

VERA LÚCIA DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS INDUZIDAS PELO HERBICIDA
GLIFOSATO-ROUNDUP SOBRE CÉLULAS TESTICULARES
DE RATOS PRÉ-PÚBERES**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ariane Zamoner Pacheco de Souza.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Regina Mena Barreto Silva.

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cavalli, Vera Lúcia de Liz Oliveira

Alterações bioquímicas induzidas pelo herbicida glifosato-Roundup sobre células testiculares de ratos pré-púberes [dissertação] / Vera Lúcia de Liz Oliveira Cavalli ; orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza ; co-orientadora, Fátima Regina Mena Barreto Silva. - Florianópolis, SC, 2013.

165 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Glifosato-Roundup. 3. Células testiculares. 4. Estresse oxidativo. 5. Sinalização celular. I. Pacheco de Souza, Ariane Zamoner . II. Silva, Fátima Regina Mena Barreto . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

VERA LÚCIA DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS INDUZIDAS PELO HERBICIDA
GLIFOSATO-ROUNDUP SOBRE CÉLULAS TESTICULARES
DE RATOS PRÉ-PÚBERES**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2013.

Prof. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza, Dr.^a.
Orientadora
BQA/CCB/UFSC

Prof.^a Fátima R. M. B. Silva, Dr.^a.
Coorientadora
BQA/CCB/UFSC

Prof.^a Aurea Elizabeth Linder, Dr.^a.
FMC/CCB/UFSC

Prof.^a Laura Difini Leite, Dr.^a.
CFS/CCB/UFSC

Prof.^a Rozangela Curi Pedrosa, Dr.^a.
BQA/CCB/UFSC

*Dedico esta dissertação a meu marido
Luiz Carlos Cavalli que sempre me incentivou
e nunca deixou que eu desistisse dos meus sonhos.
A você, minha eterna gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Em especial à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ariane Zamoner Pacheco de Souza pela oportunidade, confiança, inesgotável paciência para ensinar, generosidade, amizade, presença constante e colaboração na realização deste trabalho. Você é um grande exemplo de dedicação e amor pela ciência.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Fátima R. M. B. Silva pela acolhida em seu laboratório e pelo exemplo, aprendizado e apoio durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho que gentilmente permitiu o uso de seu laboratório para alguns experimentos.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela contribuição para minha formação.

Às meninas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular – LaBioSignal Juliana Domingues, Camila Andrade, Isabella Magnabosco, Bianka Almeida, Paola Goulart e Ranielle Vilela pela amizade e ajuda nos momentos de trabalho e principalmente a Daiane Cattani, pela valiosa colaboração e por ter dividido comigo a bancada em quase todos os experimentos.

À Carla Rieg pela amizade, carinho, paciência e ajuda nos experimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Hormônios e Transdução de Sinais pela amizade e momentos de agradável convivência, em especial à Leila Zanatta, Ana Paula Zanatta, Virginia Kappel e Renata Gonçalves pela solicitude e disponibilidade em ajudar e ensinar.

Ao Eduardo Parisotto “Bene”, pela amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Douglas Pacheco de Souza pela amizade e o incentivo para realização deste trabalho.

Aos meus pais e a minha irmã que apesar da distância física sempre se fizeram presentes através do estímulo, carinho e apoio incondicional em todos os momentos.

Ao meu marido Luiz Carlos Cavalli e minha filha Mariana Cavalli, que souberam compreender a minha ausência, por sempre acreditarem em meu potencial, pelo apoio, incentivo, tolerância e pelo seu amor.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, por ter oportunizado a realização deste trabalho.

A todos aqui não mencionados e que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPESC pelo apoio financeiro.

*“Os analfabetos do século 21 não serão
aqueles que não sabem ler e escrever,
mas aqueles que não sabem aprender,
desaprender e reaprender.”*
Alvin Toffler

RESUMO

Nossos resultados demonstraram que a exposição aguda ao glifosato-Roundup induz estresse oxidativo e ativa múltiplas vias de resposta ao estresse culminando com a morte de células testiculares em ratos pré-púberes. O pesticida aumenta a concentração de Ca^{2+} intracelular através da abertura dos canais de Ca^{2+} dependente de voltagem tipo-L (CCDV-L) e da liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, levando a uma sobrecarga de Ca^{2+} intracelular, e morte celular. Estes eventos foram prevenidos pelos antioxidantes Trolox® e ácido ascórbico. A ativação das vias de sinalização da proteína cinase C (PKC), fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs), tais como a ERK 1/2 e p38 MAPK, e fosfolipase C (PLC) estão envolvidas na indução do influxo de Ca^{2+} , no aumento da atividade da gama-glutamyltransferase (GGT) e na morte celular. A indução de estresse oxidativo por glifosato-Roundup foi confirmada através da redução nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e do aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de carbonilação de proteínas. Além disso, a exposição ao pesticida afetou os sistemas de defesa antioxidante enzimáticos, acarretando em aumento na atividade das enzimas glutathiona peroxidase, glutathiona-redutase, glutathiona-S-transferase, GGT, catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato-desidrogenase. A exposição aguda ao glifosato-Roundup também induziu ao aumento da atividade das aminotransferases AST e ALT. O aumento da atividade da GGT poderia levar a um aumento no “turnover” de GSH; no entanto, a diminuição na captação dependente de Na^+ do aminoácido modelo ^{14}C - α -methyl-amino-isobutyric acid (^{14}C -MeAIB) em células testiculares pode estar relacionada a menor disponibilidade de aminoácidos para a síntese *de novo* de glutathiona. O conjunto dos resultados demonstra que o herbicida glifosato-Roundup induz estresse oxidativo, aumenta a concentração de Ca^{2+} intracelular, ativa vias de transdução de sinais, e pode levar a morte de células testiculares. Apesar da dificuldade de extrapolação dos resultados obtidos em modelos animais para a condição humana, é possível que mecanismos semelhantes possam estar envolvidos na diminuição da capacidade reprodutiva em adultos jovens expostos ao glifosato-Roundup durante a infância e puberdade.

Palavras-chave: Glifosato-Roundup. Sinalização celular. Células testiculares. Estresse oxidativo. Cálcio. Viabilidade celular.

ABSTRACT

Our results show that acute glyphosate-Roundup exposure induces oxidative stress and activates multiple stress-response pathways leading to testicular cell death in prepubertal rat testis. The pesticide increased intracellular Ca^{2+} concentration by opening L-voltage-dependent Ca^{2+} channels (L-VDCC) and endoplasmic reticulum IP_3 and ryanodine receptors, leading to an overload of Ca^{2+} within the cells, which set off oxidative stress and cell death. These events have been prevented by the antioxidants Trolox® and ascorbic acid. Activated protein kinase C (PKC), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and the mitogen-activated protein kinases (MAPKs), such as ERK1/2 and p38MAPK have played a role in eliciting Ca^{2+} influx, gamma-glutamyl transferase (GGT) activation and cell death. Roundup® reduced the levels of reduced glutathione (GSH) and increased the amounts of thiobarbituric reactive species (TBARS) and protein carbonyl, characterizing oxidative damage. Also, exposure to the pesticide has stimulated the activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase, gamma-glutamyl transferase (GGT), catalase, superoxide dismutase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, supporting downregulated GSH levels. The glyphosate-Roundup acute exposition also leads to the induction of the transaminase AST e ALT. The GGT activity could lead to increased glutathione turnover; however, downregulation of the Na^+ -coupled ^{14}C - α -methyl-amino-isobutyric acid (^{14}C -MeAIB) accumulation in testicular cells has decreased the amino acid availability to GSH *de novo* synthesis. Overall, Roundup® toxicity was implicated in Ca^{2+} overload, cell signaling misregulation, stress response of the endoplasmic reticulum and/or depleted antioxidant defenses. Although extrapolation from animal models to the human condition should be taken with caution, it is feasible that similar mechanisms could underlie impaired reproduction capability in young male people associated with glyphosate-Roundup exposure during childhood and puberty.

Key words: Glyphosate-Roundup. Cell signaling. Testicular cells. Oxidative stress. Calcium. Cell death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do herbicida glifosato.....	25
Figura 2. A via chiquimato que leva a biosíntese de aminoácido aromáticos, e o modo de ação do glifosato na reação catalizada pela EPSPS.....	26
Figura 3. Vias de degradação do glifosato	27
Figura 4. Nova via de degradação do glifosato	28
Figura 5. Reações em cadeia da lipoperoxidação.....	40
Figura 6. Participação da vitamina E e C na regeneração do radical peroxil resultante da peroxidação lipídica. (A) Peroxidação lipídica. (B) Papel da vitamina E na regeneração do radical peroxil e da vitamina C na reciclagem da vitamina E	51
Figura 7. Esquema mostrando a geração de EROs e os principais mecanismos antioxidantes	55
Figura 8. Rotas de ativação das MAPKs relacionando os estímulos de cada rota e as respostas biológicas esperadas	58
Figura 9. Mecanismo de ativação da PLC	59
Figura 10. Túbulos seminíferos e a linhagem espermatogênica	67
Figura 11. Ilustração esquemática de célula de Sertoli	70
Figura 12. Montagem de uma célula de Sertoli típica	71
Figura 13. Curva dose-resposta do Roundup na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (A) e na viabilidade celular (B) em testículos de ratos de 30 dias de idade	88
Figura 14. Envolvimento dos canais de cálcio (CCDVs), níveis de cálcio intracelular e vias de sinalização na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos	90
Figura 15. Efeitos do Roundup na ativação da ERK1/2 (A) e p38^{MAPK} (B) em testículos de ratos	92
Figura 16. Prevenção do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e da morte celular induzidos pelo Roundup em testículos inteiros de ratos imaturos através do tratamento com antioxidantes	93

Figura 17. Efeitos do Roundup nos níveis de peroxidação lipídica (A) e carbonilação de proteínas (B) em testículos de ratos imaturos	94
Figura 18. Efeito da exposição ao Roundup sobre os níveis de GSH (A) e a atividade das enzimas: G6PD (B), GR (C), GPx (D), GST (E), GGT (F), CAT (G), SOD (H)	95
Figura 19. Participação das vias de sinalização celular no efeito do Roundup sobre a atividade da GGT em testículos de ratos.....	96
Figura 20. Participação do Ca^{2+} no efeito do Roundup sobre a atividade da GGT	98
Figura 21. Efeito do Roundup no acúmulo de ^{14}C -MeAIB em testículos de rato	99
Figura 22. Efeito do Roundup na transaminação de aminoácidos em testículos de ratos de 30 dias através da determinação da atividade da ALT (A) e da AST (B)	100
Figura 23. Efeitos comparativos da toxicidade do Roundup e de seu ingrediente ativo sozinho, o glifosato, sobre a atividade da GGT, (A) da AST, (B) da ALT e (C) sobre os níveis de GSH (D)	101
Figura 24. Curva dose-resposta do Roundup na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (A) e viabilidade celular–liberação de LDH (B) em cultura de células de Sertoli de ratos de 30 dias	102
Figura 25. Efeito da vitamina E (Trolox®) na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e morte celular induzidas pelo Roundup em células de Sertoli de ratos imaturos	104
Figura 26. Efeito da vitamina C na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e morte celular induzidas pelo Roundup em células de Sertoli de ratos imaturos	105
Figura 27. Prevenção de antioxidantes na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e morte celular induzidas pelo Roundup em células de Sertoli de ratos imaturos	106
Figura 28. Mecanismo proposto para a GGT como mediadora na geração de ERRO	117
Figura 29. Mecanismo de toxicidade proposto para o Roundup sobre as células testiculares	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos utilizados para o estudo do envolvimento dos CCDV no influxo de Ca^{2+} e na atividade da enzima GGT estimulados pelo glifosato-Roundup	76
Tabela 2. Compostos utilizados para demonstrar a participação do Ca^{2+} intracelular nos eventos ativados pelo glifosato-Roundup.....	77
Tabela 3. Inibidores de proteínas cinases e da PLC utilizados no estudo do mecanismo de ação do Roundup sobre as células testiculares.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CCDV	Canal de cálcio dependente de voltagem
DAG	Diacylglicerol
EPSPS	Enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
ERN	Espécies reativas do nitrogênio
ERO	Espécies reativas do oxigênio
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
FSH	Hormônio folículo estimulante
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GGT	Gama-glutamiltransferase
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
LDH	Lactato desidrogenase
LO [•]	Radical alcóxil
LOO [•]	Radical peróxil
LPO	Peroxidação lipídica
MAPK	Proteína serina-treonina cinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MeAIB	Aminoácido ácido α-(metil-amino)-isobutírico
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido
N ₂ O ₃	Ácido nitroso
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
[•] NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{-•}	Radical ânion superóxido

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxila
ONOO^-	Peroxinitrito
PC	Proteína carbonilada
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PIP_2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
POEA	Polioxi-etilenoamino
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
p38	Proteína 38 serina-treonina cinase ativada por mitógeno
Ras	Proteína GTPase monomérica
RE	Retículo endoplasmático
RL	Radical livre
RO^\cdot	Radical alcóxil
ROO^\cdot	Radical peróxil
SERCA	Bomba de cálcio do retículo endoplasmático
SOD	Superóxido dismutase
SOD-CuZn	Superóxido dismutase-cobre-zinco
SOD-Mn	Superóxido dismutase-mangânes
SOD-EC	Superóxido dismutase-extracelular
StAR	Proteína de regulação aguda da esteroidogênese
T	Testosterona
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 Glifosato-Roundup	25
1.1.1 Consequências da exposição ao Roundup sobre diferentes tipos celulares	29
1.1.1.1 <i>Roundup como desregulador endócrino</i>	29
1.1.1.2 <i>Ações do Roundup sobre o metabolismo e a viabilidade celular.....</i>	30
1.2 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	34
1.2.1 Mecanismo de geração de radicais livres	35
1.2.2 Radical ânion superóxido	36
1.2.3 Radical hidroxila	36
1.2.4 Peróxido de hidrogênio	37
1.2.5 Importância dos íons ferro e cobre na formação de ERO	37
1.2.6 Peroxidação lipídica	38
1.2.7 Oxidação de proteínas	41
1.3 Estresse oxidativo.....	42
1.3.1 Sistemas de defesa antioxidante	42
1.3.2 Antioxidantes enzimáticos	43
1.3.2.1 <i>Superóxido dismutase</i>	43
1.3.2.2 <i>Catalase</i>	44
1.3.2.3 <i>Glutathione Glutathione peroxidase e glutathione reductase....</i>	44
1.3.2.4 <i>Glutathione-S-transferase</i>	46
1.3.2.5 <i>Gama-glutamyltransferase.....</i>	47
1.3.3 Antioxidantes não enzimáticos	48
1.3.3.1 <i>Glutathione reduzida</i>	48
1.3.3.2 <i>α-Tocoferol (Vitamina E)</i>	49
1.3.3.1 <i>Ácido ascórbico (Vitamina C)</i>	52
1.4 Indução de estresse oxidativo e exposição a pesticidas.....	52
1.5 Estresse oxidativo e reprodução	53
1.6 Vias de sinalização intracelular	55
1.6.1 Proteínas cinases ativadas por mitógenos	55
1.6.2 ERK 1/2.....	56
1.6.3 p38 MAPK.....	57
1.6.4 Fosfolipase C.....	58
1.6.5 Proteínas cinase C	60
1.6.6 Fosfatidilinositol-3-cinase	61
1.7 Cálcio como molécula sinalizadora.....	62
1.8 Transporte de aminoácidos.....	64

1.9 Testículos	66
1.9.1 Células de Sertoli	67
2. OBJETIVOS	73
2.1 Objetivo geral.....	73
2.2 Objetivos específicos	73
MATERIAIS E MÉTODOS	75
3.1 Reagentes	75
3.2 Animais	75
3.3 Tratamento <i>in vitro</i>	75
3.4 Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	78
3.5 Transporte de aminoácidos.....	79
3.6 Cultura primária de células de Sertoli.....	79
3.7 Imunodeteção de proteínas	80
3.8 Viabilidade celular - atividade da LDH.....	81
3.9 Atividade da G6PD.....	81
3.10 Atividade da GGT.....	81
3.11 Atividade das enzimas AST e ALT	82
3.12 Conteúdo de GSH	82
3.13 Determinação das enzimas antioxidantes	83
3.13.1 Catalase	83
3.13.2 Superóxido dismutase	84
3.13.3 Glutathione peroxidase	84
3.13.4 Glutathione redutase	85
3.13.5 Glutathione S-transferase	85
3.14 Determinação dos marcadores de danos oxidativo.....	85
3.14.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS	85
3.14.2 Proteína carbonilada	86
3.15 Análise estatística.....	86
RESULTADOS	87
4.1 Envolvimento do cálcio no mecanismo de toxicidade induzido pelo Roundup em testículos de ratos de 30 dias.....	87
4.2 Mecanismos envolvidos na captação $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzidos pelo Roundup e glifosato de grau analítico.....	89
4.3 Envolvimento da via MAPK na toxicidade induzida pelo Roundup nas células testiculares.....	92
4.4 Efeito de antioxidantes na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e na viabilidade celular induzida pelo Roundup.....	93
4.5 Efeitos da exposição ao Roundup sobre parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo.....	94
4.6 Mecanismos envolvidos na ação do Roundup sobre a	

atividade enzimática da GGT.....	96
4.7 Efeito do Roundup no transporte de aminoácidos neutros.....	98
4.8 Efeito do Roundup na transaminação de aminoácidos	99
4.9 Comparação da toxicidade da preparação comercial Roundup e de seu ingrediente ativo, o glifosato, sobre a atividade da GGT, AST, ALT e nos níveis de GSH.....	100
4.10 Envolvimento do cálcio no mecanismo de toxicidade induzida pelo Roundup em cultura de células de Sertoli de ratos de 30 dias.....	102
4.11 Efeito de antioxidantes na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e na viabilidade de células de Sertoli induzida pelo Roundup.....	103
5. DISCUSSÃO	107
6. CONCLUSÕES	123
7. PERSPECTIVAS.....	125
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glifosato-Roundup

O glifosato é a substância ativa de alguns dos herbicidas mais populares do mercado atual. Em 1970, cientistas da Companhia Monsanto descobriram a atividade herbicida do glifosato e, a primeira formulação comercial foi lançada nos Estados Unidos em 1974, com o nome comercial de Roundup. Este herbicida é o mais vendido no mundo para o controle de ervas daninhas (WILLIAMS *et al.*, 2000; MINK *et al.*, 2011; MONSANTO, 2012).

O glifosato é um pesticida organofosforado pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, recebendo o nome químico de N-(fosfonometil) glicina, apresenta fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ e sua fórmula estrutural é mostrada na figura 1. A ligação estável entre carbono e fosfato (C-P) oferece certa resistência química, térmica, fotolítica e enzimática à molécula (BATISTA, 2008; ANDRIGHETTI, 2011; MONSANTO, 2012).

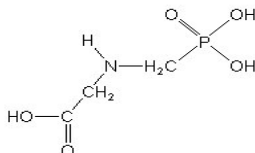


Figura 1. Fórmula estrutural do herbicida glifosato. Fonte: ANVISA (2012).

O glifosato é um herbicida classificado como não-seletivo e de ação sistêmica, pós-emergente, apresenta amplo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle de ervas daninha anuais ou perenes, sejam monocotiledôneas ou dicotiledôneas. É utilizado nas culturas de café, cana-de-açúcar, arroz, soja, milho, trigo, feijão, fumo, ameixa, banana, cacau, citrus, maçã, nectarina, pêra, pêssego, pastagem, uva, algodão, coco, mamão, pinus e eucalipto (ARAÚJO, 2002; DALLEGRAVE, 2003; CASTRO, 2005; ÇAGLAR; KOLANKAYA, 2008; MONSANTO, 2012; ANVISA, 2012).

A absorção do glifosato se dá basicamente pela região clorofilada das plantas (folhas e tecidos verdes), sendo translocado, preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos (WILLIAMS *et al.*, 2000; ARAÚJO, 2002; CERDEIRA *et al.*, 2007; ANDRIGHETTI, 2011; MONSANTO, 2012).

O glifosato inibe o crescimento da planta através da interferência na via chiquimato por inibição da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), responsável pela biossíntese de corismato, um intermediário na biossíntese de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 2) (STEINRUCKEN; AMRHEIN, 1980; RUBIN *et al.*, 1984; WILLIAMS *et al.*, 2000; DUKE; POWLES, 2008; GOMEZ *et al.*, 2009; ANADÓN *et al.*, 2009). Assim, reduz a biossíntese de proteínas, auxinas, compostos de defesa contra organismos patogênicos, fitoalexinas, ácido fólico, precursores das ligninas, flavonóides, plastoquinona e vários outros compostos fenólicos e alcalóides (DUKE *et al.*, 2003; CERDEIRA *et al.*, 2007). Esta via de biossíntese de aminoácidos aromáticos não é expressa no reino animal, tornando esse mecanismo de ação exclusivo às plantas (WILLIAMS *et al.*, 2000).

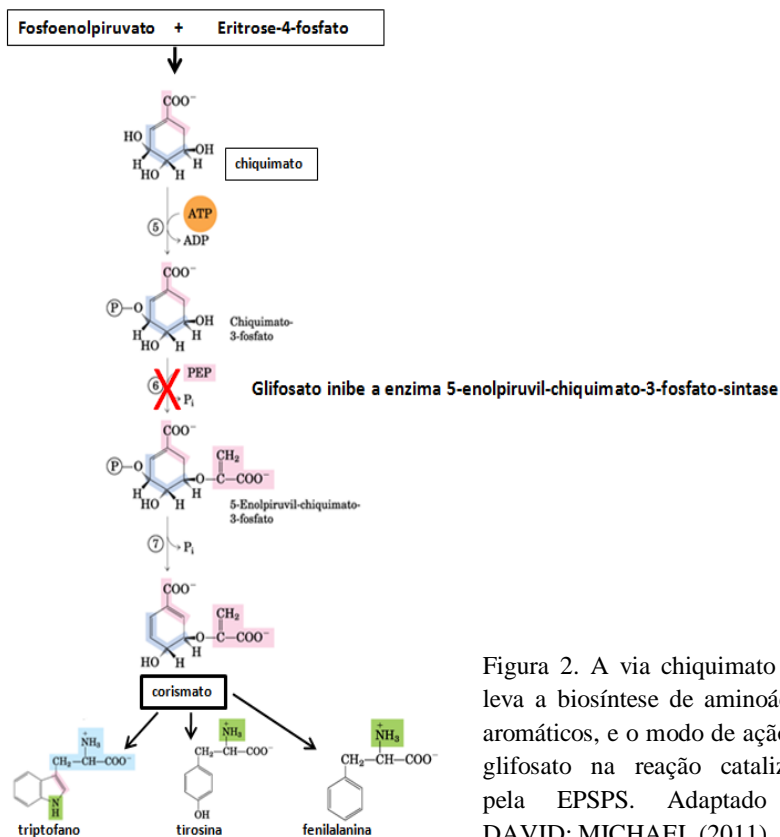


Figura 2. A via chiquimato que leva a biossíntese de aminoácido aromáticos, e o modo de ação do glifosato na reação catalizada pela EPSPS. Adaptado de DAVID; MICHAEL (2011).

Devido a sua pouca solubilidade na água, o glifosato é geralmente formulado em herbicidas comerciais como sais monoînicos, que são mais solúveis (CASTRO, 2005). O glifosato é um composto anfótero e, por isso, apresenta rápida e alta taxa de adsorção a partículas do solo. Por este motivo e, pela sua rápida biodegradação, tem sido considerado ambientalmente seguro (GIMSING *et al.*, 2004; CERDEIRA *et al.*, 2011).

O glifosato é muito pouco metabolizado nas plantas, sendo sua principal rota de degradação efetuada por microorganismos de solo e água (WILLIAMS *et al.*, 2000; MONSANTO, 2012), com meia vida de aproximadamente 30 dias em solos tropicais, como os brasileiros (CERDEIRA *et al.*, 2011). As principais vias de degradação são:

a) Via liase C-P - clivagem direta da ligação Carbono-Fósforo (C-P), resultando na formação de fosfato e N-metilglicina (sarcosina), que pode ser degradada à glicina e, então a carbono, que é incorporado em alguns aminoácidos como metionina, serina, histidina, cisteína e nas purinas (figura 3)

b) Via AMPA - clivagem oxidativa da ligação Carbono-Nitrogênio (C-N), no lado carboxil, catalisada pela glifosato oxidoreductase (GOX), resultando na formação do ácido aminometilfosfônico (AMPA) e glioxilato, sendo o AMPA o principal metabólito do glifosato (Figura 3) (DICK; QUINN, 1995; ZELENKOVA; VINOKUROVA, 2008; POLLEGIONI *et al.*, 2011; ANDRIGHETTI, 2011; DUKE, 2011; MONSANTO, 2012).

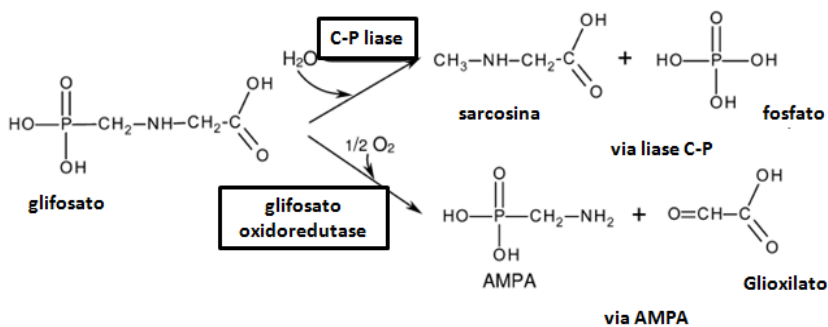


Figura 3. Vias de degradação do glifosato. Fonte: POLLEGIONI *et al.* (2011).

Recentemente, uma glicina oxidase (GO) em *Bacillus subtilis* também mostrou converter glifosato em AMPA e glioxilato (Figura 4), mas com um mecanismo de reação diferente da GOX (POLLEGIONI *et al.*, 2011).

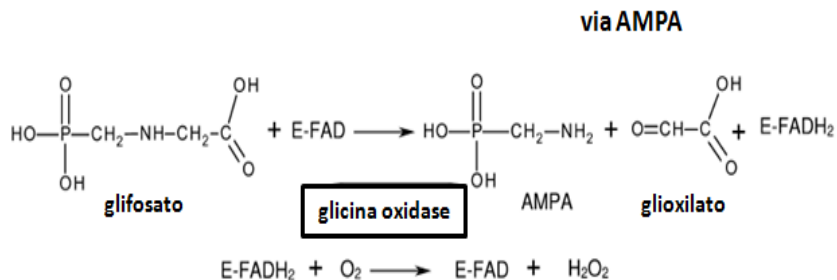


Figura 4. Nova via de degradação do glifosato. Fonte: POLLEGIONI *et al.*, 2011.

Eventualmente, ocorre decomposição do AMPA em água, dióxido de carbono, amônia e fosfato (DICK; QUINN, 1995; GOMEZ *et al.*, 2009). O AMPA também pode ser desfosforilado através da ação da enzima C-P liase originando metilamina e formaldeído (WILLIAMS *et al.*, 2000; ANDRIGHETTI, 2011).

A formulação comercial Roundup, contém em sua composição o sal de isopropilamina de glifosato, surfactante (geralmente polioxietilenoamino – POEA) e outras substâncias consideradas inertes, utilizadas para favorecer a estabilidade e a penetração do ingrediente ativo na célula (COX, 1998; (WILLIAMS *et al.*, 2000).

De acordo com a Companhia Monsanto, o Roundup Original® pertence a classe toxicológica III – medianamente tóxico, com classificação de potencial de periculosidade ambiental III – produto perigoso ao meio ambiente.

Foi encontrada na bactéria *Agrobacterium sp.* uma forma mutante da enzima EPSPS, que a tornava resistente ao glifosato. O gene CP4 foi isolado e inserido no genoma da soja (transgênica), permitindo a síntese de aminoácidos aromáticos mesmo após a aplicação do glifosato (BRAKE; EVERSON, 2004). A partir disto, em 1996 a Companhia Monsanto lançou a soja transgênica, resistente ao glifosato (DUKE; POWLES, 2008). Nas culturas transgênicas, resistentes ao glifosato,

pode-se aplicar o Roundup Ready® (pós-emergente) para remover ervas daninhas sem danificar o cultivo (POLLEGIONI, *et al.*, 2011).

Quase 90% de todas as plantas transgênicas cultivadas no mundo são resistente ao glifosato (DUKE; POWLES, 2008). Em 2010, 93% de toda a soja, 78% de todo o algodão e 70% de todo o milho plantados nos Estados Unidos foram resistentes ao glifosato (POLLEGIONI, *et al.*, 2011). No Brasil, a área plantada de soja transgênica em 2011/2012 é estimada em 80% da área total de soja (CERDEIRA, *et al.*, 2011). Na Argentina, quase 100% da soja cultivada é resistente ao glifosato (DUKE; POWLES, 2008).

Devido ao glifosato ter como alvo a inibição da enzima EPSPS, não encontrada no reino animal, concluiu-se que este herbicida não representava risco para a saúde humana (WILLIAMS, *et al.*, 2000). Além disso, devido a sua rápida degradação no solo, foi considerado ambientalmente seguro (GIMSING *et al.*, 2004).

Isso fez com que o Roundup, contendo glifosato como ingrediente ativo, se tornasse o herbicida mais utilizado no Brasil e no mundo (GIMSING *et al.*, 2004; BENACHOUR *et al.*, 2007; DUKE; POWLES, 2008). Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), em 2008, o Brasil tornou-se o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Em 2009, o país comercializou um volume de 632,2 mil toneladas do herbicida glifosato, e em 2010, o Brasil utilizou cerca de 1 bilhão de litros de agrotóxico, o que movimentou mais de US\$ 7 bilhões. Porém, nos últimos anos, a segurança do Roundup à saúde animal e do meio ambiente vem sendo questionada por pesquisadores do mundo todo.

1.1.1 Consequências da exposição ao Roundup sobre diferentes tipos celulares

1.1.1.1 Roundup como desregulador endócrino

As primeiras evidências de efeitos adversos do Roundup postulam este herbicida como um importante disruptor do sistema endócrino. Neste sentido, Walsh e colaboradores (2000) demonstraram que o Roundup inibe em 94% a esteroidogênese em células tumorais de Leydig MA-10 através da redução na expressão da proteína StAR (proteína reguladora aguda da esteroidogênese). Posteriormente, Richard e colaboradores (2005) demonstraram que o glifosato, em concentrações 100 vezes menores que a recomendada na agricultura,

leva a alterações na atividade da enzima aromatase (responsável pela síntese de estrogênios) em células de placenta humana JEG3. Benachour *et al.* (2007), observaram diminuição da atividade da aromatase em cultivos de células placentárias e embrionárias humanas. Salienta-se que a aromatase é mais suscetível às ações da preparação comercial Roundup que ao glifosato de grau analítico e que os efeitos citotóxicos, e de desregulação endócrina do Roundup, são amplificados com o tempo de exposição. Romano e colaboradores (2009) também mostraram que o Roundup é um potente disruptor endócrino, causando redução na produção de testosterona e alterações morfológicas em testículos de ratos.

Estudos posteriores demonstraram que o Roundup induz morte celular por apoptose e necrose em células de cordão umbilical, linhagem celular de placenta e células embrionárias renais humanas (BENACHOUR; SÉRALINI, 2009). Exposição a herbicidas a base de glifosato, em doses consideradas não tóxicas, induzem danos ao DNA e levam a ativação de caspases em células de linhagem de hepatoma humano (HepG2) (GASNIER *et al.* 2009). Também é descrito por estes mesmos pesquisadores, que estes herbicidas inibem a conversão de andrógenos à estrógenos, diminuindo tanto a atividade enzimática quanto os níveis de RNAm da aromatase com doses 800 vezes menores que os níveis autorizados em alguns alimentos (400 ppm, EPA-USA Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos).

Recentemente, Clair *et al.* (2012) demonstraram a toxicidade do Roundup sobre células testiculares de ratos adultos expostas a concentrações de 1 a 10.000 ppm de Roundup, concentrações encontradas por Acquavella *et al.* (2004), na urina de agricultores expostos ao pesticida. Os resultados mostraram degradação das membranas das células de Leydig com aumento da atividade da adenilato cinase após incubação por 24 horas com concentrações de 1000 ppm do pesticida. O Roundup também foi tóxico para células germinativas e células de Sertoli, causando principalmente necrose e apoptose. A atividade de desregulação endócrina do pesticida foi confirmada pela diminuição nos níveis de testosterona em 35%.

1.1.1.2 Ações do Roundup sobre o metabolismo e a viabilidade celular

Considerando-se que o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, esta liderança pode acarretar em consequências desastrosas para o homem que aplica os pesticidas e para aquele que consome os

alimentos contaminados, assim como para o ambiente. As consequências deste elevado consumo para as gerações futuras ainda permanecem desconhecidas. Recentemente, pesquisadores do grupo de pesquisa liderado pelo cientista francês Gilles-Eric Séralini demonstraram que a alimentação de ratos durante 2 anos com milho transgênico (resistente ao glifosato) induz nefropatias, patologias associadas ao sistema endócrino e aumenta a incidência de câncer (de células mamárias em fêmeas e tumores palpáveis em machos). Os dados claramente demonstram que o consumo de alimentos transgênicos, produzidos às custas do uso intensivo do herbicida Roundup, podem aumentar os riscos de desenvolvimento de câncer (SÉRALINI *et al.*, 2012). Estes dados induzem a reflexão das consequências do uso crescente deste agrotóxico mundialmente.

O potencial de toxicidade do herbicida Roundup e seu princípio ativo (glifosato) também foi testado em mitocôndrias hepáticas isoladas. Os resultados mostraram que o Roundup induz alterações na bioenergética mitocondrial e que estes efeitos não podem ser atribuídos exclusivamente ao ingrediente ativo, mas podem também ser o resultado de uma possível sinergia entre o glifosato e os demais componentes da formulação, como por exemplo, o surfactante POEA (PEIXOTO, 2005). Este sinergismo entre glifosato e os ingredientes “inertes” do Roundup também tem sido relatado sobre a divisão celular (MARC *et al.*, 2002). A succinato desidrogenase e a citocromo c redutase foram significativamente inibidas pelo Roundup, sugerindo que este herbicida afeta o estado redox da cadeia transportadora de elétrons exercendo seus efeitos sobre os complexos II e III, podendo assim comprometer o metabolismo energético celular (PEIXOTO, 2005). Além destes estudos, diversos outros tem mostrado que o Roundup é mais tóxico que seu ingrediente ativo (o glifosato) utilizado isoladamente (WALSH *et al.*, 2000; MARC *et al.*, 2002; RICHARD *et al.*, 2005; PEIXOTO, 2005; BENACHOUR *et al.*, 2007; BENACHOUR; SÉRALINI, 2009; GASNIER *et al.*, 2009; CLAIR *et al.*, 2012).

Marc e colaboradores (2002) mostraram que o Roundup provoca alterações na regulação do ciclo celular, após a fecundação de gametas de ouriços do mar, impedindo a ativação da cinase dependente de ciclina-1 (CDK1) e da ciclina B. Segundo os autores, esta alteração no ponto de checagem do ciclo celular poderia estar diretamente relacionada ao desenvolvimento de câncer em humanos. Monroy *et al.*, (2005) avaliaram a citotoxicidade e a genotoxicidade do glifosato em células humanas normais (GM38) e em células de fibrosarcoma

(HT1080), e evidenciaram danos ao DNA após o tratamento com glifosato, tanto para as células GM38 quanto para as células HT1080.

Benedetti e colaboradores (2004) demonstraram que o tratamento subcrônico de animais com glifosato induz alterações celulares importantes nos hepatócitos, sugerindo um dano irreversível a estas células. Além disso, Daruich e colaboradores (2001) demonstraram modulação da atividade da G6PD, malato desidrogenase e isocitrato desidrogenase em fígado, coração e cérebro de ratas prenhas expostas ao glifosato, sugerindo que a exposição ao agrotóxico durante a gestação pode induzir alterações nas mães. Entretanto, outro estudo demonstrou que o glifosato não induz toxicidade materna, porém induz efeitos adversos importantes sobre a função reprodutiva masculina (DALLEGRAVE *et al.*, 2007). Estes dados demonstram que os resultados descritos na literatura apresentam controvérsias, enfatizando a importância de mais estudos no sentido de se compreender as alterações celulares causadas pelos agrotóxicos.

Malatesta e colaboradores (2008) investigaram os efeitos do Roundup sobre a estrutura e função celular em células de hepatoma em cultura (HTC) e mostraram que o Roundup é capaz de induzir a atividade lisossomal e diminuir a atividade mitocondrial. Ao investigar os efeitos da exposição subaguda e subcrônica do Roundup sobre o fígado de ratos, Çağlar e Kolankaya (2008), observaram alterações nas enzimas ALT, AST e LDH, indicando toxicidade hepática induzida pelo herbicida. Também observaram formações degenerativas, tais como infiltração de células mononucleares e congestão dos tecidos hepáticos. Posteriormente, El-Shenawy (2009) demonstrou que tanto o Roundup quanto glifosato isolado poderiam induzir danos irreversíveis nos hepatócitos. O autor demonstrou depleção nos níveis de GSH e aumento nos níveis de LPO, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α , confirmando o potencial do Roundup em induzir estresse oxidativo e causar alterações nas defesas antioxidantes em tecido hepático.

Barbosa e colaboradores (2001) relataram o caso de um paciente adulto, do sexo masculino, que se contaminou acidentalmente com herbicida a base de glifosato ao pulverizar um jardim sem utilizar equipamentos de proteção individual. O indivíduo desenvolveu lesões cutâneas disseminadas seis horas após o acidente e um mês depois, desenvolveu parkinsonismo. Dois anos após a exposição inicial ao glifosato, uma ressonância magnética revelou alterações importantes no globo pálido e na substância negra. Os autores propuseram que o

glifosato pode contribuir para patologias neurológicas devido a sua similaridade com a glicina, um cofator necessário para a ativação do receptor para glutamato do tipo NMDA, que controla ações excitatórias no sistema nervoso central e também está envolvido no processo de aprendizagem e memória. Wang *et al.* (2011) também relataram o caso de uma mulher com síndrome parkinsoniana após exposição ocupacional crônica ao glifosato. A mesma trabalhava em uma fábrica de pesticidas, atuando exclusivamente na divisão de produção de glifosato. Os dados da ressonância de seu cérebro foram semelhantes aos relatados anteriormente por Barbosa e colaboradores em 2001. A paciente continua sendo investigada, e os autores sugerem que o mecanismo pelo qual o glifosato induziu o parkinsonismo nesta paciente ainda é desconhecido.

Com o intuito de compreender as ações do glifosato sobre o sistema nervoso Anadón *et al.* (2008), demonstraram que a administração oral deste pesticida por 5 dias induz depleção dose-dependente nos níveis dos neurotransmissores dopamina e serotonina no cortex frontal, no mesencéfalo e no estriado de ratos adultos. Estes dados corroboram a hipótese de que a exposição a pesticidas pode estar relacionada com o desenvolvimento da doença de Parkinson (caracterizada por redução nos níveis de dopamina). Entretanto, os mecanismos envolvidos neste evento permanecem desconhecidos.

Os efeitos tóxicos do glifosato e/ou da preparação comercial Roundup parecem envolver indução de estresse oxidativo, assim como modulação das vias de sinalização intracelulares. Neste contexto, Gehin, Guyon e Nicod (2006) mostraram que o glifosato sozinho ou incluído no Roundup 3 plus® é capaz de induzir alterações significativas no status antioxidante celular levando a depleção da glutathione reduzida (GSH), induzindo modificações na atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase (CAT, GPx e SOD, respectivamente), assim como promovendo a peroxidação lipídica em linhagens de queratinócitos humanos (HaCaT). Além disso, alterações nas enzimas antioxidantes CAT, SOD e GST (glutathione-S-transferase) e em alguns indicadores de estresse oxidativo, como TBARS e proteína carbonilada foram observadas em diferentes tecidos de peixes (catfish) após exposição a diferentes concentrações de Roundup (MENEZES *et al.*, 2011). O envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de ação do glifosato também foi demonstrado por Lueken *et al.* (2004). Os pesquisadores demonstraram sinergismo

entre os efeitos genotóxicos induzidos por estresse oxidativo e os induzidos por glifosato sobre fibroblastos humanos.

Considerando-se o que foi exposto, está claro que o glifosato e a formulação comercial Roundup não tem ação exclusivamente sobre plantas e alguns microorganismos. Além disso, a formação de radicais livres e a modulação dos sistemas de defesas antioxidantes são nitidamente alteradas pela exposição ao pesticida. Entretanto, novos estudos ainda são necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais o glifosato induz efeitos tóxicos sobre diferentes sistemas biológicos.

1.2 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Radical livre (RL) é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica. A presença de elétrons não emparelhados normalmente confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Uma vez formados, os RLs interagem com outras moléculas através de reações de oxidação-redução com o propósito de estabilizar sua configuração eletrônica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os RLs cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados ERO ou ERN, respectivamente, e representam a classe mais importante de tais espécies geradas em organismos (VISIOLI *et al.*, 2000; VALKO *et al.*, 2004).

Em 1954, Gerschman propôs a teoria do radical livre e da toxicidade do oxigênio, que estabeleceu que a toxicidade do oxigênio fosse devida a formas parcialmente reduzidas do oxigênio. Logo em seguida, Harman (1956) descobriu que RL podia ser responsável por danos celulares, mutagênese, câncer, processos degenerativos e envelhecimento.

As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares, dentre estes, os de maior interesse do ponto de vista biológico estão o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), radical peróxil (ROO^{\cdot}) e radical alcoxil (RO^{\cdot}); e os não-radicalares: oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso ($HOCl$). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\cdot NO$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (SÁNCHEZ, 2012).

1.2.1 Mecanismo de geração de radicais livres

A mitocôndria é o principal local de produção das ERO. Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam 85% a 90% do oxigênio (O_2) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Os 10% a 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e, ainda, por reações químicas de oxidação direta (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Na mitocôndria, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas de citocromo *c* removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao O_2 para formar água. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KOURY; DONANGELO, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Além da mitocôndria, existem outras fontes celulares de ERO, por exemplo, a enzima xantina oxidase. A xantina oxidase e a xantina desidrogenase são formas da mesma enzima, conhecida como xantina oxidoredutase. Esta enzima está largamente distribuída em tecidos de mamíferos e ambas as formas de xantina oxidoredutase catalisam a conversão de hipoxantina à xantina e xantina à ácido úrico, porém, apenas a forma oxidase gera $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 . A enzima tipicamente existe sob a forma de desidrogenase, mas sob determinadas condições de estresse, tais como a hipóxia, onde há falha energética e elevadas concentrações de cálcio intracelular, a xantina desidrogenase é convertida em xantina oxidase por proteases dependentes de cálcio, ou por oxidação de grupos sulfidrilas. A xantina-oxidase tem sido implicada como uma fonte de ERO após a reperfusão de tecidos isquêmicos em vários órgãos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SUGAMURA; KEANEY, 2011, SÁNCHEZ, 2012). O processo inflamatório é outra fonte endógena geradora das ERO, os macrófagos ativados produzem $O_2^{\cdot -}$ com auxílio da enzima leucócito NADPH oxidase, que catalisa a redução do O_2 com gasto de uma molécula de NADPH. Esta enzima é latente nas células em repouso, mas desenvolve atividade catalítica quando a célula entra em contato com

microorganismos. O radical ânion superóxido formado é bactericida fraco, capaz de inativar proteínas ferro-sulfurosas das bactérias, porém gera alguns produtos que possuem forte atividade antimicrobiana, tais como ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$) que são os principais responsáveis pelo combate a corpos estranhos (BABIOR, 1997; SÁNCHEZ, 2012). Acredita-se também, que numerosas enzimas são capazes de produzir espécies parcialmente reduzidas de oxigênio com uma elevada reatividade durante a catálise. Dentre elas destacam-se a monoamino oxidase (MAO), as ciclooxygenases e lipooxygenases, aminoácido oxidases, óxido nítrico sintase, entre outras (SUGAMURA; KEANEY, 2011; SÁNCHEZ, 2012).

1.2.2 Radical ânion superóxido

O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), é a primeira ERO a ser formada pela redução univalente do oxigênio molecular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Em condições fisiológicas, sua formação ocorre espontaneamente em quase todas as células aeróbicas, especialmente na membrana mitocondrial, por meio da cadeia transportadora de elétrons (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Apresenta meia vida mais longa do que a hidroxila, 1×10^{-6} segundos, sendo capaz de reagir com as moléculas por mais tempo (YU, 1994; ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005). Sua atuação como oxidante direto é irrelevante; porém, os efeitos deletérios vem de sua habilidade em gerar radicais secundários, extremamente tóxicos como o radical $\cdot OH$, ou ainda reagir com o $\cdot NO$ e gerar $ONOO^-$ (CAMPOS; YOSHIDA, 2004; GREEN *et al.*, 2004; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004, BARREIROS *et al.*, 2006). O $O_2^{\cdot-}$ é eliminado pela enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de duas moléculas de $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 . Este último, quando não eliminado do organismo pelas enzimas peroxidases e catalase, pode gerar o $\cdot OH$ (BARREIROS *et al.*, 2006).

1.2.3 Radical hidroxila

É considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outro, porque tem a capacidade de reagir com quase todas as moléculas biológicas (ANDRADE *et al.*, 2010; SÁNCHEZ, 2012). Apresenta meia vida curta, de 1×10^{-9} segundos, e não existem sequestradores específicos

in vivo para esta ERO (YU, 1994; SÁNCHEZ, 2012). Forma-se essencialmente a partir de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , através das reações de Haber-Weiss e Fenton, catalisadas por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SÁNCHEZ, 2012). O radical hidroxila ($\cdot OH$) também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) e inativar várias proteínas e enzimas, ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (S-S). (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986). O $\cdot OH$ também pode causar alterações estruturais nas cadeias de DNA por modificações nas bases nitrogenadas e pela oxidação da desoxirribose, o que quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA (DIZDAROGLU *et al.*, 2002; BARREIROS *et al.*, 2006).

1.2.4 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) forma-se *in vivo* por dismutação espontânea do $O_2^{\cdot-}$ ou enzimática, pela SOD e várias oxidases em reações de oxiredução durante o metabolismo celular (BARREIROS *et al.*, 2006; SÁNCHEZ, 2012). O H_2O_2 não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa como intermediário na reação que produz o $\cdot OH$. Apresenta meia vida longa, superior a 10^{-2} segundos, e é capaz de atravessar membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro (YU, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O H_2O_2 é capaz de oxidar grupos sulfidrilas (-SH) de proteínas, e causar a ruptura das fitas de DNA. Fisiologicamente, o H_2O_2 pode ser removido pelas enzimas GPx e CAT (SÁNCHEZ, 2012).

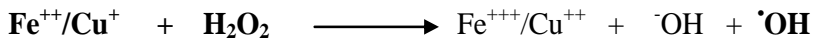
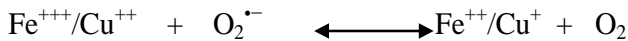
1.2.5 Importância dos íons ferro e cobre na formação de ERO

Os metais se caracterizam por suas propriedades redox e sua capacidade de união a biomoléculas (SÁNCHEZ, 2012). Os íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacita como potentes catalisadores das reações de geração de ERO. A participação desses metais se dá, especialmente, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; BARBOSA *et al.*, 2010). Embora o cobre e outros metais possam também catalisar estas reações, o ferro é o metal pesado mais abundante

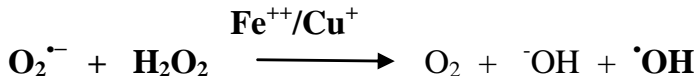
no organismo e está biologicamente mais apto para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Na reação de Fenton ocorre à geração de radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), por meio da reação do H_2O_2 com os íons em questão. Na reação de Haber-Weiss, estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot-}$, a fim de gerar, da mesma forma, o $\cdot\text{OH}$ (BARBOSA *et al.*, 2010).

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



A ligação do ferro e cobre às proteínas específicas: transferrina, ferritina e ceruloplasmina, por meio da quais estes são transportados, utilizados e estocados, previne e/ou minimiza as reações de geração de radicais livres catalisadas por esses metais (KOURY; DONANGELO, 2003).

1.2.6 Peroxidação lipídica

Os RLs de alta reatividade podem seqüestrar um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos e levar a uma reação em cadeia conhecida como peroxidação lipídica (LPO). As ERO provocam a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados e de fosfolipídios de membrana. A LPO acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (SÁNCHEZ, 2012). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989). A

LPO também pode inativar enzimas e receptores associados à membrana celular e aumentar a permeabilidade do Ca^{2+} , bem como, oxidar as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) um mecanismos envolvido na gênese da placa de ateroma (SÁNCHEZ, 2012).

Os processos de peroxidação conduzem a formação de numerosos derivados tóxicos, como o malondialdeído (MDA). O MDA é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos mais conhecidos produtos secundários de lipoperoxidação e pode ser usado como um indicador de injúria à membrana celular, proveniente de situações de estresse oxidativo, que estão implicadas na patogênese de várias doenças, incluindo, diabetes, câncer, aterosclerose, doenças renais e de Alzheimer (GROTTO *et al.*, 2007). Também está associado aos mecanismos de envelhecimento e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (SHAN *et al.*, 1990).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação começa com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular. Este seqüestro pode ser realizado pelo $\cdot\text{OH}$ ou pelo $\text{LO}\cdot$ (radical alcóxil), com conseqüente formação do $\text{L}\cdot$ (radical lipídico). A fase de propagação da peroxidação lipídica, o $\text{L}\cdot$ reage rapidamente com o O_2 , resultando em $\text{LOO}\cdot$ (radical peróxil), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o $\text{L}\cdot$ na segunda equação de propagação. O radical de carbono formado pode reagir com o O_2 para formar outro radical peróxil, e assim sucessivamente. A abstração de um hidrogênio de outro lipídio por parte do radical peróxil gerará hidroperóxidos lipídicos (LOOH). O término da reação poderá ocorrer quando dois radicais produzidos nas etapas anteriores reagirem entre si, formando um produto estável. Na fase de terminação e na presença de ferro se produzem aldeídos e outros compostos que são utilizados como marcadores biológicos de danos aos lipídios (figura 5) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SÁNCHEZ, 2012).

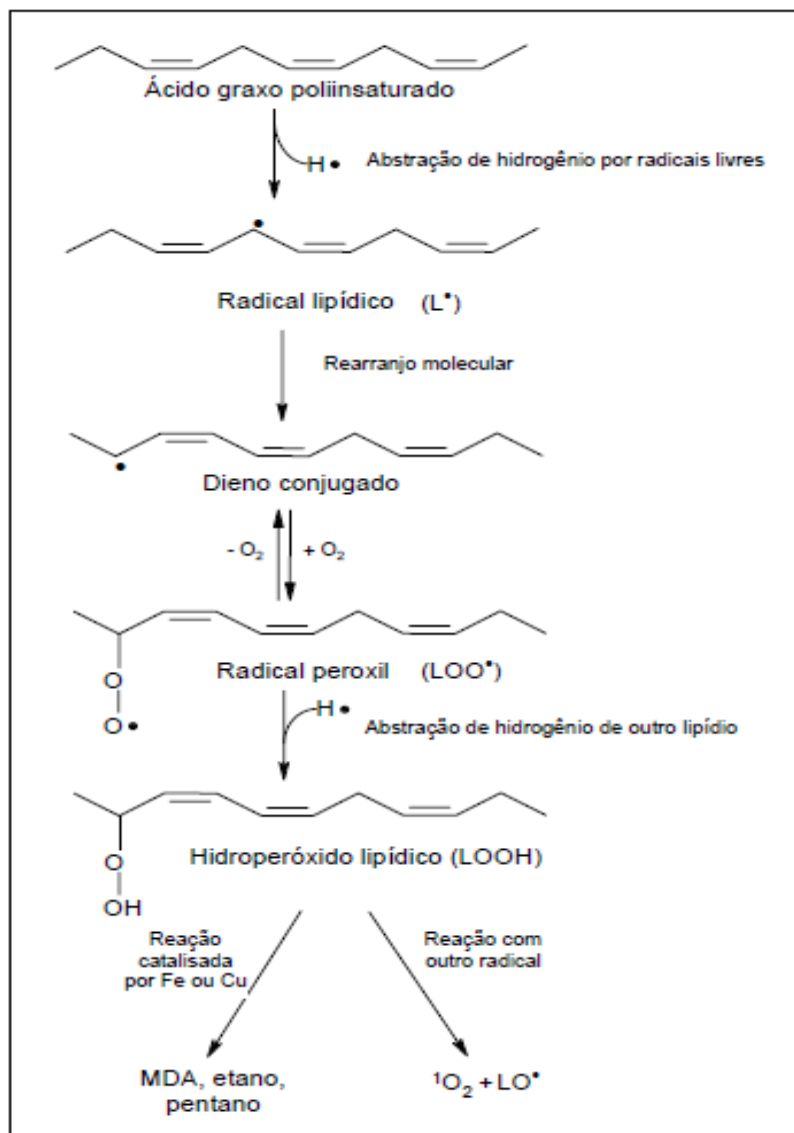


Figura 5: Reações em cadeia da lipoperoxidação. Adaptado de HALLIWELL; GUTTERIDGE (2007).

1.2.7 Oxidação de proteínas

Nos aminoácidos e proteínas, $\cdot\text{OH}$ pode reagir na cadeia lateral, onde ataca preferencialmente cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, e, em menores proporções, arginina e asparagina (BARREIROS *et al.*, 2006; SÁNCHEZ, 2012). Os ataques aos aminoácidos que compõem as proteínas podem gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas (BARREIROS *et al.*, 2006).

O $\cdot\text{OH}$ exerce mais efeitos nocivos a proteínas, enquanto que o H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, e $\cdot\text{NO}$ ficam mais restritos aos ataques de grupos facilmente oxidáveis, como os grupos sulfidrilas (-SH) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). As proteínas podem sofrer alterações nos sítios onde há ligações com metais de transição. Estes sítios são particularmente susceptíveis devido à facilidade com que os metais de transição se ligam com o H_2O_2 para formar o $\cdot\text{OH}$ (reação de Fenton) que reage com os aminoácidos adjacentes (CHEESEMAN; SLATER, 1993).

Outro importante dano oxidativo às proteínas é a oxidação dos grupos amino dos aminoácidos a grupos carbonilas (SÁNCHEZ, 2012). A introdução de grupos carbonilas (como consequência de reações oxidativas) pode ser detectada usando-se métodos específicos, um deles é a reação destes grupos com reagentes carbonil-específicos como o 2,4-dinitrofenilhidrazina que é um reagente carbonil clássico (LEVINE *et al.*, 1990). A mensuração dos níveis de proteína carbonilada (PC) tem sido amplamente utilizada como biomarcador de estresse oxidativo acarretando em dano às proteínas.

As consequências bioquímicas das modificações oxidativas às proteínas podem ser resumidas em (SÁNCHEZ, 2012):

- Perda da função de receptores, enzimas, proteínas de transporte;
- Alteração da função das enzimas reparadoras do DNA;
- Perda da fidelidade das DNAs polimerases para replicar o DNA;
- Aumento ou redução da susceptibilidade das proteólises;
- Aumento da imunogenicidade (geração de novos antígenos que provocam resposta imunitária);
- Agregação proteica;
- Modificação na transcrição gênica.

1.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio entre os mecanismos oxidativos e as defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos. Esse desequilíbrio pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de ERO e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes (PARTHIBAN *et al.*, 1995; JUNQUEIRA *et al.*, 2004; ANDRADE *et al.*, 2010). Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O estresse oxidativo tem sido relacionado com uma série de estados fisiopatológicos, assim como no processo de envelhecimento (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Na reprodução, o estresse oxidativo pode provocar efeitos deletérios tanto ao sistema reprodutor feminino como ao masculino. Em relação às fêmeas, os problemas podem ocorrer desde o processo de maturação do oócito até a gestação, e nos machos os distúrbios podem ocorrer durante as várias etapas da espermatogênese. O estresse oxidativo também pode ocasionar lesões ao DNA de células germinativas tanto masculinas quanto femininas (ANDRADE *et al.*, 2010).

1.3.1 Sistemas de defesa antioxidante

Os sistemas de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados às células pela ação deletéria das ERO e ERN. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação das ERO e ERN (sistemas de prevenção), impedindo o ataque desses às células (sistemas varredores/removedores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (KOURY; DONANGELO, 2003).

Para proteger-se do efeito letal da formação excessiva de ERO e ERN, a célula possui um sistema de defesa antioxidante enzimático e um não enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética. Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas

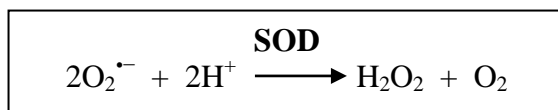
concentrações comparadas àquela do substrato oxidável, retarda ou previne significativamente, a oxidação daquele substrato.

1.3.2 Antioxidantes enzimáticos

Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das ERO. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical ânion superóxido e de peróxidos de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical $\cdot\text{OH}$ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). As enzimas glutatona-S-transferase (GST) e a glutatona redutase (GR) agem, respectivamente, detoxificando agentes eletrofílicos (como xenobióticos) e reduzindo o dissulfeto de glutatona oxidada (GSSG) à glutatona reduzida (GSH) (FERNANDES, 2010). A enzima gama glutamiltransferase (GGT) está envolvida no metabolismo da glutatona (PALLADINO *et al.*, 1994).

1.3.2.1 Superóxido dismutase

A SOD é uma metaloenzima, presente na quase totalidade dos organismos eucarióticos que catalisa a dismutação do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em oxigênio e peróxido de hidrogênio através da seguinte reação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007):



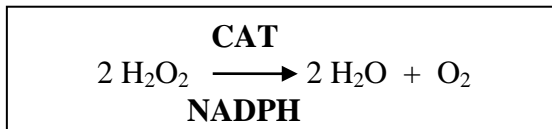
A decomposição do radical ânion superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$ ocorre naturalmente, porém, por ser uma reação de segunda ordem, necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de $\text{O}_2^{\cdot-}$, de forma que há necessidade de maior concentração do radical ânion superóxido. A presença da enzima SOD favorece essa dismutação tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas. A ação desta enzima permite a eliminação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ mesmo em baixas concentrações (BARREIROS *et al.*, 2006).

Nos organismos eucariontes existem três tipos diferentes de SOD dependentes de sua localização, que em conjunto contribuem na regulação da concentração do $\text{O}_2^{\cdot-}$ (SÁNCHEZ, 2012). A SOD-CuZn

constitui a primeira linha de defesa antioxidante, e está presente principalmente no citoplasma, requer os íons cobre e zinco no seu sítio ativo, o íon cobre é essencial para a atividade catalítica da enzima e o íon zinco promove a estabilidade da estrutura protéica. A SOD-Mn, com manganês em seu sítio ativo, é encontrada na mitocôndria, e ERO são capazes de aumentar a sua expressão (BABIOR, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SÁNCHEZ, 2012). A superóxido dismutase extracelular (SOD-EC) é secretada no espaço intersticial dos tecidos e dos fluídos extracelulares e é responsável pela atividade da SOD presente no plasma, linfa e fluído sinovial. A SOD-EC é a única enzima extracelular que elimina o $O_2^{\cdot-}$ (SÁNCHEZ, 2012).

2.3.2.2 Catalase

A CAT é uma hemoproteína tetramérica, essa enzima constitui o mais eficiente e elaborado sistema em plantas e animais para controlar as concentrações de H_2O_2 (MONTAVON *et al.*, 2007). Está localizada na matriz dos peroxissomas e na mitocôndria; entretanto, nos eritrócitos encontra-se no citoplasma (SÁNCHEZ, 2012). A CAT catalisa a redução do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

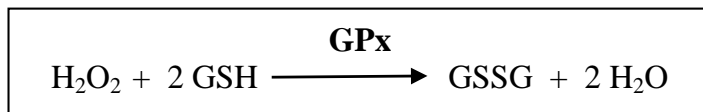


O papel antioxidante da catalase é diminuir o risco de formação do radical hidroxila a partir do H_2O_2 via reação de Fenton (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Uma molécula de NADPH é fortemente ligada a cada uma das quatro subunidades da CAT. O NADPH aumenta a eficiência da CAT, assim como a protege, prevenindo e revertendo a formação de uma forma inativa desta enzima, conhecida como composto II (KIRKMAN *et al.*, 1999).

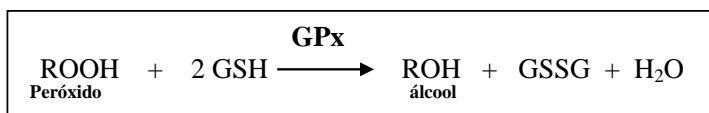
1.3.2.3 Glutathione peroxidase e glutathione reductase

As glutathione peroxidases (GPxs) são enzimas dependentes de selênio (Se) e constituem um dos sistemas antioxidantes mais importantes da célula (SÁNCHEZ, 2012). Contem um átomo de Se

unido a um resíduo de cisteína (selenocisteína) no seu sítio ativo (HUBER *et al.*, 2008). Todas as GPxs catalisam a redução do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) usando a glutatona reduzida (GSH) como substrato (NORDBERG; ARNÉR, 2001).



Estas enzimas também podem reduzir outros peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis (NORDBERG; ARNÉR, 2001), como demonstrado abaixo. O grupo sulfidríla (-SH) da GSH atua como doador de elétrons e é oxidado para a forma glutatona oxidada (GSSG) (MORAES, 2009).



Existem 5 isoformas da GPx em mamíferos, a atividade de cada isoforma varia dependendo do tipo de tecido: A GPx1 encontra-se no citosol e mitocôndria, a GPx2 no trato gastrointestinal, a GPx3 nos rins, a GPx4 está presente no citosol e membrana da maioria dos tecidos e é específica para os hidroperóxidos derivados de fosfolipídios e a GPx5 identificada recentemente é expressa especificamente no epidídimo de ratos e é independente de selênio (SÁNCHEZ, 2012).

Os processos oxidativos celulares e a atividade da GPx levam a glutatona reduzida (GSH) a glutatona oxidada (GSSG). Para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutatona redutase (GR) reduz a GSSG às custas de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular. A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) está envolvida com as defesas antioxidantes, pois fornece os equivalentes redutores (NADPH) para regeneração de GSSG em GSH. Quando o fornecimento de NADPH fica prejudicado, a função antioxidante da GSH também fica afetada, pois a GSSG não pode ser regenerada, causando sérios danos ao metabolismo celular. Neste sentido, a G6PD também pode ser considerada uma enzima antioxidante co-adjuvante (TREVISAN, 2008). A GR tem uma distribuição celular muito similar a GPx (SÁNCHEZ, 2012).

1.3.2.4 Glutathione-S-transferase

As glutathione transferases (GSTs), também conhecidas como glutathione S-transferases, compreendem uma família de enzimas multifuncionais envolvidas na detoxificação celular e excreção de substâncias fisiológicas e xenobióticas, auxiliando na proteção celular contra danos oxidativos (WILCE; PARKER, 1994; LEE *et al.*, 2002). As GSTs catalisam o ataque nucleofílico da glutathione reduzida (GSH) a grupos eletrofílicos de compostos orgânicos (xenobióticos e compostos endógenos), tornando os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a excreção (WILCE; PARKER, 1994). As GSTs geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros, apresentando dois sítios ativos por dímero cujas atividades são independentes uma da outra. Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de ligação, um para a glutathione (GSH) que é muito específico para este tripeptídeo, e outro sítio de ligação com menor especificidade para os eletrófilos (DANIELSON; MANNERVIK, 1985; ROSA DE LIMA, 2001).

Diferentes compostos, incluindo xenobióticos tóxicos e produtos reativos de processos intracelulares, como peroxidação de lipídios, atuam como substratos para a GST. Os vários substratos utilizados pelas GSTs são estruturalmente diversos, mas tem em comum a característica de serem muito hidrofóbicos e ligados a um centro eletrofílico (VAN DER AAR, 1996).

As GSTs de mamíferos podem ser divididas em três grandes famílias: GST citosólica, GST mitocondrial e GST microsossomal. As duas primeiras compreendem enzimas solúveis, enquanto que as do tipo microsossomal se encontram associadas à membrana (HUBERT *et al.*, 2008). As GSTs citosólicas são agrupadas, independente da espécie, em nove classes: Alfa, Beta, Kappa, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega e Zeta, com base em sua homologia, estrutura, especificidade ao substrato, estudos imunológicos e análise filogenética (LEE *et al.*, 2002). As atividades da GST citosólica são 5 a 40 vezes maiores do que as mitocondriais (OGA, 1996; PETERS; ROELOFS, 1997; TORRES *et al.*, 2006).

Algumas GSTs além da sua atividade catalítica podem participar da síntese de prostaglandinas, atuar como transportadores intracelulares de vários componentes hidrofóbicos endógenos, tais como hormônios esteróides, heme, bilirrubinas, sais biliares, hormônios da tireóide. Essas ligações frequentemente resultam na inibição da

atividade catalítica da molécula (MANNERVIK, 1985; WILCE; PARKER, 1994).

A atuação das GSTs é uma importante estratégia de defesa da célula contra xenobióticos. Uma vez formados os conjugados da GSH/xenobióticos (catalisado pela GST), são reconhecidos por transportadores específicos e conduzidos para o meio intercelular. No meio intercelular estes conjugados são clivados pela ação da enzima GGT e dipeptidases presentes na porção externa da membrana celular. O glutamato e a glicina livres podem ser reabsorvidos pela célula e utilizados na síntese de GSH, a cisteína/xenobiótico também é reabsorvida e metabolizada para ser eliminada (HUBER *et al.*, 2008).

1.3.2.5 Gama-glutamyltransferase

A gama-glutamyltransferase (GGT) é uma enzima ligada à membrana plasmática que cataliza a transferência do grupo gama-glutamil para aminoácidos ou aceptores peptídicos, tendo a glutatona como principal substrato. Participa na reciclagem de aminoácidos da glutatona e conjugados de glutatona secretados para o meio extracelular, esses aminoácidos são reintroduzidos para o meio intracelular participando da resíntese de GSH. A GGT desempenha um papel chave na homeostasia da cisteína e GSH. Como consequência, GGT participa na manutenção da homeostase redox de células (MARES *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005).

A GGT é amplamente distribuída nos tecidos de mamíferos, no sistema reprodutor de machos de muitas espécies a GGT é amplamente expressa nos testículos, vesícula seminal e epidídimo (PALLADINO *et al.*, 1994). Nos túbulos seminíferos está localizada nas células de Sertoli (TINDALL *et al.*, 1985). Há várias evidências sugerindo que a atividade desta enzima pode ser relevante para a fisiologia testicular e reprodução (MERONI *et al.*, 1997).

Pouco se sabe sobre seu papel na reprodução. Kumar e colaboradores (2000), analisaram alguns aspectos relacionados à reprodução em camundongos deficientes de GGT. Os resultados mostraram que os machos mutantes tiveram redução no tamanho da vesícula seminal e testículo, supressão no soro de fator de crescimento ligado a insulina I (IGF-1), redução do FSH, e eram inférteis. As fêmeas deficientes de GGT também eram inférteis. Após a administração de N-acetilcisteína na água de beber, estes animais tiveram o tamanho dos testículos, vesícula seminal, e ovários restaurados para valores

comparáveis aos camundongos tipo selvagem, além disso tornaram-se férteis produzindo números normais de descendentes quando cruzados com camundongos do tipo selvagem. Estes resultados fornecem evidências que a GGT por si só não é necessária para a reprodução normal. No entanto, os níveis adequados de GSH intracelular e cisteína, que são regulados pela GGT, são essenciais para a função reprodutiva normal.

1.3.3 Antioxidantes não enzimáticos

Entre os principais antioxidantes não enzimáticos endógenos estão a glutathiona, o ácido úrico e o estradiol, entre outros, e como antioxidantes exógenos existem as vitaminas E, C e A, os carotenóides, os polifenóis, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

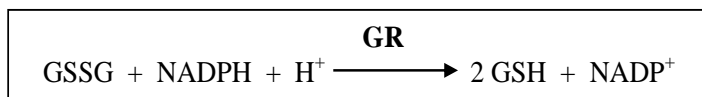
1.3.3.1 *Glutathiona reduzida*

A GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, é o principal tiol intracelular de baixo peso molecular. Está presente na maioria das células em concentrações relativamente altas (0,4–12 mM) e é o composto com grupos (-SH) mais abundante nos tecidos (-SH não protéicos). A ligação peptídica entre o glutamato e a cisteína é pelo grupo γ -carboxila e não pelo α , o que torna este tripeptídeo resistente a ação de peptidases celulares que degradam outros peptídeos pequenos (HUBER *et al.*, 2008; SÁNCHEZ, 2012).

A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes na defesa das células contra o estresse oxidativo e possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos. Esta molécula apresenta papel redutor em muitas reações, tendo uma função importante na detoxificação do H₂O₂, outros peróxidos e radicais livres. Além disso, desempenha outras funções como a proteção de grupos sulfidrilas (-SH) de proteínas contra oxidação, serve como transportadora e reservatório da cisteína, modula processos celulares como a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (DENEKE; FAMBURG, 1989; FERREIRA; MATSUBARA, 1997;

PASTORE, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HUBER *et al.*, 2008; SÁNCHEZ, 2012).

Após ser utilizada para a redução de determinado substrato, a GSH é convertida à sua forma oxidada (GSSG). No entanto, a razão entre GSH/GSSG se mantém continuamente alta, sendo que menos de 0,5% se encontra como GSSG. Isso é possível porque a GSH é regenerada a partir da GSSG através da enzima glutationa redutase (GR), reação que requer uma molécula de NADPH para regenerar cada molécula de GSH. Com isso garante-se que a GSH esteja na maior parte em sua forma reduzida, o que é essencial para sua ação como redutora de outras moléculas biológicas (PEDERZOLLI, 2004).



1.3.3.2 α -Tocoferol (Vitamina E)

A vitamina E, foi descoberta em 1922 por Evans e Bishop, como um fator dietético necessário para a reprodução em ratos e sendo a substância ativa isolada em 1936. O termo genérico “vitamina E” é utilizado para designar oito diferentes compostos, nomeados α , β , γ e δ -tocoferóis e tocotrienóis (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999; SÁNCHEZ, 2012). O α -tocoferol é o que exibe maior atividade biológica e representa aproximadamente 90% de todos os tocoferóis presentes nos tecidos dos mamíferos (SÁNCHEZ, 2012).

A molécula da vitamina E é dividida em duas partes: um anel cromanol, hidrofílico e uma cauda hidrofóbica, que serve para ancorá-la na membrana lipídica. O grupo -OH presente no anel cromanol é o responsável por sua propriedade antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A vitamina E é conhecida como o principal antioxidante lipofílico que protege os ácidos graxos poliinsaturados dos tecidos contra a peroxidação. Ela é um potente removedor de radicais peroxila (LOO^{\bullet}) e provavelmente, o mais importante inibidor da reação em cadeia da lipoperoxidação em animais (DROGE, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O grupo hidroxila presente no grupo fenólico do anel cromanol rapidamente reage com o radical peroxila (LOO^\bullet), transferindo para ele o seu átomo de H, convertendo-o em hidroperóxido de lipídio – LOOH (figura 6) (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999; WANG; QUINN, 1999; BARREIROS *et al.*, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Medições *in vitro* da taxa relativa de inibição da corrente de propagação da cadeia de LPO indicaram que o α -tocoferol elimina os radicais peroxila consideravelmente mais rápido que a reação deste com o substrato lipídico (SIES *et al.*, 1993; WANG; QUINN, 1999).

O α -tocoferol é regenerado fundamentalmente pelo ácido ascórbico (figura 6). Ubiquinol (forma reduzida da coenzima Q) também pode regenerar o α -tocoferol em membranas e lipoproteínas. O α -tocoferol também participa na prevenção dos danos originados pelo NO (ARUOMA, 1996; SÁNCHEZ, 2012).

Dependendo dos compostos presentes na reação, a vitamina E pode exercer efeito anti ou pró-oxidativo (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999). Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), os tocoferóis podem reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} e Cu^{2+} a Cu^+ , que por sua vez, exercem efeito pró-oxidativo. Além disso, o radical tocoferol ($\alpha\text{-Toc}^\bullet$), oriundo da redução do radical peroxila, pode abstrair hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados, atuando então como um fraco promotor de lipoperoxidação. Estes fenômenos já foram observados em alguns sistemas *in vitro*.

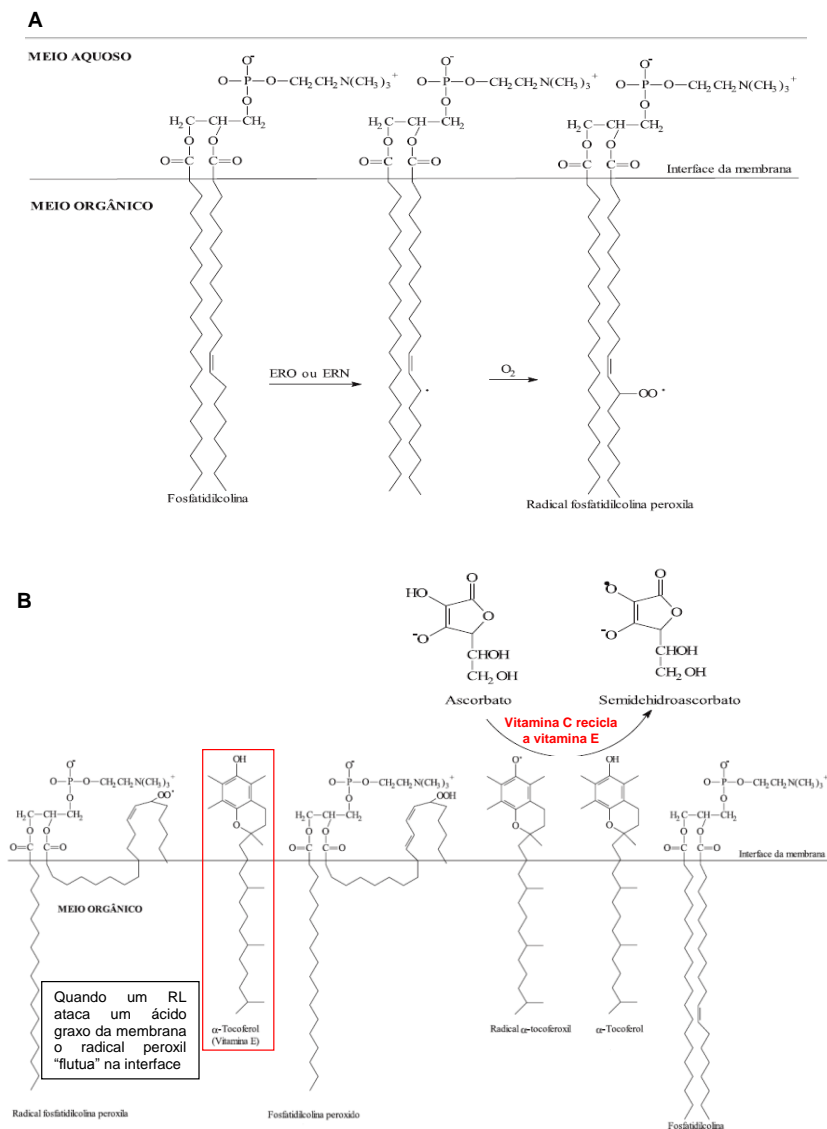


Figura 6. Participação da vitamina E e C na regeneração do radical peroxil resultante da peroxidação lipídica. (A) Peroxidação lipídica. (B) Papel da vitamina E na regeneração do radical peroxil e da vitamina C na reciclagem da vitamina E. Adaptado de Sánchez (2012) e Barreiros *et al.* (2006).

1.3.3.1 Ácido ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico, ou vitamina C, tem dois grupos hidroxila ionizáveis e, portanto, é um diácido (AscH_2). Em pH fisiológico, 99,95% da vitamina C está presente na forma protonada como ascorbato (AscH^-), e em proporções muito pequenas como AscH_2 (0,05%) e Asc^{2-} (0,004%) (SÁNCHEZ, 2012).

O ascorbato é um eficiente sequestrador do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (SIES e STAHL, 1995). É considerado o mais potente antioxidante hidrossolúvel presente nos mamíferos (SÁNCHEZ, 2012).

Estudos com lipídios plasmáticos humanos mostraram que o ácido ascórbico foi muito mais eficaz na inibição da peroxidação lipídica iniciada por um radical peroxila que outros componentes do plasma, tais como tióis proteicos, urato, bilirrubina e α -tocoferol (SIES; STAHL, 1995).

A vitamina C atua como um doador de hidrogênio para inverter a oxidação e, portanto, é denominado um antioxidante, que pode inativar os radicais livres antes que eles promovam danos às proteínas ou lipídios (RICCIONI *et al.*, 2007). É também importantíssima na eficácia da vitamina E, por regenerá-la após reação de oxidação sofrida pela mesma, constituindo seu principal papel antioxidante (DI MASCIO *et al.*, 1991).

A vitamina C é, por excelência, um antioxidante em potencial. No entanto, a presença de metais de transição como o ferro possibilita sua ação oxidante, tornando-a capaz de produzir $\cdot\text{OH}$ e H_2O_2 . Porém, em função do Fe encontrar-se, na maior parte do tempo, ligado a proteínas de transporte ou armazenamento, em situação normal, as propriedades antioxidantes do ascorbato predominam sobre suas propriedades pró-oxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999; BARREIROS *et al.*, 2006).

1.4 Indução de estresse oxidativo e exposição a pesticidas

Os radicais livres desempenham um papel importante na toxicidade de pesticidas e produtos químicos ambientais. Pesticidas podem induzir estresse oxidativo levando a geração de radicais livres e alterações nas defesas antioxidantes ou no sistema de sequestradores de ERO (AGRAWAL *et al.*, 1991; EL-SHARKAWY *et al.*, 1994; ALMEIDA *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2006).

A peroxidação lipídica tem sido sugerida como um dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade induzida por pesticidas (KHRER, 1993; BANERJEE *et al.*, 1999; KAVITHA; RAO, 2007).

Tem sido sugerido que pesticidas organoclorados, organofosforados e carbamatos exercem seus efeitos biológicos principalmente através do ataque eletrofílico a constituintes celulares com geração simultânea de ERO (TUNÇMEN; TÜZMEN, 2007).

Muitos pesquisadores trabalhando com ratos, peixes, anfíbios e culturas de células humanas, tem demonstrado que o Roundup e o glifosato isolado, aumentam a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas, os danos ao DNA, causam depleção da GSH, alterações nas defesas antioxidantes como na SOD, CAT, GPx, GR, GST, provavelmente por induzir a geração de ERO como $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (LUEKEN *et al.*, 2004; MONROY *et al.*, 2005; GEHIN *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2008; EL-SHENAWY, 2009; MENEZES *et al.*, 2011).

1.5 Estresse oxidativo e reprodução

Sabe-se que ERO desempenham papel essencial na patogênese de muitos processos reprodutivos (AGARWAL *et al.*, 2003). A geração excessiva de ERO no trato reprodutivo masculino afeta a qualidade do sêmen, incluindo perda da motilidade de forma irreversível, lesões ao DNA espermático e mitocondrial e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fecundante do espermatozóide (IRVINE *et al.*, 2000; VALENÇA; GUERRA, 2007). A perda da motilidade espermática relacionada ao estresse oxidativo foi registrada pela primeira vez por Jones e colaboradores (1979). Demonstrou-se que ERO provocam danos peroxidativos à membrana plasmática dos espermatozóides o que induz a redução de sua flexibilidade e, portanto, movimento da cauda.

Além disso, o estresse oxidativo induz danos no DNA por acelerar o processo de apoptose em células germinativas levando a um declínio na contagem de espermatozóides estando associado com infertilidade masculina e a aparente deterioração da qualidade do sêmen observado nas últimas 4-5 décadas (AGARWAL *et al.*, 2003).

Alterações nas enzimas antioxidantes e redução nos níveis de GSH tem sido correlacionada com sub-fertilidade ou infertilidade (WANG *et al.*, 2003). O plasma seminal de homens férteis tem uma

maior capacidade total antioxidante do que o plasma seminal de homens inférteis (LEWIS *et al.*, 1995).

Pesquisas também mostraram que espermatozoides humanos morfológicamente anormais têm uma maior capacidade de geração de ERO, e uma redução na capacidade antioxidante (SÁNCHEZ, 2012). O estresse psicológico produz uma redução na capacidade do semem por um mecanismo relacionado com a deterioração da unidade central de gonadotrofina. No entanto, estudos prospectivos recentes têm vinculado o período de estresse psicológico com uma redução na qualidade do espermatozóide mediado por um aumento na geração de ERO do plasma seminal e uma redução na proteção antioxidante (ESKIOCAK *et al.*, 2006).

A figura 7 esquematiza resumidamente a geração das principais ERO e os mecanismos de defesa antioxidantes envolvidos na indução de estresse oxidativo, que podem estar envolvidas no mecanismo de toxicidade do glifosato-Roundup sobre o sistema reprodutor masculino. As ERO ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $\cdot OH$) podem ser formadas em consequência de processos inflamatórios, exposição a agentes químicos (como pesticidas), radiação e por fontes endógenas. O $O_2^{\cdot-}$ pode sofrer dismutação espontânea ou enzimática, através da atividade da SOD, gerando H_2O_2 , e este por sua vez pode ser reduzido a H_2O e O_2 via catalase ou GPx, sendo que esta última é dependente de GSH como doadora de elétrons. A GSSG pode ser reduzida pela GR, às custas de NADPH. Por outro lado, o H_2O_2 também poderá gerar o $\cdot OH$ levando à oxidação do DNA e de proteínas, assim como à peroxidação lipídica. O radical LOO^{\cdot} gerado neste processo pode ser reduzido pela vitamina E prevenindo a propagação da LPO. Posteriormente, a vitamina E é reduzida novamente pela vitamina C.

Considerando-se o que foi exposto, a indução de estresse oxidativo pode levar a ativação/inibição de diversas vias de sinalização, a modulação de canais iônicos e a alterações nos sistemas de transporte em diferentes tipos celulares.

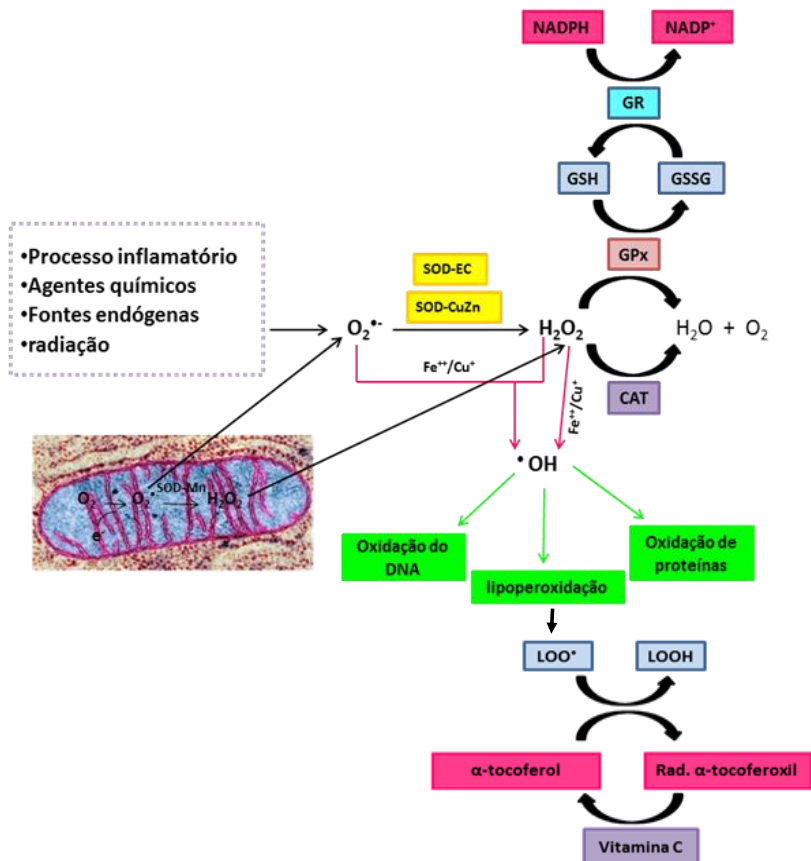


Figura 7. Esquema mostrando a geração de EROs e os principais mecanismos antioxidantes. Fonte: próprio autor.

1.6 Vias de sinalização intracelular

1.6.1 Proteínas cinases ativadas por mitógenos

As células reconhecem e respondem a estímulos extracelulares através de programas intracelulares específicos, como a cascata de sinalização que leva à ativação das proteínas cinases ativadas por mitógenos - MAPKs (ROUX; BLENIS, 2004). A via da MAPK é conhecida por ter um papel importante na transdução de sinal de muitas

respostas celulares. No testículo, está envolvida em diversos processos incluindo a progressão e diferenciação do ciclo celular das células germinativas, apoptose das células germinativas, dinamismo da barreira hematotesticular e adesão da células germinativas e de Sertoli (LI *et al.*, 2009).

A via MAPK envolve a fosforilação sequencial e ativação de três proteínas cinases, ou seja, MAPK, MAPK cinases (MAPKK ou MEK) e MAPKK cinases (MAPKKK) (Figura 8). Sob estresse, ou induzida por estímulos externos, como citocinas e fatores de crescimento ou a exposição das células e/ou testículos a toxicantes ambientais, a MAPKKK é ativada. A fosforilação desta cinase ativará a MAPKK, esta por sua vez ativará diretamente a MAPK através da fosforilação de sítios Ser/Thr e tirosina (LI *et al.*, 2009). No final dessa cascata de sinalização, a MAPK irá fosforilar proteínas citoplasmáticas, proteínas de membrana e principalmente, proteínas nucleares como fatores de transcrição regulando, portanto, uma série de genes (PEARSON *et al.*, 2001; BOUTROS *et al.*, 2008). Também, as MAPKs catalisam a fosforilação e ativação de várias proteínas cinases, chamadas proteínas cinases ativadas por MAPKs as MKs, o que representa um passo adicional na amplificação da cascata das MAPKs (ROUX; BLENIS, 2004). Os resultados desses eventos afetam a expressão gênica, mitose, motilidade celular, diferenciação, metabolismo de sobrevivência e morte celular (ROUX; BLENIS, 2004; BOUTROS *et al.*, 2008).

A super família das MAPKs é constituída por três famílias de proteínas cinases, as p38 MAPKs (α , β , γ , δ), as proteínas cinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs 1/2), e as cinases de c-Jun NH2 terminal (JNKs 1/3) (Figura 8). As p38 MAPKs e JNKs também são conhecidas como proteínas cinases ativadas por estresse. Há algumas outras MAPKs, como ERK3, ERK5 e ERK7, que possuem regulações e funções diferentes (COWAN; STOREY, 2003; LI *et al.*, 2009).

1.6.2 ERK 1/2

A via de sinalização das ERKs está relacionada a processos de sobrevivência, crescimento e diferenciação celular. Esta família é composta de duas proteínas, a p42 (ERK2) e a p44 (ERK1) (SCHWARTZ *et al.*, 2002).

A ativação de ERK1/2 ocorre inicialmente através de uma proteína Ras que é ativada por receptores tirosina cinase (Trk) e fatores de crescimento, a Ras ativa a Raf uma MAPKKK, que ativa a MEK1 e MEK2 (MAPKK), e estas ativam as ERK1/2 (MAPK) (figura 8) (SWEATT, 2004; ROUX; BLENIS, 2004). As ERKs podem ser ativadas por outras vias além da clássica, como Ca^{2+} , a rota da PKC e PI3K (GRAMMER; BLENIS, 1997; HARDINGHAM *et al.*, 2001). Uma vez ativadas, as ERK1/2 fosforilam diretamente seus substratos como fatores de transcrição, canais iônicos, proteínas de membrana, proteínas do citoesqueleto, transportadores, outras cinases, proteínas adaptadoras, receptores de fatores de crescimento e de estrógenos (ROUX; BLENIS, 2004; MATTOS, 2011).

1.6.3 p38 MAPK

A ativação da via p38 MAPK influencia um grande número de processos celulares envolvidos na inflamação, imunidade, crescimento, diferenciação, progressão do ciclo celular e ativação das vias de morte celular (SCHWARTZ *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2008). A p38 MAPK é ativada por estresse, respondendo a uma variedade de estímulos indutores, quer endógenos como exógenos, dos quais se destacam a hiperglicemia, ERO, o estresse osmótico, a radiação UV, choque térmico, hipóxia, isquemia, citocinas e fator de necrose tumoral -TNF (ROUX; BLENIS, 2004; BUITRAGO *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2008; MATTOS, 2011). A ativação da p38 desencadeia mudanças no contexto celular, modificando a expressão de proteínas citosólicas, de receptores membranares e organização do citoesqueleto, o que pode afetar o ciclo celular ou ocasionar a apoptose (BOLAND *et al.*, 2005; TREISMAN, 2006).

O mecanismo de ativação da p38 consiste de várias MAPKKK, incluindo a MEKK1-4, MLK2-3, DLK, ASK1, Tpl-2 e Tak-1 que são ativadas em resposta a estresse químico e físico. Estas MAPKKKs ativam as MAPKKs MEK3 e MEK6 (também chamadas de MKK3 e MKK6 respectivamente) que por sua vez ativam a p38 MAPK (figura 8) (ROUX; BLENIS, 2004).

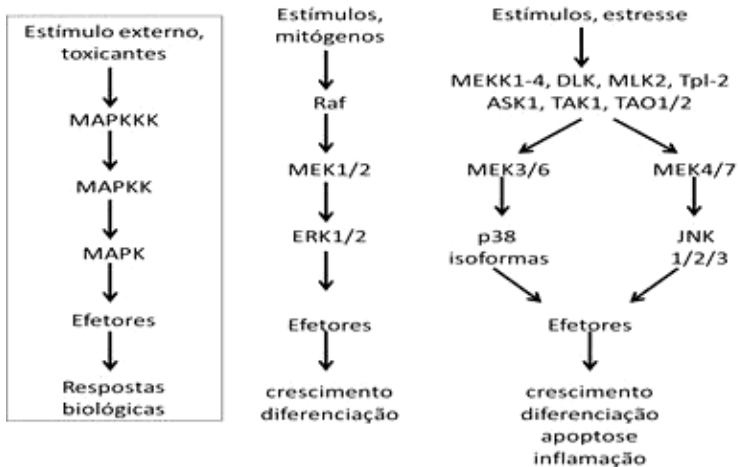


Figura 8. Rotas de ativação das MAPKs relacionando os estímulos de cada rota e as respostas biológicas esperadas. Adaptado de Li *et al.*, 2009 e ROSSO, 2010.

Li e colaboradores (2009), numa excelente revisão mostraram a importância das MAPKs nas funções reprodutivas masculinas normais e durante as disfunções reprodutivas induzidas por toxicantes ambientais. As MAPKs desempenham importante papel na espermatogênese incluindo a renovação das espermatogônias (mitose), o ciclo celular e meiose das células germinativas, espermiogênese e espermição. As MAPKs também estão envolvidas na maturação e motilidade do espermatozóide, hiperativação, capacitação e reação acrossômica antes da fecundação do oócito.

1.6.4 Fosfolipase C

A fosfolipase C (PLC) é uma enzima de membrana que hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI[4,5] P₂ ou PIP₂), que está presente em pequenas quantidades na camada interna da bicamada lipídica da membrana plasmática, para gerar dois segundos mensageiros, inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), em resposta à ativação de receptores por hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento e outras moléculas (NISHIZUKA, 1988; ALBERTS *et al.*, 2010).

O IP_3 sai da membrana e se difunde rapidamente no citosol até o retículo endoplasmático (RE) e liga-se aos canais de Ca^{2+} controlados por IP_3 (receptores de IP_3) na membrana do RE abrindo-os. O Ca^{2+} estocado no RE é liberado através dos canais abertos, aumentando rapidamente a sua concentração no citosol. O outro produto da clivagem do PIP_2 , o diacilglicerol permanece na membrana plasmática, onde tem vários papéis potenciais na sinalização. Um dos principais é mediar a ativação da proteína quinase C (PKC). O aumento inicial do Ca^{2+} citosólico, induzido por IP_3 , altera a PKC de forma que ela se desloca do citosol para a face citoplasmática da membrana. Aí ela é ativada pela combinação de Ca^{2+} , DAG e do fosfolípido de membrana carregado negativamente, fosfatidilserina (figura 9) (ALBERTS *et al.*, 2010). Uma vez ativada, a PKC fosforila proteínas-alvo modulando processos fisiológicos específicos.

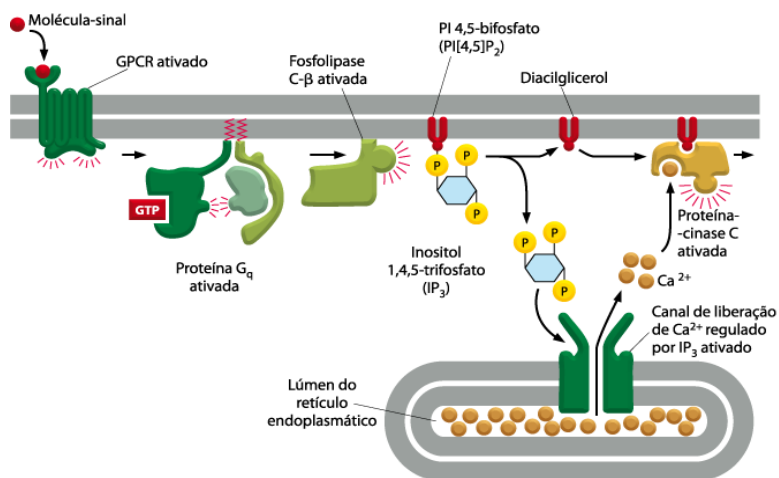


Figura 9. Mecanismo de ativação da PLC. Fonte ALBERTS *et al.* (2010).

Até o momento foram identificadas 13 isoenzimas de PLC. As isoformas foram separadas em seis classes, baseadas na estrutura e mecanismos de ativação e regulação: PLC- δ (1, 3, e 4), PLC- β (1–4), PLC- γ (1 e 2), PLC- ϵ , PLC- ξ , e recentemente foi descoberta a classe PLC- η (1 e 2) (RHEE, 2001; FUKAMI, 2002; ZHOU *et al.*, 2005; HWANG *et al.*, 2005, SMRCKA *et al.*, 2012).

Sobre as funções fisiológicas das PLCs, novas descobertas foram obtidas a partir de estudos com camundongos geneticamente

modificados em que PLCs específicas foram suprimidas ou introduzidas. Estes estudos revelaram papéis fundamentais e específicos das PLCs na organogênese e desenvolvimento embrionário, incluindo migração celular, proliferação e diferenciação. As PLCs também regulam a ativação e funções de muitas células e tecidos em outros estágios do desenvolvimento (REBECCHI; PENTYALA, 2000; SUH *et al.*, 2005, NAKAMURA; FUKAMI, 2009).

A fertilização e ativação da célula-ovo são os primeiros passos para o desenvolvimento embrionário, e vários estudos demonstraram o envolvimento crucial da PLC- δ 4 e PLC- ξ neste fenômeno. Camundongos knockout (KO) para PLC- δ 4 apresentam infertilidade masculina, e estudos de fertilização *in vitro* demonstraram que os espermatozoides destes animais induzem menor ativação de células-ovo e não provocam oscilações de cálcio (FUKAMI *et al.*, 2001). Sabe-se que em células-ovo, um aumento repentino na concentração citosólica de Ca^{2+} , que segue a fertilização, provoca uma onda de Ca^{2+} responsável pelo início do desenvolvimento embrionário (ALBERTS *et al.*, 2010). Estes resultados indicam que PLC- δ 4 em espermatozoides é um fator essencial para a indução da oscilação de Ca^{2+} e ativação da célula-ovo (NAKAMURA; FUKAMI, 2009).

Estudos com camundongos geneticamente manipulados revelaram que a falta de algumas isoformas de PLC provocam defeitos na fertilização e no desenvolvimento dos sistemas circulatório, hematopoiético, imunitário, e epidérmico (NAKAMURA; FUKAMI, 2009).

1.6.5 Proteínas cinase C

A PKC é uma Ser/Thr cinase dependente de cálcio e fosfolípídeos. É ativada intracelularmente por vias de transdução de sinal que produzem diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) e fosfatidilcolina pela ação de diversas fosfolipases (MATTOS, 2011). As PKCs são proteínas chaves no processo de sinalização intracelular. Elas atuam na regulação da expressão gênica, proliferação, diferenciação celular, tráfego de vesículas, exocitose, apoptose, modulação da atividade do citoesqueleto, regulação da atividade de receptores e canais iônicos localizados na membrana plasmática (BREITKREUTZ *et al.*, 2007; MATTOS, 2011).

Até o momento foram identificados 11 diferentes PKCs que diferem quanto à estrutura primária, distribuição tecidual, localização

subcelular, resposta a fatores extracelulares e especificidade de substrato. As isoformas podem ser separadas em três subfamílias. As PKCs clássicas ($\alpha, \beta I, \beta II, \gamma$) são ativadas por Ca^{2+} e DAG; já as novas PKCs ($\delta, \epsilon, \eta, \theta$) são independentes de Ca^{2+} e dependentes de DAG; e as atípicas (ξ, μ e τ), são irresponsáveis a ambos os fatores (BREITKREUTZ *et al.*, 2007; KRAUSS, 2008; MATTOS, 2011). Porém, fosforilação parece ser um mecanismo importante para a regulação de todas as PKCs.

1.6.6 Fosfatidilinositol-3-cinase

As fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) constituem uma família de enzimas que catalisam a fosforilação, na posição 3 do anel inositol, de um ou mais substratos fosfoinositídeos (HAWKINS *et al.*, 2006). Os membros da família PI3K são agrupados em três classes (I, II ou III), cuja a classificação é baseada nas similaridades funcionais e estruturais destas enzimas, e ainda, relacionadas com suas especificidades pelo substrato ou por suas vias de ativação (ENGELMAN *et al.*, 2006; HAWKINS *et al.*, 2006).

Os membros da classe I são os representantes mais estudados da família da PI3K por constituírem uma das principais vias de transdução de sinais ativadas por proteínas tirosinas-cinases ou receptores acoplados a proteína G. Frequentemente quando um efeito é atribuído a PI3K está sendo referida a atividade dos membros desta classe (HAWKINS *et al.*, 2006).

As enzimas PI3K classe I são dímeros, compostos por uma subunidade catalítica e uma subunidade regulatória, tendo como principal substrato o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI[4,5]P₂ ou PIP₂) e sintetizando fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI[3,4,5]P₃) que atua como segundo mensageiro e ativa várias vias de transdução de sinal intracelular que regulam funções celulares diversas como crescimento, diferenciação, sobrevivência, proliferação e metabolismo celular. (HAWKINS *et al.*, 2006). A classe II e II das PI3K tem como produto os segundos mensageiros fosfatidilinositol 3-fosfato (PI[3]P) e fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI[3,4,5]P₃) que desempenham papel central no tráfego vesicular, autogagia e internalização de receptores (DOMIN *et al.*, 2000; ODORIZZI *et al.*, 2000; GAIDAROV *et al.*, 2001, FALASCA; MAFFUCCI, 2007).

A PI3K é ativada após a estimulação celular, uma vez ativada, fosforila fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI[4,5]P₂) à fosfatidilinositol

3,4,5-trifosfato (PI[3,4,5]P₃), este interage com o domínio de homologia plequistrina (PH) presente na proteína cinase B (PKB/Akt). Esta interação não ativa diretamente a proteína cinase; entretanto, expõe um sítio de tirosina e um de serina para que outras cinases como PDK1 e PDK2/TORC2 os fosforilem (MILBURN *et al.*, 2003). Uma vez ativada, a PKB/Akt fosforila proteínas-alvo que variam dependendo do tipo celular.

Meroni e colaboradores (2002) mostraram o importante papel da via PI3K/PKB no mecanismo de ação do hormônio FSH para regular o metabolismo das células de Sertoli. Estes pesquisadores mostraram que a PI3K está envolvida na regulação da atividade da GGT, na secreção de transferrina e na produção de lactato nas células de Sertoli. Posteriormente, diversos estudos demonstraram o envolvimento da PI3K no mecanismo de ação de hormônios e fatores de crescimento sobre células testiculares, em especial sobre as de Sertoli (DUPONT *et al.*, 2010; ROSSO *et al.*, 2012; ZANATTA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; RIERA *et al.*, 2012).

Em resumo, a função reprodutiva masculina é modulada por hormônios, fatores de crescimento, citocinas, entre outros, através de várias vias de sinalização, como MAPK-ERK e p38, PLC, PKC e PI3K/PKB. As diversas rotas de transdução de sinais intracelulares também podem ser orquestradas por toxicantes, como os pesticidas. Sendo assim, as ações desreguladoras endócrinas propostas para o Roundup sobre células testiculares podem ser consequência de alterações na comunicação celular.

1.7 Cálcio como molécula sinalizadora

O íon Ca²⁺ atua como uma das principais moléculas sinalizadoras no ambiente intracelular, sendo responsável pela conversão de estímulos externos em ações específicas dando origem a respostas biológicas importantes (ZAMONER *et al.*, 2007). Hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento utilizam a via de sinalização do Ca²⁺ como rota para vários processos celulares, como a ativação de sistemas enzimáticos, a secreção, a síntese de segundos mensageiros, o transporte de açúcares e aminoácidos, a proliferação celular, modificações no citoesqueleto e reações do metabolismo intermediário celular (BRONSTON; BRONSTON, 1980; WASSERMAN *et al.*, 1992; BERRIDGE *et al.*, 2003; ZAMONER *et al.*, 2005; 2007).

O Ca^{2+} é indispensável à vida, entretanto, níveis intracelulares elevados deste íon por um longo tempo ocasionam a morte celular (CLAPHAM, 1995). Uma das razões para a manutenção da baixa concentração citoplasmática deste íon é devida à capacidade deste formar complexos solúveis com o fosfato inorgânico, presente no meio intracelular. Por isso, é essencial que os níveis intracelulares de Ca^{2+} sejam mantidos sob estrito controle (DAVILA, 1999). A concentração de Ca^{2+} no citosol é muito baixa, na ordem de (10^{-7} M), quando comparada com a concentração do meio externo (10^{-3} M) e dos estoques intracelulares (10^{-4} M). Este gradiente é mantido pela saída do íon de forma ativa por meio de bombas de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática, no retículo endoplasmático e na mitocôndria (KHANNA *et al.*, 1988). Existem, pelo menos, dois tipos de mecanismos que bombeiam o cálcio para fora da célula.

A bomba Ca^{2+} -ATPase que transporta Ca^{2+} contra o gradiente de concentração, envolvendo consumo de energia com gasto de ATP e são reguladas por proteínas Ca^{2+} - ligantes, as calmodulinas, e o sistema de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que utiliza o gradiente de Na^+ através da membrana, que é mantido pela atividade da bomba de Na^+ , para dirigir o efluxo de Ca^{2+} . Este sistema apresenta uma estequiometria de 3 Na^+ para 2 Ca^{2+} , e ocorre principalmente nas células eletricamente excitáveis (PETERSEN *et al.*, 1994; CARAFOLI *et al.*, 1996).

Por outro lado, o influxo de Ca^{2+} é mediado por uma variedade de canais que podem ser agrupados de acordo com o seu mecanismo de abertura:

- Canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV), ativados por despolarização da membrana. Estes canais são do tipo L, T, P, Q e R, diferindo entre si na sua cinética de ativação, modo de regulação e inativação via Ca^{2+} e sensibilidade a toxinas específicas (DUNLAP *et al.*, 1995);
- Canais operados por receptores, modulados pela ligação de agonistas/antagonistas;
- Canais operados por segundos mensageiros como nucleotídeos, diacilglicerol, entre outros;
- Canais operados por estoque que se abrem em resposta a redução da concentração de Ca^{2+} intracelular mediada pela participação do retículo endoplasmático, este mecanismo é denominado entrada capacitativa do cálcio (PUTNEY; BIRD, 1994).

A mobilização de Ca^{2+} dos estoques internos ocorre através de dois tipos de receptores que são o receptor de 1,4,5-inositoltrifosfato (IP_3), localizado no retículo endoplasmático, e o receptor de rianodina, localizado no retículo endoplasmático de alguns tipos celulares. Ambos estão ligados ao canal de Ca^{2+} , onde o receptor e canal iônico formam uma única unidade estrutural e podem ser abertos no processo de transdução do sinal (KRAUSS, 2003).

O cálcio também é vital para a reprodução em machos. Trabalhos realizados com bloqueadores de canais de Ca^{2+} demonstraram que a falta deste íon intracelular, leva a um significativo estresse oxidativo, com LPO da membrana dos espermatozoides, redução nos níveis de GSH, alterações nas enzimas antioxidantes, redução na contagem de espermatozoides no epidídimo e na motilidade dos espermatozoides, alteração no índice de fertilidade com redução no tamanho da ninhada de ratos (MORAKINYO *et al.*, 2009; 2011).

Considerando-se a importância do Ca^{2+} para as células testiculares, alterações nos sistemas de transporte de membrana e flutuações nos níveis intracelulares deste íon parecem ser alvos promissores nos mecanismos de toxicidade do Roundup sobre estas células.

1.8 Transporte de aminoácidos

Os primeiros estudos sobre os sistemas de transporte de aminoácidos, através de membranas plasmáticas, foram realizados em células de Ehrlich (ascites) por Christensen e colaboradores, entre as décadas de 1950 e 1960 (CHRISTENSEN *et al.*, 1973). Posteriormente, diversos trabalhos foram realizados por inúmeros pesquisadores mostrando esses sistemas nos mais diversos tipos celulares.

Os transportadores de aminoácidos são um grupo de proteínas de membrana que transportam diversos tipos de aminoácidos através da membrana plasmática, favorecendo o fornecimento de substratos para a biossíntese de proteínas e metabolismo de precursores de neurotransmissores e hormônios (MCGIVAN; PASTOR-ANGLADA, 1994; ALBERTS *et al.*, 2002).

Os sistemas de transporte de aminoácidos tem baixa especificidade quando comparado com a maioria das enzimas, ou seja, em uma mesma célula há diferentes tipos de transportadores e cada um destes pode transportar vários aminoácidos diferentes; porém, com características químicas e estruturais comuns entre eles. A configuração

da estrutura química, bem como a carga líquida iônica do aminoácido, são fatores que determinam o tipo de transportador desta molécula através da membrana (MCGIVAN; PASTOR-ANGLADA, 1994).

Os transportadores dividem-se em duas categorias gerais: transporte do tipo uniporte de aminoácidos e o transporte do tipo simporte acoplado ao íon sódio (Na^+). Neste simporte, o gradiente de Na^+ determina o transporte de aminoácidos através da membrana (O'DONNELL *et al.*, 2006). Há quatro principais sistemas de transporte de aminoácidos neutros (zwitteriônicos – com carga residual igual a zero) em células de mamíferos (ESCOTT *et al.*, 2011).

O Sistema ASC transporta alanina, serina e cisteína, mas pode reconhecer outros aminoácidos alifáticos e é dependente de cotransporte com Na^+ (KILBERG *et al.*, 1993). O Sistema L reconhece e transporta aminoácidos de cadeias ramificadas e aminoácidos aromáticos, sendo independente de Na^+ (MCGIVAN; PASTOR-ANGLADA, 1994). O Sistema N medeia à captação de glutamina, histidina e aspargina e também é um trocador de hidrogênio (H^+), íon que atua no cotransporte com Na^+ (SKINNER, 1991). O sistema A transporta aminoácidos neutros de forma dependente de Na^+ , particularmente alanina, serina e glutamina (REIMER *et al.*, 2000).

O sistema A é o mais conhecido e bem estudado dos sistemas, e tem suas atividades exercidas por estruturas pertencentes à família de proteínas transportadoras relacionadas ao gene SLC38 (REIMER *et al.*, 2000; BAIRD *et al.*, 2006). O sistema A é expresso em muitos tipos de células e sua atividade é altamente sensível ao pH, apresenta uma estequiometria de 1:1 em relação ao cotransporte com Na^+ (HYDE *et al.*, 2007), reconhece aminoácidos N-metilados, como o aminoácido α -(metil-amino)-isobutírico (MeAIB), um análogo não metabolizável da alanina amplamente utilizado para o estudo deste sistema (BAIRD *et al.*, 2006). O MeAIB não entra no núcleo e permanece no citosol sendo quantificado no estado basal e na presença de hormônios e bloqueadores. Portanto, o [^{14}C]-MeAIB serve como marcador específico para o estudo de eventos de membrana (GUIDOTTI *et al.*, 1978).

A atividade dos transportadores de aminoácidos do sistema A pode ser modulada a partir de diferentes estímulos, como adaptação à disponibilidade de aminoácidos, fatores de crescimento, choque osmótico, progressão do ciclo celular, estresses celulares e também estímulos hormonais (HÄUSSINGER; SCHLISS, 1999; SCHLISS; HÄUSSINGER, 2002; HYDE *et al.*, 2002). Além disso, o sistema A é eletrogênico e responsivo ao potencial de membrana, sendo que uma

alteração no potencial de membrana pode influenciar a cinética do transportador (GECK; HEINZ, 1976).

Vários hormônios tais como insulina (HYDE *et al.*, 2002), FSH, T₃ (SILVA *et al.*, 2002), T₄ (MENEGAZ *et al.*, 2006), 1 α ,25-(OH)₂-vitamina D₃ (MENEGAZ *et al.*, 2009, 2010) são hábeis na regulação do sistema A de transporte em diferentes tecidos. Em geral, a ação dos hormônios modifica a velocidade da captação dos aminoácidos neutros por esse transportador e gera alterações em sua expressão gênica (WASSERMANN *et al.*, 1992).

Diversos estudos tem sugerido a possível translocação desses transportadores para a membrana plasmática a partir de reservatórios endossomais intracelulares, de forma semelhante àquela descrita para a translocação de GLUT4 (isoforma 4 dos transportadores de glicose) (WASSERMANN *et al.*, 1989; FERRER-MARTINEZ *et al.*, 1994; LING *et al.*, 2001; HYDE *et al.*, 2002). Considerando-se que sistemas de transportes de aminoácidos atuam como fornecedores de substratos para a biossíntese de proteínas e de GSH, como também podem ser usados como marcadores específicos para estudar eventos de membrana, alterações na captação de aminoácidos podem representar um dos alvos do mecanismo de toxicidade do herbicida Roundup sobre o sistema reprodutor masculino.

1.9 Testículos

Os testículos são órgãos pareados e encapsulados cuja função básica é promover a produção de espermatozóides e de hormônios esteróides e proteicos, essenciais à função reprodutiva masculina (FAWCETT *et al.*, 1970).

Este órgão é revestido externamente por uma cápsula conjuntiva (túnica albugínea) que envia septos para o seu interior, dividindo-o em lóbulos. Nestes lóbulos são encontrados dois compartimentos: o compartimento intersticial ou intertubular, que contém vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras de tecido conjuntivo, macrófagos, mastócitos e células de Leydig, e o compartimento tubular onde se encontram os túbulos seminíferos que são constituídos pela túnica própria, epitélio seminífero e lumen tubular. Na túnica própria encontram-se as células mióides ou peritubulares, a membrana basal e as fibras colágenas. No epitélio seminífero, estão presentes as células de Sertoli e as da linhagem espermatogênica. Este epitélio compõe-se de quatro camadas de células germinativas distintas: na camada basal

observam-se espermatogônias e espermatócitos primários iniciais, nas camadas intermediárias observam-se gerações de espermatócitos primários mais desenvolvidos e espermatócitos secundários, e na camada adluminal, espermátides (figura 10). Este complexo é bem organizado e pode ser dividido em três fases, baseando-se em considerações morfológicas e funcionais: (1) fase proliferativa (espermatogônias), na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas, (2) fase meiótica (espermatócitos), na qual o material genético é duplicado e passa por recombinação genética, e (3) fase de diferenciação (espermátides), na qual as espermátides sofrem intensas modificações, transformando-se em espermatozóides. No lúmen tubular encontra-se o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozóides (RUSSELL *et al.*, 1990).

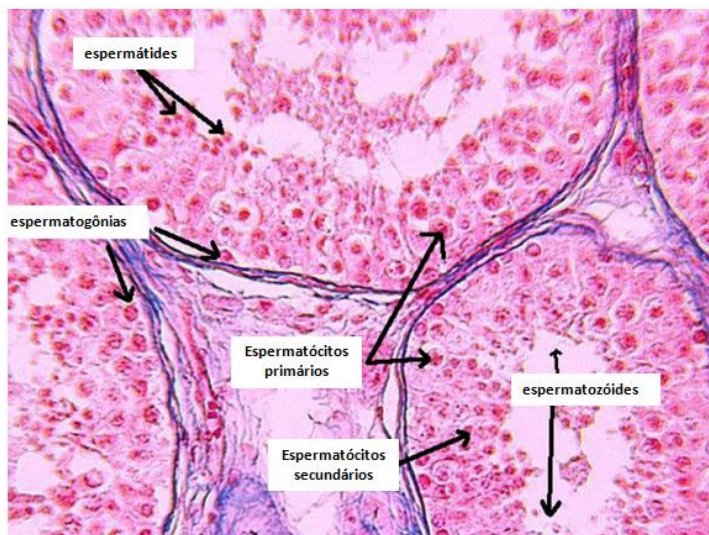


Figura 10. Túbulos seminíferos e a linhagem espermatogênica composta por espermatogônias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermátides e espermatozóides na luz tubular. Adaptado de http://minerva.ufpel.edu.br/~mgrheing/cd_histologia/especial/testículo.htm

1.9.1 Células de Sertoli

As células de Sertoli são células somáticas que apóiam-se sobre a membrana basal do tubo seminífero e atingem a superfície do epitélio. São basicamente prismáticas ou piramidais, com cerca de 70µm de

altura, embora os seus contornos se apresentem muito irregulares devido à presença de numerosos recessos laterais onde se alojam os elementos da linha espermatogênica ou seminal (figuras 11 e 12) (JÉGOU, 1992; FAWCETT *et al.*, 1994).

O seu núcleo é irregular e possui formato triangular que varia durante o ciclo seminífero determinando a arquitetura deste epitélio (COLE; CUPPS, 1984). O alto grau de plasticidade da célula se deve ao elaborado citoesqueleto que lhe permite alterar de configuração, adaptando-se à associação feita com as células germinativas (FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005).

Ao microscópio eletrônico é possível observar que as células de Sertoli se ligam às da linhagem germinativa através de especializações juncionais características (O'DONNELL *et al.*, 2000). As junções entre células de Sertoli adjacentes formam uma barreira, a barreira hemato-testicular, que divide funcionalmente o epitélio seminífero em dois compartimentos: o basal e o adluminal (RUSSELL *et al.*, 1990; SETCHELL *et al.*, 1994).

A renovação e proliferação das espermatogônias até espermatócito primário em pré-leptóteno ocorrem no compartimento basal, ou seja, abaixo das junções entre células de Sertoli adjacentes. No início da fase de leptóteno da primeira divisão meiótica, os espermatócitos primários migram através da barreira para o compartimento adluminal, onde a meiose continua e a espermiogênese ocorre (RUSSELL *et al.*, 1990).

A barreira hemato-testicular cria um compartimento exclusivo onde as células germinativas ficam isoladas em um ambiente especializado. Esta barreira protege as células germinativas, impedindo a passagem de agentes nocivos e complexos imunológicos oriundos do tecido intersticial (SHARPE *et al.*, 2003; LOSS *et al.*, 2007). As junções entre as células de Sertoli modificam-se de modo a permitir a passagem dos espermatócitos em pre-leptóteno do compartimento basal para o adluminal, quando estes iniciam a meiose, o que significa que existe uma dinâmica das junções que permite que as células envolvidas no processo da espermatogênese movam-se no sentido da luz do tubo seminífero, sem ruptura da barreira (LUI *et al.*, 2001). Isoladas no ambiente tubular as células germinativas tornam-se dependentes de suporte físico e nutricional das células de Sertoli (SHARPE *et al.*, 2003; MRUK; CHENG, 2004).

As células de Sertoli desempenham papel fundamental na regulação da espermatogênese (RUSSELL; GRISWOLD, 1993). Estas

células desempenham várias funções tais como: nutrição e fornecimento de suporte físico (sustentação) para as células germinativas em desenvolvimento, manutenção da integridade do epitélio seminífero, secreção de fluido testicular principalmente em direção ao lúmen tubular, secreção de fatores de crescimento e diversas proteínas, como a ceruloplasmina, transferrina, algumas proteases, inibidores de proteases, e glicoproteínas inibitórias. Atuam também de forma parácrina com as células adjacentes, tendo participação na espermiacão liberando as espermátides no lúmen tubular, na fagocitose de células germinativas em degeneração e do excesso de citoplasma (corpo residual) remanescente após a liberação das espermátides, na esteroidogênese e no metabolismo de esteróides (RUSSELL *et al.*, 1990; GNESSI, 1997; GRILLO; GRISWOLD, 1998; CARREAU *et al.*, 1999; HESS, 2000; FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005).

As células de Sertoli são reguladas pelos hormônios folículo estimulante (FSH) e testosterona (T). Embora FSH e T tenham distintos mecanismos de ação, eles agem sinergicamente para promover a espermatogênese (GORCZYŃSKA-FJÄLLING, 2004).

O desenvolvimento normal das células de Sertoli é fundamental para a formação de testículos funcionais e expressão do fenótipo masculino. Tal é sua complexidade, que as células de Sertoli apresentam estrutura e funções características em cada período do desenvolvimento, no processo de formação dos testículos ou diferenciação sexual e na espermatogênese (SHARPE *et al.*, 2003).

A proliferação das células de Sertoli é essencial para fornecer suporte estrutural e funcional para a diferenciação e a proliferação das células germinativas (SHARPE *et al.*, 2003). O período de proliferação varia de espécie para espécie. Em ratos, a proliferação ocorre até, aproximadamente, os 15 dias de vida do animal, enquanto que em humanos a proliferação se divide em dois momentos: da vida fetal até 12 a 18 meses de vida e na puberdade, entre 10 e 13 anos, entre esses períodos proliferativos as células entram num período quiescente, onde não há proliferação (STEINBERGER; STEINBERGER, 1971; SHARPE *et al.*, 2003).

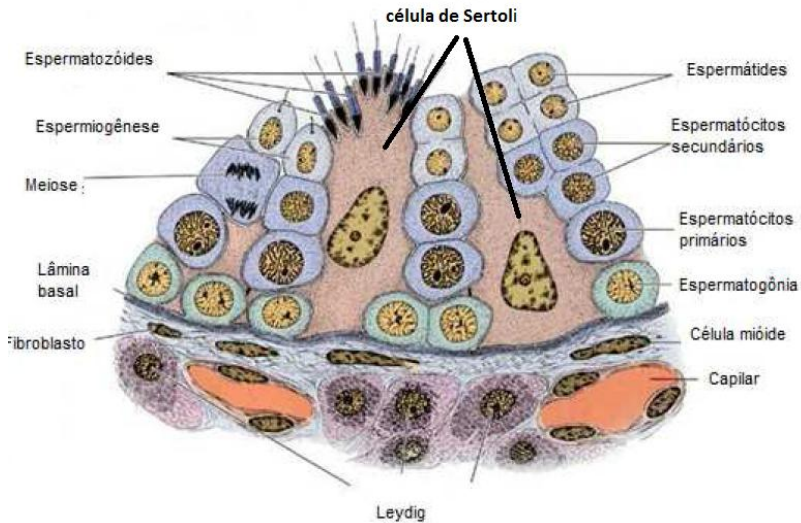


Figura 11. Ilustração esquemática célula de Sertoli. Adaptado de <http://www.ronaldschulte.nl/Preparaten%20Testis%2001.htm>

Cada célula de Sertoli suporta um número fixo de células germinativas dependendo da espécie, o que determinará o tamanho potencial do testículo e a produção espermática na fase adulta (FRANÇA; RUSSELL, 1998). No homem, a célula de Sertoli é pouco eficiente, pois apresenta uma capacidade de suporte de, aproximadamente, três espermatídes por célula de Sertoli e uma produção espermática diária de, aproximadamente $4,5 \times 10^6$ espermatozoides por grama de testículo (SHARPE, 1994). Após a puberdade, as células de Sertoli praticamente cessam sua fase proliferativa (FRANÇA; RUSSELL, 1998; FRANÇA *et al.*, 2005).

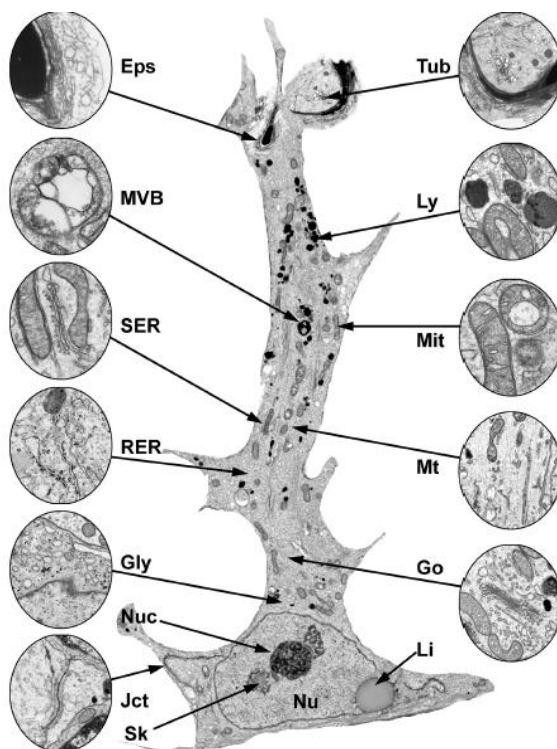


Figura 12. Montagem de uma célula de Sertoli típica. Legenda: **Nu** (núcleo), **Li** (gotículas lipídicas), **Sk** (cariossoma satélite), **Jct** (junções tight), **Nuc** (nucléolo) **Gly** (glicogênio), **Go** (complexo de Golgi), **RER** (retículo endoplasmático rugoso), **Mt** (mitocôndria), **SER** (retículo sarcoplasmático), **Ly** (lisossomos), **MVB** (multivesículas corporais), **Tub** (complexos tubulobulbar), **Eps** (especializações ectoplasmáticas). Fonte HESS; FRANÇA (2005).

Apesar de diversos dados da literatura demonstrarem a influência do Roundup sobre o sistema endócrino e sobre a espermatogênese, o mecanismo de ação e as vias de sinalização envolvidas nos efeitos deletérios deste herbicida sobre o sistema reprodutor masculino ainda não é conhecido. Considerando-se que as células de Sertoli desempenham um papel central na regulação e manutenção da espermatogênese e que o glifosato é um potente desregulador endócrino, propomos investigar os efeitos do herbicida Roundup sobre o transporte de membrana e a indução de estresse oxidativo nestas células.

3. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os mecanismos envolvidos na citotoxicidade induzida pela exposição ao herbicida glifosato-Roundup sobre o influxo de cálcio e aminoácidos, e a indução de estresse oxidativo em células testiculares de ratos pré-púberes.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Estudar o efeito do herbicida glifosato, tanto isolado quanto na formulação comercial Roundup sobre o influxo de Ca^{2+} em testículos inteiros e em células de Sertoli em cultura, assim como sobre a viabilidade celular;
- ✓ Investigar os mecanismos envolvidos na captação de Ca^{2+} induzida pelo Roundup através da utilização de bloqueadores de canais de cálcio;
- ✓ Verificar o efeito do Roundup sobre a atividade da GGT em testículo de ratos, considerando-se a importância da expressão desta enzima nas células de Sertoli para a função reprodutiva;
- ✓ Avaliar o envolvimento das vias de sinalização da PLC/PKC, MAPKs (ERK1/2 e p38), PKA e PI3K/Akt no influxo de Ca^{2+} e na atividade da GGT induzidos por Roundup em células testiculares;
- ✓ Caracterizar mecanismos de proteção celular aos danos causados pelo herbicida estudado, utilizando-se os agentes antioxidantes vitamina C e E (isolados ou em associação);
- ✓ Verificar a provável indução de estresse oxidativo por Roundup através da determinação dos níveis de TBARS, proteína carbonilada (PC) e GSH;
- ✓ Estudar o efeito do Roundup sobre a atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, GR, GST, G6PD, AST e ALT em testículos de ratos pré-púberes;
- ✓ Avaliar as consequências da exposição ao Roundup no acúmulo de aminoácidos neutros, utilizando-se o aminoácido modelo ^{14}C -MeAIB, em células testiculares em desenvolvimento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

As substâncias radiotivas ($[^{14}\text{C}]$ MeAIB) (sp.act. 1.85 GBq/mmol), $[^{45}\text{Ca}]\text{CaCl}_2$ (sp. act. 321 KBq/mg Ca^{2+}) foram obtidos da Du Pont NEN Products, Boston, USA e o líquido de cintilação biodegradável Optiphase Hisafe III foi adquirido da Perkin Elmer São Paulo-SP (Brasil). Foi utilizado o Roundup produzido pela empresa Monsanto (St Louis, MO). Os anticorpos Anti-p44/42 MAP cinase (anti-ERK1/2), anti-phospho-p44/42 MAP cinase (anti-phospho ERK1/2), anti p38^{MAPK} e anti-phospho p38^{MAPK} foram adquiridos da Cell Signaling Technology, Inc. (EUA). O glifosato de grau analítico (P.A., para análise), os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo, o meio Ham's F12/DMEM, antibióticos e fungicida para a cultura celular, e todos os inibidores enzimáticos, antagonistas de receptores, bloqueadores de canais, substâncias antioxidantes, foram adquiridos da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os demais reagentes foram de grau analítico (P.A.).

3.2 Animais

Ratos machos (linhagem Wistar) de 30 dias de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e submetidos a um ciclo claro/escuro (12/12 horas), em sala climatizada com temperatura controlada, ração padronizada e água à vontade. Todos os animais foram monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Conselho de Medicina Veterinária (CMV) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolo PP00471/CEUA/UFSC.

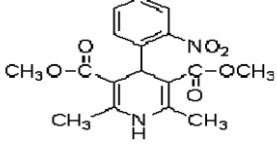
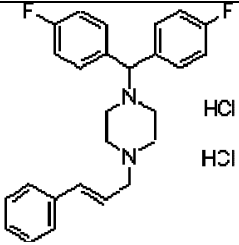
3.3 Tratamento *in vitro*

O glifosato-Roundup foi utilizado em modelo experimental de exposição *in vitro* com o intuito de avaliar as ações desta substância sobre células testiculares. Para tanto foram utilizados ratos Wistar de 30 dias de idade (corresponde ao período pré-púbere do desenvolvimento sexual). No dia do experimento os animais foram sacrificados por decapitação, os testículos foram removidos, descapsulados e fatiados. As fatias foram previamente incubadas por 15 min em tampão Krebs-

Ringer bicarbonato (KRb = NaCl 122mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10mM) a 34°C, pH 7,4, em banho metabólico Dubnoff sob agitação em atmosfera carbogênica (O₂:CO₂, 95:5 v/v), para estabilização dos tecidos, seguido por uma incubação de 30 minutos na presença ou ausência de 36 ppm de glifosato-Roundup. Nos experimentos onde foram utilizados inibidores enzimáticos, antagonistas de receptores, bloqueadores de canais ou substâncias antioxidantes, as fatias foram pré-incubadas novamente por 15 minutos na presença ou ausência de tais substâncias e posteriormente incubadas por 30 minutos com ou sem glifosato ou Roundup. Ao final da incubação o tecido foi rapidamente lavado em KRb e homogeneizado em tampões específicos, de acordo com a determinação bioquímica a ser realizada.

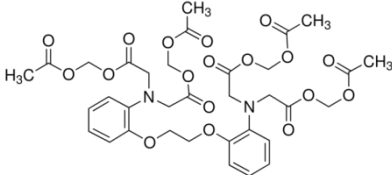
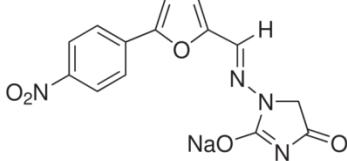
Os bloqueadores e inibidores utilizados podem ser visualizados nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Compostos utilizados para o estudo do envolvimento dos CCDV no influxo de Ca²⁺ e na atividade da enzima GGT estimulados pelo glifosato-Roundup.

Composto	Ação farmacológica	Estrutura química
Nifedipina	Bloqueador dos CCDV-L	
Flunarizina	Bloqueador dos CCDV-T	

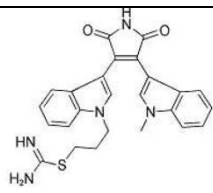
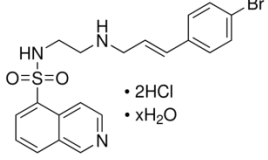
Fonte: www.sigmaaldrich.com/brazil

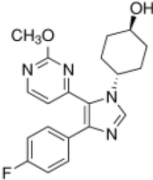
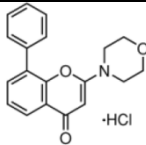
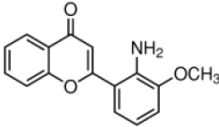
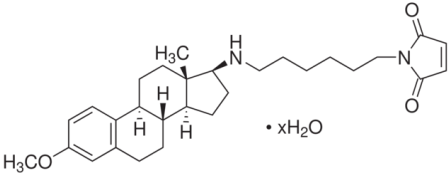
Tabela 2. Compostos utilizados para demonstrar a participação do Ca^{2+} intracelular nos eventos ativados pelo glifosato-Roundup.

Composto	Ação farmacológica	Estrutura química
BAPTA-AM	Quelante de Ca^{2+} intracelular	
Dantrolene	Antagonista do receptor de rianodina	

Fonte: www.sigmaaldrich.com/brazil

Tabela 3. Inibidores de proteínas cinases e da PLC utilizados no estudo do mecanismo de ação do Roundup sobre as células testiculares.

Composto	Ação farmacológica	Estrutura química
Ro 31-3220	Inibidor de PKC	
H-89	Inibidor da PKA	 • 2HCl • xH ₂ O

SB 239063	Inibidor da p38 MAPK isoformas α e β	
LY 294002	Inibidor da PI3K	
PD 98059	Inibidor da MEK1/2, rota ERK 1/2	
U 73122	Inibidor da PLC	

Fonte: www.sigmaaldrich.com/brazil

3.4 Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Testículos ou culturas de células de Sertoli de ratos de 30 dias de idade foram pré-incubados em tampão KRb por 15 min a 34 °C, pH 7,4, em banho metabólico sob agitação e atmosfera carbogênica ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5 v/v). Após, o meio foi trocado por KRb fresco com 0,1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e o tecido ou as células de Sertoli foram incubados durante 30 minutos na ausência (controle) ou presença do 36 ppm de glifosato-Roundup. Em alguns experimentos, inibidores protéicos, bloqueadores de canais ou substâncias antioxidantes foram adicionados durante o período de pré-incubação e mantidos durante o período de incubação (ZAMONER *et al.*, 2007; MENEGAZ *et al.*, 2010). Posteriormente, o $^{45}\text{Ca}^{2+}$ extracelular foi totalmente lavado com uma solução de cloreto de lantânio (127,5 mM NaCl, 4,6 mM KCl, 1,2 mM MgSO_4 , 10 mM HEPES, 11 mM Glicose, 10 mM LaCl_3), pH 7,3 a 2 °C, interrompendo o fluxo de cálcio na preparação (BATRA; SJÖGREN,

1983). Após 30 min, a solução de cloreto de lantânio foi removida e 250 μL de NaOH 0,5 M foram adicionados a cada amostra. Aliquotas de 100 μL deste homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, que foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA), e uma alíquota de 5 μL foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os resultados foram expressos como $\text{pmol } ^{45}\text{Ca}^{2+} / \mu\text{g}$ de proteína (ZAMONER *et al.*, 2007).

3.5 Transporte de aminoácidos

No estudo do transporte de aminoácidos, os testículos foram pré-incubados em tampão KRb por 15 min a 34 °C, pH 7.4 em um banho metabólico sob agitação em atmosfera carbogênica ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5 v/v). No período de incubação (60 min), o tecido foi transferido para um meio igual ao anterior, porém, na presença do aminoácido modelo do sistema A de transporte, o [^{14}C]-MeAIB (3,7 kBq/mL) (SILVA *et al.*, 2001). O glifosato-Roundup (36 ppm) foi adicionado nos últimos 30 min de incubação com o radioativo. Após a incubação as fatias foram lisadas em NaOH 0,5 M e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Após o processamento das amostras, alíquotas de 25 μL do líquido tissular e do meio de incubação foram utilizadas para medir a radioatividade do [^{14}C]-MeAIB num espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). Os resultados foram expressos pela razão da radioatividade no tecido e no meio de incubação, avaliada pelo número de contas por minuto (cpm), por mL do líquido tissular/número de contas por minuto por mL do líquido de incubação por μg de proteína (T/M).

3.6 Cultura primária de células de Sertoli

Alguns experimentos foram realizados em culturas de células de Sertoli de ratos de 30 dias de idade, da linhagem Wistar. Os ratos foram mortos por decapitação, os testículos foram removidos e decapsulados. As células de Sertoli foram obtidas por digestão enzimática sequencial de acordo com o método de Dorrington *et al.* (1975). As células obtidas foram semeadas na densidade de 650.000 células/ cm^2 , em placas de 24 poços e cultivadas por 72 hs em meio Ham's F12/DMEM (1:1)

suplementado com soro de reposição 3, bicarbonato de sódio 2,2 g/L, antibióticos (penicilina 50.000 UI/L, estreptomicina 50 mg/L e kanamicina 50 mg/L) e fungicida (anfotericina B 0,25 mg/L), em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂, a 32 °C. No terceiro dia, as células germinativas foram removidas do meio de cultura através de um breve tratamento hipotônico com uma solução de Tris-HCl 20 mM, pH 7,2 (GALDIERI *et al.*, 1981; BOURAÏMA-LELONG *et al.*, 2010), sendo após lavadas com PBS e adicionado meio fresco Ham's F12/DMEM (1:1) (ZANATTA *et al.*, 2011). No quinto dia após o cultivo, as células foram utilizadas para estudar o efeito do Roundup sobre a captação de ⁴⁵Ca²⁺ e a viabilidade celular.

3.7 Imunodeteção de proteínas

Para investigar o envolvimento das vias de sinalização foi realizada a imunodeteção utilizando anticorpos específicos para as formas total e fosforilada das MAPKs, ERK1/2 e p38. Após o tratamento com o glifosato-Roundup (36 ppm) os testículos foram homogeneizados em 300 µL de uma solução de lise contendo EDTA 2 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, 4% SDS (p/v) e a concentração de proteínas foi determinada (LOWRY *et al.*, 1951). As amostras foram dissolvidas em uma solução 25% (v/v) contendo 40% de glicerol, 5% 2-mercaptoethanol, Tris-HCl 50 mM, pH 6.8 e foram fervidas durante 3 minutos. Para a análise de eletroforese, concentrações iguais de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, analisadas em SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência (Trizma 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% e SDS 0,25%) (60 min). As membranas de nitrocelulose foram lavadas e incubadas por 2h em solução bloqueadora (TBS; NaCl 0,5M, Trizma 20 mM e leite em pó desnatado 5%). Após a incubação as membranas foram lavadas e então incubadas durante a noite (18h) a 4°C com o anticorpo primário (anti-ERK1/2, anti-phospho ERK1/2, anti p38^{MAPK} ou anti-phospho p38^{MAPK}, diluídos 1:2000). Após a incubação com os anticorpos, as membranas foram lavadas e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, diluído 1:2000) para posterior revelação. O *blot* foi revelado (ImmobilonTM Western chemiluminescence HRP substrate kit), as autoradiografias foram quantificados com scanner Hewlett-Packard Scanjet 6100C e a densidade óptica foi determinada com o programa

OptiQuant versão 02.00 da Packard Instrument Company (ZAMONER *et al.*, 2008).

3.8 Viabilidade celular - atividade da LDH liberada no meio extracelular

A diminuição da viabilidade celular foi determinada pela atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio extracelular. Os testículos ou as células de Sertoli em cultura foram expostos ao glifosato-Roundup (36 ppm) por 30 min, o meio de incubação foi coletado, e a atividade da LDH no meio extracelular foi medida através de um método colorimétrico (leitura a 500 nm) utilizando-se um “kit” comercial (Dolles[®]). A atividade da LDH foi determinada através da mensuração da oxidação do NADH e os resultados foram expressos como U/L/mg de proteína. A metodologia foi adaptada a partir das instruções do fabricante.

3.9 Atividade da G6PD

Para o ensaio da enzima G6PD, os testículos foram incubados por 30 min com ou sem glifosato-Roundup (36 ppm), homogeneizados em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4, e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). Uma alíquota do homogeneizado foi incubada na presença de NADP⁺ levando a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato. O NADPH produzido foi quantificado de modo cinético a 570 nm durante 10 minutos. Os resultados foram calculados pela avaliação do aumento da densidade óptica por minuto (declínio) da amostra contra o "declínio" da atividade enzimática do padrão de G6PD. Os resultados foram expressos como U/ μ g proteína.

3.10 Atividade da GGT

Após a incubação dos testículos ou das células de Sertoli na presença ou ausência de glifosato-Roundup (36 ppm), inibidores de vias de sinalização e/ou bloqueadores de canais, as células/testículos foram homogeneizadas em 300 μ L de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). A atividade da GGT foi determinada usando-se a técnica modificada descrita por Orłowsky e Meister (1963), utilizando L- γ -

glutamil-p-nitroanilina como substrato e glicilglicina como molécula aceptora.

Alíquotas do homogenato do tecido foram incubadas com o substrato enzimático por 60 min a 37 °C, e a reação enzimática foi boqueada pela adição de ácido acético. As absorbâncias das amostras foram determinadas num leitor de placas (Tecan Infinite® 200 PRO) a 530 nm. Os resultados foram expressos como U/L/ μ g proteína.

3.11 Atividade das enzimas AST e ALT

Após a incubação dos testículos com ou sem glifosato-Roundup (36 ppm), o tecido foi homogeneizado em 300 μ L de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4, e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), sendo que a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinadas através da utilização de Kits colorimétricos (Gold Analisa®), adaptados a partir das instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como U/L/mg de proteína.

Na reação, a AST catalisa a transferência do grupo amina do substrato ácido-L-aspartico para o ácido alfa-cetogutárico com formação de glutamato e oxaloacetato. O oxaloacetato formado reage com a 2-4-dinitrofenilhidrazina, formando a hidrazona. A ALT catalisa a transferência do grupo amina do substrato L-alanina para o ácido alfa-cetogutárico com formação de glutamato e piruvato. O piruvato formado reage com a 2-4-dinitrofenilhidrazina também formando a hidrazona. A partir daí, ambas as reações adquirem coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio, e a intensidade da coloração (leitura em 505 nm) é proporcional à atividade enzimática da amostra.

3.12 Conteúdo de GSH

Para determinar o conteúdo de GSH, os testículos foram pesados antes da incubação na presença ou ausência de 36 ppm de glifosato-Roundup. Após a incubação os testículos foram homogeneizados com solução de ácido tricloroacético 12%, (TCA 12%) na proporção de 1:10 p/v. As determinações foram realizadas com o sobrenadante após a centrifugação do homogeneizado. Todas as análises foram realizadas em duplicata, e mantidas em gelo durante todo o ensaio.

Os níveis de glutatona foram determinados segundo o método descrito por Beutler *et al.* (1963), que é baseado na reação da GSH com DTNB (5,5'-Dithiobis(ácido 2-nitrobenzóico) formando um ânion conjugado, TNB (ácido tionitrobenzóico) de cor amarelada, que é mensurável em 412 nm. Para a realização da técnica, uma alíquota de 50 μL da amostra foi acrescentada na cubeta contendo 950 μL de Tampão Fosfato 0,2 M pH 8,0, seguida da adição de 100 μL de DTNB 2,5 mM. Após cerca de 2 min obtém-se a máxima formação de TNB, que é medida espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos como conteúdo de GSH $\mu\text{mol.g}^{-1}$.

3.13 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

Para a determinação dos níveis dos marcadores de danos oxidativos (TBARS e proteína carbonilada - PC), assim como da atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx, GR e GST, os testículos foram pesados, pré-incubados em KRb e posteriormente incubados com ou sem Roundup por 30 min. Após a incubação, os testículos foram homogeneizados com uma solução contendo tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4; 0,1% Triton e NaCl 150 mM, (1:20 p/v), e uma alíquota foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry *et al.* (1951). As determinações enzimáticas foram realizadas usando-se o sobrenadante após centrifugação do homogeneizado (5.000 x g por 5 min). Todas as análises foram determinadas em duplicatas em pelo menos 3 experimentos independentes (n=6 animais por experimento).

3.13.1 Catalase

A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por Aebi (1984), que é baseado na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato 50 mM pH 7,0. Adicionou-se 2 mL desta solução na cubeta, com acréscimo de 20 μL da amostra, em seguida realizou-se leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 30 segundos. Os valores foram expressos em $\text{mmol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

3.13.2 Superóxido dismutase

A atividade da SOD foi realizada de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2.0 para pH 10.0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, o qual é mensurado em 480 nm. A amostra adicionada na cubeta com a solução de adrenalina retarda a oxidação e conseqüentemente a produção de adrenocromo através da enzima SOD. Em uma cubeta contendo 1,95 mL de glicina 50 mM, pH 10.2, foram adicionados 50 µL de adrenalina 60 mM (pH em torno de 2.0, gelo e frasco âmbar). A velocidade inicial de formação do adrenocromo foi monitorada durante cerca de 100s do início da reação, com acréscimo de absorbância a cada intervalo de 15s em torno de 0,013-0,015 unidades, para então adicionar a alíquota da amostra, geralmente em torno de 20 a 50 µL, dependendo da concentração e atividade da enzima presente nesta alíquota, totalizando um tempo de aproximadamente 3 min. Curvas de 3 ou 4 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD (USOD/g) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo.

3.13.3 Glutathiona peroxidase

Para a análise enzimática de GPx o método de Flohé e Gunzler (1984) foi utilizado, no qual a reação é baseada na redução de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx, e conseqüente regeneração de GSH através da enzima GR, com oxidação de NADPH em 340 nm. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade de GPx na amostra. Para a realização da técnica, foi preparado um meio de reação contendo 25 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 7.0), 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) a 5 mM, 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH, e 5 U de GR, no momento do ensaio. Em seguida, foram adicionados 10 µL de t-BuOOH e 10 µL de amostra em 1 mL de um meio de reação na cubeta. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

3.13.4 Glutaciona redutase

A GR foi determinada pelo método de Calberg e Mannervick (1985), o qual verificou em 340 nm a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de GSH, a partir da GSSG, pela ação desta enzima presente na amostra. Um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de glutaciona oxidada e DPTA 5 mM foi adicionado na cubeta (0,95mL), e a adição de 50µL de amostra deu início a reação que foi monitorada durante 3 minutos, gerando uma curva descendente. Os valores da atividade desta enzima foram também expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.13.5 Glutaciona S-transferase

A atividade da GST foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Habig e colaboradores (1976). A reação baseia-se na capacidade da GST em conjugar GSH no substrato, formando uma substância mensurável em 340 nm, monitorada durante 3 minutos. A amostra foi adicionada a um meio contendo 10 µL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) (substrato), 10 µL de GSH 0,1 M e 970 µL de tampão fosfato 0,1 M pH 7.0, além da cubeta de referência, na qual foram adicionados os mesmos reagentes, com exceção da amostra. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.14 Determinação dos marcadores de danos oxidativo

3.14.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS

A avaliação do dano oxidativo lipídico foi realizada no homogenato através da detecção de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o produto majoritário, malondialdeído (MDA), produzindo uma base de Schiff de coloração rosa, os quais são derivados de oxidação do processo de lipoperoxidação (BIRD; DRAPER, 1984). O método consiste na precipitação da amostra (100 µL) com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 12%, seguido da incubação em 900 µL de tampão tris-HCl 60 mM 7,4 e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 min. a 100 °C. Posteriormente, o material foi resfriado em banho de gelo, centrifugado (5.000 x g por 5 min), e a mensuração do cromóforo rosa foi detectada 535 nm, os valores foram expressos em $\text{nmol MDA} \cdot \text{g}^{-1}$.

3.14.2 Proteína carbonilada

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado na amostra pelo método descrito por Levine e colaboradores (1990). Inicialmente foram adicionados 100 μL da amostra em 600 μL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 Mm preparado em solução de HCl 2 N, seguido de uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação contínua. Após, foi adicionado 600 μL de TCA 20 %, com agitação e banho de gelo durante 10 min, seguido de centrifugação (5 min a 10.000 x g), e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado por três vezes consecutivas (centrifugação por 5 min a 10.000 x g), com 800 μL de etanol-acetato de etila (1:1 v/v). Finalmente, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete e foram adicionados 900 μL de guanidina 6,0 M preparada em solução de KH_2PO_4 20 Mm, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C com agitação contínua por 60 min, para posteriormente proceder a leitura a 360 nm. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol.mg^{-1} proteína.

3.15 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações realizadas em duplicatas em 3 a 4 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste “t” de Student ou ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni, quando necessário, utilizando-se o programa INSTAT versão 2.02. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Envolvimento do cálcio no mecanismo de toxicidade induzido pelo Roundup em testículos de ratos de 30 dias

Para estudar a toxicidade induzida pelo Roundup em testículos de ratos pré-púberes (30 dias) na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e na viabilidade celular, foi realizada inicialmente uma curva de dose-resposta. Os testículos foram expostos a diferentes concentrações de glifosato na formulação Roundup que variaram de 0,72 a 360 ppm e alterações na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e viabilidade celular foram investigadas. Os resultados mostraram que a exposição ao glifosato-Roundup durante 30 min estimulou o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, em doses que variaram de 7,2 a 36 ppm, no entanto, 360 ppm de glifosato-Roundup levou a uma diminuição importante no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Figura 13A). A fim de investigar se as alterações na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foram acompanhadas de morte celular, a liberação de LDH citosólica para o meio extracelular foi medida. A Figura 13B mostra que concentrações de glifosato-Roundup superiores a 36 ppm são capazes de induzir a morte celular. Além disso, a redução na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ com 360 ppm de glifosato-Roundup (Figura 13A) é coincidente com a liberação mais proeminente do conteúdo LDH para o meio extracelular (Figura 13B).

É importante enfatizar que as diluições de Roundup utilizadas na agricultura variam de 10.000 a 20.000 ppm, concentrações muito maiores do que as descritas nos nossos resultados.

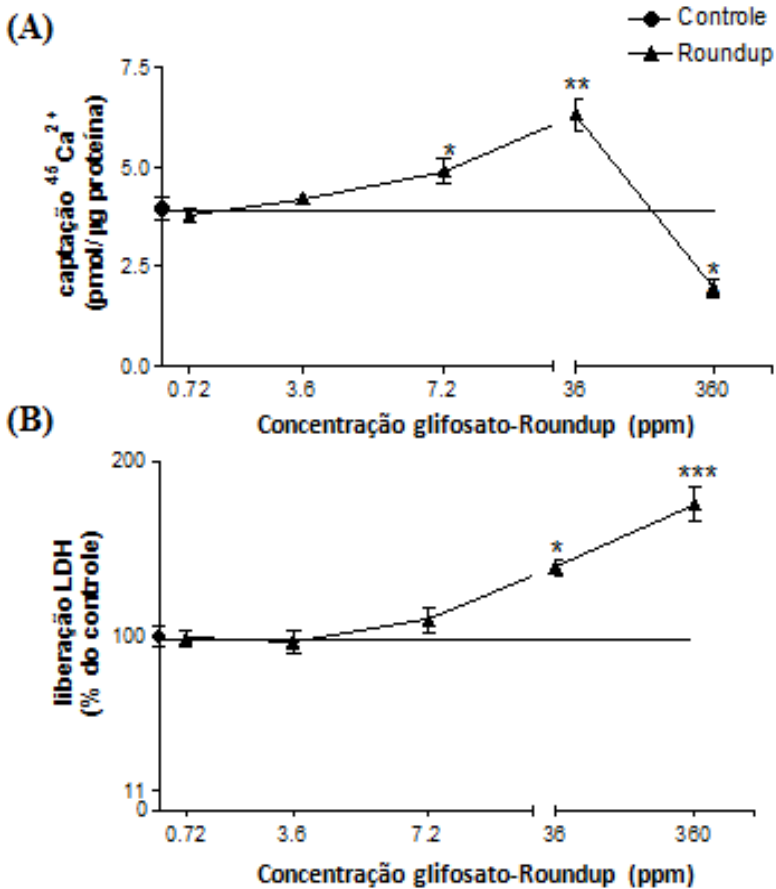


Figura 13. Curva dose-resposta do Roundup na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (A) e na viabilidade celular (B) em testículos de ratos de 30 dias de idade. Os testículos foram pré-incubados por 15 min e então incubados por 30 min com $0,1\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, com ou sem glifosato-Roundup em diferentes concentrações (0,72 a 360 ppm). Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

4.2 Mecanismos envolvidos na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzidos pelo Roundup e glifosato de grau analítico

Uma vez que o Roundup estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, foram utilizados bloqueadores específicos para caracterizar as vias de entrada de Ca^{2+} moduladas por este pesticida. Os experimentos seguintes foram realizados utilizando-se 36 ppm de glifosato-Roundup, uma concentração capaz de estimular tanto a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ quanto a viabilidade celular. A Figura 14A mostra que a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzida pelo Roundup ocorre através de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (CCDV-L), como demonstrado pelo uso de 10 μM nifedipina (bloqueador de CCDV-L). A participação do cálcio nos eventos ativados pelo Roundup foi confirmada usando 50 μM BAPTA-AM (quelante de cálcio intracelular) e 50 μM dantrolene (antagonista do receptor de rianodina). Os resultados mostraram que a co-incubação do Roundup com cada uma destas substâncias foi capaz de prevenir a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzida pelo herbicida, sugerindo a dependência dos níveis de Ca^{2+} intracelular mediando seus efeitos (Figura 14A).

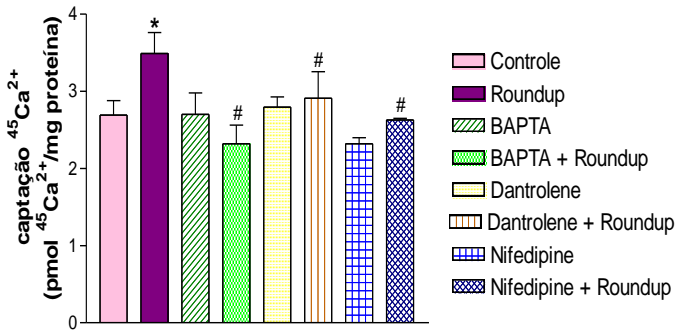
A fim de esclarecer os mecanismos envolvidos na captação de Ca^{2+} mediada pelo Roundup, e a contribuição das vias de sinalização PLC, PKC e PKA nos efeitos do pesticida, foram utilizados os seguintes inibidores destas vias: 30 μM U73122 (inibidor PLC), 20 μM Ro-31.8220 (inibidor PKC) e 10 μM H89 (inibidor PKA). Os resultados mostraram que a U73122 foi capaz de prevenir totalmente o efeito do pesticida sobre a captação de Ca^{2+} , enquanto que Ro 31.8220 preveniu parcialmente o influxo de Ca^{2+} induzido pelo Roundup, evidenciando um mecanismo dependente de PLC e PKC, respectivamente. Por outro lado, o H89, foi ineficaz na prevenção de tal efeito, sugerindo que a ativação da PKA não está envolvida no modo de ação deste pesticida (Figura 14B).

A participação de outras proteínas cinases, tais como PI3K, e vias de sinalização MAPKs (MEK/ERK e p38) no mecanismo de ação do Roundup foi investigada utilizando os inibidores específicos: 10 μM LY294002 (inibidor da PI3K), 30 μM PD98059 (inibidor de MEK) e 10 μM SB239063 (inibidor da p38). Os resultados demonstraram que todos os inibidores preveniram totalmente o efeito estimulatório do pesticida na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Figura 14C), o que sugere que a habilidade do Roundup em aumentar a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ pode estar associada a ativação de várias vias de transdução de sinais. Juntos, estes resultados demonstram o envolvimento da PLC/ PKC, PI3K, ERK e p38 no

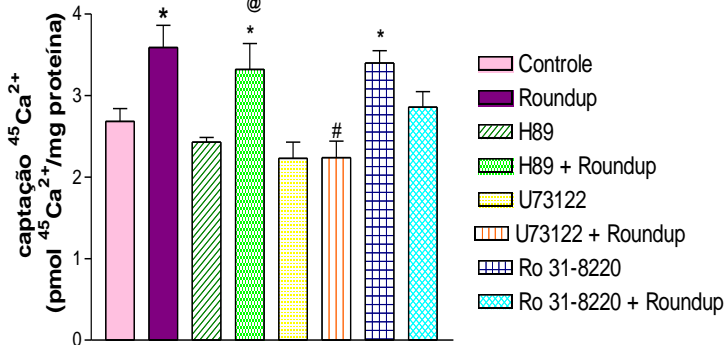
mecanismo de ação do pesticida sobre o influxo de cálcio em testículos de ratos.

Para determinar o efeito do glifosato sozinho (sem adjuvante/surfactante) em células testiculares sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, usou-se a concentração de 36 ppm de glifosato de grau analítico (P.A.). Os resultados mostraram que o glifosato P.A. aumentou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, e este efeito também foi prevenido por 10 μM de nifedipina mostrando o envolvimento dos CCDV-L no mecanismo de ação do glifosato (Figura 14D).

(A)



(B)



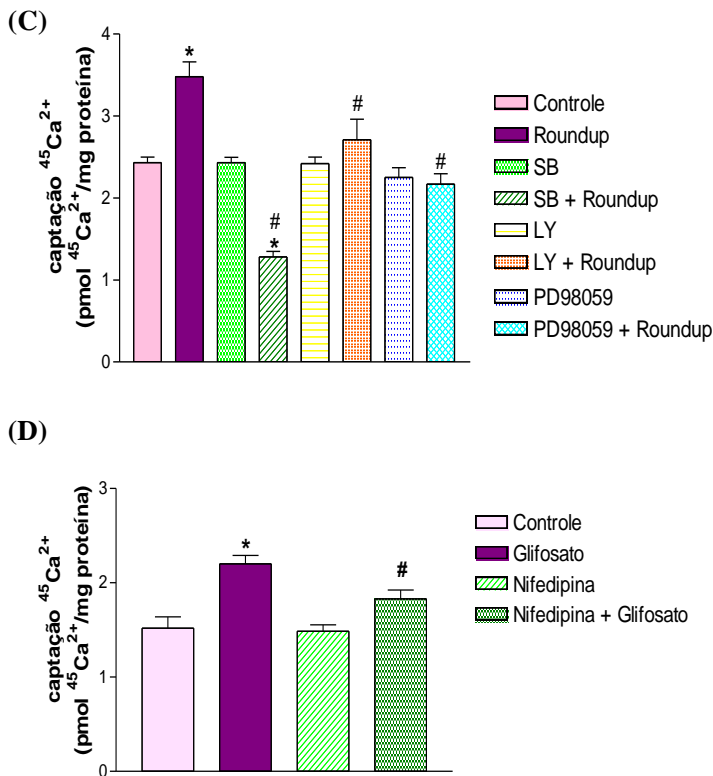


Figura 14. Envolvimento dos canais de cálcio (CCDVs), níveis de cálcio intracelular e vias de sinalização na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos. Testículos foram pré-incubados por 15 minutos com ou sem 10 μM de nifedipina (bloqueador de CCDV-L), ou 50 μM de BAPTA-AM (quelante de Ca^{2+} intracelular), ou 50 μM de dantrolene (bloqueador do receptor de rianodina) (A), ou 10 μM H89 (inibidor PKA), ou 30 μM U73122 (inibidor PLC), ou 20 μM Ro-31.8220 (inibidor PKC) (B) ou 10 μM SB239063 (inibidor p38 MAPK), 10 μM LY294002 (inibidor da PI3K), 30 μM PD98059 (inibidor de MEK) (C). Em seguida os testículos foram incubados com ou sem 36 ppm de glifosato-Roundup (A, B e C) por 30 min na presença de 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{3+}$. Testículos foram incubados com ou sem glifosato P.A. na presença ou ausência de 10 μM de nifedipina (D). Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais e expressos como pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ / mg de proteína. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo Roundup ou glifosato; @ $p < 0,05$ comparado com o grupo H 89.

4.3 Envolvimento da via MAPK na toxicidade induzida pelo Roundup nas células testiculares

As MAPKs estão envolvidas em numerosos processos reprodutivos masculinos, incluindo espermatogênese, maturação e ativação do espermatozóide, capacitação e reação acrossômica antes da fecundação do oócito (LI *et al.*, 2009).

O envolvimento da via MAPK na toxicidade induzida pelo Roundup nas células testiculares foi confirmado através da imunodeteção por “Western blot”, uma vez que a ERK1/2 e a p38 foram ativadas/fosforiladas em testículos de ratos pré-púberes expostos ao pesticida (Figura 15A e 15B).

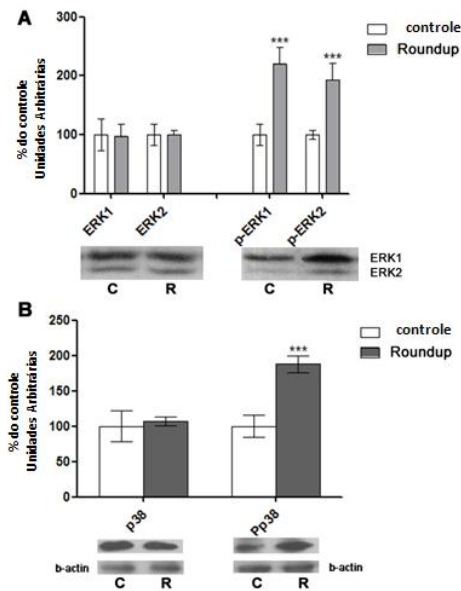


Figura 15. Efeitos do Roundup na ativação da ERK1/2 (A) e p38^{MAPK} (B) em testículos de ratos. Após a pré-incubação de 15 min, os testículos foram incubados com glifosato-Roundup (36 ppm/30 min). O tecido foi lisado e os níveis total e fosforilado de ERK1/2 e p38^{MAPK} foram determinados por Western blot. Os resultados foram expressos em % do controle como a média \pm E.P.M. (n=6). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni. *** $p < 0.001$ comparado ao grupo controle. “Immunoblots” representativos estão representados na figura. P-ERK = fosfo-ERK; Pp38 = fosfo-p38.

4.4 Efeito de antioxidantes na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e na viabilidade celular induzida pelo Roundup

Tal como ilustrado na Figura 16A e 16B, a exposição ao pesticida durante 30 min foi capaz de aumentar a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e induzir a morte celular, respectivamente. A fim de verificar o envolvimento de estresse oxidativo no efeito estimulatório do Roundup na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e na morte celular, os antioxidantes, ácido ascórbico e Trolox[®] (nome comercial para vitamina E solúvel em água) foram utilizados. Os resultados mostraram que ambos preveniram o efeito do pesticida na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, sugerindo a contribuição de eventos oxidativos provocados pela toxicidade do Roundup nas células testiculares (Figura 16A). Além disso, o Trolox[®] preveniu totalmente a liberação de LDH pelo Roundup, enquanto que o ácido ascórbico preveniu apenas parcialmente a morte celular (Figura 16B).

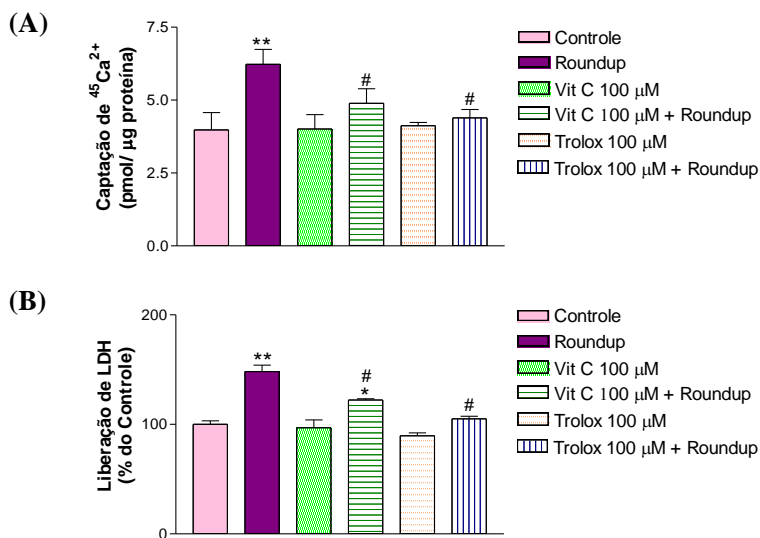


Figura 16. Prevenção do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e da morte celular induzidos pelo Roundup em testículos inteiros de ratos imaturos através do tratamento com antioxidantes. Os testículos foram pré-incubados por 15 min na presença ou ausência dos antioxidantes Trolox[®] (100 µM) ou ácido ascórbico (100 µM) (A/B). Em seguida, o tecido foi incubado com Roundup mais os antioxidantes por 30 min. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo e expressos como % do controle. Diferenças

estatisticamente significante foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni. $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$ comparado com o grupo controle. $^{\#}p < 0,05$ comparado ao grupo Roundup.

4.5 Efeitos da exposição ao Roundup sobre parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo

Para avaliar a indução de estresse oxidativo em testículos expostos ao Roundup, parâmetros de EO, como peroxidação lipídica e oxidação de proteínas foram avaliados. Um aumento significativo nos níveis de TBARS e proteína carbonilada foram encontrados no grupo tratado com Roundup, quando comparado com o controle (Figura 17A e 17B).

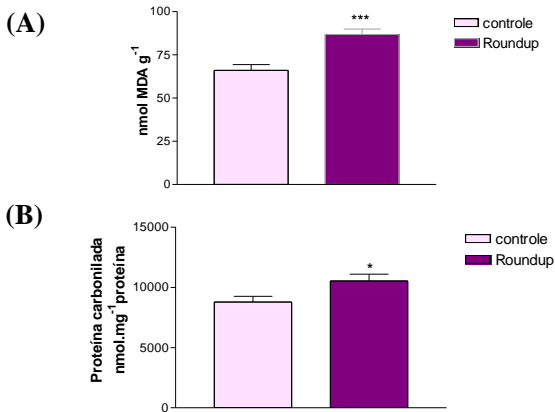


Figura 17. Efeitos do Roundup nos níveis de peroxidação lipídica (A) e carbonilação de proteínas (B) em testículos de ratos imaturos. Os testículos foram incubados na presença ou ausência de 36 ppm de Roundup por 30 min. Os resultados da mensuração dos níveis de TBARS e proteína carbonilada (PC) foram expressos como a média \pm E.P.M. de 06 animais de cada grupo. Análise estatística: teste “t” de Student. $*p < 0,05$, $**p < 0,001$ comparado com grupo controle.

Uma vez estabelecida a participação de eventos oxidativos no mecanismo de toxicidade do Roundup levando à sobrecarga de cálcio e à morte celular, investigou-se o efeito do pesticida no sistema de defesa antioxidante testicular. Foram avaliados vários parâmetros do metabolismo oxidativo, tais como as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Os resultados mostraram que a exposição ao pesticida

leva a uma redução nos níveis de GSH, e a um aumento na atividade das enzimas G6PD, GR, GPx, GST e GGT. Além disso, testículos de ratos expostos ao Roundup também apresentaram maior atividade da CAT e SOD em relação ao controle (Figura 18).

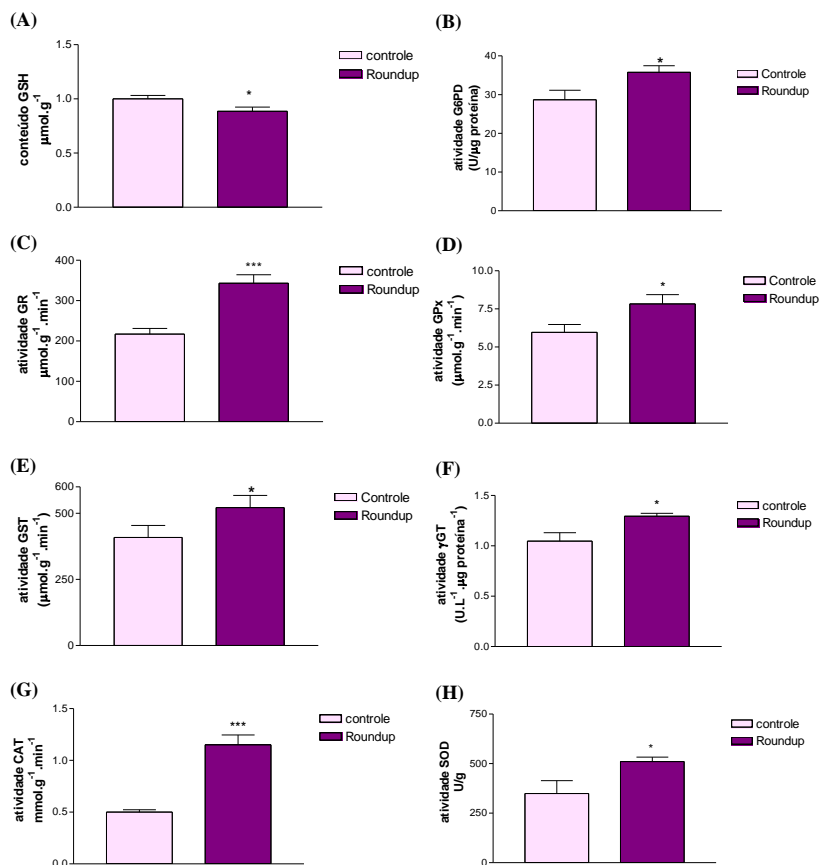
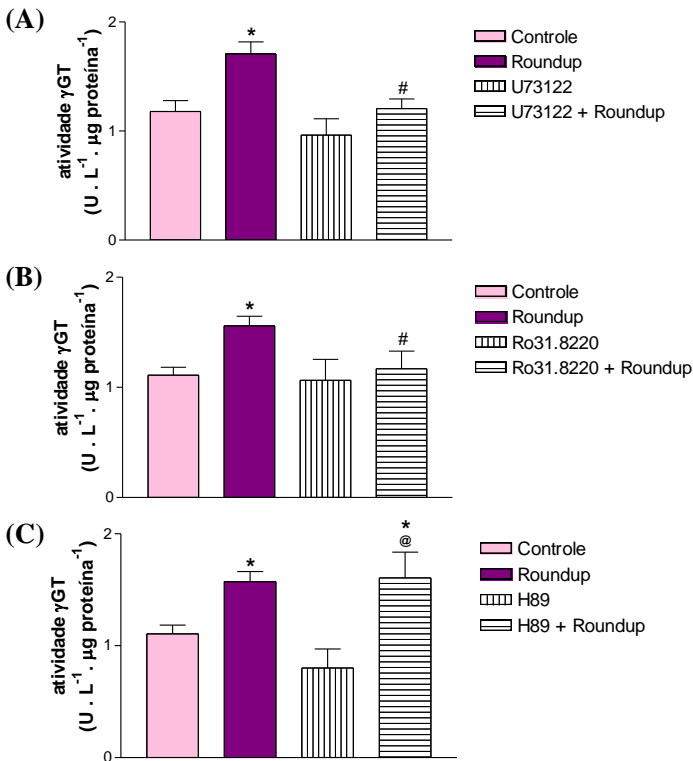


Figura 18. Efeito da exposição ao Roundup sobre os níveis de GSH (A) e a atividade das enzimas: G6PD (B), GR (C), GPx (D), GST (E), GGT (F), CAT (G), SOD (H). Os testículos foram incubados na presença ou ausência de 36 ppm de Roundup por 30 min. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: teste “t” de Student. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparado com grupo controle.

4.6 Mecanismos envolvidos na ação do Roundup sobre a atividade enzimática da GGT

Considerando-se que alterações na atividade das enzimas antioxidantes podem estar relacionadas a insultos oxidativos, os mecanismos envolvidos na ação do Roundup sobre a atividade enzimática da GGT, um componente essencial no sistema de defesa antioxidante celular envolvido no “turnover” da GSH, foram investigados. Para isto foram utilizados inibidores da via da PLC, PKC, PKA, assim como da ERK e PI3K. As concentrações dos respectivos inibidores foram: 30 μM U73122, 20 μM Ro-31.8220, 10 μM H89, 30 μM PD98059 e 10 μM LY294002. Os resultados mostraram que o efeito do pesticida é dependente da ativação da PLC, PKC, ERK, mas independente de PKA e parcialmente dependente da PI3K (figura 19), reforçando os dados obtidos sobre captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.



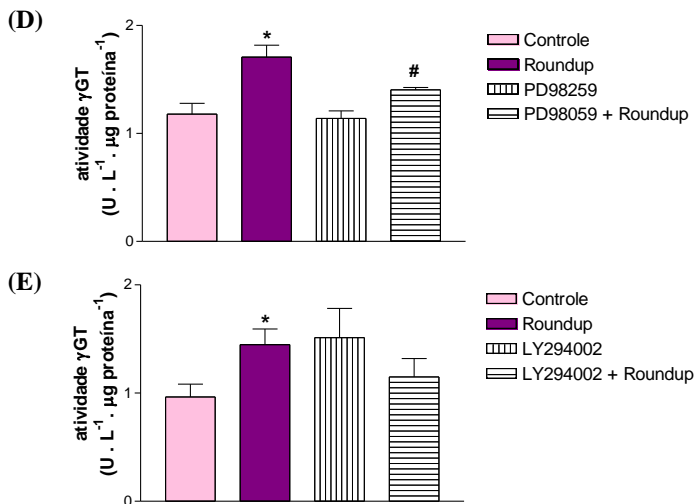


Figura 19. Participação das vias de sinalização celular no efeito do Roundup sobre a atividade da GGT em testículos de ratos de 30 dias. Os testículos foram pré-incubados por 15 minutos com ou sem 30 μ M U73122 (inibidor PLC) (A), ou 20 μ M Ro-31.8220 (inibidor PKC) (B), 10 μ M H89 (inibidor PKA) (C), ou 30 μ M PD98059 (inibidor de ERK) (D), ou 10 μ M LY294002 (inibidor da PI3K) (E). Em seguida os testículos foram incubados com ou sem 36 ppm de glifosato-Roundup por 30 min. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais em cada grupo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$ comparado ao Roundup; @ $p < 0,001$ comparado com o H89.

Na tentativa de compreender a relação entre a atividade da GGT e as flutuações nas concentrações de cálcio intracelular, utilizou-se bloqueadores de CCDV tipo L e T como a nifedipina (10 μ M) e flunarizina (10 μ M), respectivamente, e BAPTA (50 μ M), um quelante de Ca²⁺ intracelular. Os resultados mostraram que tanto o Roundup quanto a nifedipina e o BAPTA aumentaram a atividade da GGT em testículos de ratos pré-púberes (Figura 20). Entretanto, o efeito do Roundup foi prevenido, quando este foi co-incubado com a nifedipina ou com o BAPTA, mostrando uma possível relação entre o cálcio intracelular e o mecanismo de ação do pesticida sobre a GGT (figura 20A e B). Por outro lado, como mostrado na figura 20C, os CCDV-T não estão envolvidos na atividade da GGT.

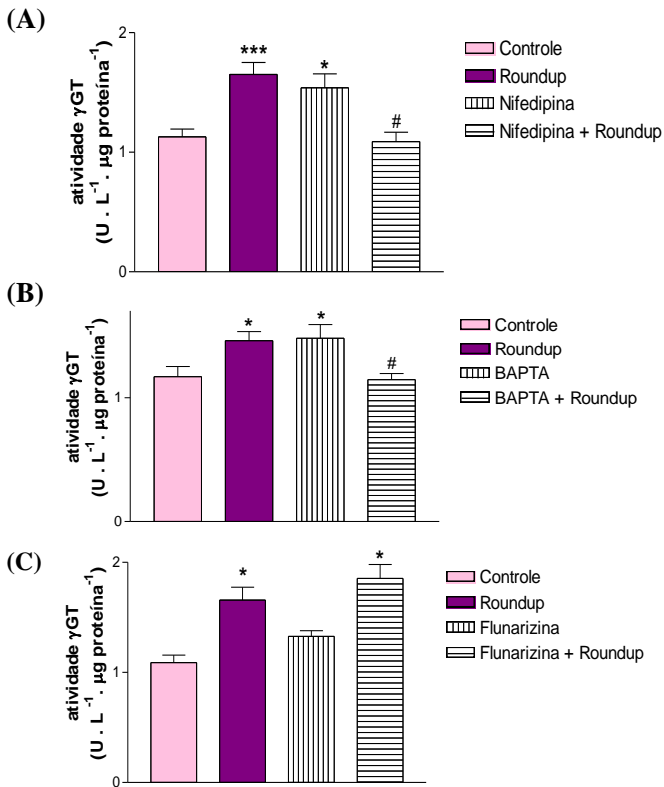


Figura 20. Participação do Ca²⁺ no efeito do Roundup sobre a atividade da GGT. Os testículos foram pré-incubados por 15 minutos com ou sem 10 μ M nifedipina (bloqueador de CCDV-L) (A), ou 50 μ M BAPTA-AM (quelante de cálcio intracelular) (B), ou 10 μ M flunarizina (bloqueador de CCDV-T) (C). Em seguida os testículos foram incubados na presença ou ausência de 36 ppm de glifosato-Roundup por 30 min. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni. *** p < 0,001, * p < 0,05 comparado ao controle; # p < 0,05 comparado ao Roundup.

4.7 Efeito do Roundup no transporte de aminoácidos neutros

A enzima GGT está envolvida no metabolismo da GSH extracelular, proporcionando aminoácidos precursores para a síntese *de novo* de GSH intracelular. Embora a atividade da GGT esteja aumentada em testículos tratados com Roundup, os resultados mostraram baixos níveis de GSH

citoplasmáticos. Um dos prováveis motivos desta redução de GSH, é a alteração do sistema de transporte de aminoácidos “A”, aqui testado através do aminoácido α -(metil-amino)-isobutírico (^{14}C -MeAIB). A figura 21 mostra uma redução na captação de ^{14}C -MeAIB em relação ao controle. Neste contexto, a redução na captação de ^{14}C -MeAIB pode estar influenciando a disponibilidade de aminoácidos para a síntese *de novo* de GSH.

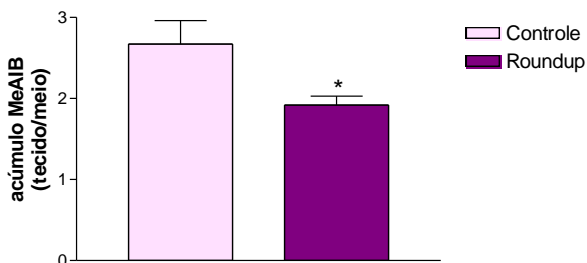


Figura 21. Efeito do Roundup no acúmulo de ^{14}C -MeAIB em testículos de rato. Os testículos foram incubados por 60 min min na presença ou ausência de 3.7 KBq/mL de ^{14}C -MeAIB, sendo que 36 ppm de Roundup foram adicionados nos 30 min finais. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: teste “t” de Student. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

4.8 Efeito do Roundup na transaminação de aminoácidos

As células de Sertoli são fundamentais para nutrir e suportar as germinativas. O metabolismo energético das células de Sertoli envolve principalmente a entrada de glicose nestas células, a qual gera piruvato através da glicólise, que pode ser transportado para a mitocôndria para formar Acetil-CoA, ou ser convertido a lactato ou a alanina. O lactato é secretado destas células e captado pelas células germinativas, onde será utilizado para síntese de ATP. No trato reprodutivo, o lactato também desempenha um importante papel modulando os níveis de NADPH (ALVES *et al.*, 2012). Sendo assim, a modulação da atividade da alanina aminotransferase (ALT) desempenha papel importante para disponibilizar lactato (indiretamente) ou desviar o piruvato para formar alanina, e vice-versa. Além disso, a aspartato aminotransferase (AST) catalisa a transaminação do aspartato em oxaloacetato, modulando também a disponibilidade de substratos para o metabolismo energético,

assim como o de aminoácidos. A elevada atividade destas enzimas (fig. 22A e B), induzida por Roundup, pode contribuir, mesmo que indiretamente, para as alterações nas vias de produção de energia nas células testiculares.

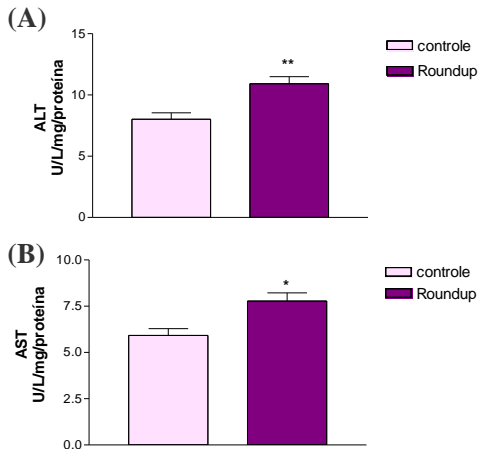


Figura 22. Efeito do Roundup na transaminação de aminoácidos em testículos de ratos de 30 dias através da determinação da atividade da ALT (A) e da AST (B). Os testículos foram incubados na presença ou ausência de 36 ppm de Roundup por 30 min. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: teste “t” de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado com grupo controle.

4.9 Comparação da toxicidade da preparação comercial Roundup e de seu ingrediente ativo, o glifosato, sobre a atividade da GGT, AST, ALT e nos níveis de GSH

A atividade enzimática da GGT, AST, ALT e os níveis de GSH foram determinados após exposição ao glifosato sozinho (sem adjuvante/surfactante) ou a formulação comercial Roundup com o intuito de comparar a toxicidade destes sobre células testiculares. O glifosato foi utilizado na concentração de 36 ppm de glifosato, equivalente a concentração deste herbicida na formulação comercial Roundup utilizada neste estudo. Os resultados mostraram que o Roundup é mais tóxico que o glifosato de grau analítico, pois, a atividade das enzimas GGT, AST, ALT e os níveis de GSH não apresentaram diferença significativa entre os grupos tratados com glifosato puro em relação ao grupo controle (figura 23).

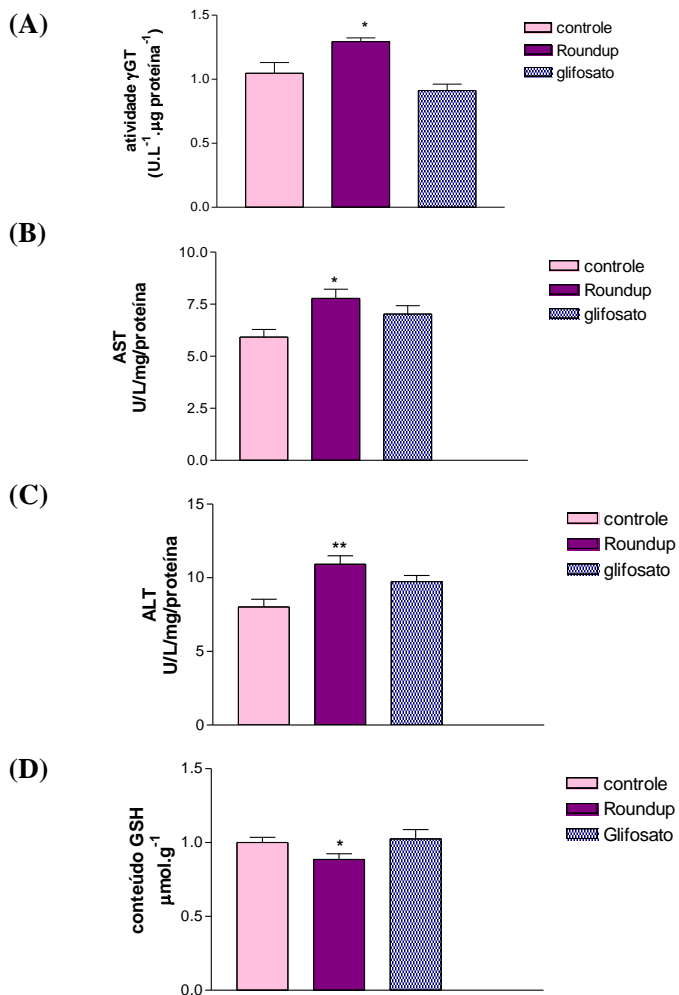
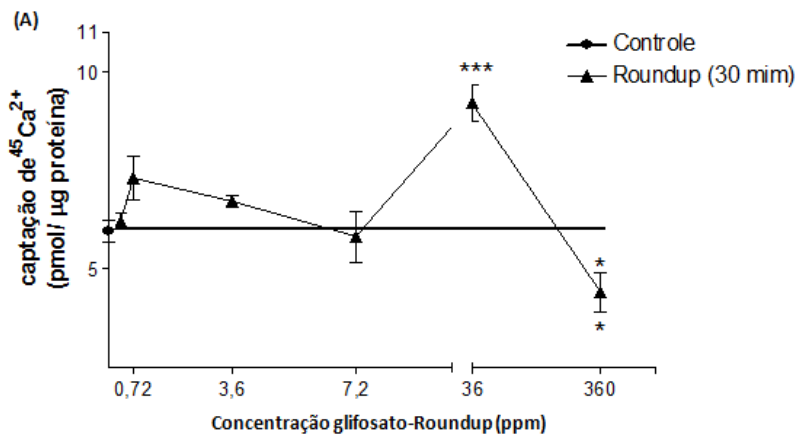


Figura 23. Efeitos comparativos da toxicidade do Roundup e de seu ingrediente ativo sozinho, o glifosato, sobre a atividade da GGT, (A) da AST, (B) da ALT e (C) sobre os níveis de GSH (D). Os testículos foram incubados na presença ou ausência de 100 ppm de Roundup (equivalente a 36 ppm de glifosato) ou de 36 ppm de glifosato P..A. por 30 min. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de 08 animais de cada grupo. Análise estatística: teste “t” de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado ao controle.

4.10 Envolvimento do cálcio no mecanismo de toxicidade induzida pelo Roundup em cultura de células de Sertoli de ratos de 30 dias

Com o intuito de investigar as células de Sertoli como um alvo da ação do Roundup dentro dos testículos, foram examinados os efeitos deste pesticida sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em culturas primárias de tais células.

Culturas de células de Sertoli de ratos de 30 dias foram expostas a diferentes concentrações de Roundup e investigou-se o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Os resultados mostraram que a exposição ao Roundup durante 30 min aumentou o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ de 3,6 ppm a 36 ppm, enquanto que 360 ppm do pesticida diminuiu a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Figura 24A). Para investigar se as alterações na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi acompanhada de morte celular, investigou-se a liberação de LDH das células de Sertoli em cultura tratadas com Roundup (figura 24B). Semelhante aos resultados observados nos testículos inteiros, concentrações de Roundup superiores a 36 ppm são capazes de induzir a morte celular. A redução da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas células de Sertoli em 360 ppm de Roundup (Figura 24A) também é coincidente com a liberação mais proeminente de LDH (Figura 24B), como observado anteriormente em testículos inteiros.



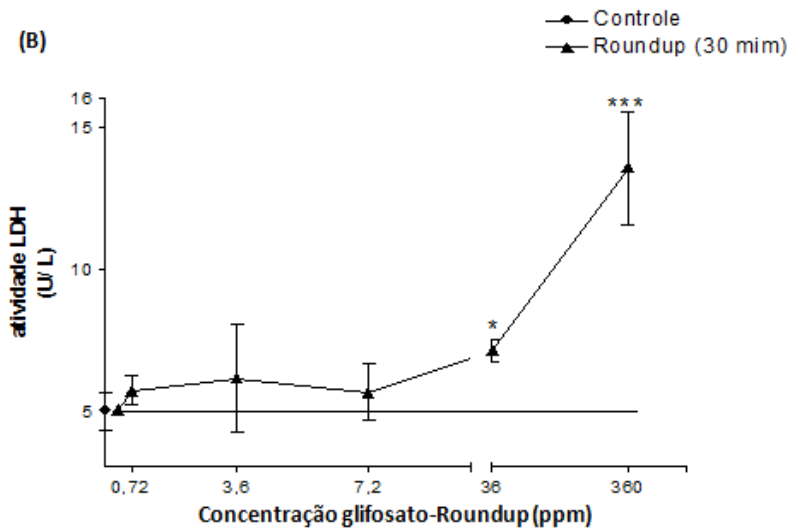
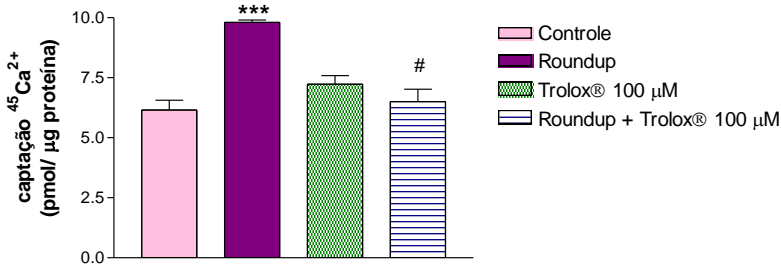


Figura 24. Curva dose-resposta do Roundup na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (A) e viabilidade celular–liberação de LDH (B) em cultura de células de Sertoli de ratos de 30 dias. As células de Sertoli foram pré-incubadas por 15 min e então incubadas por 30 min com $0,1\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, com ou sem Roundup em diferentes concentrações (0,72 a 360 ppm). Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 04 experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

4.11 Efeito de antioxidantes na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e na viabilidade de células de Sertoli induzida pelo Roundup

Os experimentos seguintes foram realizados utilizando-se 36 ppm glifosato-Roundup, uma concentração capaz de alterar a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e a viabilidade celular na cultura de células de Sertoli. Para confirmar o envolvimento de estresse oxidativo em ambos os processos, foram realizados novos experimentos com as culturas de células de Sertoli, utilizando Trolox[®] e ácido ascórbico, como antioxidantes. É interessante notar que de acordo com os resultados demonstrados nos testículos inteiros, observou-se o mesmo grau de proteção induzido por Trolox[®] (Figura 25A e 25B) e ácido ascórbico (Figura 26A e 26B) na prevenção da sobrecarga intracelular de Ca^{2+} e morte celular em culturas de células de Sertoli, quando foram utilizadas as mesmas concentrações de antioxidantes (100 μM de vit C e Trolox[®]). Porém, quando utilizou-se 200 μM de vit C houve morte celular (figura 26B).

(A)



(B)

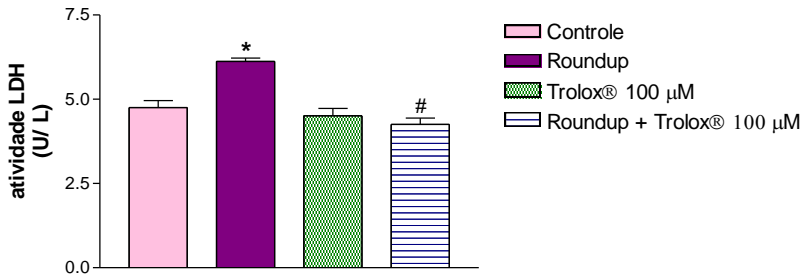


Figura 25. Efeito da vitamina E (Trolox®) na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e morte celular induzidas pelo Roundup em células de Sertoli de ratos imaturos. As células de Sertoli foram pré-incubadas por 15 min na presença ou ausência de 100 µM de Trolox® (A/B). Em seguida, as células foram incubadas com ou sem Roundup na presença ou não do antioxidante por 30 min. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 04 experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado ao controle; # $p < 0,05$ comparado ao Roundup.

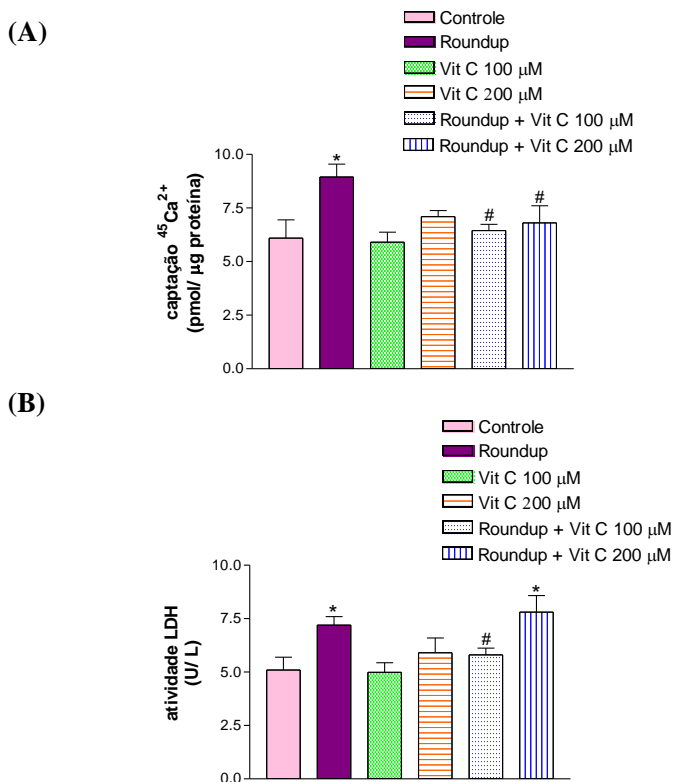
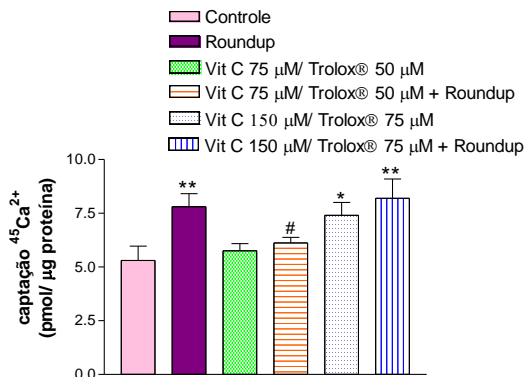


Figura 26. Efeito da vitamina C na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e morte celular induzidas pelo Roundup em células de Sertoli de ratos imaturos. As células de Sertoli foram pré-incubadas por 20 min na presença ou ausência de 100 μM ou 200 μM de vitamina C (A/B) Em seguida, as células foram incubadas com ou sem Roundup na presença ou não ds antioxidante por 30 min. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 04 experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significante foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$ comparado ao Roundup.

Também testamos os efeitos da co-incubação de Trolox[®] e ácido ascórbico, na presença de Roundup. A combinação destes dois antioxidantes previniu a sobrecarga de Ca^{2+} e morte celular induzida por Roundup nas seguintes concentrações: ácido ascórbico 75 μM , mais Trolox[®] 50 μM . Por outro lado, quando o ácido ascórbico foi utilizado a 150 μM com Trolox[®] a 75 μM , estes antioxidantes foram capazes de induzir a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e a morte celular. Além disso, este efeito

não foi modificado pelo Roundup (Figura 27A e 27B). Portanto, a geração de estresse oxidativo pode ser uma das causas da toxicidade induzida pelo Roundup no aparelho reprodutor masculino, especialmente em células de Sertoli.

(A)



(B)

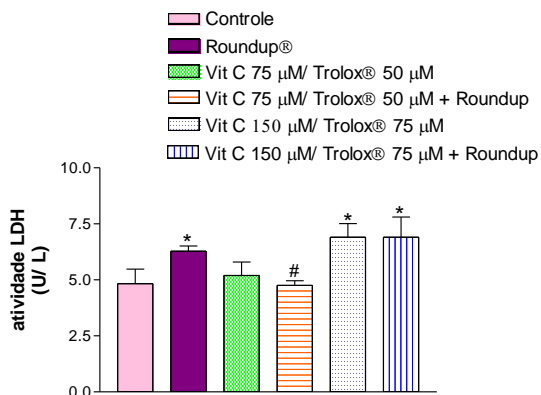


Figura 27. Prevenção de antioxidantes na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e morte celular induzidas pelo Roundup em células de Sertoli de ratos imaturos. As células de Sertoli foram pré-incubadas por 20 min na presença ou ausência de vitamina C mais Trolox® (75 µM vit C + 50 µM Trolox® ou 150 µM vit C + 75 µM Trolox®) (A/B). Em seguida, as células foram incubadas com ou sem Roundup na presença ou não dos antioxidantes por 30 min. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 04 experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao controle; # $p < 0,05$ comparado ao Roundup.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que o pesticida glifosato-Roundup induz estresse oxidativo e ativa várias vias de resposta ao estresse culminando com a morte de células testiculares. O modo de ação do glifosato-Roundup envolve geração de estresse oxidativo, sobrecarga de Ca^{2+} e ativação de cascatas de proteínas cinases, tendo as células de Sertoli como alvo.

As consequências da exposição ao glifosato na fisiologia testicular tornou-se reconhecida a partir de estudos iniciais que ligam este herbicida com alterações na qualidade dos espermatozoides, incluindo o declínio no volume ejaculado, concentração espermática, frutose no sêmen e osmolalidade do sêmen (YOUSEF *et al.*, 1995). Além disso, Walsh *et al.* (2000) provaram que o Roundup é um disruptor endócrino, uma vez que é capaz de alterar a esteroidogênese através da redução na expressão da proteína StAR, proteína que é passo limitante na esteroidogênese.

Nos últimos anos, outros pesquisadores demonstraram a toxicidade do Roundup para as células reprodutoras masculinas. Dallegrave *et al.* (2007) mostraram que a exposição ao Roundup altera a produção de espermatozoides e os níveis de testosterona. Oliveira *et al.* (2007) observaram que a exposição ao Roundup leva a alterações na estrutura dos testículos e da região epididimal de patos *Anas platyrhynchos*, bem como a modificações na expressão de receptores androgênicos e nos níveis plasmáticos de testosterona e estradiol. Romano e colaboradores (2009) também demonstraram que o Roundup é um potente disruptor endócrino, causando alterações na produção de testosterona, assim como alterações morfológicas testiculares. Além disso, recentes publicações de Clair *et al.* (2012) mostraram que células de Leydig tiveram uma degradação significativa nas suas membranas após exposição ao Roundup. Este pesticida também foi tóxico para células germinativas e células de Sertoli, causando principalmente necrose e apoptose. Apenas 1 ppm de Roundup levou a desregulação endócrina, diminuindo os níveis de testosterona em 35%. Romano *et al.* (2012) demonstraram que o glifosato pode alterar o processo de masculinização e promover mudanças comportamentais, bem como alterações de hipersecreção de andrógenos, aumento da atividade das gônadas e produção de esperma.

Estes resultados suportam o nosso presente estudo demonstrando que o glifosato-Roundup leva à morte de células de

Sertoli. Considerando que as células de Sertoli desempenham um papel central na regulação e manutenção da espermatogênese e que são responsáveis pela nutrição e sustentação das células germinativas em desenvolvimento, o comprometimento destas células pode afetar a fertilidade masculina.

Quando comparamos a toxicidade do glifosato P.A. com a da formulação comercial Roundup em alguns parâmetros bioquímicos, tais como a atividade enzimática da GGT, AST, ALT e os níveis de GSH em testículos, observamos que o Roundup é mais tóxico que seu ingrediente ativo isoladamente (figura 23). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que atribuem a toxicidade do Roundup ao efeito sinérgico do glifosato e dos surfactantes adicionados, juntamente com as substâncias inertes (WALSH *et al.*, 2000; MARC *et al.*, 2002; RICHARD *et al.*, 2005; PEIXOTO, 2005; BENACHOUR, *et al.*, 2007; BENACHOUR; SÉRALINI, 2009; GASNIER *et al.*, 2009; CLAIR *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013). Por outro lado, a indução do influxo de cálcio foi semelhante quando utilizou-se o Roundup ou o glifosato isolado, demonstrando que o princípio ativo também altera a função celular.

O íon cálcio é um segundo mensageiro que tem papel fundamental na regulação de vários processos biológicos. Embora o Ca^{2+} seja fundamental à manutenção da vida, um aumento prolongado deste íon pode levar a célula à morte (PRADO, 2001). Nossos resultados mostraram que tanto o glifosato sozinho como a formulação comercial Roundup aumentam a concentração de Ca^{2+} intracelular nas células testiculares e nas células de Sertoli. A captação de Ca^{2+} induzida pelo Roundup é dependente da entrada de Ca^{2+} via CCDV-L e do efluxo de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, uma vez que bloqueadores desses canais preveniram o efeito do herbicida (figura 14). Provavelmente, este aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular provocado pelo glifosato-Roundup foi pelo estresse oxidativo que este pesticida induz.

Vários estudos mostram que ERO e ERN causam um rápido aumento na concentração de Ca^{2+} no citoplasma de diversos tipos de células (ROONEY *et al.*, 1991; ROVERI *et al.*, 1992; RENARD *et al.*, 1992; DOAN *et al.*, 1994; JOSEPH *et al.*, 1997; WANG; JOSEPH, 2000). Parece que este aumento pode ser devido tanto a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, tais como o RE e a mitocôndria, como a partir da importação de Ca^{2+} dos espaços extracelulares pela membrana plasmática, dependendo tanto da concentração como do tipo de oxidante envolvido (ERMAK; DAVIES, 2001). O aumento na

concentração de Ca^{2+} no citoplasma causa influxo desse íon para dentro das mitocôndrias e núcleo. Na mitocôndria, o cálcio acelera e altera o metabolismo normal da organela podendo levar a célula à morte. No núcleo, o Ca^{2+} modula a transcrição de genes e a atividade de nucleases que controlam a apoptose celular. Tanto no núcleo como no citoplasma, o Ca^{2+} pode regular a fosforilação/desfosforilação de proteínas e modular vias de transdução de sinais (ERMAK; DAVIES, 2001).

Pesquisas mostram que o estresse oxidativo causado por moderados níveis de H_2O_2 aumentam transitoriamente o conteúdo de Ca^{2+} citoplasmático, mesmo em meio livre de Ca^{2+} , mas não consegue fazê-lo se o Ca^{2+} for primeiro esgotado do RE. Concentrações mais elevadas de H_2O_2 , no entanto, causam uma elevação sustentada de Ca^{2+} citosólico que não foi observada no meio livre de Ca^{2+} , sugerindo que o estresse oxidativo severo provoca absorção de Ca^{2+} pelas células dos espaços extracelulares (ROVERI *et al.*, 1992). Além disso, a elevação dos níveis de Ca^{2+} no citoplasma pode ativar outras enzimas que produzem RL, tais como a óxido nítrico sintase (LYNCH; DAWSON, 1994), e a xantina oxidase (geradora de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2), que é produzida a partir da xantina desidrogenase por proteases dependentes de Ca^{2+} (SANCHEZ, 2012). Assim, o aumento dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático pode causar a produção de mais RL e, indiretamente, aumentar ainda mais os níveis intracelulares de Ca^{2+} (ERMAK; DAVIES, 2001). O IP_3 age nos receptores do RE ocasionando liberação de Ca^{2+} dos estoques. Ele é gerado pela ação da PLC sobre o fosfolípídio de membrana PIP_2 , em resposta principalmente a neurotransmissores ou hormônios. No entanto, ERO também podem regular a liberação de Ca^{2+} do RE via produção de IP_3 (DOAN *et al.*, 1994).

A bomba de cálcio do retículo endoplasmático (SERCA) transporta Ca^{2+} para o lúmen do RE contra o gradiente de concentração, envolvendo gasto de ATP. Assim, a SERCA antagoniza a função de IP_3 através da redução dos níveis de cálcio citoplasmático livre, acumulando-o no RE, de onde pode ser liberado quando necessário, através de canais operados por IP_3 (MARIN *et al.*, 1999). Tem sido demonstrado que ERO tais como o $\text{O}_2^{\cdot-}$ (GROVER e SAMSON, 1988) e o H_2O_2 (GROVER *et al.*, 1992) podem efetivamente inibir o transporte de Ca^{2+} pelas bombas SERCA em células musculares lisas. Parece que SERCA pode ser inibida tanto por oxidação de seus grupos sulfidrilas, como pelo ataque direto dos oxidantes no sítio de ligação ao ATP (SCHERER; DEAMER, 1986; SUZUKI; FORD, 1991; CASTILHO *et al.*, 1996; XU *et al.*, 1997). Além disso, ATPases de membrana

plasmática também podem ser inibidas por agentes oxidantes (ROHN *et al.*, 1993). Neste contexto, ERO podem contribuir para a alteração na concentração de Ca^{2+} intracelular através de diversos mecanismos.

A co-incubação das células testiculares com Roundup na presença dos antioxidantes vitamina C e/ou vitamina E preveniu o aumento na concentração de Ca^{2+} citoplasmático induzido por Roundup (figura 16). Estes dados corroboram a hipótese de que o estresse oxidativo, induzido por este herbicida, é um evento importante no mecanismo de toxicidade do Roundup. Esses antioxidantes também foram capazes de prevenir a morte celular induzida pela sobrecarga de Ca^{2+} intracelular. Porém, quando utilizou-se concentrações mais altas de vitamina C e E (tanto sozinhas como co-incubada entre si) nas células de Sertoli, observou-se morte celular e aumento na captação de Ca^{2+} ao invés de prevenção (figura 26 e 27). Sabe-se que a vit C em altas concentrações e na presença de metais de transição como o ferro passa a ter ação oxidante, sendo capaz de produzir $\cdot\text{OH}$ e H_2O_2 . (BIANCHI; ANTUNES, 1999; BARREIROS *et al.*, 2006). Segundo Halliwell e Gutteridge, (2007) os tocoferóis em determinadas situações podem reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , assim como Cu^{2+} a Cu^+ , que por sua vez, exercem efeito pró-oxidativo. A alta taxa mitótica das células germinativas masculinas requer quantidades elevadas de ferro. A importância universal de ferro, sua elevada toxicidade, e sua química complexa representam um desafio para os sistemas biológicos, em especial para o sistema reprodutor (LEICHTMANN-BARDOOGO *et al.* 2012). Sugere-se que a entrada de ferro nas células germinativas seja mediada pela transferrina, secretada pelas células de Sertoli (SKINNER; GRISWOLD, 1982). Neste contexto, as altas concentrações de ferro presentes nos testículos os tornam vulneráveis a danos oxidativos, e corroboram a hipótese proposta neste estudo. Nossos resultados fornecem evidências que os antioxidantes ácido ascórbico e Trolox® em concentrações ideais podem proteger as células contra danos oxidativos decorrentes dos efeitos deletérios do Roundup nas células testiculares.

A fosforilação de proteínas é um processo molecular reversível, de modulação intracelular e desempenha um papel fundamental na regulação de diversas funções celulares, sendo o principal mecanismo utilizado no processo de transdução de sinais (HUNTER, 1995). Reações de fosforilação/desfosforilação ocorrem tanto no núcleo como no citoplasma, e são controladas por proteínas cinases e fosfatases (ERMAK; DAVIES, 2001). Estima-se que o genoma dos mamíferos

codifica mais de 2000 proteínas cinases e 1000 fosfatases diferentes (HUNTER, 1995).

Nossos resultados mostraram que a enzima PLC está envolvida na captação de Ca^{2+} mediada pelo Roundup (figura 14B). Considerando-se que esta enzima hidroliza o PIP_2 em IP_3 e DAG, o IP_3 pode contribuir para o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular através da liberação dos estoques do RE. Já DAG, juntamente com o Ca^{2+} ativariam a PKC. Esta PKC, juntamente com outras proteínas cinases, como a PI3K, MAPK-ERK1/2 e p38 estão de alguma forma modulando processos envolvidos na captação de Ca^{2+} mediada pela toxicidade do Roundup.

Sabe-se que pesticidas induzem estresse oxidativo levando a geração de ERO e alterações no sistema enzimático antioxidante ou de remoção de radicais livres (BANERJEE *et al.*, 1999; BUKOWSKA, 2003; INBARAJ; CHIGNELL, 2004, GEHIN *et al.*, 2006). Tem sido sugerido que vários pesticidas também exercem seus efeitos biológicos através do ataque eletrofílico a componentes celulares com geração simultânea de ERO (TUNÇMEN; TUZMEN, 2007).

É provável que o pesticida Roundup também gere ERO como $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Peixoto (2005) mostrou que o Roundup afeta a cadeia transportadora de elétrons ao nível dos complexos I e III. Assim, formulações a base de glifosato podem estar envolvidas no aumento da produção do $\text{O}_2^{\cdot-}$ e, portanto, desencadeando estresse oxidativo e respostas antioxidantes (ROMERO *et al.*, 2011).

Espécies reativas de oxigênio são capazes de oxidar muitos compostos celulares incluindo DNA, RNA, lipídios de membranas e proteínas, levando a danos celulares. Como uma forma de defesa primária contra ERO, tanto procariontes como eucariontes tem desenvolvido sistemas de defesa antioxidante para proteger as células contra estes danos.

Em procariontes, como *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, sistemas de defesa antioxidante tem sido amplamente estudados (WEI *et al.*, 2012). Estudos realizados na década de 1980 mostraram que nestas bactérias, a presença de baixas concentrações de H_2O_2 leva à indução da síntese de aproximadamente 30 proteínas, das quais 12 são induzidas rapidamente nos primeiros 10 minutos após o tratamento com H_2O_2 e as outras 18 são induzidas dentro da primeira hora. A expressão de nove destas proteínas induzidas nos primeiros minutos são reguladas pelo gene *oxyR* (CHRISTMAN, *et al.*, 1985; MORGAN, *et al.*, 1986), que transcreve um fator de transcrição de 34-KDa também denominado *oxyR*. O H_2O_2 ativa esta proteína via

oxidação de dois resíduos de cisteína (cys199 e cys208) formando pontes dissulfeto entre estes dois aminoácidos. Assim, a proteína sofre uma mudança conformacional que lhe permite ligar-se ao DNA e recrutar a RNA polimerase levando a ativação da transcrição de uma bateria de genes antioxidantes incluindo os que codificam as enzimas catalase e glutatona redutase (LEE *et al.*, 2004; WEI *et al.*, 2012). Harris (1992) mostrou que o fator de transcrição de procariontos denominado soxR, controla a expressão de nove proteínas em resposta à exposição destas células ao $O_2^{\cdot-}$, fazendo parte delas a MnSOD e a G6PD, enzima que participa da via das pentoses gerando NADPH, que pode ser utilizado no processo de redução da glutatona oxidada (GSSG).

Em eucariotos um dos mais importantes mecanismos de defesa celular contra estresse oxidativo é mediado pelo fator de transcrição Nrf2 (ZHANG, 2006; JUNG; KWAK, 2010). O NF-E2-related factor 2 (Nrf2) é um factor de transcrição da família “Cap 'n' collar” (CNC) e contém um domínio de ligação ao DNA, bZIP, também chamado zíper de leucina, que regula a expressão basal e induzida de uma grande variedade de genes antioxidantes tais como: GSTs, GCL, GPx, SOD, CAT, TXN (tioredoxina), HO-1 (heme oxigenase 1), NQO (NADP(H): quinona oxidoreductase), ferritina, entre outros (JUNG; KWAK, 2010).

Sob condições basais, Nrf2 é reprimido por um regulador negativo Keap1 (Kelch-like ECH-associated Protein 1) e fica bloqueado no citoplasma como um complexo inativo. O heterodímero Nrf2-Keap1 funciona como um sensor intracelular contra as alterações nas concentrações de eletrófilos ou de ERO. Em condições normais, Nrf2 está constantemente ubiquitinada por Keap1 e é degradada por proteossomas. Durante estresse oxidativo, resíduos de cisteína do Keap1 tornam-se oxidados, o que leva a uma modificação conformacional do complexo Nrf2-Keap1, parando a ubiquitinação e este processo leva a estabilização do Nrf2. A fosforilação do Nrf2 por cinases resultam em dissociação do Nrf2 do complexo Keap1 e assim Nrf2 é translocado para o núcleo. Uma vez no núcleo liga-se a uma região promotora do DNA chamada ARE (elemento de resposta a antioxidantes) e ativa a transcrição de diversos genes antioxidantes (ZHANG, 2006; JUNG; KWAK, 2010; STEPKOWSKI; RUSZEWSKI, 2011).

É possível que eucariotos também possuam fatores de transcrição semelhantes à oxyR e soxR, que possam ser ativados rapidamente em resposta ao aumento do $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Já o fator de transcrição Nrf2, bem documentado em eucariotos, inclusive mamíferos,

também pode estar sendo ativado em resposta a ERO geradas pelo Roundup. Numerosos estudos têm mostrado que Nrf2 pode ser ativado por diversas cinases em respostas a estresse oxidativo, incluindo PKC, ERK1/2, p38, PI3K, AKT (YU *et al.*, 1999; BLOOM; JAISWAL, 2003; GONG *et al.*, 2004; JAKUBIKOVA *et al.*, 2005; KEUM *et al.*, 2006; MANANDHAR *et al.*, 2007; SURH *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012). Nossos resultados mostraram que o Roundup é capaz de aumentar a expressão de ERK1/2 e p38 fosforiladas (figura 15). Estas cinases poderiam estar contribuindo para a fosforilação e ativação de Nrf2 e, conseqüentemente, a transcrição de genes antioxidantes incluindo os que codificam as enzimas CAT, GPx, GST, SOD, o que explicaria o rápido aumento destas enzimas nas células testiculares expostas ao pesticida Roundup.

Diversos trabalhos já realizados com animais experimentais e estudos *in vitro*, indicam que as enzimas associadas com mecanismos de defesa antioxidante são alteradas sob a influência de pesticidas (PAOLICCHI *et al.*, 1977; MALIK; SUMMER, 1982; JUNQUEIRA *et al.*, 1986; LECHNER; REHMAN ABDEL, 1986; CHHABRA *et al.*, 1993; BANERJEE *et al.*, 1999).

Removedores de radicais livres como SOD, CAT e GSH e enzimas reguladoras do metabolismo como GPx, GR e GST podem proteger a célula de efeitos deletérios de radicais livres (JUNQUEIRA *et al.*, 1986; CHHABRA *et al.*, 1993; BANERJEE *et al.*, 1999; MENEZES *et al.*, 2011). Nossos resultados mostraram uma redução nos níveis de GSH acompanhada de um aumento na atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, GR, GST, G6PD e GGT após tratamento com Roundup (figura 18), indicando que este pesticida provavelmente induz estresse oxidativo em testículos de ratos e que as enzimas citadas acima foram induzidas em resposta ao insulto oxidativo. Estes resultados estão de acordo com outros estudos já realizados com Roundup, glifosato puro ou outros pesticidas em diferentes organismos e populações celulares tanto *in vitro* como *in vivo* (BANERJEE *et al.*, 1999; GEHIN *et al.*, 2006; TUNÇMEN; TUZMEN, 2007; COSTA *et al.*, 2008; EL-SHARKAWY, 2009; MARIANA *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2011; ROMERO *et al.*, 2011).

O aumento da atividade da SOD observado neste estudo deve-se, provavelmente, ao aumento da produção do $O_2^{\cdot-}$ após a exposição ao Roundup (figura 18H). Conforme descrito, a primeira linha de defesa contra ERO é realizada pela SOD, que catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ à H_2O_2 e água; porém, o H_2O_2 é tóxico para a célula e precisa ser

removido por enzimas antioxidantes como a CAT que promove a decomposição direta do H_2O_2 à água e oxigênio; e a GPx, que é uma enzima antioxidante tiol-específica que decompõe peróxidos inorgânicos e orgânicos como o H_2O_2 utilizando a GSH como doadora de elétrons (TUNÇMEN; TUZMEN, 2007; MARIANA *et al.*, 2009). A segunda linha de defesa é realizada pela GPx, porque o Km para o H_2O_2 é menor que o da CAT, sendo esta a terceira linha de defesa (TUNÇMEN; TUZMEN, 2007). Portanto, o aumento da atividade da GPx observada em nosso trabalho (figura 18D), provavelmente foi pelo aumento da produção do H_2O_2 derivado do $O_2^{\cdot-}$, e o aumento da atividade da CAT deve estar ligada com o aumento da SOD, uma vez que Menezes e colaboradores (2011) sugerem que estas enzimas possuem funções integradas, aumentando juntas para controlar uma situação de estresse oxidativo.

A glutathione S-transferase (GST) é uma enzima que age na detoxificação de xenobióticos, catalizando sua conjugação, ou de seus metabólitos, com substratos endógenos como a GSH. Estudos realizados por Banerjee e colaboradores (1999) mostraram que outros pesticidas, inclusive organofosforados, aumentam a atividade da GST por conjugação da GSH com pesticidas *in vivo*. Isto pode ser explicado pelo fato de que alguns pesticidas (organoclorados e organofosforados) consomem GSH através da reação catalisada pela GST como uma forma importante de desintoxicação desses compostos químicos (AGRAWAL *et al.*, 1991; KHRER, 1993; ALMEIDA *et al.*, 1997). Provavelmente o aumento da atividade da GST encontrada em nosso trabalho também seja em decorrência da conjugação da GSH ao Roundup como forma de detoxificação desse xenobiótico (figura 18E).

Sabendo-se que a GR é a enzima responsável pela redução da glutathione oxidada (GSSG) à glutathione reduzida (GSH) às custas de NADPH (HUBER *et al.*, 2008), e que a atividade da GGT é importante para a ressíntese de GSH no interior da célula (BANERJEE *et al.*, 1999). O aumento da atividade da GGT e GR encontrados em nosso trabalho (figura 18F/C) já eram esperados como um mecanismo compensatório para repor a concentração de GSH dentro da célula; e o aumento da G6PD (figura 18B) como fornecedora de NADPH para a redução da GSSG.

O principal papel da GSH baseia-se na sua habilidade de proteger a célula contra danos oxidativos causados por estresse oxidativo. Consequentemente, a mensuração dos níveis deste peptídeo pode fornecer dados essenciais para descrever o que está acontecendo na

célula (BUKOWSKA, 2003). Os níveis diminuídos de GSH encontrados em nossos estudos, pode ter sido pela utilização direta da GSH como redutora de espécies oxidantes geradas pelo Roundup (figura 18A) (BANERJEE *et al.*, 1999), ou como resultado do aumento da atividade de GPx para reduzir o H₂O₂ ou reduzir hidroperóxidos lipídicos para estabilizar álcoois lipídicos não radicais, utilizando a GSH como fonte de equivalentes redutores (TUNÇMEN; TUZMEN, 2007), ou ainda por ser consumida através da reação catalizada pela GST para detoxificação do pesticida (ALMEIDA *et al.*, 1997).

A atividade dos transportadores de aminoácidos do sistema A pode ser modulada a partir de diferentes estímulos, como adaptação à disponibilidade de aminoácidos, fatores de crescimento, choque osmótico, progressão do ciclo celular, estresses celulares e também estímulos hormonais (HÄUSSINGER; SCHLISS, 1999; SCHLISS; HÄUSSINGER, 2002; HYDE *et al.*, 2002). É possível que a redução na captação do aminoácido ¹⁴C-MeAIB que encontramos seja em decorrência do estresse oxidativo induzido pelo Roundup, que leva a LPO e oxidação de proteínas (figura 21). Sanchez (2012), relata que a LPO inativa enzimas e receptores associados a membrana, e que danos oxidativos às proteínas levam a perda da função de proteínas de transporte. Além disso, tanto a LPO como a oxidação de proteínas podem, de alguma forma, estar alterando o potencial de membrana o que influenciaria a cinética deste transportador. Desta forma, pode estar ocorrendo uma redução na disponibilidade de aminoácidos necessários para a síntese proteica e para a síntese de GSH, o que também contribuiria para a redução dos níveis de GSH encontrados.

Organofosforados podem aumentar a LPO por interagir diretamente com a membrana plasmática celular (HAZARIKA *et al.*, 2003). Lipídios são facilmente oxidados, portanto, são substratos preferidos por radicais livres causando danos via LPO, resultando em degradação de fosfolipídios, injúria a membrana e formação de hidroperóxidos lipídicos (COSTA *et al.*, 2008). A LPO é um dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade induzida por pesticidas (KHRER, 1993; KAVITHA; RAO 2007). Costa e colaboradores (2008) trabalhando com fígado e músculo de anfíbios expostos a Roundup relataram aumento dos níveis de hidroperóxidos lipídicos nestes tecidos, gerados pelo ataque oxidativo aos fosfolipídios e lipídios circulantes das células, indicando que há acúmulo de ERO nestes tecidos e que os danos induzidos por estes pode ser um dos efeitos tóxicos deste organofosforado. El-Shenawy (2009) reportou um

aumento nos níveis de TBARS quando estudou fígado de ratos expostos ao Roundup e glifosato, ele também atribuiu este aumento à geração de ERO pelo pesticida. Pieniazek *et al.* (2004) demonstrou que o Roundup e glifosato aumentam os níveis de peroxidação lipídica em eritrócitos humanos.

Menezes *et al.* (2011) descreveram que o Roundup pode induzir estresse oxidativo, levando a geração de radicais livres bem como causando LPO e carbonilação de proteínas como um mecanismo envolvido na toxicidade do pesticida, e que o aumento da LPO em tecidos de peixes sugere que o Roundup medeia a produção de radicais livres, que pode ser a causa do estresse oxidativo. Estes pesquisadores também citaram que os níveis de TBARS e o conteúdo de proteína carbonilada são efetivos biomarcadores da exposição ao Roundup.

Nossos resultados também mostraram um aumento nos níveis de TBARS e carbonilação de proteína (figura 17) provavelmente pelos mesmos mecanismos citados acima, mostrando que as ERO induzidas pelo Roundup não foram totalmente neutralizadas pelo sistema antioxidante testicular. Nossos resultados indicam claramente que o Roundup pode induzir a geração de ERO, alterar os sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, resultando em estresse oxidativo em testículos de ratos.

A GGT é a única enzima da membrana plasmática que é capaz de iniciar a metabolização da glutathiona (GSH) extracelular através da remoção do seu grupo gama-glutamil, assim ocorre a formação de um sulfidridi-peptídeo, a cisteinil-glicina (cys-gly). Esta pode ser clivada por dipeptidases de membrana e os aminoácidos são reabsorvidos para dentro da célula, ou a própria cisteinil-glicina é levada para o interior celular, onde juntamente com os aminoácidos são usados para a síntese de novo de GSH e síntese proteica (DROZDZ *et al.*, 1988; KUMAR *et al.*, 2000). Como consequência, a GGT participa na manutenção da homeostase redox das células (MARES *et al.*, 2005). Drozd e colaboradores (1998), investigaram a possibilidade da geração de ERO pela combinação da reação GGT/GSH, utilizando a transferrina como fonte de ferro. O trabalho mostrou claramente que a reação GGT/GSH pode gerar ERO na presença de uma fonte de ferro, via formação de cisteinil-glicina (cys-gly), metabólito da GSH.

A transferrina é a proteína que retira o íon ferro da circulação, prevenindo a geração de ERO. Conforme descrito anteriormente, em testículos esta proteína é sintetizada e secretada pelas células de Sertoli. Vários agentes redutores, como por exemplo os tióis, podem facilitar a

redução do Fe^{3+} ligado a transferrina levando a formação do Fe^{2+} que, então livre, pode via reação de Fenton levar a produção de ERO (DROZDZ *et al.*, 1998). A capacidade redutora dos tióis é aumentada pela formação do ânion tiolato (MISRA, 1974). A constante PK do tiol cys-gly é 6,4 enquanto que da GSH é 8,56. Em pH fisiológico, aproximadamente 90% da cys-gly é um tiolato, desta forma, na presença deste potente redutor, o ferro pode ser liberado das proteínas transportadoras formando o Fe^{2+} . O tiolato cys-gly também pode reduzir o oxigênio molecular (O_2) e formar o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que por dimutação espontânea ou enzimática, forma o H_2O_2 , e assim, o letal radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) pode ser produzido através da reação de Fenton (Figura 28) (DROZDZ *et al.*, 1998).

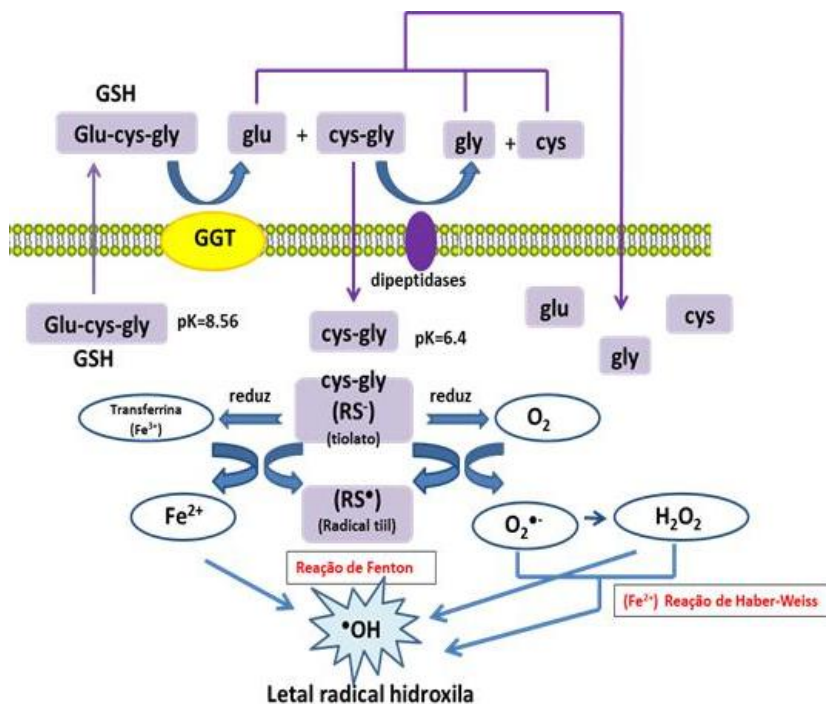


Figura 28. Mecanismo proposto para a GGT como mediadora na geração de ERO. Adaptado de Drozd *et al.*, (1998).

Paradoxalmente, a GGT desempenha um importante papel no sistema antioxidante protegendo a célula da depleção de GSH, mas, também é responsável pela produção de ERO. Recentes estudos epidemiológicos apresentam a GGT como preditor de diabetes tipo 2, acidente vascular cerebral, hipertensão, infarto do miocárdio isquêmico e doenças renais crônicas (POMPELLA *et al.*, 2004; TARGHER, 2010).

Sakuta (2005) sugeriu que esta enzima pode ser usada não só como um marcador de danos hepáticos e consumo de álcool, mas também como um marcador de riscos cardiovasculares. Targuer e colaboradores (2010) realizaram uma análise transversal dos dados da Agência Nacional de nutrição e saúde dos EUA do período de 2001 a 2006 e avaliaram a associação entre níveis séricos de GGT e doença renal crônica em uma amostra de 13.188 adultos. Os resultados mostraram uma forte relação entre o aumento nas concentrações séricas de GGT e doença renal crônica na população adulta dos EUA.

Simão *et al.* (2008), demonstraram que pacientes com síndrome metabólica apresentam aumento de estresse oxidativo, verificado por elevados níveis séricos de hidroperóxidos e aumento de GGT. Este estudo também confirmou que a GGT é um potente preditor da síndrome metabólica e um bom marcador de estresse oxidativo. Há algumas evidências que usam a GGT como um indicador de risco de câncer (STRASAK *et al.*, 2008). Em um estudo de coorte com 545.460 pessoas encontrou-se evidências da associação entre a elevação da GGT e o risco de desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (HEMELRIJCK *et al.*, 2011). A associação positiva entre os níveis de GGT e incidência de diversas patologias, inclusive câncer, pode ser pela ligação entre esta enzima e estresse oxidativo.

Em nosso trabalho encontramos a atividade aumentada da GGT nas células testiculares na presença do Roundup (figura 18F). É provável que essa elevação seja para manter os níveis de GSH (que estão diminuídos) provavelmente pelo estresse oxidativo gerado pelo pesticida. Paradoxalmente a este papel antioxidante, o aumento da atividade da GGT também pode estar indiretamente contribuindo para a geração de mais ERO de acordo com a hipótese proposta por Drozd e seu grupo (1998), exposta anteriormente.

Nossos resultados também mostraram que o efeito do Roundup sobre a atividade da GGT é dependente da ativação da PLC, PKC, ERK e parcialmente dependente de PI3K (figura 19). Estes resultados estão de acordo com os resultados de Meroni e colaboradores (1997), que mostraram que a atividade da GGT é dependente de cálcio e PKC em

células de Sertoli. Em relação ao envolvimento do cálcio, estes pesquisadores sugerem que existe uma via inibitória dependente de Ca^{2+} -calmodulina que participa na regulação da atividade basal da GGT. Quando nós utilizamos um bloqueador de CCDV-L, como a nifedipina, e um quelante de Ca^{2+} intracelular, como BAPTA, obtivemos um aumento na atividade da GGT (figura 20), provavelmente, porque a redução de Ca^{2+} intracelular levou a uma redução na disponibilidade de Ca^{2+} -calmodulina que regula de forma inibitória a atividade da GGT. Porém, quando co-incubamos estes bloqueadores com Roundup houve uma redução significativa na atividade da GGT. Isto provavelmente ocorreu porque, como já demonstramos anteriormente, o Roundup aumenta as concentrações de Ca^{2+} intracelular formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina. Consequentemente a via inibitória dependente deste complexo é ativada, diminuindo a atividade da GGT. Meroni *et al.*, (2002) também mostraram o envolvimento da via PI3K na atividade da GGT.

Zhang e colaboradores (2005) demonstraram que 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE), um produto da peroxidação lipídica gerado durante o estresse oxidativo, é capaz de aumentar tanto a expressão como a atividade da GGT e que as vias ERK 1/2 e p38 estão envolvidas no aumento da GGT em células pulmonares de ratos.

Além da GGT, as aminotransferases ALT e AST também foram estimuladas pela exposição ao Roundup (figura 22). Estas enzimas são responsáveis pela conversão de aminoácidos como a alanina e o aspartato aos seus α -cetoácidos correspondentes (piruvato e oxaloacetato, respectivamente). Estes aminoácidos, assim como glutamina, leucina e valina são importantes para o metabolismo energético das células de Sertoli. Além disso, as células de Sertoli secretam o lactato, que irá suprir as necessidades energéticas das células germinativas (ALVES *et al.*, 2012). Neste contexto, a estimulação na atividade da AST e da ALT pelo pesticida pode levar a alterações metabólicas importantes para o epitélio seminífero. O déficit energético pode ser um dos fatores envolvidos na geração de estresse oxidativo.

No conjunto, nossos resultados sugerem que o aumento da atividade da GGT, assim como das aminotransferases pode ocorrer em resposta ao estresse oxidativo induzido por Roundup e que a GGT também pode estar indiretamente contribuindo para a geração de mais ERO, sendo que diferentes vias de transdução de sinais podem estar envolvidas na regulação da atividade desta enzima.

A ativação de vias de transdução de sinais pelo Roundup (como a rota das MAPKs, da PI3K/Akt, da PLC/PKC) pode estar contribuindo para a fosforilação e ativação de Nrf2 e, conseqüentemente, a transcrição de genes antioxidantes envolvidos na resposta celular ao insulto oxidativo provocado pelo herbicida. Também, a ativação destas cinases pode contribuir para o aumento da atividade da GGT, ou ainda, para a ativação da p38 levando a morte celular. Neste contexto, é descrito que a via da p38 MAPK é ativada por estresse, como ERO, e esta rota influencia um grande número de processos celulares, inibindo o crescimento celular e promovendo a morte celular por necrose e apoptose (KYRIAKIS; AVRUCH, 1996; LOPES *et al.*, 2008).

Estudos mostram a participação de MAPKs na apoptose de células germinativas quando os testículos estão sob estresse (SINHA HIKIM, *et al.*, 2003; SHOW, *et al.*, 2008). E pesquisas em modelos animais têm indicado que a via MAPK está frequentemente envolvida na interrupção da espermatogênese e em outras funções das células germinativas ou de Sertoli. Isto, por sua vez, leva a um declínio na qualidade do esperma e na fertilidade (LI, *et al.*, 2009). Sendo assim, a hiperativação da via MAPK pelo pesticida Roundup pode de diversas formas estar contribuindo para alterações na função reprodutiva masculina.

O conjunto dos resultados observados demonstra que o herbicida glifosato-Roundup induz estresse oxidativo, aumenta a concentração de Ca^{2+} intracelular levando a ruptura da homeostase do Ca^{2+} , ativa vias de transdução de sinais envolvendo PLC, PKC, PI3K, MAPK-ERK1/2, p38, e pode levar a morte de células testiculares. O mecanismo de toxicidade proposto para o glifosato-Roundup está representado esquematicamente na figura 29. Estes eventos podem estar associados às disfunções reprodutivas observadas em agricultores ocupacionalmente expostos, que são supostamente atribuídas a este agrotóxico.

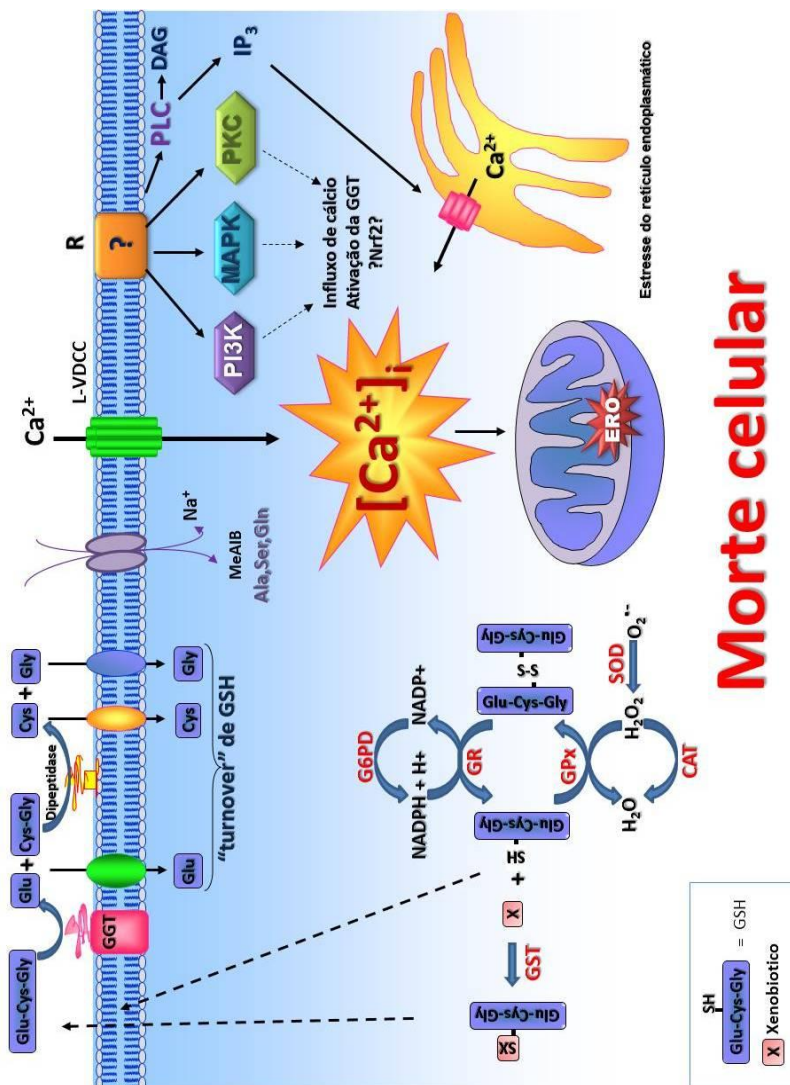


Figura 29. Mecanismo de toxicidade proposto para o Roundup sobre as células testiculares. A exposição ao Roundup (R) aumenta o influxo de Ca^{2+} via CCDV-L e através de mecanismos dependentes do efluxo de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e da ativação das vias de sinalização da PLC/PKC, MAPKs. Níveis intracelulares excessivos de Ca^{2+} podem estar relacionados ao estresse oxidativo, em especial ao estresse do retículo endoplasmático. A indução de estresse oxidativo representa a principal via de indução de morte celular. Fonte: próprio autor.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O herbicida glifosato, tanto isolado quanto na formulação comercial Roundup, aumenta o influxo de Ca^{2+} em testículos inteiros e em células de Sertoli em cultura, acarretando em morte celular; entretanto, a preparação comercial apresenta maior toxicidade;
- ✓ Os mecanismos envolvidos na captação de Ca^{2+} induzida pelo Roundup são dependentes da entrada deste íon via CCDV-L, assim como de seu efluxo do retículo endoplasmático;
- ✓ A captação de Ca^{2+} e o aumento na atividade da GGT induzidos pelo Roundup são dependentes da ativação das vias de sinalização da PLC/PKC, MAPKs (ERK1/2 e p38);
- ✓ Os antioxidantes vitamina C e Trolox[®] (isolados ou em associação) previnem o influxo de Ca^{2+} e a morte celular induzidos por Roundup tanto em testículos inteiros quanto em células de Sertoli em cultura;
- ✓ A indução de estresse oxidativo por Roundup foi confirmada através do aumento nos níveis de TBARS, na carbonilação de proteínas e na redução nos níveis de GSH;
- ✓ O Roundup afetou os sistemas de defesa antioxidante enzimáticos, acarretando em aumento na atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, GR, GST e G6PD em testículos de ratos pré-púberes;
- ✓ Flutuações no influxo de cálcio via CCDV-L participam, de alguma forma, no mecanismo de indução na atividade da GGT;
- ✓ O acúmulo de aminoácidos neutros, como a alanina, serina e glutamina, em testículos de ratos é reduzido pela exposição ao Roundup, conforme evidenciado pelo estudo utilizando o aminoácido modelo ^{14}C -MeAIB, o que pode afetar a disponibilidade destes para o metabolismo celular;
- ✓ A exposição aguda ao Roundup induziu a atividade das aminotransferases AST e da ALT.

7. PERSPECTIVAS

O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, e o Roundup, contendo como ingrediente ativo o glifosato, é o herbicida mais utilizado. O seu uso excessivo e inadequado tem levado à contaminação dos recursos hídricos e, principalmente à do homem que aplica estas substâncias e ingere alimentos contaminados. Estes dados demonstram a urgência de se avaliar o impacto dessas substâncias sobre a saúde e o ambiente. Sendo assim, pretende-se dar continuidade a este trabalho, aprofundando os estudos de investigação dos mecanismos moleculares de ação do glifosato-Roundup sobre a atividade desreguladora endócrina e a função reprodutiva. Dentre as principais perspectivas, destacamos:

- ✓ Investigar o efeito do glifosato-Roundup sobre a expressão da proteína Nrf2 em células testiculares, com o intuito de confirmar o envolvimento desta via na resposta ao estresse oxidativo gerado pelo pesticida;
- ✓ Estudar a modulação dos níveis de RNAm das enzimas envolvidas no metabolismo da glutatona: gama-glutamilcisteína sintetase, glutatona sintetase e GGT;
- ✓ Avaliar as possíveis alterações nos níveis séricos dos hormônios testosterona, estradiol, hormônios da tireoide e FSH, que participam de diversas funções testiculares, em ratos expostos *in vivo* ao Roundup;
- ✓ Determinar as alterações nos parâmetros oxidativos e nas vias de sinalização celular após exposição *in vivo* ao herbicida;
- ✓ Investigar os mecanismos envolvidos na diminuição da viabilidade celular induzida pelo glifosato-Roundup;
- ✓ Considerando-se que as alterações na atividade das transaminases e no influxo de aminoácido induzidas por Roundup sugerem alterações no metabolismo energético, pretende-se caracterizar o efeito deste herbicida sobre o metabolismo energético celular através do estudo da atividade de diferentes complexos da cadeia respiratória (I-V), de enzimas do ciclo de Krebs e da via glicolítica em células testiculares de ratos;
- ✓ Comparar a toxicidade da formulação comercial Roundup, glifosato P.A. e AMPA (principal metabólito do glifosato) sobre alguns parâmetros bioquímicos.
- ✓ Investigar o efeito do glifosato-Roundup sobre o ciclo celular

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, v. 10, p. 141-147, 2004.

ACQUAVELLA, J.F.; ALEXANDER, B.H.; MANDEL, J.S.; GUSTIN, C.; BAKER, B.; CHAPMAN, P.; BLEEKE, M. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. **Environ. Health Perspect.**, v. 112, p. 321–326, 2004.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 204, p. 234–254, 1984.

AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and sterility**, v. 79, n. 4, 2003.

AGRAWAL, D.; SULTANA, P.; GUPTA, G.S.D. Oxidative damage and changes in the glutathione redox system in erythrocytes from rats treated with hexachlorocyclohexane. **Fd. Chem. Toxicol.**, v. 29, p. 459–462, 1991.

AKINGBEMI, B.T.; GE, R.; KLINEFELTER, G.R.; ZIRKIN, B.R.; HARDY, M.P. Phthalate-induced leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. **PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 3, p. 775-780, 2004.

ALBERTS, B., et al. **Molecular Biology of The Cell**. New York, Taylor & Francis Group, 2002.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**, 5.ed, Porto Alegre, Artmed, 2010.

ALMEIDA, M.G.; FANINI, F.; DAVINO, S.C.; AZNAR, A.E.; KOCH, O.R.; BARROS, S.B.M. Pro- and anti-oxidant parameters in rat

liver after short-term exposure to hexachlorobenzene. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 16, p. 257–261, 1997.

ALVERAZ-SILVA, M. The Effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. **Toxicol. Lett.** 153, p. 227–232, 2004.

ALVES, M.G.; RATO, L.; CARVALHO, R.A.; MOREIRA, P.I.; SOCORRO, S.; OLIVEIRA, P.F. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. **Cell Mol Life Sci.** 20, 2012.

ANADÓN, A.; DEL PINO, J.; MARTÍNEZ, M.A.; CABALLERO, V.; ARES, I.; NIETO, I.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. Neurotoxicological effects of the herbicide glyphosate. 45th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2008), 5–8 October, Rhodes, Greece. **Toxicol. Lett.** 180S, S164, 2008.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; MARTINEZ, M.A.; CASTELLANO, V.J.; MARTÍNEZ, M.; MARTIN, M.T.; NOZAL, M.J.; BERNAL, L.L. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology Letters**, v. 190, p. 91–95, 2009.

ANDRADE JÚNIOR, D.R.; SOUZA, R.B.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J. Bras. Pneumol.**, v. 31(1), p. 60-68, 2005.

ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, 2010.

ANDRIGHETTI, M.S. **Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos cultivados com macieira com diferentes históricos de aplicação deste herbicida.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

ANVISA, Monografias de agrotóxicos. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 10 de julho de 2012.

ANVISA. Monitoramento do Mercado de Agrotóxicos: Observatório da Indústria de Agrotóxicos, 2010. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 01 out.2011.

ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 01 out.2011.

ARAÚJO, A.S.F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, 2002.

ARUOMA, O.I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 675–705, 1996.

BABIOR, B.M. Superoxide: a two-edged. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 30, p. 141-155, 1997.

BAIRD, F.E. ; PINILLA-TENAS, J.J.; OGILVIE, W.L.J.; GANAPATHY, V.; HUNDAL, H.S.; TAYLOR, P.M. Evidence for allosteric regulation of pH-sensitive System A (SNAT2) and System N (SNAT5) amino acid transporter activity involving a conserved histidine residue. **Biochemical Journal**. v. 397, p. 369-375. 2006.

BANERJEE, B.D.; SETH, V.; BHATTACHARYA, A.; PASHA, S.T.; CHAKRABORTY, A.K. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. **Toxicol Lett**. v. 107, p. 33-47, 1999.

BARBOSA, E.R.; LEIROS DA COSTA, M.D.; BACHESCHI, L.A.; SCAFF, M.; LEITE, C.C. Parkinsonism after glucine-derivative exposure. **Mov. Disord.**, v.16, p. 565–568, 2001.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R. BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23(4), p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo **Quim. Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BATISTA, M.T.A. **Efeito do herbicida Roundup® sobre a estabilidade de membranas de eritrócitos de coelho e de frangos.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2008.

BATRA, S.; SJÖGREN, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle, **Life Sci.** 32, p. 315-319, 1983.

BENACHOUR, N.; SERALINI, G.E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, p. 97-105, 2009.

BENACHOUR, N.; SIPAHUTAR, H.; MOSLEMI, S.; GASNIER, C.; TRAVERT, C.; SERALINI, G.E. Time and dose-dependent effects of Roundup on human embryonic and placental cells. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 53, p. 126-133, 2007.

BENEDETTI, A.L.; DE LOURDES VITURI, C.; TRENTIN, A.G.; DOMINGUES, M.A.C.; BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D.; RODERICK, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature Review Molecular Cellular Biology**, v. 4, p 517-529, 2003.

BEUTLER, E.; DURON O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 61, p. 882-90, 1963.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.**, v. 12 (12), p.123-30, 1999.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol**, v. 90 (1), p. 105-10, 1984.

BLOOM, D.A.; JAISWAL, A.K. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. **J. Biol. Chem.** v. 278(45), p. 44675–44682, 2003.

BOLAND, R.; BUITRAGO, C.; DE BOLAND, A.R. Modulation of tyrosine phosphorylation signalling pathways by $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D3. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 6, p. 280-287, 2005.

BOURAÏMA-LELONG, H.; VANNESTE, M.; DELALANDE, C.; ZANATTA, L.; WOLCZYNSKI, S.; CARREAU, S. Aromatase gene expression in immature rat Sertoli cells: age-related changes in the FSH signaling pathway. **Reprod Fertil Dev** 22, p. 508-515, 2010.

BOUTROS, T. CHEVET, E.; METRAKOS, P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. **Pharmacol. Rev.** 60, p. 261–310, 2008.

BOVERIS, A.; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A.I.; KOCH, O.R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 227(2), p. 534–541, 1983.

BRAKE, D.G.; EVENSON, D.P. A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development, **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 29–36, 2004.

BREITKREUTZ, D.; BRAIMAN-WIKSMAN, L.; DAUM, N.; DENNING, M.F.; TENNENBAUM, T. Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor pithelium. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v. 133, n 11, p. 793-808, 2007.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. **The FASEB Journal**, v.13, p. 1145-1155, 1999.

BRONSTON, C.; BRONSTON, M.A. Calcium-dependent regulation of protein synthesis in intact mammalian cells. **Annual Review of Physiology**, v. 52, p. 577-590, 1980.

BUDNI, P. **Efeito do carvedilol e monitoramento de terapias antioxidantes ao longo de 7 anos em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

BUITRAGO, C.G.; RONDA, A.C.; DE BOLAND, A.; BOLAND, R. MAP Kinases p38 and JNK are activated by the steroid hormone 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ in the C2C12 Muscle Cell Line. **Biochemistry**. v. 97, p. 698-708, 2006.

BUKOWSKA, B. Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. **Comp. Biochem. Phys.** v. 135, p. 435, 2003.

ÇAGLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 57–62, 2008.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484–490, 1985.

CAMPOS, E.B.P.; YOSHIDA, W.B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **J Vasc Br**, v. 3, n. 4, p. 357-366, 2004.

CARAFOLI, E.; GARCIA-MARTIN, E.; GUERINI, D. The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives. **Experientia**, v. 52, n.12, p.1091-100. 1996.

CARREAU, S.; GENISSEL, C.; BILINSKA, B. LEVALLET, J. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. **International Journal of Andrology**, v.22, n.4, p.211-223, 1999.

CASTILHO, R.F., CARVALHO-ALVES, P.C., VERCESI, A.E., FERREIRA, S.T. Oxidative damage to sarcoplasmic reticulum Ca⁽²⁺⁾-

pump induced by $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ascorbate}$ is not mediated by lipid peroxidation or thiol oxidation and leads to protein fragmentation. **Mol. Cell Biochem.** v. 159, p. 105–114, 1996.

CASTRO, A.S. **Avaliação pontual da degradação e transporte do herbicida glifosato no solo da bacia do Arroio Donato-Pejuçara (RS)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CERDEIRA, A. L.; GAZZIERO, D. L. P.; DUKE, S. O.; MATALLO, M. B.; SPADOTTO, C. A. Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosate-resistant soybean in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health Part B.**, v. 42, p. 539–549, 2007.

CERDEIRA, A.L.; GAZZIERO, D.L.P.; DUKE, S.O. ; MATALLO, M.B.;. Agricultural Impacts of Glyphosate-Resistant Soybean Cultivation in South America, **Journal Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 5799–5807, 2011.

CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. An introduction to free radical biochemistry. In: CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. editors. **Free Radical in Medicine**. London (UK), p. 481-493, 1993.

CHHABRA, S.K.; HASHIM, S.; RAO, A.R. Modulation of hepatic glutathione system of enzymes in suckling mouse pups exposed translocationally to malathion. **J. Appl. Toxicol.**, v. 13, p. 411-416, 1993.

CHRISTENSEN, H.N.; CESPEDES, C.; HANDLOGTEN, M.E.; RONQUIST, G. Energization of amino acid transport, studied for the Ehrlich ascites tumor cell. **Biochim biophys acta**, v. 300 (4), p. 487-522, 1973.

CHRISTMAN, M. F.; MORGAN, R. W.; JACOBSON, F. S.; AMES, B. N. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimutium*. **Cell**, v. 41, p. 753-762, 1985.

CLAIR, E.; MESNAGE, R.; TRAVERT, C.; SÉRALINI, G.E. 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, p. 269-279, 2012.

CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. **Cell**, v. 80, p. 259-268, 1995.

COLE, H.H.; CUPPS, P.T. **Reproduction in domestic animals**. New York: Academic Press, 1977.

COSTA, M.J.; MONTEIRO, D.A.; OLIVEIRA-NETO, A.L.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 153-163, 2008.

COWAN, K.J.; STOREY, K.B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. **J Exp Biol**. v. 206(7), p. 1107-1115, 2003.

COX, C. Glyphosate (Roundup). **J. Pest. Reform**. v. 18, p. 3-17, 1998.

DALLEGRAVE, E. **Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato-Roundup® em ratos wistar**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F.D.; OLIVEIRA, R.T.; ANDRADE, A.J.; DALSENTER, P.R.; LANGELOH, A. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Arch Toxicol**. v.81, p. 665-673, 2007.

DANIELSON, U.H.; MANNERVIK, B. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. **Biochem. J.**, v. 231, p. 263-267, 1985.

DARUICH, J.; ZIRULNIK, F.; GIMENEZ, M.S. Effect of the Herbicide Glyphosate on Enzymatic Activity in Pregnant Rats and Their Fetuses. **Environ. Res. Sec. A**. 85, p. 226-231, 2001.

DAVID, L.N.; MICHAEL, M.C. **Princípios de Bioquímica de LEHNINGER**, 5ed. Porto Alegre: Sarvier, Artmed, 2011.

DAVILA, H.M.; Molecular and functional diversity of voltage-gated calcium channels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 868, p. 102-117, 1999.

DELLEGRAVE, E.; MANTESE, F.D.; COELHO, R.S.; PEREIRA, J.D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 142, n.1-2, p. 45-52, 2003.

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **Am J Physiol**, 257: L163-73, 1989.

DI MASCIO, P.; MURPHY, M.E.; SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. **Am J Clin Nutr**, v. 53, 1 Suppl, p. 194S-200S, 1991.

DICK, R.E.; QUINN, J.P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 43, p. 545-550, 1995.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCIOGLU, M.; RODRIGUEZ, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radic Biol Med**, v.32, n.11, p.1102- 1115. 2002.

DOAN, T.N.; GENTRY, D.L.; TAYLOR, A.A.; ELLIOTT, S.J. Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive $\text{Ca}^{(2+)}$ -flux pathways in canine venous endothelial cells. **Biochem. J.**, v. 297, p. 209-215, 1994.

DOMIN, J.; GAIDAROV, I.; SMITH, M.E.; KEEN, J.H.; WATERFIELD, M.D. The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2 alpha is concentrated in the trans-Golgi network and present in clathrin-coated vesicle. **IBio Chem**. 275 (16), p. 11943-11950, 2000.

DORRINGTON, J.H.; ROLLER, N.F.; FRITZ, I.B. Effects of follicle-stimulating hormone on cultures of Sertoli cell preparations. **Mol Cell Endocrinol**, v. 3, p. 57-70, 1975.

DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiol Rev.**, v. 82, p. 47–95, 2002.

DROZDZ, R.; PARMENTIER, C.; HACHAD, H.; LEROY, P.; SIEST, G.; WELLMAN, M. Gamma-glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, n. 7, p. 786–792, 1998.

DUKE, S.O. Glyphosate Degradation in Glyphosate-Resistant and – Susceptible Crops and, **Journal Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 5835–5841, 2011.

DUKE, S.O.; BAERSON, S.R.; RIMANDO, A.M. Herbicides: Glyphosate. In: **Encyclopedia of Agrochemicals**; PLIMMER, J.R.; GAMMON, D.W.; RAGSDALE, N.N., eds., JOHN WILEY & SONS: New York, 2003.

DUKE, S.O.; POWLES, S.B. Glyphosate: a once in a century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, p 319-325, 2008.

DUNLAP, K.; LUEBKE, J.L.; TURNER, T.J. Exocytic Ca^{2+} channels in mammalian central neuron. **Trends in Neurosciences**, v .18, p. 89-98, 1995.

DUPONT, J.; MUSNIER, A.; DECOURTYE, J.; BOULO, T.; LÉCUREUIL, C.; GUILLOU, H.; VALET, S.; FOUCHÉCOURT, S.; PITETTI, J.L.; NEF, S.; REITER, E.; CRÉPIEU, X. P. FSH-stimulated PTEN activity accounts for the lack of FSH mitogenic effect in prepubertal rat Sertoli cells. **Mol Cell Endocrinol**. Feb 5;315(1-2), p. 271-276, 2010.

Effect of psychological stress on the L-arginine-nitric oxide pathway and semen quality. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 39(5), p. 581-588, 2006.

EL-SHARKAWY, A.M.; ABDEL-RAHMAN, S.Z.; HASSAN, A.A.; GABR, M.H.; EL-ZOGHBY, S.M.; EL-SEWEDY, S.M. Biochemical effects of some insecticides on the metabolic enzymes regulating glutathione metabolism. **Bull. Environ.Contam. Toxicol.**, v. 52, p. 505–510, 1994.

EL-SHENAWY, N.S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 379–385, 2009.

ENGELMAN, J.A.; LUO, J.; CANTLEY, L.C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinase as regulators of growth and metabolism. **Nature Rev. Genet.** 7, p 606-619, 2006.

ERMAK, G.; DAVIES, K. J.A. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. **Molecular Immunology** 38, p. 713–721, 2001.

ESCOTT, G.M.; ROSA, L.A.; LOSS, E.S. Hormonal regulation of glucose and amino acid transport and its relation with functions and development of Sertoli cells: a review. **Ciência em Movimento**, ano XIII, n.27, 2011.

ESKIOCAK, S.; GOZEN, A.S.; TASKIRAN, A.; KILIC, A.S.; ESKIOCAK, M.; GULEN, S. FALASCA, M. MAFFUCI, T. Role of as class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. **Biochem Soc Trans.** 35(2), p. 211-214, 2007.

FAWCETT, D.W. *In: A Textbook of histology*, 12. ed. Chaoman & Hall, New York, p. 770-772. 1994.

FAWCETT, D.W.; LEAK, L.V.; HEIDGER, P.M.JR. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement. v. 10, p. 105-122, 1970.

FERNANDES, R.O. **Hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo experimental: papel do estado redox sobre proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular para crescimento, sobrevivência e morte celular**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43(1), p. 61-68, 1997.

FERRER-MARTINEZ, A.; CASADO, J.; LETURQUE, A.; FELIPE, A.; PASTOR-ANGLADA, M. Up-regulation of liver system A for neutral amino acid transport in euglycemic hyperinsulinemic rats. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1222, n. 1, p. 63-69. 1994.

FIOCRUZ. O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Disponível em: www.fiocruz.br. Acesso em: 01 out.2011.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105(1), p. 114–121, 1984.

FRANÇA, L. R; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H. F; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo:Manole, 2005.

FRANÇA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v.63, n.2, p.300-318, 2005.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTÍNEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.). **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. España: Churchill Communications Europe España, p.197- 219, 1998.

FUKAMI, K.; NAKAO K, INOUE T, KATAOKA Y, KUROKAWAM, FISSORE RA, NAKAMURA K, KATSUKI M, MIKOSHIBA K, YOSHIDA N, TAKENAWA T. Requirement of phospholipase C delta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. **Science** 292, p 920–923, 2001.

GAIDAROV, I.; SMITH, M.E.; DOMIN, J.; KEEN, J.H. The class II phosphoinositide 3-kinase C 2 alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. **Mol Cell**, 7(2), p. 443-449, 2001.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M.C.; SERALINI, G.E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, p. 184-191, 2009.

GECK, P.; HEINZ, E. Coupling in secondary transport. Effect of electrical potential on the kinetics of ion linked co-transport. **Acta Biochimica Biophysica**, v. 4, n. 1, p. 49-63, 1976.

GEHIN, A.; GUYON, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p. 27–34, 2006.

GENNADY, E.; DAVIES, K.J.A. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death, Review. **Molecular Immunology**, v. 38, p.713–721, 2001.

GERSCHMAN, R.; GILBERT, D.L.; NYE, S.W.; DWYER, P.; FENN, W.O. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. **Science**, v. 119, p.623-626, 1954.

GIMSING, A.L.; BORGGAARD, O.K.; JACOBSEN, O.S.; AAMAND, J.; SØRENSEN, J. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils, **Applied Soil Ecology**, v. 27, p. 233–242, 2004.

GNESSI, L.; FABBRI, A.; SPERA, G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated systems. **Endocrinology Reviews**, v. 18, p. 541-609, 1997.

GOMEZ, E.; FERRERAS, L.; LOVOTTI, L.; FERNANDEZ, E. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. **European Journal of soil biology**, v. 45, p.163–167, 2009.

GONG, P.; HU, B.; CEDERBAUM, A.I. Diallyl sulfide induces heme oxygenase-1 through MAPK pathway. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 432, p. 252–260, 2004.

GORCZYŃSKA-FJÄLLING, E. The role of calcium in signal transduction processes in Sertoli cells. **reproductive biology**, v. 4, n. 3, p. 219-241, 2004.

GRAMMER, T.C.; BLENIS, J. Evidence for MEK-independent pathways regulating the prolonged activation of the ERK-MAP kinases. **Oncogene**, 14, p. 635 -1642, 1997.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes.**, v. 53(1), p. 110-118, 2004.

GRILLO, M.L.; GRISWOLD, M.W. The central role of Sertoli cells. In: Spermatogenesis Seminars In **Cell & Developmental Biology**, v. 9, p. 411-416, 1998.

GROTTO, D.; SANTA MARIA, L.D.; BOEIRA, S.; VALENTINI, J.; CHARÃO, M.F.; MORO, A.M.; NASCIMENTO, P.C.; V.J. POMBLUM, V.J.; GARCIA, S.C. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.43, p.619-624, 2007.

GROVER, A.K.; SAMSON, S.E. Effect of superoxide radical on Ca²⁺ pumps of coronary artery. **Am. J. Physiol.**, v. 255, p. C297–C303, 1988.

GROVER, A.K.; SAMSON, S.E.; FOMIN, V.P. Peroxide inactivates calcium pumps in pig coronary artery. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. H537–H543, 1992.

GUIDOTTI, G.G.; BORGUETTI, A.F.; GAZZOLA, G.C. The regulation of amino acid transport in animal cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 515, p. 329-366, 1978.

HABIG, W.H, PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249(1), p.7130–7139, 1976.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4.ed. Oxford University Press. 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochem Soc Trans**, v. 24, n. 4, p. 1023-1027, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**, v. 246, p. 501-514, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**. 142(2): 231-55, 2004.

HARDINGHAM, G.E.; ARNOLD, F.J.; GADING, H. Calcium microdomain near NMDA receptors: on switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication. **Nat. Neurosci**. v. 4, p. 565-566, 2001.

HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol**, v.11, n. 3, p. 298-300, 1956.

HARRIS, E. Regulations of antioxidant enzymes. **FASEB J**. 6:2675-2683, 1992.

HÄUSSINGER, D.; SCHLIESS, F. Osmotic induction of signaling cascades: role in regulation of cell function. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 255, p. 551-555, 1999.

HAWKINS, P.T.; ANDERSON, K.E.; DAVIDSON, K.; STEPHENS, L.R. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. **Biochemical Society Transactions**. v. 34, p. 647- 662, 2006.

HAZARIKA, A.; SARKAR, S.N.; HAJARE, S.; KATARIA, M.; MALIK, J.K. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. **Toxicology** 185:1-8, 2003.

HEMELRIJCK, M.V.; JASSEM, W.; WALLDIUS, G.; FENTIMAN, I.S.; HAMMAR, N.; LAMBE, M.; GARMO, H.; JUNGNER, I.; HOLMBERG, L. Gamma-glutamyltransferase and risk of cancer in a cohort of 545.460 persons—the Swedish AMORIS study. **European journal of cancer** 47, p. 2033–2041, 2011.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, 26: 277-85, 1989.

HESS, R.A. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. **Reviews of Reproduction**, v.5, n.2, p.84-92, 2000.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, vol. 31, No. 5, 1170-1179, 2008.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, v. 80, p. 225-236, 1995.

HWANG, J.I.; OH, Y.S.; SHIN, K.J.; KIM, H.; RYU, S.H.; SUH, P.G. Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC-eta. **Biochem J**. 389, p. 181–186, 2005.

HYDE, R. ; CWIKLINSKI, E.L.; MACAULAY, K.; PETER M.; TAYLOR, P.M.; HUNDAL, H.S. Distinct Sensor Pathways in the Hierarchical Control of SNAT2, a Putative Amino Acid Transceptor, by Amino Acid Availability. **Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 27, p. 19788-19798. 2007.

HYDE, R.; PEYROLLIER, K.; HUNDAL, H.S. Insulin Promotes the Cell Surface Recruitment of the SAT2/ATA2 System A Amino Acid Transporter from an Endosomal Compartment in Skeletal Muscle Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 16, n. April 19, p. 13628-13634. 2002.

INBARAJ, J.J.; CHIGNELL, C.F. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. **Chem. Res. Toxicol**. 17, 55, 2004.

IRVINE, D.S.; TWIGG, J.; GORDON, E.; FULTON, N.; MILNE, P.; AITKEN, R.J. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. **J Androl**, v.21, p. 33-44, 2000.

JAKUBIKOVA, J.; SEDLAK, J.; MITHEN, R.; BAO, Y. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. **Biochem. Pharmacol.** v. 69, p.1543–1552, 2005.

JÉGOU U, B. The Sertoli cell in vivo and in vitro. **Cell Biol. Toxicol.**, 8: 49-54, 1992.

JIA, Z.; MISRA, H.P. Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (sh-sy5y) cytotoxicity: role of NFkappaB and caspase-3. **Free Radical Biology & Medicine**; v. 42, n.2 :p. 288-98, 2007.

JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. **Fertil Steril.** 31(5):531-7, 1979.

JOSEPH, J.A.; STRAIN, J.G.; JIMENEZ, N.D.; FISHER, D. Oxidant injury in PC12 cells-a possible model of calcium “Dysregulation” in aging: I. Selectivity of protection against oxidative stress. **J. Neurochem.** 69, 1252–1258, 1997.

JUNG, K.A.; KYOUNG KWAK, M. The Nrf2 System as a potential Target for the Development of Indirect Antioxidants. **Molecules.** v.15, p.7266-7291, 2010.

JUNQUEIRA, V.B.C.; BARROS, S.B.M.; CHAN, S.S.; RODRIGUES, L.; GIAVAROTTI, L.; ABUD, R.L.; DEUCHER, G.P. Aging and oxidative stress. **Mol. Aspects Med.** 25, 5-16, 2004.

JUNQUEIRA, V.B.C.; SIMIZU, K.; VIDELA, L.A.; BARROS, S.B.M. Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver superoxide anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. **Toxicol.** 41: 193-204, 1986.

KARPOUZAS, D.G.; SINGH, B.K. Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: Metabolic pathways and molecular basis. **Advances in Microbial Physiology**, v.51, p. 119-154, 2006.

KAVITHA, P.; RAO, J.V. Oxidative stress and locomotor behavior response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. **Pest. Biochem. Physiol.** 87:182–188, 2007.

KESAVACHANDRAN, C.; SINGH, V.K.; MATHUR, N.; RASTOGI, S.K.; SIDDIQUI, M.K.; REDDY, M.M.; BHARTI, R.S.; KHAN, A.M. Possible mechanism of pesticide toxicity-related oxidative stress leading to airway narrowing. **Redox Report**, v.11, n.4: p.159-62, 2006.

KEUM, Y.S.; YU, S.; CHANG, P.P.; YUAN, X.; KIM, J.H.; XU, C.; HAN, J.; AGARWAL, A.; KONG, A.N. Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen- activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. **Cancer Res.** v. 66, p. 8804–8813, 2006.

KHANNA, N.C.; TOKUDA, M.; WAISMAN, D.M. The role of calcium binding protein in signal transduction. In: COOKE, B.A.; KING, R.J.B.; VAN DER MOLEN, H.J. **Hormone and their actions.** Parte II, p. 63, 1988.

KHRER, J.P. Free radical as mediator of tissue injury and disease. **Crit. Rev. Toxicol.** 23, 21–48, 1993.

KILBERG, M. S.; STEVENS, B. R.; NOVAK, D. A. Recent advances in mammalian amino acid transport. **Annu Rev Nutr.** v. 13, p. 137-165. 1993.

KIM, Y.H.; HONG, J.R.; GIL, H.W.; SONG, H.Y.; HONG, S.Y. Mixtures of glyphosate and surfactant TN20 accelerate cell death via mitochondrial damage-induced apoptosis and necrosis. **Toxicol In Vitro.** Feb:27(1), p. 191-197, 2013. doi: 10.1016/j.tiv.2012.09.021.

KIRKMAN, H. N.; ROLFO, M.; FERRARIS, A. M.; GAETANI, G. F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. **J. Biol. Chem.** **274**:13908–13914; 1999.

KOURY J.C, DONANGELO CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr.** 16(4):433-41, 2003.

KRAUSS, G. Intracellular Messenger Substances: “Second Messengers”. In: **Biochemistry of Signal Transduction and Regulation**. 3 ed. Darmstadt: Druckhaus Darmstadt GmbH, 2003.

KUMAR, T.R.; WISEMAN, A.L.; KALA, G.; KALA, S.V.; MATZUK, M.M.; LIEBERMAN, M.W. Reproductive defects in gamma-glutamyl transpeptidase - deficient mice. **Endocrinology** 141: 4270-4277, 2000.

KYRIAKIS, J.M.; AVRUCH, J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. **J Biol Chem.** 271(40), p. 24313-24316, 1996.

LECHNER, W.D., REHMAN ABDEL, M.S. The effect of carbamyl and malathion in combination of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione-S-alkyl transferase activity in vitro. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 15, p. 647–651, 1986.

LEE, A.J.; HUNTLEY, J.; VAN DEN BROEK, A.; COATES, D.; ISAAC, R.E. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. **Veterinary Parasitology.** 105, 49–63, 2002.

LEE, K.M.; KANG, K.; LEE, S.B.; NHO, C.N. Nuclear factor-E2 (Nrf2) is regulated through the differential activation of ERK1/2 and PKC α/β II by *Gymnaster koreayne* B. **Cancer Letters**, article in press, Dez. 2012.

LEE, C.; LEE, S.M.; MUKHOPADHYAY, P.; KIM, S.J.; LEE, S.C.; AHN, W.S.; YU, M.H.; STORZ, G.; RYU, S.E. Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 11, 1179–1185, 2004.

LEICHTMANN-BARDOOGO, Y.; COHEN, L.A.; WEISS, A.; MAROHN, B.; SCHUBERT, S.; MEINHARDT, A.; MEYRON-HOLTZ, E.G. Compartmentalization and regulation of iron metabolism proteins protect male germ cells from iron overload. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 302, p. 1519-1530, 2012.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v.186, p.464-478, 1990.

LEWIS, S.E.; BOYLE, P.M.; MCKINNEY, K.A.; YOUNG, I.S.; THOMPSON, W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. **Fertil Steril.** 64(4):868-70, 1995.

LI, M.W.M.; MRUK, D.D.; CHENG, Y.C. Mitogen-activated protein kinases in male reproductive function. **Trends in Molecular Medicine**, v.15 n.4, p. 159-168, 2009.

LING, S. M.; JIANG, Z.L.; BI, X.S.; YI, X.H. The preparation of Ag/AgCl nanoparticle and its resonance scattering spectroscopic study. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi.** v. 21, n. 6, p. 819-821. 2001.

LIU, Y.; ZHANG, Y.; LIU, J.; HUANG, D. The role of reactive oxygen species in the herbicide acetochlor-induced DNA damage on *Bufo raddei* tadpole liver. **Aquatic Toxicol** 78:21–26, 2006.

LOPES, J.P.; OLIVEIRA, S.M.; FORTUNATO, J.S. Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células β -pancreáticas relação com as complicações da diabetes *mellitus* tipo 2. **Acta Med Port.** v. 21, p. 293-302, 2008.

LOSS, E.S.; LOSS, E.S.; JACOBUS, A.P.; WASSERMANN, G.F. Diverse FSH and Testosterone Signaling Pathways in the Sertoli Cell. **Hormone and Metabolic Research.** v. 39, p. 1-7. 2007.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193:265-267, 1951.

LUEKEN, A.; JUHL-STRAUSS, U.; KRIEGER, G.; WITTE, I. Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H₂O₂) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. **Toxicology Letters** 147, 35–43, 2004.

LUI W. Y.; LEE W. M.; CHENG C. Y. Transforming growth factor-beta3 perturbs the inter-sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. **Endocrinol.**, 142: 1865-1877, 2001.

LYNCH, D.R.; DAWSON, T.M. Secondary mechanisms in neuronal trauma. **Curr. Opin. Neurol.** 7, 510–516, 1994.

MALATESTA, M.; PERDONI, F.; SANTIN, G.; BATTISTELLI, S.; MULLER, S.; BIGGIOGERA, M. Hepatoma tissue culture (HTC) cells as a model for investigating the effects of low concentrations of herbicide on cell structure and function. **Toxicol. in vitro**, 22, 1853–1860, 2008.

MALIK, J.K., SUMMER, K.M. Toxicity and metabolism of malathion and its impurities in isolated rat hepatocytes: role of glutathione. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.66, p. 69–76, 1982.

MANANDHAR, S.; CHO, J.M.; KIM, J.A.; KENSLER, T.W.; KWAK, M.K. Induction of Nrf2- regulated genes by 3H-1, 2-dithiole-3-thione through the ERK signaling pathway in murine keratinocytes. **Eur. J. Pharmacol.** v. 577, p.17–27, 2007.

MANNERVIK, B. The isoenzymes of glutathione S transferase. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**57, p. 357-406, 1985.

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

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BOULBEN, S.; HUREAU, D.; DURAND, G.; BELLÉ, R. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chem. Res. Toxicol.** 15, 326–331, 2002.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; DURAND, G.; BELLÉ, R. Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. **Environ. Chem. Lett.** 1, 8–12, 2003.

MARES, V.; MALÍK, R.; LISÁ, V.; SEDO, A. Up-regulation of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activity in growth perturbed C6 astrocytes. **Molecular Brain Research** 136, p.75–80, 2005.

MARIANA, A.; ALANIZ, M.J.T.; MARRA, C.A. The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 94, 93–99, 2009.

MARIN, J.; ENCABO, A.; BRIONES, A.; GARCIA-COHEN, E.C.; ALONSO, M.J. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. **Life Sci.** 64, 279–303, 1999.

MATTOS, G.E. **Vias de sinalização e efeito biológico da corticotropina (ACTH), do peptídeo NH₂-terminal da pró-opiomelanocortina (N-POMC) e do fator de crescimento de fibroblastos (FGF2) em culturas primárias de células da suprarenal de ratos.** Tese de doutorado, USP, São Paulo, 2011.

MCCONNELL, L.L. Biochemical Factors Involved in the FSH Action on Amino Acid Transport in Immature Rat Testes. **Hormone and Metabolic Research.** v. 24, n. 6, p. 276-279. 1992.

MCGIVAN, J.D.; PASTOR-ANGLADA, M. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. **Biochemical Journal.** v. 299, p. 321-334. 1994.

MENEGAZ, D.; BARRIENTOS-DURAN, A.; KLINE, A.; SILVA, F.R.; NORMAN, A.W.; MIZWICKI, M.T.; ZANELLO, L.P. 1 α ,25(OH)₂-Vitamin D₃ stimulation of secretion via chloride channel activation in Sertoli cells. **J Steroid Biochem Mol Biol,** v. 119, p. 127-134, 2010.

MENEGAZ, D.; ROSSO, A.; ROYER, C.; LEITE, L.D.; SANTOS, A.R.S.; SILVA, F.R.M.B. Role of 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃ on α -[1-

14C]MeAIB accumulation in immature rat testis. **Steroids**, v. 74, p. 264-269, 2009.

MENEGAZ, D.; ROYER, C.; ROSSO, A.; SOUZA, A.Z.; SANTOS, A.R.; SILVA, F.R. Rapid stimulatory effect of thyroxine on plasma membrane transport systems: calcium uptake and neutral amino acid accumulation in immature rat testis. **Int J Biochem Cell Biol**, 42:1046-51, 2010.

MENEGAZ, D.; ZAMONER, A.; ROYER, C.; LEITE, L.D.; BORTOLOTTI, Z.A.; SILVA, F.R. Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway. **Mol Cell Endocrinol**, v. 246, p. 128-134, 2006.

MENEZES, C.C.; FONSECA, M.B.; LORO, V.L.; SANTI, A.; CATTANEO, R.; CLASEN, B.; PRETTO, A.; MORSCH, V.M. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhambdia quelen*. **Arch Environ Contam Toxicol** 60:665–671, 2011.

MERONI, S.; CÁNEPA, D.; PELLIZZARI, E.; SCHTEINGART, H.; CIGORRAGA, S. Regulation of γ -glutamyl transpeptidase activity by Ca^{2+} -and protein kinase C-dependent pathways in Sertoli cells. **International Journal of Andrology**. v. 20, p. 189-194, 1997.

MERONI, S.B.; RIERA, M.F.; PELLIZZARI, E.H.; CIGORRAGA, S.B. Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. **J Endocrinol**, 174(2), p. 195–204, 2002.

MILBURN, C.C.; DEAK, M. KELLY, S.M.; PRICE, N.C.; ALESSI, D.R.; VAN AALTEN, D.M. Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformation change. **Biochem J. Nov.** 1, 375 (pt 3), 531-538, 2003.

MINK, P.J.; MANDEL, J.S.; LUNDIN, J.I.L.; SCEURMAN, B.K. Epidemiologic studies of glyphosate and non-cancer health outcomes: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 61, p. 172–184, 2011.

MISRA, H.P. Generation of superoxide free radicals during the autoxidation of thiols. **J. Biol. Chem.** 249:2151–2155; 1974.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, 247:188–92, 1972.

MONROY, C. M.; CORTÉS, A.C.; SICARD, D.M.; GROOT DE RESTREPO, H. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. **Biomédica**, vol.25,335-345, 2005.

MONSANTO, glifosato. Disponível em: www.monsanto.com.br/roundup/glifosato. acesso em: 10 de julho de 2012.

MONTAVON, P.; KUKIC, K.R.; BORTLIK, K. A simple method to measure effective catalase activities: Optimization, validation, and application in green coffee, **Analytical Biochemistry**, 360, 207–215, 2007.

MONTEIRO, D.A.; ALMEIDA, J.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, Brycon cephalus, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comp Biochem Physiol** 143:141–149, 2006.

MORAES, T.B. **Papel do ácido lipóico na neuroproteção contra a toxicidade da fenilalanina**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MORAKINYO, A.O.; IRANLOYE, B.O.; ADEGOKE, A.O. Antireproductive effect of calcium channel blockers on male rats. **Reproductive Medicine and Biology**, v.8, p 97-102, 2009.

MORAKINYO, A.O.; IRANLOYE, B.O.; DARAMOLA, A.O.; ADEGOKE, A.O. Antifertility effect of calcium channel blockers on male rats: association with oxidative stress. **Advances in Medical Sciences**, vol. 56(1), p 95-105, 2011.

MORGAN, R. W.; CHRISTMAN, M. F.; JACOBSON, F. S.; STORZ, G.; AMES, B. N. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella*

typhimurium overlap with heat shock and other stress proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83: 8059-8063, 1986.

MRUK, D.D.; CHENG, C.Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell Interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**. v. 25, n. 5, p. 747-806. 2004.

NAKAMURA, Y.; FUKAMI, K. Roles of Phospholipase C Isozymes in Organogenesis and Embryonic Development. **Physiology**, 24, p. 332–341, 2009.

NISHIZUKA, Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. **Nature** 334: 661–665, 1988.

NORDBERG, J. & ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

O'DONNELL, L. **Endocrine Regulation of Spermatogenesis**. KNOBIL AND NEILL'S Physiology of Reproduction, 3 Ed. St Louis, Academic Press: 1017-1069, 2006.

O'DONNELL, L.; STANTON P. G.; BARTLES J. R.; ROBERTSON D. M. Sertoli cell ectoplasmic specializations in the seminiferous epithelium of the testosterone-suppressed adult rat. **Biol. Reprod.**, 63: 99-108, 2000.

ODORIZZI, G.; BABST, M.; EMR,S.D. Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. **Trends Biochem Sci**. 25(5): 229-235, 2000.

OGA, S. Toxicinética. In: **Fundamentos da toxicologia**. São Paulo: Atheneu, p. 9-27, 1996.

OLIVEIRA, A.G.; TELLES, L.F.; HESS, R.A.; MAHECHA, G.A.; OLIVEIRA, C.A. Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*. **Reprod Toxicol.**, v.23(2), p. 182-191, 2007.

PALLADINO, M.A.; LAPERCHE, Y.; HINTON, B.T. Multiple Forms of Gamma-Glutamyl Transpeptidase Messenger Ribonucleic Acid Are Expressed in the Adult Rat Testis and Epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 320-328, 1994.

PAOLICCHI, A.; SOTIROPOULOU, M.; PEREGO, P.; DAUBEUF, S.; VISVIKIS, A.; LORENZINI, E.; FRANZINI, M.; ROMITI, N.; CHIELI, E.; LEONE, R.; APOSTOLI, P.; COLANGELO, D.; ZUNINO, F.; POMPELLA, A. Gamma-Glutamyl transpeptidase catalyses the extracellular detoxification of cisplatin in a human cell line derived from the proximal convoluted tubule of the kidney. **Eur. J. Cancer**, v. 39, p. 996-1003, 2003.

PAOLICCHI, A.; TONGIANI, R.; TONARELLI, P.; COMPORTI, M.; POMPELLA, A. Gamma-glutamyl transpeptidase-dependent lipid peroxidation in isolated hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. **Free Radic. Biol. Med.** 22:853–860; 1997.

PARTHIBAN, A.; VIJAYALINGAM, S.; SHANMUGASUNDARAM, K.; MOHAN, R. Oxidative stress and the development of diabetic complications – Antioxidantes and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. **Cell Biol. Int.** v. 19, p. 987-992, 1995.

PASTORI, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta.** v. 333, p. 19-39, 2003.

PEARSON, G. ROBINSON. F.; BEERS GIBSON, T.; XU, B.E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr. Rev.** 22, p.153–183, 2001.

PEDERZOLLI, C.D. **Papel do estresse oxidativo na neurotoxicidade do ácido L-piroglutâmico: relevância nos distúrbios hereditários do ciclo y-glutamil.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere** 61, 1115–1122, 2005.

PETERS, W. H.; ROELOFS, H. M. Effect of long time storage on cytosolic glutathione S-transferase. **Biochemistry Molecular International**, [S.l.], v. 41, n. 5, p. 913-917, 1997.

PETERSEN, O.H.; PETERSEN, C.C.H.; KASAI, H. Calcium and hormone action. **Annual Review of Physiology**, v. 14, p. 297-319, 1994.

PIENIAZEK, D.; BUKOWSKA, B.; DUDA, W. Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. **Pest Biochem Physiol**, 79:58–63, 2004.

POLLEGIONI, L.; SCHONBRUNN, E.; SIEHL, D. Molecular basis of glyphosate resistance – different approaches through protein engineering. **FEBS Journal**, v. 278, ed. 16, p. 2753 – 2766, 2011.

POMPELLA, A.; EMDIN, M.; PASSINO, C.; PAOLICCHI, A. The significance of serum gamma-glutamyltransferase in cardiovascular diseases. **Clin. Chem. Lab. Med.**; 42:1085–91, 2004.

PRADO, W.A. Involvement of calcium in pain and antinociception. **Braz J Med Biol Res**. v. 34(4), p. 449-461, 2001.

PUTNEY, J.W. BIRD, G.S. Calcium mobilization by inositol phosphates and other intracellular messengers. **Trends Endocrinol Metab**, v.5, p.256–260, 1994.

REBECCHI, M.J.; PENTYALA, S.N. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. **Physiol Rev** 80, p. 1291-1335, 2000.

REIMER, RICHARD J.; FARRUKH, A. ;CHAUDHRY, F.A.; GRAY, A.T.; EDWARDS, R.H. Amino acid transport System A resembles System N in sequence but differs in mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 97, n. 14, p. 7715–7720. 2000.

RENARD, D.C.; SEITZ, M.B.; THOMAS, A.P. Oxidized glutathione causes sensitization of calcium release to inositol 1,4,5-trisphosphate in permeabilized hepatocytes. **Biochem. J**. 284, 507–512, 1992.

RHEE, S.G. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. **Annu Rev Biochem** .70, p. 281–312, 2001.

RICCIONI,G.; BUCCIARELLI, T.; MANCINI, B.; CORRADI, F.; DIILIO, C.; MATTEI, P.A.; D'ORAZIO, N. Antioxidant vitamin supplementation in cardiovascular diseases. **Ann Clin Lab Sci**, v. 37, n. 1, p. 89-95, 2007.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 716-720, 2005.

RIERA, M.F.; REGUEIRA, M.; GALARDO, M.N.; PELLIZZARI, E.H.; MERONI, S.B.; CIGORRAGA, S.B. Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 302(8), p.914-923, 2012.

ROHN, T.T.; HINDS, T.R.; VINCENZI, F.F. Ion transport ATPases as targets for free radical damage. Protection by an aminosteroid of the Ca^{2+} pump ATPase and $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ pump ATPase of human red blood cell membranes. **Biochem. Pharmacol**. 46, 525–534, 1993.

ROMANO, M.A.; ROMANO, R.M.; SANTOS, L.D.; WISNIEWSKI, P.; CAMPOS, D.A.; SOUZA, P.B.; VIAU, P.; BERNARDI, M.M.; NUNES. M.T.; OLIVEIRA, C.A. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Arch Toxicol**, v. 86, p.663–673, 2012.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M.A.; MOURA, M.O.; OLIVEIRA, C.A. A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 481-487, 2008.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M.A.; OLIVEIRA, C.A. Glyphosate as endocrine chemical disruptor. **Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 5 n. 2 Maio/Ago. 2009.

ROMANO, R.M.; ROMANO, M.A.; BERNARDI, M.M.; OLIVEIRA, C.A.; FURTADO, P.V. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. **Arch Toxicol**, 84, p. 309-317, 2010.

ROMERO, D.M.; MOLINA, M.C.; JUÁREZ, A.B. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 74, 741–747, 2011.

ROONEY, T.A.; RENARD, D.C.; SASS, E.J.; THOMAS, A.P. Oscillatory cytosolic calcium waves independent of stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate formation in hepatocytes. **J. Biol. Chem.** 266, 12272–12282, 1991.

ROSA DE LIMA, M.F. **Clonagem e caracterização parcial de cDNA de glândula salivar de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) similar a Glutathione S-transferase.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001

ROSSO, A. **Estudo do envolvimento iônico e de proteínas cinases no mecanismo de ação da 1- α ,25(OH) $_2$ vitamina D $_3$ no influxo de cálcio em células de Sertoli e em testículos de ratos.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

ROSSO, A.; PANSERA, M.; ZAMONER, A. ZANATTA, L.; BOURAÏMA-LELONG, H.; CARREAU, S.; SILVA, F.R.M.B. 1 α ,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$ stimulates rapid plasma membrane calcium influx via MAPK activation in immature rat Sertoli cells. *Biochimie*. 94, p. 146-154, 2012.

ROUX, P.P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of protein kinases with Diverse Biological Functions. **Microbiology and molecular biology reviews**, June, p. 320–344, 2004.

ROVERI, A.; COASSIN, M.; MAIORINO, M.; ZAMBURLINI, A.; VAN AMSTERDAM, F.T.; RATTI, E.; URSINI, F. Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells. **Arch. Biochem. Biophys.** 297, 265–270, 1992.

RUBIN, J.L.; GAINES, C.G.; JENSEN, R.A. Glyphosate inhibition of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from suspension-cultured cells of *Nicotiana glauca*. **Plant Physiol.** 25, 839–845, 1984.

RUSSELL, H.; PEYROLLIER, K.; HUNDAL, H.S. Insulin promotes the cell surface recruitment of the SAT2/ATA2 system A amino acid transporter from an endosomal compartment in skeletal muscle cells. **Journal of Biological Chemistry.** v. 16, n. 19, p. 13628-13634, 2002.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIN, A.P. CLEGG, E.D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. 1. Clearwater, Fla.: Cache River Press, 286p, 1990.

RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. The Sertoli Cell. Clearwater: Cache River Press, 801p, 1993.

SAKUTA, H.; SUZUKI, T.; YASUDA, H. ITO, T. Gamma-glutamyl transferase and metabolic risk factors for cardiovascular disease. **Intern. Med.** 44: 538–41, 2005.

SÁNCHEZ, G.M. **Ambiente anti-oxidante/pro-oxidante su impacto medico.** 1ª ed .Aracne, 2012.

SANTOS FILHO, E.; SILVA, R.S.; LEMES, V.R.R. ; BARRETTO, H.H.C.; INOMATA, O. N.K.; KUSSUMI, T.A.; ROCHA, O.B. Alterações clínicas e laboratoriais relacionadas à exposição ambiental aos praguicidas organoclorados em moradores de aterro à céu aberto, Cubatão, S.P. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 64: 70-8, 2005.

SCHERER, N.M.; DEAMER, D.W. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca^{2+} -ATPase. **Arch. Biochem. Biophys.** 246, 589–601, 1986.

SCHLISS, F.; HÄUSSINGER, D. The cellular hydration state: a critical determinat for cell death and survival. **Biol Chem**, v. 383, p. 577-583, 2002.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME.** 10(10):308-13, 2004.

SCHWARTZ, Z.; EHLAND, H.; SYLVIA, V.L.; LARSSON, D.; HARDIN, R.R.; BINGHAM, V.; LOPEZ, D.; DEAN, D.D.; BOYAN, B.D. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ and $24R,25$ -dihydroxyvitamin D₃ modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase. **Endocrinology**. v. 143, p.2775–2786, 2002.

SCHWARTZ, Z.; SYLVIA, V.L.; LARSSON, D.; NEMERE, I.; CASSOLA, D.; DEAN, D.; BOYAN, D. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulates chondrocyte matrix vesicle protein kinase D (PKC) directly via G protein-dependent mechanisms and indirectly via incorporation of PKC during matrix vesicle biogenesis. **Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 11828–11837, 2002.

SÉRALINI, G.E.; CLAIR, E.; MESNAGE, R.; GRESS, S.; DEFARGE, N.; MALATESTA, M.; HENNEQUIN, D.; VENDÔMOIS, J.S. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Food and Chemical Toxicology** 50, p. 4221–4231, 2012.

SETCHELL, B.P.; MADDOCKS, S.; BROOKS, D.E. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds). **The Physiology of Reproduction**. 2Ed. New York: Raven Press, p.1063-1175, 1994.

SHAN, X.Q.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**. 47: 61-71, 1990.

SHARPE, R.M. Regulation of Spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds). **The Physiology of Reproduction**. 2Ed. New York: Raven Press, p.1363-1434, 1994.

SHARPE, R.M.; McKinnell, C.; Kivlin, C.; Fisher, J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**. v. 125, p. 769-784. 2003.

SHOW, M.D. HILL, C.M.; ANWAY, M.D.; WRIGHT, W.W.; ZIRKIN, B.R. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8) is associated with germ cell apoptosis and redistribution of the Bcl2-modifying factor (BMF). *J. Androl.* 29, p. 338–344, 2008.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A.R. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. **Ann N Y Acad Sci**, v. 669, p. 7-20, 1993.

SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; D'AGOSTINI, C.; ZAMONER, A. Effect of 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. **Life Science**, v. 69, 977-986, 2001.

SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; WASSERMANN, G.F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 147, p. 425-433, 2002.

SIMÃO, A.N.C.; DICI, J.B.; BARBOSA, D.S.; CECCHINI, R.; DICI, I. Influence of uric acid and gamma-glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. **Nutrition** 24 675–681, 2008.

SINDAG. Saúde alerta para os efeitos dos agrotóxicos no Brasil. Disponível em: www.agrosoft.org.br. Acesso em: 01 out.2011.

SINHA HIKIM, A.P.; LUE, Y.; DIAZ-ROMERO, M.; YEN, P.H.; WANG, C.; SWERDLOFF, R.S. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85, p. 175-182, 2003.

SKINNER, M. A. Murine plasma cell antigen PC-1 has a region homologous to the active site of bovine intestinal 5'-nucleotide phosphodiesterase I (EC 3.1.4.1). **Nucleic Acids Res.** v. 19, n. 21, p. 6049. 1991.

SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D. Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids. **Biol. Reprod.** 27, p. 211–221, 1982.

SMITH, E.A.; OEHME, F.W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Vet. Hum Toxicol**, 34, p. 531-543, 1992.

SMRCKA, A.V.; BROWN, J.H.; HOLZ, G.G. Role of phospholipase C ϵ in physiological phosphoinositide signaling networks. **Cellular Signalling**, 24, p. 1333–1343, 2012.

SOLEO, L.; STRZELCZYK, R. [Xenobiotics and glutathione]. **Gionale. Ital. Med. Lav. Ergon.** v.21, p 302– 308, 1999.

SOLOMON, G.M.; SCHETTLER, T. Environment and Health: Endocrine disruption and potential human health implications. **Canadian Medical Association of Journal**, v. 163, n. 11, p. 1471-76, 2000.

STEINBERGER, A. ; STEINBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ. **Biology of Reproduction.** v. 4, p. 84-87. 1971.

STEINRUCKEN, H.C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 94, 1207–1212, 1980.

STĘPKOWSKI, T.M.; KRUSZEWSKI, M.K. Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine.** v. 50, p.1186-1195, 2011.

STRASAK, A.M.; RAPP, K.; BRANT, L.J., et al. Association of gamma- glutamyltransferase and risk of cancer incidence in men: a prospective study. **Cancer Res.** 68(10):3970–7, 2008.

SUGAMURA, K.; KEANEY, J.F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 5, p. 978-992, 2011.

SUH, P.G.; PARK, J.I.; MANZOLI, L.; COCCO, L.; PEAK, J.C.; KATAN, M.; FUKAMI, K.; KATAOKA, T.; YUN, S.; RYU, S.H. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. **BMB Rep** 41, p. 415–434, 2008.

SUN, Z.; HUANG, Z.; ZHANG, D.D. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. **PLoS One**, v. 4 (8), e6588, 2009.

SURH, Y.J.; KUNDU, J.K.; NA, H.K. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals, **Planta Med.** v. 74, p.1526–1539, 2008.

SUZUKI, Y.J.; FORD, G.D. Inhibition of Ca(2+)-ATPase of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum by reactive oxygen intermediates. **Am. J. Physiol.** 261, H568–H574, 1991.

SWEATT, J.D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. **Curr. Opin. Neurobiol.** 14, p. 311-317, 2004.

TARGHER G. Elevated serum gamma-glutamyltransferase activity is associated with increased risk of mortality, incident type 2 diabetes, cardiovascular events, chronic kidney disease and cancer – a narrative review. **Clin Chem Lab Med**; 48(2):147–57, 2010.

TARGHER, G.; KENDRICK, J.; SMITS, G.; CHONCHOL, M. Relationship Between serum gamma glutamyl transferase and chronic kidney disease in the United States adult population. Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2006, **Nutrition Metabolism and Cardiovascular**, v.20, p. 583-590, 2010.

TATE, S.S.; MEISTER, A. γ -glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 39, 357-368, 1981.

TINDALL, D. J.; ROWLEY, D. R.; MURTHY, L.; LIPSHULTZ, L. I.; CHANG, C. H. Structure and biochemistry of Sertoli cells. **International Review of Cytology**, 94, 127-149, 1985.

TOPE, A.; BEBE, F.N.; PANEMANGALORE, M. Micronuclei frequency in lymphocytes and antioxidants in the blood of traditional limited-resource farm workers exposed to pesticides. **Journal of Environmental Science and Health**, 41:843-53, 2006.

TORRES, M.C.L.; SOARES, N.F.F.; PEREIRA, J.A.M. Extração, purificação e avaliação da atividade da glutathione s-transferase de fígado bovino. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 302-307, mar./abr., 2006.

TREISMAN R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. **Current opinion in cell Biology**. v. 8, n. 2, p. 205-215, 2006.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

TUNÇMEN, H.; TÜZMEN, M.N. Biochemical Effects of Pesticide Contaminated Drinking Water on Lipid Peroxidation and Free-Radical Scavenger. **Hacettepe J. Biol. & Chem.**, 35 (2), 111-116, 2007.

VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p.47-53, 2007.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol Cell Biochem**, v. 266, n. 1-2, p. 37-56, 2004.

VAN DER AAR, E. M.; BOUWMAN, T.; COMMANDEUR, N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Structure-activity relationships for chemical and glutathione transferase-catalysed glutathione conjugation reactions of a series of 2-substituted 1-chloro-4-nitrobenzenes. **Biochem. J.** v. 320, p. 531-540, 1996.

VISIOLI, F.; BORSANI, L.; GALLI, C. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals.

Cardiovascular Research 47, 419–425, 2000.

WALSH, L.P.; MCCORMICK, C.; MARTIN, C.; STOCCO, D.M.

Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health**

Perspectives, v. 108, n. 8, p. 769-776, 2000.

WANG, G.; FAN, X.N.; TAN, Y.Y.; CHENG, O.; CHEN, S.

Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate. A letter to the editor. **Parkinsonism and Related Disorders** 17, p. 486–487, 2011.

WANG, H.; JOSEPH, J.A. Mechanism of hydrogen peroxide-induced

calcium deregulation in PC12 cells. **Free Rad. Biol. Med.** 28, 1222–1231, 2000.

WANG, X. F.; LI, S.; CHOU, A.P.; BRONSTEIN, J. M. Inhibitory

effects of pesticides on proteasome activity: implication in parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v.2, n.1: p.198-205, 2006.

WANG, X.; QUINN, P.J. Vitamin E and its function in membranes.

Prog Lipid Res, v. 38, n. 4, p. 309-336, 1999.

WANG, X.; SHARMA, R.K.; SIKKA, S.C.; THOMAS, A.J;

FALCONE, T.; AGARWAL, A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertil Steril.** 80(3):531–5, 2003.

WASSERMANN, G.F.; BLOCH, L.M.; GRILLO, M.L.; SILVA,

F.R.M.B.; LOSS, E.S.; McCONNELL, L.L. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. **Hormone and Metabolic Research**, v. 24, p. 276-279, 1992.

WASSERMANN, G.F.; SILVA, F.R.M.B.; GRILLO, M.L. Role of

microtubules and protein synthesis on the stimulatory action of FSH on amino acid uptake in rat testes. **Med. Sci. Res.** v. 17, p. 737-738. 1989.

WEI, Q.; MINH, P.N.L.; DOTSCHE, A.; HILDEBRAND, F.; PANMANEE, W.; ELFARASH, A.; SCHULZ, S.; PLAISANCE, S.; CHARLIER, D.; HASSETT, D.; HAUSSLER, S.; CORNELIS, P. Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen. **Nucleic Acids Research**, p. 1–14, 2012.

WILCE, M.C.J.; PARKER, M.W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochimica et biophysica acta**, 1205, p. 1-18, 1994.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

XU, K.Y.; ZWEIER, J.L.; BECKER, L.C. Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase function by direct attack on the ATP binding site. **Circ. Res.** 80, 76–81, 1997.

YANG, C.M.; HUANG, S.M.; LIU, C.L.; HU, M.L. Apo-8'-lycopenal induces expression of HO-1 and NQO-1 via the ERK/p38-Nrf2-ARE pathway in human HepG2 cells. **J. Agric. Food Chem.** v. 60 p.1576–1585, 2012.

YOUSEF, M.I.; SALEM, M.H.; IBRAHIM, H.Z.; HELMI, S.; SEEHY, M.A.; BERTHEUSSEN, K. Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. **J Environ Sci Health B**, v.30, p. 513–534, 1995.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.** 74: 139-161,1994.

YU, R.; LEI, W.; MANDLEKAR, S.; WEBER, M.J.; DER, C.J.; WU, J.; KONG, A.N. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals, **J. Biol. Chem.** v. 274, p. 27545–27552, 1999.

ZAMONER, A.; BARRETO, K.P.; FILHO, D.W, SELL, F.; WOEHL, V.M.; GUMA, F.C.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Propylthiouracil-induced congenital hypothyroidism upregulates vimentin phosphorylation and depletes antioxidant defenses in immature

rat testis. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.40, n.3, 125-35, 2008.

ZAMONER, A.; CORBELINI, P.F.; FUNCHAL, C.; MENEGAZ, D.; SILVA, F.R.M.B.S.; PESSOA- PUREUR, R. Involvement of calcium dependent mechanisms in T3-induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. **Life Sciences**. v. 77, p. 3321–3335, 2005.

ZAMONER, A.; ROYER, C.; BARRETO, K.P.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neurosci Res**, 57: 98–103, 2007.

ZANATTA, L.; GOULART, P.B.; GONÇALVES, R.; PIEROZAN, P.; WINKELMANN-DUARTE, E.C.; WOEHL, V.M.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B.; ZAMONER, A. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ mechanism of action: Modulation of L-type calcium channels leading to calcium uptake and intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of young rats. **Biochimica Biophysica Acta (BBA)**. v. 1823, p. 1707-1719, 2012.

ZANATTA, L.; ZAMONER, A.; GONÇALVES, R.; ZANATTA, A.P.; BOURAIMA-LELONG, H.; CARREAU, S.; SILVA, F.R.M.B. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ signaling pathways on calcium uptake in 30-day-old rat Sertoli cells. **Biochemistry**, v. 50, p. 1-9, 2011.

ZELENKOVA, N. F.; VINOKUROVA N. G. Determination of Glyphosate and Its Biodegradation Products by Chromatographic Methods. **Journal of Analytical Chemistry**, Vol. 63, No. 9, p. 871–874, 2008.

ZHANG, D.D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. **Drug Metabolism Reviews**, v. 38, p.769–789, 2006.

ZHANG, H.; DICKINSON, D.A.; LIU, R.M.; FORMAN, H.J. 4-Hydroxynonenal increases γ -glutamyl transpeptidase gene expression through mitogen-activated protein kinase pathways. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 463-471, 2005.

ZHANG, S.; ZENG, Y.; QU, J.; LUO, Y.; WANG, X.; LI, W. Endogenous epidermal growth factor (EGF), contributing to the maintenance of the integrity of Sertoli-germ cell anchoring junction, is required for early recovery from acute testicular ischemia/reperfusion (IR) injury. **Reproduction**. Dec 14, 2012. (Epub ahead of print).

ZHOU, Y., WING, M.R.; SONDEK, J.; HARDEN, T.K. Molecular cloning and characterization of PLC eta2. **Biochem J**. 391, p. 667–676, 2005.