduzido comparado ao que foi observado nos animais controle com 6 e 12 meses de idade. Esse prejuízo na dilatação dependente do endotélio observado nos ratos GHB pode acarretar repercussões patológicas importantes, sendo este um fator intimamente relacionado com o surgimento de enfermidades cardiovasculares, como por exemplo a aterosclerose, inflamação e hipertensão arterial (GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016; GUZIK; TOUYZ, 2017; VIEIRA et al., 2018).

O mecanismo por trás dessa disfunção vasomotora não está claro, mas é bem conhecido que a exposição ao pesticida glifosato promove uma produção aumentada de ânions superóxidos e que esse tem papel fundamental na diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico. O radical superóxido reage rapidamente com o óxido nítrico, inibindo sua biodisponibilidade e gerando espécies reativas oxidantes secundárias, como o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) que é capaz de oxidar moléculas de LDL, causar disfunção vascular e contribuir na gênese da aterosclerose (BAHIA et al., 2004).

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que a prole de animais expostos ao glifosato teve um aumento expressivo na contração induzida por fenilefrina, tanto em artérias sem adição do L-NAME como nas artérias em que foi pré-incubado o inibidor da síntese de óxido nítrico. O aumento da contração em artérias com L-NAME é esperado, visto que o fator determinante para o relaxamento foi inibido. Mas esse aumento na contração em artérias de animais tratados que não receberam o inibidor L-NAME, significa que a biodisponibilidade do vasodilatador óxido nítrico já estava prejudicada, devido ao dano endotelial.

Sabe-se que a presença de radicais livres derivados do oxigênio, provoca redução da atividade do óxido nítrico e esse estresse oxidativo implica em disfunção endotelial, inflamação e processos que estão envolvidos na hipertensão, como hipertrofia, apoptose, migração, fibrose e angiogênese (MONTEZANO; TOUYZ, 2012; TOUYZ; BRIONES, 2011). Uma maior liberação de substâncias vasoconstritoras e uma menor biodisponibilidade de óxido nítrico contribuem para a hiperreatividade à fenilefrina observada.

A presença do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) aumenta atividade da enzima produtora de  $\text{O}_2^-$ , a NADPH oxidase, e isso está associado ao aumento da pressão arterial e vasoconstrição (BOULDEN et al., 2006). Para avaliar a participação das espécies reativas de oxigênio (EROs), os anéis de aorta torácica foram pré-incubados com TEMPOL, um mimético da superóxido dismutase, importante na defesa antioxidante. Observou-se que a presença do TEMPOL melhorou o relaxamento induzido por acetilcolina nos ratos GHB em ambas as idades, sugerindo que a exposição materna ao glifosato-Roundup resultou em estresse oxidativo na prole, sendo esse fator a causa para a menor biodisponibilidade do óxido nítrico nos vasos desses animais. Chaufan, Coalova & Molina (2014) demonstraram em seu estudo que a exposição ao herbicida contendo glifosato em sua formulação pode

causar citotoxicidade, modificação no equilíbrio redox intracelular com aumento da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), produção de espécies reativas de oxigênio e morte celular.

Estudos demonstram que a exposição perinatal ao estresse oxidativo é fator contribuinte para o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos e a presença do TEMPOL melhorou o relaxamento em ratos, mas não parece estar relacionado com a melhora da função endotelial (DE QUEIROZ et al., 2010). Isso sugere que outros mecanismos estão envolvidos na regulação da pressão arterial e disfunção endotelial.

Condições pró inflamatórias são frequentemente associadas a um remodelamento vascular e causa disfunção endotelial em artérias sistêmicas. O aumento da síntese ou da liberação de fatores contráteis, como por exemplo, os derivados do ácido araquidônico através do metabolismo da cicloxigenase (COX), é apontado como um mecanismo responsável pelas alterações vasculares secundárias a exposição a um agente citotóxico (MCGIFF; MALIK; TERRAGNO, 1976).

Duas COXs foram caracterizadas, a COX-1 que pode ser detectada na maioria dos tecidos e é expressa em níveis constantes durante o ciclo celular, e a COX-2, que é induzida a partir de processos inflamatórios e de proliferação celular (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011; SCHMEDTJE et al., 1997) e em condições associadas ao risco cardiovascular, como hipertensão arterial, diabetes, aterosclerose, obesidade e envelhecimento. As prostaglandinas são formadas a partir da catálise do ácido araquidônico que é liberado a partir da hidrólise dos fosfolipídios da membrana celular sob ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>. A COX converte o ácido araquidônico em PGG<sub>2</sub>, a qual sofrerá a ação da enzima peroxidase, dando origem ao PGH<sub>2</sub>. A PGH<sub>2</sub> sofrerá a ação de enzimas específicas e originará outras prostaglandinas, como a PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> e TxA<sub>2</sub>. As prostaglandinas e o tromboxano A<sub>2</sub> são moduladores importantes do tônus vascular e da atividade plaquetárias em condições fisiológicas ou patológicas (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011).

Para avaliar o envolvimento dos produtos derivados da COX-2 nas respostas à acetilcolina e à fenilefrina, usamos o inibidor não seletivo da COX, a indometacina. Os resultados aqui apresentados demonstram que houve aumento do relaxamento à acetilcolina em artérias dos ratos GHB com 6 e 12 meses de idade que receberam a

indometacina. No que diz respeito à resposta contrátil à fenilefrina, a adição desse inibidor promoveu uma redução desta resposta nas artérias aórticas dos animais GHB com 6 meses de idade.

Num estado de homeostasia, a resposta dos derivados do ácido araquidônico na presença de acetilcolina ocasiona diminuição da amplitude de relaxamento e na presença de fenilefrina, a vasoconstrição é acentuada. Os resultados do presente estudo demonstraram que na presença da indometacina houve a inibição da síntese de substâncias vasoconstritoras nos vasos dos animais GHB, e isso resultou no aumento da amplitude de relaxamento. Isso indica que há participação de prostanoides nas alterações vasculares da prole de animais expostos ao herbicida, e são mediadas pela ativação e/ou maior expressão da COX-2 e essas alterações podem variar de acordo com a idade destes animais. Em ratos machos adultos expostos, por via oral, a doses variadas de glifosato foi detectado, em tecido hepático, uma elevação nos marcadores inflamatórios como citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS), outro nome dado a enzima COX (LAGES et al., 1998; LUO; LIU; ZHOU, 2016; PANDEY; DHABADE; KUMARASAMY, 2019).

Estímulos como a tensão de cisalhamento e agonistas, aumentam a concentração de cálcio no interior da célula endotelial, estimula a fosfolipase A<sub>2</sub>, provoca a liberação de ácido araquidônico, que por sua vez, ativa a cascata para a síntese das prostaglandinas vasoconstritoras, por meio da ativação de receptores TP ou EP do músculo liso, causando as contrações dependente do endotélio (TANG et al., 2007b). As prostaglandinas presentes no mecanismo de vasoconstrição são o TxA<sub>2</sub>, a PGI<sub>2</sub> e a PGE<sub>2</sub>. A PGE<sub>2</sub> é o produto mais abundante do metabolismo da cicloxigenase, e pode atuar tanto em receptores TP como em receptores específicos EP<sub>1</sub> e EP<sub>3</sub>. Esse resultado, portanto, sugere que há participação de prostanoides vasoconstritoras no processo de disfunção endotelial e na hiperreatividade à fenilefrina observada e pode-se dizer que a prostaglandina envolvida nesse processo é a PGE<sub>2</sub>.

Quanto a análise tecidual, não foram observadas alterações histopatológicas nos tecidos aórticos dos animais em ambos os grupos CON e GHB em ambas as idades. Não foram observadas alterações estruturais nas aortas dos animais. A aorta é uma artéria elástica e apresenta acúmulo de elastina em sua túnica média, contribuindo assim para a função de uniformizar o fluxo de sangue (JUNQUEIRA;

CARNEIRO, 2018). As alterações estruturais que poderiam ser observadas nos cortes histológicos incluem o infiltrado inflamatório na parede arterial, que se caracteriza pelo acúmulo de macrófagos, células multinucleadas, células natural killer, neutrófilos e linfócitos vindos das arteríolas que nutrem a camada adventícia da aorta (SANTOS-ROCHA et al., 2019b). Outra alteração histopatológica que pode acometer a camada média arterial é a isquemia focal, podendo resultar em áreas de necrose, caracterizada por células do tecido muscular liso anucleadas (DE SÁ, 2011). Já na camada íntima, onde encontra-se o endotélio, placas de ateroma podem ser encontradas em casos de disfunção endotelial que ocasiona alterações na função antitrombogênica do endotélio. A placa é caracterizada por espessamento do epitélio, composta por tecido fibroso e de músculo liso, além de lipídeos, colesterol e cálcio. Nos resultados histológicos do presente estudo, não foram observadas infiltrações celulares aderidas ao endotélio, necrose nem distúrbios degenerativos do tecido.

Os resultados histopatológicos do atual estudo vão em contrapartida do que foi observado por Fanti (1999) no seu trabalho para comparar as alterações funcionais e alterações inflamatórias na superfície endotelial em animais normais e hipertensos, onde encontrou células do tipo inflamatórias aderidas no endotélio vascular na aorta de ratos com a produção de óxido nítrico bloqueada. Como já mencionado anteriormente, a biodisponibilidade de óxido nítrico estava prejudicada nos animais do grupo GHB devido a disfunção endotelial causada pela exposição materna ao glifosato. Partindo desse pressuposto, a integridade endotelial comprometida possibilitaria a adesão de células inflamatórias. Por outro lado, nos achados histológicos deste estudo não foram observadas adesão celular de nenhum tipo ao endotélio vascular. Cabe ressaltar que a NOS endotelial possui um papel importante como sensor mecânico, mediando a liberação de NO conforme as alterações hemodinâmicas acontecem dentro do vaso (FANTI, 1999).

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que ratos machos adultos provenientes de ratas expostas ao herbicida glifosato-Roundup® tiveram seu relaxamento dependente do endotélio prejudicado, e um prejuízo mais acentuado em ratos com 12 meses de idade, indicando assim que o fator idade também contribuiu para esse resultado. Houve também um aumento expressivo na contração induzida por fenilefrina na presença de L-NAME, pois o dano endotelial comprometeu a biodisponibilidade do vasodilatador óxido nítrico. O relaxamento induzido por acetilcolina melhorou nos ratos GHB com a presença do TEMPOL, em ambas as idades. Isso sugere que a exposição materna ao glifosato resulta em estresse, sendo esse fator uma possível causa para a hiperreatividade vascular observada. Com a indometacina houve aumento da amplitude de relaxamento, indicando que há participação de prostanóides nas alterações vasculares da prole de animais expostos ao herbicida, e são mediadas pela ativação e/ou maior expressão da COX. O aumento na síntese ou da liberação de fatores contráteis, como derivados do ácido araquidônico através do metabolismo da ciclooxygenase, associado a um maior estresse oxidativo podem ser os principais mecanismos envolvidos nessas alterações vasculares. Os resultados também revelam que, embora não tenham sido demonstradas alterações nos parâmetros cardíacos ou histológicos, os níveis atuais considerados seguros para exposição ao glifosato merecem maiores investigações, principalmente durante a gravidez.

## REFERÊNCIAS

- AIRES, M. DE M. **Fisiologia**. 3º ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- AIT-BALI, Y. et al. Pre- and postnatal exposure to glyphosate-based herbicide causes behavioral and cognitive impairments in adult mice: evidence of cortical ad hippocampal dysfunction. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 5, p. 1703–1723, 1 maio 2020.
- ALEXANDER, B. T. Fetal programming of hypertension. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 1, p. R1–R10, jan. 2006.
- ANADÓN, A. et al. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology letters**, v. 190, n. 1, p. 91–95, 8 out. 2009.
- ASHTON, N. Perinatal development and adult blood pressure. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 7, p. 731–740, jul. 2000.
- BAHIA, L. et al. Endotélio e Aterosclerose. **Revista da SOCERJ**, v. 17, 2004.
- BALDI, I. et al. Neurobehavioral effects of long-term exposure to pesticides: results from the 4-year follow-up of the PHYTONER Study. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 68, n. 2, p. 108–115, 1 fev. 2011.
- BARBOSA, A. et al. Study of muscle fibers of the extensor digitorium longus and soleus muscles of C57BL/6 females exposed to glyphosate during pregnancy and lactation. **Einstein (São Paulo)**, v. 19, 2 ago. 2021.
- BARKER, D. INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES. **The Lancet**, v. 327, n. 8489, p. 1077–1081, maio 1986.
- BARKER, D. J. et al. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ**, v. 298, n. 6673, p. 564–567, 4 mar. 1989a.
- BARKER, D. J. P. et al. WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577–580, set. 1989b.
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, p. 328–338, 2001a.
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, p. 328–338, 2001b.
- BAYSTON, T. et al. Prostaglandin e2 receptors in abdominal aortic aneurysm and human aortic smooth muscle cells. **Journal of Vascular Surgery**, v. 38, n. 2, p. 354–359, ago. 2003.
- BEN MAAMAR, M. et al. Epigenome-wide association study for glyphosate induced transgenerational sperm DNA methylation and histone retention epigenetic biomarkers for disease. **Epigenetics**, v. 16, n. 10, p. 1150–1167, 3 out. 2021.
- BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G.-E. Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 97–105, 19 jan. 2009.

- BENEDETTI, A. L. et al. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb®. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 2, p. 227–232, nov. 2004.
- BEURET, C. J.; ZIRULNIK, F.; GIMÉNEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. **Reproductive Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 501–504, 2005.
- BOCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 73–89, mar. 2007.
- BOMBARDI, LARISSA. M. **Atlas Geográfico do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia**. 1. ed. São Paulo: [s.n.].
- BOS, C. L. et al. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 7, p. 1187–1205, jul. 2004.
- BOULDEN, B. M. et al. Early determinants of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced endothelial dysfunction. **Free radical biology & medicine**, v. 41, n. 5, p. 810–7, 1 set. 2006.
- CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: [s.n.].
- CARVALHO, M. H. C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Bras Hipertens**, p. 76–88, 2001.
- CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxygenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448–464, jun. 2004.
- CASARES, F. M.; MANTIONE, K. J. Pesticides may be altering constitutive nitric oxide release, thereby compromising health. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 12, n. 10, 1 out. 2006.
- CASTILLA, R. et al. **Environmental pollutant hexachlorobenzene induces hypertension in a rat model**. **Chemosphere**, 2018.
- CATTANI, D. et al. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, n. February, p. 67–80, 2017a.
- CATTANI, D. et al. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, v. 387, n. February, p. 67–80, 2017b.
- CAVARAPE, A. et al. Effects of angiotensin II, arginine vasopressin and tromboxane A 2 in renal vascular bed: role of rho-kinase. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, p. 1764–1769, 2003.
- CHAN, Y. C. et al. Cardiovascular effects of herbicides and formulated adjuvants on isolated rat aorta and heart. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 4, p. 595–603, 1 jun. 2007.
- CHAUFAN, G.; COALOVA, I.; MOLINA, M. DEL C. R. DE. Glyphosate Commercial Formulation Causes Cytotoxicity, Oxidative Effects, and Apoptosis on Human Cells. **International Journal of Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 29–38, 16 jan. 2014.

- CLAIR, É. et al. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 2, p. 269–279, mar. 2012.
- COSTA, N. Z. et al. EXPOSURE TO TOXIC AGROCHEMICALS AND DEVELOPMENT OF CONGENITAL MALFORMATIONS: A SCOPING REVIEW. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 30, 2021.
- CRACOWSKI, J.-L. et al. Response of Rat Thoracic Aorta to F2-Isoprostane Metabolites. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 39, n. 3, p. 396–403, mar. 2002.
- CUDABACK, E. et al. Therapeutic implications of the prostaglandin pathway in Alzheimer's disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 565–572, 15 abr. 2014.
- DALLEGRAVE, E. et al. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 142, n. 1–2, p. 45–52, 30 abr. 2003.
- DARUICH, J.; ZIRULNIK, F.; SOFÍA GIMENEZ, M. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. **Environmental Research**, v. 85, n. 3, p. 226–231, 1 mar. 2001a.
- DARUICH, J.; ZIRULNIK, F.; SOFÍA GIMENEZ, M. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. **Environmental Research**, v. 85, n. 3, p. 226–231, 1 mar. 2001b.
- DE AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glyphosate: properties , toxicity, use and legislation. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.
- DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V. L. et al. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 335–346, dez. 2013.
- DE QUEIROZ, D. B. et al. Perinatal l-arginine and antioxidant supplements reduce adult blood pressure but not ameliorate the altered vascular function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 66, n. 4, p. 301–309, 2010.
- DE SÁ, M. P. L. A aorta, o tecido elástico e a necrose cística da média. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 26, n. 1, p. III–V, mar. 2011.
- EL-SHENAWY, N. S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 379–385, nov. 2009.
- FANTI, L. **Alterações endoteliais funcionais e histológicas na hipertensão por bloqueio do óxido nítrico em ratos**. Porto Alegre: [s.n.]. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/197747/000265669.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 20 set. 2022.
- FATIMA CAVANAL, M. DE et al. The Influence of L-Arginine on Blood Pressure, Vascular Nitric Oxide and Renal Morphometry in the Offspring from Diabetic Mothers. 2007.
- FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 894–912, out. 2011.

FERNÁNDEZ, L. **Global pesticide agricultural use 2020, by leading country.** Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/1263069/global-pesticide-use-by-country/#statisticContainer>>. Acesso em: 28 nov. 2022.

FERREIRA ROS, L. et al. ANÁLISE DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA ORAL AO HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO NA REMODELAÇÃO CARDÍACA EM RATOS. **COLLOQUIUM VITAE**, v. 12, n. 3, p. 10–15, 1 out. 2020.

FISHMAN, A. P. ENDOTHELIUM: A DISTRIBUTED ORGAN OF DIVERSE CAPABILITIES. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 401, n. 1 Endothelium, p. 1–8, dez. 1982.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 3, n. 9, p. 2007–18, jul. 1989.

GALDIANO, L. L. DA S. et al. Household pesticide exposure: an online survey and shelf research in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 7, 2021.

GALLEGOS, C. E. et al. Exposure to a glyphosate-based herbicide during pregnancy and lactation induces neurobehavioral alterations in rat offspring. **NeuroToxicology**, v. 53, p. 20–28, 2016.

GARCÍA-RAYADO, G.; NAVARRO, M.; LANAS, A. NSAID induced gastrointestinal damage and designing GI-sparing NSAIDs. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1031–1043, 3 out. 2018.

GILDEN, R. C.; HUFFLING, K.; SATTLER, B. Pesticides and health risks. **JOGNN - Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing**, v. 39, n. 1, p. 103–110, 2010.

GIMBRONE, M. A.; GARCÍA-CARDEÑA, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. **Circulation research**, v. 118, n. 4, p. 620–636, 19 fev. 2016.

GLUAIS, P. et al. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 6, p. 834–845, nov. 2005.

GOMES, N. GLIFOSATO NO ALIMENTO. **Rev. Episteme Transversalis**, v. 11, p. 82–99, 2020.

GRESS, S. et al. Glyphosate-Based Herbicides Potently Affect Cardiovascular System in Mammals: Review of the Literature. **Cardiovascular Toxicology**, v. 15, n. 2, p. 117–126, 23 abr. 2015a.

GRESS, S. et al. Glyphosate-Based Herbicides Potently Affect Cardiovascular System in Mammals: Review of the Literature. **Cardiovascular Toxicology**, v. 15, n. 2, p. 117–126, 23 abr. 2015b.

GRESS, S. et al. Cardiotoxic Electrophysiological Effects of the Herbicide Roundup® in Rat and Rabbit Ventricular Myocardium In Vitro. **Cardiovascular Toxicology**, v. 15, n. 4, p. 324–335, 2 out. 2015c.

GUZIK, T. J.; TOUYZ, R. M. Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in

- Hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 70, n. 4, p. 660–667, 2017.
- HAAS, P.; HOEHNE, L.; KUHN, D. REVISÃO: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO GLIFOSATO NO ECOSSISTEMA AGRÍCOLA E SUA TOXICIDADE PARA A SAÚDE HUMANA. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 10, n. 4, 28 dez. 2018.
- HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595–601, jul. 1992.
- HASS, U. et al. Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 261–274, 2012a.
- HASS, U. et al. Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 261–274, 2012b.
- HUXLEY, R. R.; SHIELL, A. W.; LAW, C. M. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure. **Journal of Hypertension**, v. 18, n. 7, p. 815–831, jul. 2000.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **The Science of the total environment**, v. 575, p. 525–535, 1 jan. 2017.
- KIMMEL, G. L. et al. Evaluation of developmental toxicity studies of glyphosate with attention to cardiovascular development. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 79–95, 4 fev. 2013.
- KONGTIP, P. et al. Glyphosate and Paraquat in Maternal and Fetal Serums in Thai Women. **Journal of Agromedicine**, v. 22, n. 3, p. 282–289, 3 jul. 2017.
- KOPINCOVÁ, J.; PÚZSEROVÁ, A.; BERNÁTOVÁ, I. L-NAME in the cardiovascular system – nitric oxide synthase activator? **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 3, p. 511–520, maio 2012.
- LAGES, A. DOS S. et al. Inibidores seletivos de prostaglandina endoperóxido sintase-2 (PGHS-2): nova estratégia para o tratamento da inflamação. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 761–771, nov. 1998.
- LANGLEY-EVANS, S. C.; GARDNER, D. S.; WELHAM, S. J. M. Intrauterine programming of cardiovascular disease by maternal nutritional status. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 14, n. 1, p. 39–47, jan. 1998.
- LARSEN, K. et al. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 811–818, nov. 2012.
- LARSEN, K. et al. Effects of sublethal exposure to a glyphosate-based herbicide formulation on metabolic activities of different xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. **International Journal of Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 307–318, 2014.

LAW, C. M.; SHIELL, A. W. Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. **Journal of hypertension**, v. 14, n. 8, p. 935–41, ago. 1996.

LEDDA, C. et al. Gestational Hypertension and Organophosphorus Pesticide Exposure: A Cross-Sectional Study. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

LEMKE, N. et al. **Ensaios em Biociências**. [s.l]: s.n.].

LOBO, M. P. Epigenética: Ligando e desligando os genes. **Open Journal of Mathematics and Physics**, v. 3, 2021.

LOPES, L. P. G. et al. Perfil epidemiológico de intoxicações infantis por agrotóxicos na Região Norte do Brasil de 1999 a 2020/ Epidemiological profile of childhood pesticide poisoning in the Northern Region of Brazil from 1999 to 2020. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 6, p. 24906–24919, 14 nov. 2021.

LOUREIRO-SILVA, M. R.; MOLINA, M. H.; BORGES, D. R. Substâncias Vasoativas e a Modulação do Sistema Microvascular Hepático. **Rev Ass Med Brasil**, p. 206–16, 1999.

LUEKEN, A. et al. Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. **Toxicology Letters**, v. 147, n. 1, p. 35–43, fev. 2004.

LUO, W.; LIU, B.; ZHOU, Y. The endothelial cyclooxygenase pathway: Insights from mouse arteries. **European journal of pharmacology**, v. 780, p. 148–58, 5 jun. 2016.

LUSCHER, T. F.; BARTON, M. **Biology of the EndotheliumClin. Cardiol.** [s.l]: s.n.].

M BAYLISS, B. W. **On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure**. [s.l]: s.n.]. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16992618/>>. Acesso em: 18 jan. 2022.

MAIA, F. C. C. Dano cardiovascular associado à exposição subcrônica inalatória e oral ao herbicida glifosato. 2020.

MALATESTA, M. et al. Hepatoma tissue culture (HTC) cells as a model for investigating the effects of low concentrations of herbicide on cell structure and function. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 8, p. 1853–1860, dez. 2008.

MARC, J. et al. Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 326–331, 1 mar. 2002.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BELLÉ, R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. **Biology of the cell**, v. 96, n. 3, p. 245–249, 2004a.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BELLÉ, R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. **Biology of the cell**, v. 96, n. 3, p. 245–249, 2004b.

MASON, R. G. et al. The endothelium: roles in thrombosis and hemostasis. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 101, n. 2, p. 61–4, fev. 1977.

MATTHEWS, G. A. **Pesticides: Health, Safety and the Environment**. [s.l]: s.n.].

MCGIFF, J. C.; MALIK, K. U.; TERRAGNO, N. A. Prostaglandins as determinants of vascular reactivity. **Federation proceedings**, v. 35, n. 12, p. 2382–7, out. 1976.

MENDEZ, F.; ORDOÑEZ-BETANCOURTH, J.; ABRAHAMS, N. Effects of Glyphosate Exposure on Reproductive Health: A Systematic Review of Human, Animal and In-Vitro Studies. **Exposure and Health**, 18 nov. 2021.

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, nov. 2013a.

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, nov. 2013b.

MICHALAKIS, M. et al. Hypospadias in offspring is associated with chronic exposure of parents to organophosphate and organochlorine pesticides. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 139–145, out. 2014.

MILESI, M. M. et al. Glyphosate Herbicide: Reproductive Outcomes and Multigenerational Effects. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 7 jul. 2021.

MILIĆ, M. et al. Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 69, n. 2, p. 154–168, 2018.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Molecular Mechanisms of Hypertension—Reactive Oxygen Species and Antioxidants: A Basic Science Update for the Clinician. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 28, n. 3, p. 288–295, maio 2012.

MOSE, T. et al. Placental Passage of Benzoic acid, Caffeine, and Glyphosate in an Ex Vivo Human Perfusion System. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 71, n. 15, p. 984–991, 2 jun. 2008.

NELDSON MARCOLIN. **40 primaveras depois**. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/40-primaveras-depois/>>. Acesso em: 10 jul. 2022.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. **Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.translate.goog/7733230/>>. Acesso em: 19 jan. 2022.

NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L. PESTICIDAS: USO, LEGISLAÇÃO E CONTROLE. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 9, 31 dez. 1999.

OLIVEIRA, B. L. et al. EPIDEMIOLOGIA DAS INTOXICAÇÕES POR PESTICIDAS EM GOIÁS. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 129–132, 2005.

PAN, L. et al. The association between coronary artery disease and glyphosate exposure found in pesticide factory workers. **Journal of Public Health and Emergency**, v. 1, n. June 2016, p. 4–4, 2017.

PANDEY, A.; DHABADE, P.; KUMARASAMY, A. Inflammatory Effects of Subacute Exposure of Roundup in Rat Liver and Adipose Tissue. **Dose-response : a publication of International Hormesis Society**, v. 17, n. 2, p. 1559325819843380, 2019.

- PAUMGARTTEN, F. J. R. Glyphosate exposure, cardiovascular diseases and cancer risks. **Journal of Public Health and Emergency**, v. 1, p. 15–15, 9 jan. 2017.
- PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p. 1115–1122, dez. 2005.
- PEREIRA, J. L. et al. Glyphosate Impact on Arthropods Associated to Roundup Ready and Conventional Soybean (*Glycine max* L.). **Planta Daninha**, v. 38, 2020.
- POSSIDÔNIO DE AMARANTE JUNIOR, O.; RODRIGUES, T. C.; SANTOS, D. **GLIFOSATO: PROPRIEDADES, TOXICIDADE, USOS E LEGISLAÇÃO**. Quim. Nova. [s.l.: s.n.].
- PU, Y. et al. Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 21, 26 maio 2020.
- RELYEA, R. A. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 48, n. 3, p. 351–357, abr. 2005.
- RIEG, C. E. H. **CONSEQUÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO MATERNA À FORMULAÇÃO COMERCIAL CONTENDO GLIFOSATO NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS EM FÍGADO E SANGUE PERIFÉRICO DE RATOS IMATUROS**. [s.l.: s.n.].
- ROSSETTI, M. F. et al. Epigenetic Changes Associated With Exposure to Glyphosate-Based Herbicides in Mammals. **Frontiers in endocrinology**, v. 12, p. 671991, 2021.
- ROY, N. M. et al. Glyphosate induces cardiovascular toxicity in *Danio rerio*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 46, p. 292–300, set. 2016.
- SALDANA, T. M. et al. Pesticide Exposure and Hypertensive Disorders During Pregnancy. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 9, p. 1393–1396, set. 2009.
- SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. **Surgical Neurology International**, v. 6, n. 1, p. 45, 2015.
- SANTOS, L. D. **EFEITO DA EXPOSIÇÃO PERINATAL AO HERBICIDA GLIFOSATO-ROUNDUP NA DIFERENCIACÃO SEXUAL E ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA**. [s.l.: s.n.].
- SANTOS-ROCHA, J. et al. Maternal high-sodium intake affects the offspring' vascular renin-angiotensin system promoting endothelial dysfunction in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 115, p. 33–45, abr. 2019a.
- SANTOS-ROCHA, J. et al. Maternal high-sodium intake affects the offspring' vascular renin-angiotensin system promoting endothelial dysfunction in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 115, p. 33–45, abr. 2019b.
- SCHMEDTJE, J. F. et al. Hypoxia Induces Cyclooxygenase-2 via the NF-κB p65 Transcription Factor in Human Vascular Endothelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 1, p. 601–608, jan. 1997.

SILVA, F. C. DA. **Disfunção endotelial pela inibição da síntese de óxido nítrico: proposta e caracterização de um modelo celular in vitro.** [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 20 fev. 2020a.

SILVA, M. F. DA. **BOLETIM INFORMATIVO DE TOXICOLOGIA.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.saude.go.gov.br/files/boletins/informativos/CIATox/boletimciatox-03-22.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2022.

SILVA, F. **Disfunção endotelial pela inibição da síntese de óxido nítrico: proposta e caracterização de um modelo celular in vitro.** [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 20 fev. 2020b.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada.** 5º ed ed. Porto Alegre: [s.n.].

SONG, H.-Y. et al. In Vitro Cytotoxic Effect of Glyphosate Mixture Containing Surfactants. **Journal of Korean Medical Science**, v. 27, n. 7, p. 711, 2012a.

SONG, H.-Y. et al. In Vitro Cytotoxic Effect of Glyphosate Mixture Containing Surfactants. **Journal of Korean Medical Science**, v. 27, n. 7, p. 711, 2012b.

SPINACI, M. et al. Impact of glyphosate and its formulation Roundup® on stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 179, p. 197–203, fev. 2022.

TANG, E. H. C. et al. The role of prostaglandin E and thromboxane-prostanoid receptors in the response to prostaglandin E 2 in the aorta of Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. 2007a.

TANG, E. H. C. et al. The role of prostaglandin E and thromboxane-prostanoid receptors in the response to prostaglandin E 2 in the aorta of Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. 2007b.

TAVARES, D. C. G. et al. Utilização de agrotóxicos no Brasil e sua correlação com intoxicações. **Sistemas & Gestão**, v. 15, n. 1, p. 2–10, 13 abr. 2020a.

TAVARES, D. C. G. et al. Utilização de agrotóxicos no Brasil e sua correlação com intoxicações. **Sistemas & Gestão**, v. 15, n. 1, p. 2–10, 13 abr. 2020b.

TORRES-BADIA, M. et al. Impaired mammalian sperm function and lower phosphorylation signaling caused by the herbicide Roundup® Ultra Plus are due to its surfactant component. **Theriogenology**, v. 172, p. 55–66, set. 2021.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertension Research**, v. 34, n. 1, p. 5–14, 28 jan. 2011.

VAN RODIJNEN, W. F. et al. Direct vasoconstrictor effect of prostaglandin E<sub>2</sub> on renal interlobular arteries: role of the EP3 receptor. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 292, n. 3, p. F1094–F1101, mar. 2007.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. **Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 73, n. 4, p. 595–601, abr. 2009.

VANLAEYS, A. et al. Formulants of glyphosate-based herbicides have more deleterious impact than glyphosate on TM4 Sertoli cells. **Toxicology in Vitro**, v. 52, p. 14–22, out. 2018.

VIEIRA, L. D. et al. Oxidative stress induced by prenatal LPS leads to endothelial dysfunction and renal haemodynamic changes through angiotensin II/NADPH oxidase pathway: Prevention by early treatment with α-tocopherol. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 12, p. 3577–3587, 2018.

VIRDIS, A.; DURANTI, E.; TADDEI, S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. **International Journal of Hypertension**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

WALSH, L. P. et al. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 8, p. 769–776, ago. 2000.

WANG, G. et al. Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate. **Parkinsonism & related disorders**, v. 17, n. 6, p. 486–487, jul. 2011.

WAREMBOURG, C. et al. Exposure to phthalate metabolites, phenols and organophosphate pesticide metabolites and blood pressure during pregnancy. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 222, n. 3, p. 446–454, 1 abr. 2019.

WHO. **Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture**. Geneva, Switzerland. Geneva, Switzerland.: [s.n.]. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39772/9241561394.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 11 nov. 2021.

WHO. **Q&A on Glyphosate**. [s.l]: s.n.].

WICKERHAM, E. L. et al. Reduced birth weight in relation to pesticide mixtures detected in cord blood of full-term infants. **Environment international**, v. 47, p. 80–85, 15 out. 2012.

YAVUZ, T. et al. Vascular wall damage in rats induced by organophosphorus insecticide methidathion. **Toxicology letters**, v. 155, n. 1, p. 59–64, 15 jan. 2005.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. e264–e270, dez. 2006.

ZOUAOUI, K. et al. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. **Forensic Science International**, v. 226, n. 1–3, p. e20–e25, mar. 2013.

## ANEXOS

### **ANEXO A - Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIVASF**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 MINISTÉRIO DE CIÉNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### **Certificado de autorização**

Certificamos que a proposta intitulada: "**Estudo da exposição materna à formulação comercial contendo glifosato sobre a função vascular de artérias de ratos adultos**", registrada com o nº **0001/240919**, sob a responsabilidade de **Diego Barbosa de Queiroz** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, em reunião de 24/09/2019.

Finalidade	( <input type="checkbox"/> ) Ensino ( <input checked="" type="checkbox"/> ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/11/2019 a 12/06/2021
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i>
Nº de animais	35 M; 08 F = 43
Peso/Idade	10 - 24 semanas/ 300g
Sexo	Ambos
Origem	Biotério Central da UNIVASF

Em: 22/10/2019

**KARINE VIEIRA ANTUNES**  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 CEUA/UNIVASF