

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**AÇÃO DE MISTURA DE PRAGUICIDAS NO SISTEMA  
REPRODUTOR DE RATOS LEWIS MACHOS**

**MEIRE FRANÇA MARTINEZ**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Patologia da Faculdade de  
Medicina de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista - UNESP para obtenção do  
título de Doutor em Patologia**

**BOTUCATU - SP**

**2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**AÇÃO DE MISTURA DE PRAGUICIDAS NO SISTEMA REPRODUTOR  
DE RATOS LEWIS MACHOS**

**DOUTORANDA: MEIRE FRANÇA MARTINEZ  
ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO LAURO VIANA DE CAMARGO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Patologia da Faculdade de  
Medicina de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista - UNESP para obtenção do  
título de Doutor em Patologia**

**BOTUCATU - SP**

**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Martinez, Meire França.

Ação de mistura de praguicidas no sistema reprodutor de ratos Lewis machos  
/ Meire França Martinez. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina  
de Botucatu

Orientador: João Lauro Viana de Camargo

Capes: 40105008

1. Patologia - Estudos experimentais. 2. Alimentos – Contaminação.  
3. Praguicidas. 4. Toxicologia.

Palavras-chave: Anvisa; Desregulação endócrina; Misturas; Praguicidas; Ratos  
Lewis.

*"Estas cousas vos tenho dito para que tenhais paz em mim. No mundo passais por aflições; mas tende bom ânimo, eu venci o mundo."*

*(João 16:33)*

*Dedicatória*



*Ao meu anjo Henio,*

*Muito obrigada por ter feito dos meus sonhos seus próprios objetivos e de meu objetivo sua própria luta. Pessoa tão especial que não poupou esforços para que o sorriso que hoje traço no rosto fosse possível. A você que me ofereceu sempre o melhor que pôde, através de seu olhar de apoio, de sua palavra de incentivo, de seu gesto de compreensão, de sua atitude de segurança, mesmo quando me veio o desânimo. Nos momentos importantes, suportou minha ausência; nos dias de fracasso, respeitou meu sentimento e enxugou minhas lágrimas. Se hoje estou aqui é porque você acreditou em mim e caminhou ao meu lado!*

*Agradecimiento Especial*



*Ao meu orientador, Dr. João Lauro Viana de Camargo,*

*"O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer. Entre a sua mente e o seu corpo. Entre a sua educação e a sua recreação. Entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo..."*

*Obrigada, por compartilhar comigo um pouco de sua sublime experiência. Pelos conselhos, pelas conversas, pela grandiosa convivência, serei eternamente grata por tudo que me ensinou, seja na vida profissional ou pessoal!*

*Agradecimientos*



A Deus.

Aos meus pais Mara e Edson, minha irmã Edmary, meu irmão Edson e minha sobrinha Nathalie por torcerem incondicionalmente pelo meu sucesso.

Aos meus sogros Henio e Evany e cunhada Flávia pela torcida.

À Milenia Agrociências S/A, pela doação do praguicida Dicofol.

À Bayer CropScience S/A, pela doação do praguicida Endosulfan.

Ao Luciano e Cristina Dórico, minha gratidão por todas as vezes que necessitei de ajuda e encontrei em vocês aliados de eficiência incontestável.

À Maria Luísa Ardanz (Mara) e Paulo Roberto Cardoso, pela incondicional ajuda no processamento do material histológico e pela amizade.

Ao Paulo César Georgette, pela ajuda e participação durante toda a etapa experimental e pela atenção em todos os momentos.

Ao Marcos Roberto Franchi pela ajuda no processamento imunohistoquímico.

À Carla Adriene da Silva Franchi por todos os conselhos e ajuda nos momentos em que precisei.

Aos grandes amigos do anexo João Francisco Lozano Luizotto, Tony Fernando Grassi, Marize de Lourdes Marzo Solano e Merielen Garcia Nascimento.

Aos amigos, companheiros, colegas e pós-graduandos do Toxicam, Gabriele Brianezi, Viviane de Mattos Pascotto, Ana Paula Ferragut Cardoso, Mitscheli Sanchez da Rocha, Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira, Alexandre Domingues, Shadia Muhammad Ihlaseh, pela pronta ajuda, risos e conselhos.

À secretária da Pós-Graduação em Patologia, Vânia Soler, pela presteza e carinho com que sempre atendeu as minhas solicitações, muito obrigada!

Aos amigos do Istituto Superiore di Sanità (Roma-IT), Gabriele Moracci, Roberta Tassinari, Ilária Proietti, Bruno Berg, Laura Stecca, Candida Gisoldi, Chiara Frazzoli, Stefano Lorenzetti, Laura Narciso, Sabrina Taiti, Francesca Baldi, Francesca Maranghi, Alberto Mantovani.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES pelo auxílio financeiro (Bolsa PDEE - 2374-10-2).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq pelo auxílio financeiro (Bolsa no Brasil - 142780/2008-1).

*Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro das seguintes instituições:*

- *Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana - TOXICAM, Departamento de Patologia;*
- *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 06/60506-1).*

*Aos animais*

*Foste um instrumento de nosso aprendizado?*

*Foste apenas um objeto de experiência?*

**NÃO!!!**

*Foste para nós, vítimas solicitadas pela ciência, para benefício  
a humanidade, porém, apesar do teu olhar mudo e de não teres  
a permissão da palavra, isso não nos impedirá de dizer-te*

*sempre:*

*Muito Obrigado!*

*Índice*



# Índice Geral

## Capítulo I

<b>Revisão da Literatura</b> .....	01
1. Aparelho Reprodutor Masculino.....	01
2. Sistema Endócrino.....	07
3. Identificação de substâncias desreguladoras endócrinas.....	09
4. Desreguladores endócrinos e praguicidas agrícolas.....	11
5 Exposição a compostos bioacumulativos e as misturas químicas.....	14
6 ANVISA e gerenciamento do risco de praguicidas.....	16
6.1 Praguicidas utilizados neste estudo.....	18
Referências Bibliográficas.....	21
Tabela 1 – Praguicidas utilizados para compor a mistura experimental fornecidas a ratos Lewis machos.....	20

## Capítulo II

### Artigo Científico 1

<b>Resumo</b> .....	30
1. Introdução.....	31
2. Material e Métodos.....	33
3. Resultados.....	38
4. Discussão.....	47
5. Referências Bibliográficas.....	51
Figura 1 – Delineamento Experimental.....	35
Figura 2 – Hipertrofia de hepatócitos centrolobulares.....	43
Tabela 1 – Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso.....	39
Tabela 2 – Pesos relativos (%)* de órgãos dos diferentes grupos experimentais ao final do experimento.....	41
Tabela 3 – Concentrações (em ng/ml) de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona.....	42
Tabela 4 – Incidência (%) de eventos histológicas no fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	44
Tabela 5 – Análise histológica, dinâmica do processo espermatogênico e morfometria de testículo dos animais nos diferentes grupos experimentais.....	46

## Capítulo III

### Artigo Científico 2

<b>Resumo</b> .....	57
1. Introdução.....	58
2. Material e Métodos.....	61
3. Resultados.....	67
4. Discussão.....	73
5. Referências Bibliográficas.....	76
Figura 1 – Delineamento Experimental.....	64
Figura 2 – Cortes histológicos de próstata.....	72
Tabela 1 – Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso ao longo do tratamento.....	67
Tabela 2 – Pesos relativos (%) de órgãos coletados ao final do experimento dos diferentes grupos experimentais.....	69
Tabela 3 – Grau de maturação do epitélio germinativo, morfometria e incidências histológicas dos testículos de ratos aos 39 dias de idade.....	71
Tabela 4– Estereologia da próstata.....	71

*Capítulo I*

*Revisão da Literatura*



## 1. **Aparelho reprodutor masculino**

O aparelho reprodutor masculino do rato, assim como o da maioria dos mamíferos, é constituído pelos testículos, epidídimos, ductos eferentes e deferentes, glândulas acessórias e pênis. Trata-se de um conjunto de órgãos integrados pelo sistema endócrino e articulados para exercer a função reprodutora masculina, tal como indicado por seu nome.

Os testículos são envolvidos pela túnica albugínea, uma cápsula grossa de tecido conjuntivo denso constituído por fibroblastos, células mioepiteliais e fibras colágenas, revestido externamente pelo peritônio visceral. A túnica albugínea é mais espessa na superfície dorsal do testículo, onde forma o mediastino, do qual partem septos que dividem os testículos em lóbulos. Os lóbulos armazenam os túbulos seminíferos altamente enovelados, entremeados por tecido conjuntivo frouxo, o interstício (Setchell e Breed, 2006). Este interstício possui vasos sanguíneos e linfáticos, macrófagos, nervos e, particularmente, as células intersticiais, também denominadas células de Leydig, sendo estas responsáveis pela produção de andrógenos (Russel, 1990).

O testículo do rato contém aproximadamente 30 túbulos seminíferos, com diâmetro externo de cerca de 250 µm e comprimento total de 20 metros por testículo (Setchell e Breed, 2006). Os túbulos seminíferos são constituídos por uma membrana basal própria ou camada peritubular e pelo epitélio seminífero, composto por células de Sertoli e células germinativas (Clermont, 1972). Os túbulos seminíferos iniciam-se em fundo cego e terminam nos túbulos retos, que os conectam a uma rede de canais anastomosados, denominada rede testicular (*rete testis*), que conflui para os ductos eferentes.

Dentre as funções desempenhadas pelas células de Sertoli destacam-se a a) nutrição e suporte das células germinativas, b) a compartimentalização dos túbulos seminíferos, definida por suas junções intercelulares de modo a criar um microambiente específico para as células germinativas, c) a produção e secreção de um fluido com proteínas e fatores de crescimento e, também, d) fagocitose de células degeneradas ou de restos citoplasmáticos resultantes da espermiogênese (Hess e França, 2005; Skinner, 2005a, 2005b).

Em indivíduos adultos, o epitélio seminífero é o local onde ocorre o processo espermatogênico e, por isto, apresenta uma “citoarquitetura maturacional” bem definida. A espermatogênese é um processo contínuo e elaborado de proliferação, desenvolvimento e diferenciação das células germinativas, no qual células tronco espermatogoniais diplóides tornam-se células haploides altamente diferenciadas, os espermatozóides (Clermont, 1972).

A espermatogênese é composta por três fases distintas: mitótica (proliferativa), meiótica e espermiogênica (diferenciação) (Clermont, 1972; Russel et al., 1990), que são especificamente reguladas (Sharpe, 1994).

Durante a fase mitótica, as espermatogônias tronco (espermatogônias tipo A isolada -  $A_s$ ) proliferam e expandem a população espermatogonial, formando as diferentes classes de espermatogônias [tipo A proliferativa (A pareada –  $A_{pr}$  e A alinhada –  $A_{al}$ ), tipo A diferenciada ( $A_1, A_2, A_3, A_4$ ), tipo intermediário e tipo B]. As espermatogônias em estado diferenciado estão comprometidas com a formação dos espermátócitos primários, diferenciando-se neste tipo celular (Russel et al., 1990).

Na fase meiótica, os espermátócitos primários entram em meiose I, dando origem aos espermátócitos secundários, que passam pela meiose II, transformando-

se em espermatídes. Na fase pós-meiótica, as espermatídes sofrem uma série de modificações citológicas, como condensação da cromatina, formação de acrossomo, perda de citoplasma, reposicionamento de mitocôndrias e formação de flagelo; dando origem aos espermatozóides (Clermont, 1972; Russel et al., 1990).

O epitélio seminífero de um indivíduo adulto apresenta uma ou duas gerações de espermatogônias, espermatócitos e espermatídes. Cada geração representa um grupo de células que estão em um mesmo estágio de desenvolvimento, ou seja, que foram produzidas aproximadamente ao mesmo tempo e de maneira sincronizada. As várias gerações de células germinativas não são associadas aleatoriamente, elas sofrem associações celulares de composição fixa, denominadas estágios do ciclo da espermatogênese. O número de estágios da espermatogênese varia de acordo com a espécie, sendo que no rato são 14 (Clermont, 1972).

Em mamíferos, a duração total da espermatogênese baseada em 4,5 ciclos espermatogênicos varia de 30 a 75 dias (Sharpe, 1994). Esta duração está sob controle das próprias células germinativas (França et al., 1998), sendo geralmente constante dentro de uma espécie (França et al., 2005). A espermatogênese em ratos consiste em ciclos de 12,8 a 13,3 dias e tem duração de 52 a 53,2 dias, dependendo da linhagem (Clermont, 1972).

O processo espermatogênico é diretamente regulado pelo eixo neuroendócrino hipotalâmico-hipofisário-gonadal. A hipófise, por influência hipotalâmica, secreta dois hormônios sexuais que exercem o controle da função testicular, o LH (hormônio luteinizante) e o FSH (hormônio folículo-estimulante) Russel et al., 1990). Este hormônio atua sobre as células de Sertoli, estimulando suas funções sobre a espermatogênese, e aquele sobre as células de Leydig,

estimulando a produção de andrógenos, principalmente a testosterona (Christensen & Mason, 1965; Lipsett, 1976).

Em ratos, o FSH atua especificamente sobre o estágio inicial de desenvolvimento espermatogonial (Meachem et al., 1999), enquanto a testosterona regula a espermatogênese (Kerr et al., 1992). Estes hormônios atuam em cooperação nos demais estágios da espermatogênese, estimulando o início do processo meiótico e promovendo o desenvolvimento de espermátocitos e a produção de espermátides arredondadas (Kerr et al., 1992).

Com relação aos ductos eferentes, no rato, seu epitélio é composto por células cuboides não ciliadas que se alternam com grupos de células ciliadas. Os cílios movimentam-se ativamente, deslocando os espermatozóides em direção ao epidídimo. Esses ductos penetram pela região cranial do epidídimo, onde, após um trajeto tortuoso, terminam desembocando em um ducto único, o ducto epididimário (Haschek e Rousseaux, 1998; Junqueira e Carneiro, 2004).

O epidídimo é formado por um ducto único, longo e altamente enovelado, que liga os ductos eferentes ao ducto deferente (Consentino e Cockett, 1986; Hermo e Robaire, 2002). É dividido em cabeça, corpo e cauda (França et al., 2005; Sullivan et al., 2005). Estas porções são histologicamente subdivididas em zonas, designadas de acordo com a altura do epitélio e distribuição e quantidade dos seus seis tipos celulares (basais, principais, estreitas, halo, claras e apicais (Hermo e Robaire, 2002).

O ducto deferente é enovelado e liga a cauda do ducto epididimário à uretra prostática. Em muitas espécies, ele se apresenta como um ducto único de paredes espessas, com epitélio pseudoestratificado e revestimento muscular espesso. Os

seus tipos celulares são semelhantes às células principais, basais e estreitas do epidídimo (Setchell e Breed, 2006). Antes de chegar à próstata, o ducto deferente dilata-se, formando uma região chamada ampola. Na porção final desta região, desembocam as vesículas seminais. Quando o ducto deferente penetra na próstata e se abre na uretra prostática, passa a ser chamado de ducto ejaculatório (Haschek e Rousseaux, 1998).

Em roedores, as glândulas acessórias são a vesícula seminal, próstata, glândula de coagulação, glândula bulbouretral e glândula preucial. Localizam-se ao longo da uretra, desde o ducto deferente até o pênis (Haschek e Rousseaux, 1998).

A funções das glândulas acessórias estão relacionadas à produção de secreções que contribuem para nutrição e suporte dos espermatozoides pós ejaculação. Estas funções são dependentes de ação de andrógenos e, por isso, refletem as mudanças da homeostase endócrina e/ou da função testicular (Mann, 1974; Clegg et al., 2001).

As vesículas seminais consistem de um par de ductos de luzes amplas, enovelados e revestidos por epitélio pseudo-estratificado pregueado, constituído por células epiteliais secretoras e células basais. A membrana basal deste epitélio apóia-se em camada muscular lisa com uma lâmina interna (fibras circulares) e outra externa (fibras longitudinais) (Hayward et al., 1996a; 1996b). A secreção seminal tem aspecto hialino, favorece a coagulação do semem, a motilidade espermática, a estabilidade da cromatina do espermatozoide e modula a atividade imune no trato reprodutor feminino (Wang e Zhang, 2007).

A próstata é formada por um conjunto de glândulas tubuloalveolares ramificadas, cujos ductos desembocam na uretra prostática, que a atravessa. Essas

glândulas são envoltas por abundante tecido fibroelástico e muscular liso; o epitélio luminal é formado por células secretoras colunares simples, com células basais e neuroendócrinas intercaladas (Roy-Burman et al., 2004). Esta glândula contribui para a produção de nutrientes para o fluido seminal e para a manutenção do gradiente iônico e do pH adequados de sua secreção (Untergasser et al., 2005). No rato, a próstata é dividida em quatro pares de lóbulos denominados lóbulos dorsais, laterais, ventrais e anteriores (Roy-Burman et al., 2004).

As glândulas bulbouretrais, ou glândulas de Cowper, são constituídas por glândulas tubuloalveolares, que secretam um fluido pré-ejaculatório na uretra durante a excitação sexual. Esta secreção ajuda a neutralizar vestígios de urina na uretra e a lubrificar a uretra e vagina, servindo também como fonte de energia para os espermatozóides (Haschek e Rousseaux, 1998; Chughtai et al., 2005).

As glândulas prepúciais são pequenas glândulas sebáceas autócrinas, localizadas no tecido subcutâneo no final do prepúcio; secretam uma mistura de óleos e células epiteliais descamadas, o esmegma, que lubrifica a glândula e pode ter propriedades antibacterianas e antivirais (O'Neill e Gershbein, 1976; Haschek e Rousseaux, 1998).

Em mamíferos o sêmen é depositado no trato reprodutor feminino pelo pênis. O corpo do pênis do rato é formado por dois corpos cavernosos e um corpo cavernoso uretral (Chiasson, 1969). Histologicamente, os corpos cavernosos são constituídos por tecido erétil como vasos calibrosos, e revestidos por uma túnica albugínea (Murakami e Mizuno, 1986). Além disso, o pênis do rato tem um osso peniano que se inicia na transição do corpo para a glândula, como uma continuação dos corpos cavernosos (Hebel e Stromberg, 1986).

A quantidade de órgãos e funções relacionadas à manutenção da integridade física e funcional dos espermatozóides traduz a complexidade do sistema reprodutor masculino, bem como sugere que suas disfunções só se manifestam quando esta diversidade de sistemas de manutenção da estabilidade forem alteradas, i.e., as agressões devem ser realmente relevantes para serem conseqüentes.

## **2. Sistema Endócrino**

O sistema endócrino controla funções e reações corporais em todos os vertebrados (aves, répteis, peixes, anfíbios e mamíferos) e invertebrados (moluscos e insetos) (Nogueira, 1999). Este sistema é constituído basicamente por três componentes distintos: I – Conjunto de glândulas especializadas, como hipófise, tireóide e paratireóide, hipófise, adrenais, pâncreas e gônadas; II – Hormônios, sintetizados e liberados pelas glândulas; III – Tecidos e/ou células alvo que respondem aos estímulos hormonais. Também, existem alguns órgãos especializados, como o hipotálamo e o fígado, e agrupamentos celulares específicos, como as células neuroendócrinas, que participam de algum modo da manutenção da homeostase endócrina (Nogueira, 1999).

Os hormônios são substâncias de natureza química variada que agem em tecidos e órgãos específicos, promovendo comunicação intercelular e regulando seu desenvolvimento. Quimicamente, são de três tipos: os esteróides, os protéicos e ou peptídicos, e os derivados do aminoácido tirosina. O FSH e LH, produzidos pela hipófise anterior, são de natureza glicoprotéica; a testosterona é um hormônio

esteróide sintetizado a partir do colesterol principalmente nas células intersticiais das gônadas em ambos os sexos, mas em pequena quantidade também pelas adrenais.

Os hormônios podem ser transportados pelo sangue em pequenas quantidades, agindo em diferentes partes do organismo (ação endócrina), ou sobre as células vizinhas aos locais de sua produção (parácrina) ou ainda, sobre as próprias células que os produzem (autócrina). São essenciais para o metabolismo geral e para a homeostase dos órgãos e suas funções, influenciando desde as funções dos sistemas imune e nervoso até o estabelecimento das características sexuais e reprodutivas, inclusive as comportamentais.

De interesse particular ao nosso estudo é o sistema reprodutor masculino, revisto atrás. Este sistema é controlado principalmente pelas secreções do hipotálamo, hipófise anterior e gônadas, embora outras glândulas e mensageiros químicos também intervenham. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) produzido pelo hipotálamo atua na hipófise anterior liberando, entre outros, o FSH, que estimula a gametogênese, e o LH, que estimula a secreção de andrógenos pelos testículos. O FSH tem papel importante na gametogênese pois atua nas células de Sertoli, que nutrem e sustentam as espermatídes. O LH estimula as células intersticiais a secretarem andrógenos, em particular a testosterona, que é responsável pela manutenção da espermatogênese e fertilidade (mediada pelas células de Sertoli), maturação dos órgãos reprodutores e pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias, pela interação com os receptores intranucleares nos tecidos alvo (Rang et al., 1997).

Uma substância ou mistura de substâncias químicas exógenas capazes de alterar a função(s) do sistema endócrino e, conseqüentemente, provocar efeitos adversos para a saúde de um organismo intacto, ou à sua descendência, ou à

(sub)populações é considerado um desregulador endócrino (EPA, 2008; OECD, 2010). Investigações epidemiológicas indicam aumento de incidência de malformações no trato genito-reprodutivo e decréscimo da fertilidade masculina, bem como o aumento da incidência de certas neoplasias de testículos e próstata no homem e da mama e vagina em mulheres (Skakkebaek et al., 2001; Toppari et al., 2002; Heley e Korach, 2006). Estas condições nosológicas possivelmente estão associadas às substâncias desreguladoras endócrinas.

### **3. Identificação de substâncias desreguladoras endócrinas**

A União Européia (EU), a Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (EPA), a Organização Mundial de Saúde (OMS), e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), têm manifestado sérias preocupações a respeito da ação dos desreguladores endócrinos sobre a saúde humana e animal. Isto porque, durante as últimas décadas, têm sido obtidas várias evidências de que certas substâncias químicas naturais e ou sintéticas exercem efeitos adversos sobre a o equilíbrio hormonal. Particularmente, muitos praguicidas agrícolas são suspeitos de interferirem neste equilíbrio, afetando a saúde humana (Mnif et al., 2011).

Uma das ações daquelas instituições foi a criação de grupos de trabalho e comitês especiais direcionados para desenvolver e harmonizar ensaios a avaliação de substâncias suspeitas de interferir na homeostase hormonal (Nogueira, 1999; OECD, 2010; EPA, 2011). Um desses grupos é o “Endocrine Disruptor Screening Program” (EDSP), criado pela EPA com o objetivo de identificar substâncias químicas com potencial de desregulação hormonal através de uma bateria inicial

(Tier 1) com onze ensaios. Esta bateria consiste de cinco ensaios *in vitro* (teste de ligação ao receptor de estrógeno (ER) e ao receptor de andrógeno (AR), teste do gene repórter da ativação de transcrição hormonal, avaliação da esteroidogênese e avaliação da atividade aromatase) e de seis ensaios *in vivo* (teste uterotrófico, teste de Hershberger, testes de roedores púberes machos e fêmeas, testes de reprodução de peixes e da metamorfose de anfíbios – sapo) (OECD, 2010; EDSTA, 2011; EPA, 2011). Após a análise dos resultados desses ensaios iniciais, é determinado se a substância tem potencial de interferência hormonal e, neste caso, deverá ser submetida a outros testes *in vivo* (Tier 2). Esses outros testes devem ser mais abrangentes e envolver mamíferos, aves, anfíbios, peixes e invertebrados para estabelecer relações de dose-resposta em um contexto de maior toxicidade, além de identificar potenciais adversidades envolvendo a reprodução e desenvolvimento, o sistema endócrino, bem como sistemas não endócrinos (por exemplo: neurológico, hepático, imunológico e renal) (OECD, 2010; EDSTA, 2011; EPA, 2011.).

De nosso interesse é o ensaio de Hershberger em ratos machos, que avalia *in vivo* o potencial androgênico ou antiandrogênico - indicado a partir de agora como (anti)androgênico - de uma substância por alterações dos pesos de cinco órgãos/tecidos sexuais sensíveis a andrógenos: glândulas de Cowper, músculo elevador do ânus, músculo bulbo cavernoso, vesículas seminais, glândulas de coagulação e próstata dorsolateral e ventral. Este ensaio pode ser realizado por dois métodos; o primeiro é o ensaio original que impõe a castração de animais adultos jovens; o segundo utiliza animais recém desmamados não castrados (Ashby et al., 2004; Owens et al., 2007; OECD, 2010; EDSTA, 2011). A sensibilidade dos dois métodos está no uso de animais com mínima produção endógena de andrógeno e mínima variabilidade do peso inicial dos tecidos e órgãos alvo. Como os níveis de

andrógenos circulantes são muito baixos, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal não é capaz de compensar o *feedback* sobre os mecanismos internos, e a habilidade de resposta dos tecidos é maximizada (OECD, 2010; EDSTA, 2011).

#### **4. Desreguladores endócrinos e praguicidas agrícolas**

Nos últimos anos, muitos estudos apontaram para o fato de que alguns xenobióticos como fármacos, solventes e poluentes ambientais podem mimetizar ou antagonizar os efeitos dos hormônios esteróides, como estrógenos e andrógenos, sendo portanto considerados como desreguladores endócrinos. Inclusive, há sugestões de que as atuais incidências elevadas dos cânceres de mama, testículos e próstata, além de algumas disfunções reprodutivas e alterações do desenvolvimento do sistema reprodutor, possam ser resultados de exposição à aquelas substâncias (Skakkebaek et al., 2001; Massaad et al., 2002; Bila & Dezotti, 2007; Mnif et al., 2011).

Nos últimos 50 anos ocorreu aumento progressivo da prevalência de alterações no trato reprodutivo masculino, particularmente decréscimo da quantidade e qualidade espermática, e aumento da freqüência de malformações (criptorquidismo e hipospádia) e de tumores testiculares (Cooper e Kavlock, 1997; Nunes e Tajara, 1998; Toppari et al., 2002; Skakkebaek et al., 2001). Dentre os compostos químicos com ação desreguladora endócrina potencial, muita importância tem sido atribuída aos praguicidas agrícolas, de forma que um número crescente de estudos tem sido realizado sobre os efeitos da exposição populacional a estes compostos (Quandt et al., 2004; Mnif et al., 2011).

Neste quadro, fato relevante e de nosso interesse particular é o crescimento do mercado de praguicidas agrícolas no mundo. O Brasil se destacou como o

primeiro mercado global destes produtos, movimentando 7,1 bilhões de dólares no ano de 2008 (Pacheco- Estado de São Paulo, 2009). O uso de enorme quantidade destes produtos deve propiciar a contaminação difusa do meio ambiente e a exposição de aplicadores e consumidores, esses últimos de forma contínua e à baixas doses. O potencial nocivo desta exposição acidental e à baixas doses de praguicidas agrícolas sobre a saúde humana não pode ser ignorado.

Um dos primeiros praguicidas identificados como desregulador endócrino foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), seguido por outros organoclorados como o dieldrin, clordane, heptaclor, endosulfan, hexaclorobenzeno, metoxicloro e clordecone (Massaad et al., 2002). Devido sua persistência no meio ambiente, estes produtos também têm sido incluídos no grupo dos “poluentes orgânicos persistentes” (POPs). Esta persistência é resultante de características químicas como lipossolubilidade e estabilidade, que os tornam resistentes à degradação biótica ou abiótica, podendo ser detectados em diferentes regiões do planeta décadas após sua liberação. Em virtude desta característica, estes compostos podem ser encontrados também em alimentos de origem animal (leite, carnes e seus derivados), o que perpetua a contaminação da cadeia alimentar. Por estas razões, muitos destes praguicidas tiveram seu uso proibido, controlado ou substituído em diversos países, incluindo no Brasil. Apesar disto, vários produtos organoclorados continuam sendo utilizados em culturas agrícolas, ou para outros fins (Guillette et al., 1994; D’Amato et al., 2002; Delgado et al., 2002; Windhan et al., 2005; Mnif et al., 2011). Por não possuírem característica acumulativa, alguns organoclorados têm sido utilizados em substituição aos que possuem esta característica, como o dicofol. No entanto, o dicofol é suspeito de atuar como desregulador endócrino, em virtude de sua estrutura química muito semelhante ao DDT e porque concentrações de

0,63% a 24% de resíduos de DDT já foram observadas como contaminantes em diferentes formulações comerciais desse produto (Di Muccio et al., 1988).

Substâncias químicas exógenas com ação estrogênica – ou xenoestrógenos - mesmo possuindo mecanismos de ação variados em organismos superiores, aparentemente provocam redução da fertilidade, malformações genito-reprodutivas (hipospadia e criptorquidismo) e neoplasias masculinas (Skakkebaek et al., 200; Rittler et al., 2002; Toppari et al., 2002). As mais descritas são as que agem como agonistas ou antagonistas em receptores nucleares de estrógeno (ER) ou de andrógenos (AR). O *o,p'*-DDT e seu metabólito o *p,p'*-DDE, por exemplo, têm efeito antiandrogênico, ligando-se e bloqueando a função dos ARs. Um mecanismo particular de ação dos desreguladores endócrinos em roedores machos é o aumento do *clearance* metabólico da testosterona e este modo de ação é possível de ocorrer em outros mamíferos. Alguns praguicidas, como o endosulfan e *o,p'*-DDT aumentam a eliminação de testosterona circulante pela indução de enzimas hepáticas de biotransformação (Massaad et al., 2002; Coulson et al., 2003).

A exposição humana aos xenoestrógenos durante a puberdade ou vida adulta pode causar retardo do aparecimento de características sexuais masculinas e ou diminuição da produção espermática, respectivamente (Massaad et al., 2002; Toppari et al., 2002). Em animais de experimentação, o dieldrin é considerado antiandrogênico fraco, enquanto outros compostos, como o metoxicloro, causam atrofia testicular, decréscimo da produção espermática, diminuição dos níveis de testosterona e diminuição de fertilidade em ratos e camundongos (Cocco, 2002).

Apesar dos relatos sobre redução de motilidade espermática, malformações do aparelho reprodutor masculino e feminino e aumento na incidência de alguns tipos de neoplasias ocorrido nos últimos anos (Skakkebaek et al., 2001; Toppari et

al., 2002), a relação destes fenômenos com possível ação desreguladora endócrina de praguicidas em seres humanos ainda é controversa, de modo que os estudos epidemiológicos - principalmente com relação à influência destes compostos sobre o desenvolvimento de tumores de mama, próstata e de testículos – têm provocado intenso debate. Em contraste, os estudos experimentais documentam a importância da exposição aos desreguladores endócrinos no período pré-natal e puberdade de roedores (Skakkeback et al., 2001; Birnbaum e Fenton, 2003). Mesmo assim, a influência de alguns fatores como dose, idade e tempo de exposição carecem de mais estudos.

##### **5. *Exposição a compostos bioacumulativos e as misturas químicas***

Diferente dos ensaios toxicológicos padronizados e harmonizados com animais de laboratório, nos quais os efeitos adversos e os mecanismos pelo quais ocorrem são avaliados em modelos que utilizam substâncias individuais, os estudos epidemiológicos com seres humanos são muito mais complexos, porque raramente esta espécie sofre exposição isolada a um único agente químico, em determinado momento ou ao longo de sua vida. No entanto, muito da legislação que procura proteger a saúde humana dos efeitos adversos causados pela exposição à contaminantes ambientais baseia-se no primeiro tipo de estudo, isto é, em estudos experimentais com substâncias individuais, e ignora a eventual exposição às misturas químicas que ocorre no cotidiano da espécie humana.

Assim, há relativamente pouca informação sobre se, e como, a exposição a dois ou mais contaminantes pode afetar a saúde do homem (Carpenter et al., 1998). Isto ocorre em virtude de um número significativo de fatores que complicam a avaliação das misturas químicas, como o fato de dois ou mais compostos poderem

exercer efeitos aditivos, antagonistas ou sinergistas sobre um mesmo órgão-alvo, do mesmo modo que um composto pode alterar o metabolismo de outros, gerando novos metabólitos tóxicos. Além do modo de exposição, que pode ser seqüencial ou simultâneo, muitas outras combinações e cenários são possíveis quando se trata da exposição humana a múltiplos agentes químicos (Mantovani, 2006).

Dentre os poucos trabalhos que estudam os efeitos das misturas sobre os órgãos reprodutivos, cabe citar os de Heindel et al. (1997) e Chapin & Gulati (1997). Estes autores forneceram a camundongos machos Swiss CD-1 misturas semelhantes àquelas encontradas em águas contaminadas nos estados norte-americanos de Iowa (alaclor, atrazina, cianazina, metolaclor, metribuzin e nitrato de amônio) e Califórnia (aldicarb, atrazina, dibromocloropropano, 1,2-dicloropropano, dibrometo de etileno, simazina e nitrato de amônio). Embora não tenham sido detectados efeitos reprodutivos relevantes, os camundongos tratados com a mistura “Califórnia” apresentaram redução de 11% no peso médio das vesículas seminais (Chapin e Gulati, 1997), o que pode causar danos à fertilidade, dado o importante papel da secreção dessas glândulas na viabilidade dos espermatozóides (Wang & Zhang, 2007).

As evidências sugestivas de ação dos desreguladores endócrinos, as incertezas associadas a elas, e a complexidade da análise dos efeitos da exposição às misturas químicas na desregulação endócrina requerem investigações abrangentes e de maior profundidade, sejam estas por estudos epidemiológicos ou por estudos experimentais. O presente estudo objetivou avaliar o potencial desregulador endócrino de uma mistura de cinco praguicidas em ratos Lewis machos recém-desmamados, motivado por um amplo levantamento realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sobre contaminação de alimentos por praguicidas agrícolas.

## 6. ANVISA e gerenciamento do risco de praguicidas

Não apenas os trabalhadores agrícolas e industriais estão constantemente expostos a estes praguicidas potencialmente desreguladores endócrinos, mas também a população em geral está sob risco devido a exposição crônica e à baixas doses que ocorre via alimentos, água e ar (Cocco, 2002). Nesta área, a Organização Mundial de Saúde (WHO) e a Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO) estabeleceram o limite máximo de resíduos (LMR) de praguicidas e o índice de ingestão diária aceitável (IDA). O Limite Máximo de Resíduo (LMR) é um índice técnico que representa a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou substância afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica desta cultura, desde sua produção até o consumo (CONFEA, 2002). As IDAs são valores limites que, baseadas em conhecimento atualizado sobre os aspectos toxicológicos de determinado agente químico, indicam que é improvável que a exposição a seus resíduos represente qualquer risco à saúde humana se forem ingeridos dentro daqueles limites durante toda a vida dos indivíduos. A IDA de determinado praguicida é geralmente obtida a partir de doses críticas, como o <sup>1</sup>NOEL, <sup>2</sup>NOAEL, <sup>3</sup>LOAEL e <sup>4</sup>LOEL, verificados em estudos de toxicidade com animais de laboratório e corrigidos por fatores de segurança, que podem variar de 10 a 2.000 vezes (WHO, 1962; Lu, 1988; 1991).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária indicou que a população brasileira está exposta a resíduos de praguicidas (ANVISA, 2005, 2010). Entre julho de 2001 e dezembro de 2004, o Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA) pesquisou 4.001 amostras de alimentos *in natura* (alface, banana,

---

<sup>1</sup>NOEL (no-observed-effect-level) = nível sem efeito observável; <sup>2</sup>NOAEL (no-observed-adverse-effect-level) = nível sem efeito adverso observável; <sup>3</sup>LOEL (lowest-observed-effect-level) = menor nível com efeito observável; <sup>4</sup>LOAEL (lowest-observed-adverse-effect-level) = menor nível com efeito adverso observável.

batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate) coletadas em 12 estados da Federação. Do total de amostras analisadas, 3.271 apresentavam resíduos de produtos, dos quais 931 (28,5%) foram considerados como irregulares, pois continham níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) (16,6%) ou continham resíduos de praguicidas não autorizados para aquele tipo de cultura (83,4%). As culturas com maior frequência de irregularidades foram as de tomates, maçãs e morangos. Particularmente com relação aos tomates, foram detectados resíduos de seis praguicidas não autorizados para essa cultura (dicofol, dieldrin, endossulfan, monocrotofós, clorpirifós e diclorvós) e cinco outros, embora autorizados, apresentaram resíduos acima do LMR: metamidofós, permetrina, triazofós, ditiocarbamatos e cialotrina (ANVISA, 2005). Dentre os praguicidas encontrados pela ANVISA como contaminantes listam-se: o ditiocarbamato, dois piretróides (permetrina e cialotrina), três organoclorados (dicofol, dieldrin e endossulfan) e cinco organofosforados (diclorvós, monocrotofós, clorpirifós, metamidofós e triazofós).

A estimativa do risco da exposição aos clorados é complexa. Possíveis efeitos somatórios ou sinérgicos podem ocorrer quando há exposição concomitante e ou prolongada a dois ou mais desses agentes. Como eles podem se acumular na água, por suspensão ou sedimentação, ou ligarem-se a partículas do solo - propriedades devidas as suas ligações cloro-carbono, de difícil quebra - sua persistência e de seus metabólitos no meio ambiente leva à exposição contínua de animais e seres humanos. Embora os fosforados também possuam características lipofílicas, as reações de biotransformações (oxidação, clivagem hidrolítica e redução) tornam seus metabólitos menos lipofílicos, sendo considerados pouco persistentes, pois são degradados no período de 1 a 12 semanas. Já os piretróides,

são degradados rapidamente por reações de hidrólise e oxidação no ambiente, sendo considerados de modo geral como não persistentes (Larini, 1999).

### **6.1 Praguicidas utilizados neste estudo**

Os praguicidas utilizados neste estudo foram cinco dos onze relatados pelo PARA (ANVISA, 2004) como irregulares no tomate. Quatro deles não autorizados para essa cultura (dicofol, dieldrin, endossulfan, diclorvós) e um (permetrina) em níveis acima do LMR. Todos se enquadram no grupo suspeito de atuar como desreguladores endócrinos. Os possíveis efeitos já relatados para cada um deles são os seguintes (Mnif et al., 2011):

Dicofol: competição por receptores de estrógenos, aumento da síntese de estrógenos e inibição da síntese de andrógenos,

Dieldrin: competição por receptores androgênicos, efeitos estrogênicos por estímulo na produção de receptores de estrógeno;

Endossulfan: competição por receptores androgênicos, efeitos estrogênicos, estímulo na produção de receptores de estrógeno e inibição da atividade da aromatase;

Diclorvos: Antagonista fraco do receptor de andrógeno;

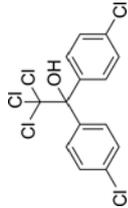
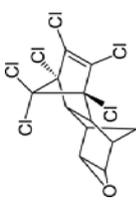
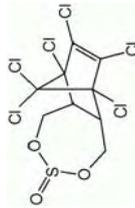
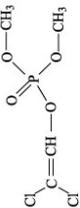
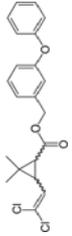
Permetrina: inibição de proliferação de células sensíveis ao estrógeno.

As doses selecionadas e incorporadas à ração nos estudos aqui apresentados foram baseadas em ensaios anteriores de longa duração, conforme relatórios da USEPA e FAO/WHO (Tabela 1). A mistura dos cinco praguicidas foi preparada em dois níveis de contaminação; na mistura “Baixas Doses” as praguicidas foram incorporados à ração em níveis de seus respectivos NOEL e

NOAEL, dependendo de qual informação estava disponível; na mistura “Doses Efetivas”, a incorporação foi feita segundo os respectivos LOEL, LOAEL e LEL.

Neste contexto todo, o objetivo de nosso trabalho foi avaliar possível efeito desregulador endócrino de uma mistura de 5 praguicidas em baixas doses em modelos experimentais utilizando ratos machos jovens da linhagem Lewis. Com este estudo pretendemos contribuir para a discussão dos efeitos potenciais da contaminação por praguicidas agrícolas detectada pela ANVISA em alimentos frescos disponíveis para a população brasileira.

Tabela 1 – Praguicidas utilizados para compor a mistura experimental fornecidas a ratos Lewis machos.

Praguicida	Fórmula Estrutural	Classe Química	Espécie	Tipo de estudo	Doses mg/kg/dia	Efeitos Adversos	Referência
<b>Dicofol</b>		Organoclorado - acaricida	Rato ♂	2-anos, ração	NOAEL 0,22  LOEL 2,5	Alterações histológicas no fígado e vacuolização das células do córtex da adrenal	WHO/FAO, 1996 <sup>(1)</sup>
<b>Dieldrin</b>		Organoclorado - inseticida	Rato	2-anos, ração	NOAEL 0,025  LOAEL 0,05	Aumento do fígado (histologia)  Alterações histopatológicas hepáticas como proliferação celular e hiperplasia focal	WHO/FAO, 1970 <sup>(2)</sup>
<b>Endosulfan</b>		Organoclorado – inseticida e acaricida	Rato ♀ Rato ♂	2-anos, ração	NOAEL 0,6  LOAEL 2,9	Ganho de peso corporal reduzido em machos e fêmeas, aumento da incidência de glomerulonefrite e aneurismas em machos	WHO/FAO, 1989 <sup>(3)</sup>
<b>Diclorvos</b>		Organofosforado - inseticida	Rato	2-anos, ração	NOEL 0,23  LEL 2,3	Inibição da atividade da AchE em ≥100ppm. Vacuolização de hepatócitos e esteatose em ratos tratados ≥ 500ppm	USEPA, 1993 <sup>(4)</sup>
<b>Permetrina</b>		Piretróide - acaricida	Rato	2-anos, ração	NOEL 5  LEL 25	Aumento do peso do fígado	USEPA, 1992 <sup>(5)</sup>

Fonte: <sup>1</sup>WHO/FAO.INCHEM. Data sheets on pesticides, Dicofol, n.81, p. 1-13, 1996. Disponível em [www.inchem.org/documents/](http://www.inchem.org/documents/) Acesso em 14 de janeiro de 2012. <sup>2</sup>WHO/FAO.INCHEM. Evaluation of some pesticides residues in food. Dieldrin. WHO/Food ADD/71.42, p. 1-32, 1970. Disponível em: [www.inchem.org/documents/](http://www.inchem.org/documents/) Acesso em 14 de janeiro de 2012. <sup>3</sup>WHO/FAO.INCHEM. Data sheets on pesticides, Endosulfan, n. 92, p. 1-15, 1989. Disponível em [www.inchem.org/documents/](http://www.inchem.org/documents/) Acesso em 14 de janeiro de 2012. <sup>4</sup>USEPA (United States Environmental Protection Agency). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD), Dichlorvos, 1993. Disponível em [www.epa.gov/iris](http://www.epa.gov/iris). Acesso em 14 de janeiro de 2012. <sup>5</sup>USEPA (United States Environmental Protection Agency). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD), Permethrin, 1992. Disponível em [www.epa.gov/iris](http://www.epa.gov/iris). Acesso em 14 de janeiro de 2012.

## 7. Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Controlando agrotóxicos nos alimentos: O trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, a FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR e ITEP/PE. Relatório de atividades 2004. Brasília. ANVISA, 2005. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) [Acesso 28 abr 2008].

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Monitoramento de resíduos de agrotóxicos pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, BA, DF, ES, GO, MS, MG, PA, PR, PE, RJ, RS, SC, SP, SE, TO, e com os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED e LACEN/PR. Relatório de atividades de 2001-2007. Brasília. ANVISA, 2007. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) [Acesso 04 jan 2012].

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos Alimentos: trabalho desenvolvido pela anvisa, com as Vigilâncias sanitárias dos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Santa Catarina, Sergipe e Tocantins, e com os laboratórios Instituto Octávio Magalhães (IOM/FUNED/MG), laboratório Central do Paraná (LACEN/PR) e Eurofins (São Paulo/Sp). Relatório de atividades de 2009. Brasília. ANVISA, 2010. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) [Acesso 04 jan 2012].

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Relatório de atividades de 2010. Brasília. ANVISA, 2011. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) [Acesso 04 jan 2012].

Ashby J et al. Testosterone-stimulated weanlings as an alternative to castrated male rats in the Hershberger anti-androgen assay. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004; 39:229–238.

Bila DM, Dezotti M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Quim Nova*. 2007; 3:651-666.

Birnbaum LS, Fenton SE. Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Perspec* 2003; 111: 389-394.

Carpenter DO, Arcaro KF, Bush B, Niemi WD, Pang S, Vakhariad D. Human health and chemical mixtures: an overview. *Environ Health Perspec* 1998; 106:1263-1270.

Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972 Jan;52(1):198-236

Chapin RE, Gulati DK. Pesticide/Fertilizer mix II (California). *Environ Health Perspec* 1997; 105:373-374.

Chiasson RB. *Laboratory anatomy of the White rat*. 2ed. Arizona: Wm. C. Brown, 1969;81p.

Christensen AK, Mason NR. Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testes to synthesize androgens from progesterone-4-14c in vitro. *Endocrinology.* 1965 Apr;76:646-56.

Chughtai B, Sawas A, O'Malley RL, Naik RR, Ali Khan S, Pentyala S. A neglected gland: a review of Cowper's gland. *Int J Androl.* 2005 Apr;28(2):74-7.

CONFEA (Conselho Federal de Engenharia e Agronomia). Decreto nº 4.074, de 4 de Janeiro de 2002. Disponível em <http://normativos.confea.org.br>. Acesso em 01/fev/2012.

Cocco P. On the rumors about the silent spring. Review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. *Cad Saúde Pública* 2002; 1:379-402.

Consentino MJ, Cockett AT. Structure and function of the epididymis. *Urological Research*, 1986; 14(5):229-40.

Cooper RL, Kaviocck RJ. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. *Endocrinol* 1997; 152:159-166.

D'Amato C, Torres JPM, Malm O. DDT (dicloro-difenil-tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental – Uma Revisão. *Quím Nova* 2002; 25:995-1002.

Delgado IF, Barretto HHC, Kussumi TA, Alleluia IB, Baggio CA, Paumgarten FJR. Serum levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls among inhabitants of greater metropolitan Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Pública* 2002; 18:519-524.

Dimuccio A, Camoni I, Citti P, Pontecorvo D. Survey of DDT-like compounds in dicofol formulations. *Ecotoxicol Environ Safety* 1988; 16:129-132.

EDSTA (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee). EPA/743/R-98/003: Final Report. Washington: USEPA; 1998.

EDSP/USEPA Endocrine Disruptor Screening Program. (United States Environmental Protection Agency). Weight-of-Evidence: Evaluating Results of EDSP Tier 1 Screening to Identify the Need for Tier 2 Testing. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention Washington DC 20460. 2011; 1-47.

França RL, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.*, 1998;59:1371-7.

França LR, Avelar GF, Almeida FFL. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 2005;63:300-18.

Guillette Jr LJ, Cross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspec* 1994; 102:680-688.

Hascheck W, Rousseaux CG. Male reproductive system. In: Hascheck W, Rousseaux CG. (Eds). *Fundamentals of toxicologic pathology*. San Diego: Academic Press, 1998: 443-84p.

Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, et al. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat.*, 1996a; 155:81-93.

Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, et al. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat.*, 1996b; 155:94-103.

Hebel R, Stromberg MV. *Anatomy and embryology of the laboratory rat*. Wortheseer: Biomed Verlag, 1986; 270p.

Heindel JJ, George JD, Fail PA, Grizzle TB. Pesticide/Fertilizer mix III (Iowa). *Environ Health Perspec* 1997; 105:375-376.

Hermo L, Robaire B. Epididymal cell types and their function. In: Robaire B, Hinton BT. (Eds). *The epididymis: from molecules to clinical practice*. 1ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2002;81-102p.

Hess RA, França LR. Structure of Sertoli cell. In: Skinner MK, Giswold MD (Eds). *Sertoli cell biology*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005:19-40p.

Junqueira LC, Carneiro J. *Aparelho reprodutor masculino*. In: *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004:415-31p.

Kerr JB, Maddocks S, Sharpe RM. Testosterone and FSH have independent, synergistic and stage-dependent effects upon spermatogenesis in the rat testis. *Cell Tissue Res.*, 1992;268;179-89.

Larini L. *Toxicologia dos praguicidas*. São Paulo: Brasil: Manole; 1999. 230p.

Lu FC. *Basic Toxicology*. New York: Hemisphere Publishing Corporation; 1991. p.327-344.

Lu FC. Acceptable daily intakes: inception, evolution and application. *Reg Toxicol Pharmacol* 1988; 8:45-60.

Mantovani A. Risk assessment of endocrine disrupters: the role of toxicological studies. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1076:239-252.

Massaad C, et al. How can chemical compounds alter human fertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 100:127-137.

Meachem SJ, McLachlam RI, Stanton PG, Robertson DM, Wreford NG. FSH Immunoneutralization acutely spermatogonial development in normal adult rats. *J. Androl.*, 1999; 20:756-62.

Mendes JJA. The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food Chem Toxicol* 2003; 40:65-71.

Mnif W; Hassine AIH; Bouaziz A; Bartegi A; Thomas O; Roig B. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2011, 8, 2265-2303.

Murakami R, Mizuno T. Proximal-distal sequence of development of the skeletal tissues in the penis of rat and the inductive effect of epithelium. *J Embryol Exp Morphol*. 1986 Mar;92:133-43.

Nogueira JMF. Desreguladores endócrinos: Efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química* 2003;88:65-71.

Nunes MV, Tajara EH. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. *Rev Saúde Pública* 1998; 32:372-382.

O'Neill HJ, Gershbein LL. Lipids of human and equine smegma. *Oncology*. 1976;33(4):161-6.

Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD. Guidance Document on the Assessment of Chemicals for Endocrine Disruption Version 9 (with changes to V8 accepted, 17 November 2010). Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/63/8/46436593.pdf>. [Acesso 12 dez 2011].

Owens W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray Jr LE. The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Environ Health Perspect*. 2006;114:1259-65.

Pacheco P. Brasil lidera uso mundial de agrotóxicos. O Estadão de S.Paulo. 07 de agosto de 2009. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/impresso,brasil-lidera-uso-mundial-de-agrotoxicos,414820,0.htm> [Acesso em 05 fev 2012].

Quandt SA, Doran AM, Rao P, Hoppin JA, Snively BM, Arcury TA. Reporting pesticide assessment results to farmworker families: development, implementation, and evaluation of a risk communication strategy. *Environ Health Perspec* 2004; 112:636-642.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1997; 332-342, 362-370.

Rittler M, Castilla EE. Endocrine disruptors and congenital anomalies. *Cad Saúde Pública* 2002; 18:421-428.

Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkford J, Cohen MB. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr.Relat.Cancer* 2004; 11:225-324.

Russel LD, Ettlín R, Hikim APS, Clegg ED. Mammalian spermatogenesis. In: Russel LD, Ettlín R, Hikim APS, Clegg ED (Eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press,1990:1-40p.

Setchell BP, Breed WG. Anatomy, vasculature, and innervations of the male reproductive tract. In: Knobil E., Neill JD. (Eds). *The physiology of reproduction*. New York: Elsevier, 2006:771-825p.

Skakkebaek NE, Rajpert-DeMeyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reprod* 2001; 16:972-978.

Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD. (Eds). *The physiology of reproduction*. 2ed. Vol.2, New York: Raven Press, 1994:1363-434p.

Skinner MK. Sertoli cell-somatic cell interactions. In: Skinner MK, Giswold MD (Eds). Sertoli cell biology. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005a:317-28p.

Skinner MK. Sertoli cell secreted regulatory factors. In: Skinner MK, Giswold MD (Eds). Sertoli cell biology. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005b:107-20p.

Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2005; 35:1-10.

Toppari J, Haavisto AM, Alanen M. Changes in male reproductive health and effects of endocrine disruptors in Scandinavian countries. *Cad Saúde Pública* 2002; 18:413-420.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). EPA/630/R-96/012: Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Washington: USEPA; 1997.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). EPA/600/R-98/087: Research Plan for Endocrine Disruptors. Washington: USEPA; 1998.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD), Dichlorvos, 1993. Disponível em [www.epa.gov/iris](http://www.epa.gov/iris). Acesso em 14 de janeiro de 2012.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD), Permethrin, 1992. Disponível em [www.epa.gov/iris](http://www.epa.gov/iris). Acesso em 14 de janeiro de 2012.

WHO/FAO.INCHEM. Data sheets on pesticides, Dicofol, n.81, p. 1-13, 1996. Disponível em [www.inchen.org/documents/](http://www.inchen.org/documents/) Acesso em 14 de janeiro de 2012.

WHO/FAO.INCHEM. Evaluation of some pesticides residues in food. Dieldrin. WHO/Food ADD/71.42, p.1-32, 1970. Disponível em: [www.inchen.org/documents/](http://www.inchen.org/documents/). Acesso em 14 de janeiro de 2012.

WHO/FAO.INCHEM. Data sheets on pesticides, Endosulfan, n. 92, p. 1-15, 1989. Disponível em [www.inchen.org/documents/](http://www.inchen.org/documents/) Acesso em 14 de janeiro de 2012.

WHO (World Health Organization). Principles in governing consumer safety in relation to pesticides residues. WHO Tech Rep Ser 1962; 240:1-18.

Windham GC, Lee D, Mitchell P, Anderson M, Petreas M, Lasley B. Exposure to organochlorine compounds and effects on ovarian function. *Epidemiology* 2005; 16:182-190.

*Capítulo II*

*Artigo Científico 1*



## **Ação de mistura de praguicidas no sistema reprodutor de ratos Lewis machos**

Meire França Martinez<sup>1</sup>, Juliana Elaine Perobelli<sup>2</sup>, João Francisco Lozano Luvizutto<sup>1</sup>, Carla Adriane da Silva Franchi<sup>1</sup>, Janete Aparecida Anselmo-Franci<sup>3</sup>, João Lauro Viana de Camargo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana - TOXICAM, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Autor Correspondente: Meire França Martinez  
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP  
Departamento de Patologia  
Distrito de Rubião Junior, S/N  
Botucatu/SP – CEP: 18.618-000  
Telefone (14) 3882-8255 - Fax (14) 3815-2348  
e-mail: meirefm@fmb.unesp.br

NOTA - Apresentação do manuscrito de forma genérica, uma vez que o periódico a que será submetido não foi definido.

**Resumo**

Levantamento feito pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) apontaram resíduos de agrotóxicos em alimentos frescos à disposição da população brasileira. Esses resíduos apresentaram-se acima do permitido, ou representavam ingredientes ativos não autorizados para determinadas culturas. Situações como estas têm aumentado a preocupação quanto a exposição prolongada de consumidores a múltiplos agentes potencialmente nocivos. Há pouca informação experimental sobre se, e como, exposições múltiplas ou a misturas podem afetar a saúde. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos de uma mistura de cinco praguicidas sobre o sistema reprodutor do rato macho. Para compor a mistura que foi adicionada à ração em níveis de NOEL/NOAEL ou LOEL/LEL/LOAELs, foram selecionados cinco praguicidas cujos resíduos foram detectados em tomates pela ANVISA em 2004. Foram constituídos oito grupos de acordo com o tipo de ração: Grupo 1- ração basal, sem praguicidas; Grupo 2 (“Baixas doses” ou praguicidas de acordo com seus respectivos NOEL/NOAELs) - diclorvós 0,23 mg/kg, dicofol 0,22 mg/kg, endosulfan 0,6 mg/kg, dieldrin 0,025 mg/kg, permetrina 5,0 mg/kg; Grupo 3 (“Doses efetivas”, de acordo com respectivos LOEL/LEL/LOAEL) - diclorvós 2,3 mg/kg, dicofol 2,5 mg/kg, endosulfan 2,9 mg/kg, dieldrin 0,05 mg/kg, permetrina 25,0 mg/kg e Grupos 4 a 8 - rações contendo cada praguicida em separado, em concentrações de acordo com os respectivos LOEL, LEL ou LOAEL. Os animais foram sacrificados no final da 8<sup>a</sup>. semana de tratamento. O modelo utilizado permitiu verificar que a mistura em “baixas doses” aumentou o peso relativo dos testículos, mas não causou alterações morfológicas nesse órgão, nem alterou a dinâmica da espermatogênese e função testicular. Níveis séricos de FSH e testosterona não apresentaram diferenças significativas entre os grupos G1 (Controle), G2 e G3 (misturas); apenas o G3 apresentou níveis aumentados de LH em relação ao controle.

## **1. Introdução**

A exposição dos seres humanos a praguicidas agrícolas ao longo de sua vida ocorre de forma muito complexa: são exposições múltiplas, simultâneas ou não, em altas ou baixas doses, etc. (Yang, 1998). Esta situação difere daquelas estabelecidas nos ensaios toxicológicos convencionais com animais de laboratório, que são executados com uma substância única, com alto nível de pureza, e que objetivam identificar seus efeitos adversos potenciais (sistêmicos, neurológicos, comportamentais, cancerígenos, reprodutivos, etc.) (Viau, 2002). Nestas circunstâncias, há relativamente pouca informação sobre se, e como, a exposição a misturas pode afetar a saúde animal (Mantovani, 2006; Carpenter et. al., 1998).

Particularmente, a estimativa do risco da exposição humana a múltiplos praguicidas é complexa devido às particularidades químicas de cada produto, seus modos de ação e acúmulo no organismo e a possibilidade de ocorrerem efeitos aditivos, somatórios ou sinérgicos sobre um mesmo órgão ou sistema-alvo. Além disso, podem alterar mutuamente seus metabolismos, eventualmente gerando novos metabólitos potencialmente tóxicos (Yang, 1998; Mantovani, 2006).

A Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem realizado monitoramento periódico para detectar resíduos de agrotóxicos em frutas, legumes e verduras frescas disponíveis para compra e consumo pela população. Entre julho de 2001 e dezembro de 2004, o Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA) pesquisou 4.001 amostras de alimentos *in natura* (alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate), coletadas em 12 estados da Federação. Do total de amostras analisadas, 3.271 (81,7%) apresentaram resíduos de praguicidas, sendo que 931 (28,5%) delas continham níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) (16,6%) ou continham resíduos de produtos não-autorizados para aquele tipo de cultura (83,4%). As culturas com maior frequência de irregularidades foram as de tomates, maçãs e morangos. Particularmente com relação aos tomates, foram detectados resíduos de seis praguicidas não-autorizados (dicofol, dieldrin, endossulfan, monocrotofós, clorpirifós e diclorvós), e de cinco praguicidas permitidos, mas cujos níveis estavam acima do LMR (metamidofós, permetrina, triazofós, ditiocarbamatos e cialotrina)

(ANVISA, 2004). Esses praguicidas pertencem a diferentes classes: um ditiocarbamato, dois piretróides (permetrina e cialotrina), três organoclorados (dicofol, dieldrin e endosulfan) e cinco organofosforados (diclorvós, monocrotofós, clorpirifós, metamidofós e triazofós). O impacto potencial destes tomates contaminados à saúde do consumidor não é conhecido.

Por outro lado, alguns poluentes ambientais podem mimetizar ou antagonizar os efeitos dos hormônios esteróides, como estrógenos e andrógenos, provocando o que é denominado desregulação endócrina (DE) (Massaad et al., 2002). Apesar dos relatos sobre redução de motilidade espermática, malformações do aparelho reprodutor masculino e feminino e aumento na incidência de alguns tipos de neoplasias (Skakkebaek et al., 2001; Toppari et al., 2002), a relação destes fenômenos com possível ação desreguladora endócrina de praguicidas em seres humanos ainda é controversa; estudos epidemiológicos - principalmente com relação à influência destes compostos sobre o desenvolvimento de tumores de mama e de testículos - têm provocado intenso debate porque não são claramente conclusivos. Em contraste, os estudos experimentais documentam a importância da exposição aos desreguladores endócrinos no período pré-natal e puberdade de roedores (Skakkeback et al., 2001; Birnbaum e Fenton, 2003). Mesmo assim, a influência de alguns fatores como dose, idade e tempo de exposição carecem de mais estudos.

Ensaio para detecção de interferência endócrina em roedores ainda estão em fase de desenvolvimento e validação por agências reguladoras de substâncias químicas ao redor do mundo (OECD, 2010; EDSTA, 2011) O presente estudo utilizou-se de uma abordagem geral de avaliação de toxicidade sistêmica para avaliar possíveis efeitos provocados por uma mistura de 5 praguicidas fornecidos a ratos machos adultos jovens da linhagem Lewis durante oito semanas. Esses praguicidas foram escolhidos porque foram alguns dos responsáveis pelas irregularidades detectadas pelo PARA no monitoramento da ANVISA em 2004.

## 2. Material e métodos

### Reagentes

Dicofol (C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>6</sub>O), CAS 115-32-2 (gentilmente cedido pela Milenia Agrociências S/A, Londrina (PR), 96,5% puro); endosulfan, mistura de isômeros *alfa* e *beta* (2:1) (C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S), CAS 115-29-7 (gentilmente cedido pela Bayer CropScience S/A, Belford Roxo, RJ), 100% puro; diclorvós (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P), CAS 62-73-7, 99,4% puro; permetrina, mistura de isômeros *cis* e *trans* (proporção?)(C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), CAS 52645-53-1, 98,0% puro; dieldrin (C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>6</sub>O), CAS 60-57-1, 97,9% puro. Os praguicidas diclorvós, permetrina e dieldrin foram adquiridos da Fluka Chemicals, Sigma-Aldrich, Milwaukee, EUA. Anticorpo Ki-67 (ab16667, Abcam, EUA).

### Animais e ambiente

Machos da linhagem isogênica Lewis, foram adquiridos com 4 semanas de idade em lotes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da UNICAMP (CEMIB - UNICAMP, Campinas-SP). Todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Durante toda a fase experimental foram controladas as condições ambientais do biotério como: temperatura (22 ± 2°C), umidade relativa do ar (55 ± 10%), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão do ar contínua. Todos os animais receberam ração específica de acordo com o grupo a que pertenciam, e água filtrada em bebedouros de vidro com tampa de borracha e bico metálico (500 ml). A água e a ração foram fornecidas *ad libitum*.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (CEEA), protocolo nº 670.

### Delimitação Experimental (Figura 1)

Os praguicidas e o óleo comestível componente da formulação (8%) foram incorporados à ração [AIN93-M (Reeves et al.,1993)] em pó produzida pela Nutri Experimental – (Campinas, SP). As concentrações dos praguicidas nas rações dependeram das doses críticas NOEL/NOAEL (*nível sem efeito*

*observável/nível sem efeito adverso observável*) ou LOEL/LEL/LOAEL (menor nível com efeito observável/nível de efeito observável/menor nível com efeito adverso observável), determinadas em ensaios crônicos com ratos, disponíveis na literatura. Após a incorporação dos praguicidas, as diferentes rações foram peletizadas. Foram constituídos os seguintes grupos experimentais:

**Grupo 1:** Controle negativo - ração basal; **Grupo 2:** “Baixas Doses” - praguicidas adicionados à ração em concentrações que permitiram ingestões finais correspondentes a seus respectivos NOEL/NOAELs. Ração basal contendo diclorvós 0,23 mg/kg, dicofol 0,22 mg/kg, endosulfan 0,6 mg/kg, dieldrin 0,025 mg/kg, permetrina 5,0 mg/kg (FAO/WHO, 1986; WHO/FAO, 1970; 1989; 1996, EPA, 1992; 1993); **Grupo 3:** “Doses Efetivas” - ração basal contendo diclorvós 2,3 mg/kg, dicofol 2,5 mg/kg, endosulfan 2,9 mg/kg, dieldrin 0,05 mg/kg, permetrina 25,0 mg/kg. Estas doses correspondem aos LOAELs do dieldrin e endosulfan, ao LOEL do dicofol, e LELs para o diclorvós e permetrina (FAO/WHO, 1986; WHO/FAO, 1970; 1989; 1996, EPA, 1992; 1993); **Grupo 4:** Ração basal com 2,5 mg/kg de dicofol (LOEL); **Grupo 5:** Ração basal com 25,0 mg/kg de permetrina (LEL); **Grupo 6:** Ração basal com 2,3 mg/kg de diclorvós (LEL); **Grupo 7:** Ração basal com 0,05 mg/kg de dieldrin (LOAEL); **Grupo 8:** Ração basal com 2,9 mg/kg de endosulfan (LOAEL).

Todos os animais foram eutanasiados por exsanguinação após narcose induzida em câmara de CO<sub>2</sub> ao final da 8ª semana de tratamento. Durante o experimento, os animais passaram por avaliação clínica semanal que constituía de observações da pelagem, mucosas, fezes, ocorrência de atividade autônoma (lacrimação, piloereção, variação do tamanho da pupila, padrão respiratório, etc.), alterações no modo de andar, postura, orientação, ocorrência de movimentos espasmódicos ou tônicos ou comportamento anormal (automutilação).

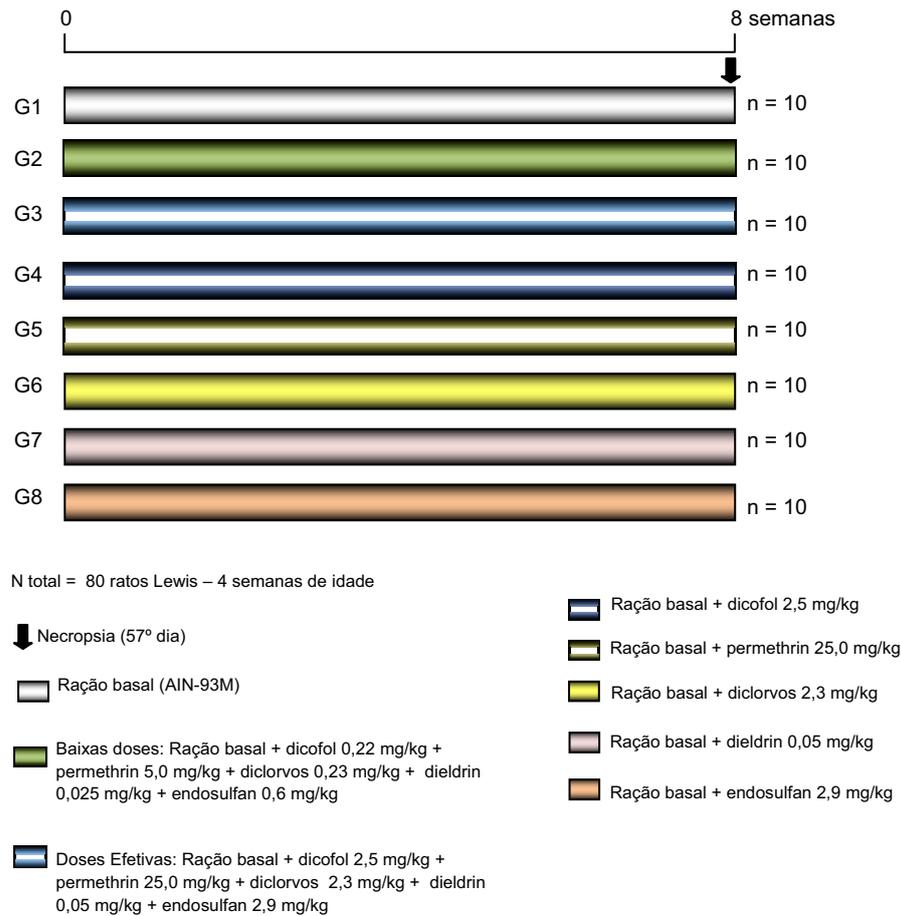


Figura 1: Delineamento Experimental

### Análises Hormonais

Após eutanásia, o sangue foi imediatamente coletado (n=10/grupo) por punção cardíaca para determinação das concentrações de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona pela técnica de radioimunoensaio de duplo anticorpo. O soro foi obtido após centrifugação (2400rpm, 20min, 4°C). Medições de testosterona foram realizadas utilizando o kit TESTOSTERONE MAIA® (Biochem. Immuno System, Allentown, PA, USA). Para as medições de LH e FSH foram utilizados kits específicos do National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive, and Kidney Diseases (NIADDK, USA). O nível plasmático de cada hormônio foi detectado no mesmo ensaio para evitar erros inter ensaio. O erro intra-ensaio foi de 3,4% para LH, de 2,8% para FSH e 4% para testosterona.

### ***Análises histológicas***

Foram coletados o fígado, testículos, epidídimos, vesículas seminais e glândulas de coagulação. Estes órgãos foram pesados e imersos em formalina 10% tamponada por 48 horas, exceto os testículos e epidídimos direitos, que foram fixados em ALFAC (5% de ácido acético, 10% de formol 100%, 85% de álcool 80%) por 24 horas. Cortes histológicos de 5µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina (H.E.) e analisados qualitativa e/ou quantitativamente sob em microscópio de luz Leica®, sem conhecimento do animal do qual a peça procedia.

### ***Análise histológica dos testículos***

Após pré-fixação de 4 horas os órgãos foram recortados, retornando em seguida ao fixador. Após 24 horas de fixação, a solução foi substituída por álcool 80°, onde as peças permaneceram até inclusão em paraplast, obtenção de cortes com 5µm de espessura e coloração com hematoxilina e eosina. A avaliação histológica foi realizada em 3 cortes não consecutivos do órgão por animal.

A inspeção histológica foi realizada de modo qualitativo, analisando-se 100 cortes de túbulos seminíferos por animal e classificando-os em normais ou anormais. Os túbulos foram considerados anormais quando ocorriam células germinativas acidófilas, células multinucleadas, espermátides retidas, degeneração celular em seus diferentes estágios de maturação, vacuolização do epitélio ou esfoliação de células na luz (Toledo et al., 2011).

### ***Contagem de núcleos de células de Sertoli***

Nos mesmos cortes histológicos, os núcleos das células de Sertoli foram contados em 20 seções transversais de túbulos seminíferos no estágio VII da espermatogênese, classificados de acordo com Toledo et al. (2011).

### ***Avaliação da dinâmica da espermatogênese***

Foram analisadas 100 seções transversais de túbulos seminíferos por animal, os quais apresentavam forma a mais regular e circular possível, sendo os mesmos caracterizados segundo a espermatogênese como se segue: Estágios

I-VI: com duas gerações de espermatídes; Estágios VII-VIII: com espermatídes maduras localizadas na borda do lúmen; Estágios IX-XIII: com somente uma geração de espermatídes; Estágio XIV: com espermatócitos secundários.

### ***Morfometria dos testículos***

Utilizando o programa para análise de NIS-ELEMENT (NIKON Instruments Inc., EUA), foram avaliadas a altura do epitélio germinativo e a área da luz tubular de 6 (seis) animais por grupo. Para mensurar a altura do epitélio, foram contados 20 túbulos aleatórios, sendo feita 4 (quatro) medidas em diferentes regiões do epitélio de cada túbulo. Para a determinação da área da luz tubular, foram utilizados os mesmos túbulos utilizados para a medida da altura epitelial; foram colocados 5 (cinco) pontos ao redor da luz tubular, formando uma circunferência da qual se extraiu a área. A seguir, obteve-se a média grupal dos valores registrados para cada um dos parâmetros.

### ***Análise histológica dos epidídimos***

Toda a extensão do corte longitudinal do epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda epididimária) foi avaliada quanto à estrutura e aspecto do epitélio, presença de espermatozóides na luz ductal.

### ***Determinação do índice de proliferação celular no fígado***

O índice de proliferação celular (IM) foi estimado pela quantificação dos núcleos Ki-67 positivos detectados por imunohistoquímica. Para tanto, foi utilizado o anticorpo anti-Ki-67 (clone SP6 - 1:100 - ABCAM). Foram selecionados fragmentos de fígado de 10 animais dos grupos Controle (G1), “baixas doses” (G2) e “doses efetivas” (G3), fixados em formaldeído (10%), desidratados em álcool e incorporados em paraplast. As seções (5µm) foram desparafinadas e depois reidratadas em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em ácido cítrico 0,21% pH 6.0 em câmara de pressão (PASCAL) a 120° por 3 minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 0,3% por 45 minutos, seguido por rápido enxágüe em água destilada e tampão fosfato (PBS), em seguida incubadas com o anticorpo secundário (LSAB - LINK - K0609 - DAKO) por 30 minutos e posteriormente incubadas com o anticorpo terciário (LSAB -

Streptavidina – K0609 - DAKO) por 30 minutos. A revelação foi realizada com 3,3-Diaminobenzidina (K3468 - DAKO) por 5 minutos. Os cortes foram então contracorados com hematoxilina de Harris em seguida desidratados em etanol absoluto, diafanizados em xilol e montados em resina sintética. A seguir foram analisados 40 campos por lâmina sob aumento 400x (número aproximado de células contadas = 4.000). O IM foi determinado da seguinte maneira: N° de hepatócitos imunomarcados para Ki-67/N° total de hepatócitos analisados x100. A quantificação foi realizada em microscópio de luz contendo uma gradícula milimetrada em uma das oculares (aumento de 400x, correspondente a 0,25mm<sup>2</sup>) (Eyepiece Micrometer Olympus, Japan).

### **Análises estatísticas**

Foram utilizados os testes Kruskal-Wallis, Dunn, Tukey e Bonferroni. As análises foram realizadas utilizando o software SigmaStat versão 3.5. As comparações foram feitas entre os grupos Controle, “Baixas Doses” e “Doses Efetivas” entre si, e entre cada grupo exposto aos praguicidas individuais (G4 a G8) e o controle. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## **3. Resultados**

### **Peso corpóreo (Tabela 1)**

Os grupos Baixas Doses (G2) e Doses Efetivas (G3), não apresentaram diferença significativa no ganho de peso durante o período experimental quando comparados ao grupo Controle (G1).

Todos outros grupos não diferiram do controle, exceção feita ao grupo G6 (Diclorvós) que apresentou peso significativamente menor comparado ao controle (grupo G1), possivelmente por ter iniciado o período experimental com peso abaixo dos outros grupos e ingerido menos da ração durante o estudo (ver a seguir).

Tabela 1 - Pesos corpóreos (g) inicial, final e ganho de peso (% , g).

Grupos	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ganho de peso entre momento inicial e semana 8	
			%	g
G1 Controle	86,8 ± 17,1	304,1 ± 46,9	250,6	217,3 ± 36,7ab
G2 “Baixas Doses” <sup>2</sup>	86,4 ± 5,3	274,2 ± 25,6	215,0	187,8 ± 25,6a
G3 “Doses Efetivas” <sup>2</sup>	82,8 ± 4,9	312,1 ± 19,3	275,9	229,3 ± 20,5b
G4 Dicofol	93,5 ± 5,52	331,1 ± 29,4	252,2	237,1 ± 27,6
G5 Permetrina	103,9 ± 8,5	314,7 ± 29,6	202,8	210,8 ± 24,6
G6 Diclorvós	57,8 ± 8,2	232,3 ± 31,2	300,0	174,5 ± 27,4*
G7 Dieldrin	70,8 ± 14,1	282,1 ± 43,1	297,2	211,3 ± 35,7
G8 Endosulfan	84,4 ± 10,6	281,4 ± 41,7	234,5	197,0 ± 37,1

<sup>2</sup>Ver Material e Métodos – Delineamento Experimental. Resumo em média e desvio padrão apesar de algumas variáveis não apresentarem distribuição simétrica. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o controle e o grupo comparado por Mann-Whitney. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Dunn.

### Consumo de ração e água

O consumo médio estimado de ração variou entre 21,01 ± 3,74 g (G1-Controle) e 12,73 ± 2,87 g (G6-Diclorvós) e o de água entre 16,88 ± 2,16 g (G5-Permetrina) e 13,55 ± 2,39 g (G3-Doses Efetivas). Embora tenham sido detectadas algumas diferenças significativas entre os grupos, essas não foram consideradas relevantes do ponto de vista toxicológico (*dados não mostrados*).

### Peso médio relativo dos órgãos (Tabela 2)

Os pesos do fígado dos grupos “baixas doses” (G2) e “doses efetivas” (G3) apresentaram-se significativamente maiores quando comparados aos grupos Controle (G1)

O peso do rim dos grupos “baixas doses” e “doses efetivas” não diferiram significativamente do grupo Controle.

O peso da adrenal dos grupos G2 e G3 não diferiram em relação ao controle, mas, entre si, o grupo G2 apresentou-se significativamente maior que o grupo G3.

O peso do testículo do grupo “baixas doses” (G2) apresentou-se significativamente maior quando comparado aos grupos controle (G1) e “doses

efetivas” (G3). O peso dos testículos dos grupos G3 e controle não mostraram diferenças significativas entre si. Todos outros grupos não diferiram do controle, exceção feita ao grupo G6 (Diclorvós) que apresentou peso significativamente maior comparado ao controle (grupo G1),

Os pesos das próstatas e da vesícula seminal não diferiram significativamente entre si e do grupo Controle G1.

O peso do epidídimo dos grupos G2 e G3 não diferiram significativamente do grupo Controle (G1), mas o G2 apresentou peso significativamente maior do que o grupo G3. Todos outros grupos não diferiram do controle, exceção feita ao grupo G6 (Diclorvós) que apresentou peso significativamente maior comparado ao controle (grupo G1),

Tabela 2 – Pesos relativos (%)\* de órgãos dos diferentes grupos experimentais ao final do experimento.

Grupos	FÍGADO <sup>1</sup>	RIM <sup>2</sup>	ADRENAL <sup>3</sup>	TESTÍCULO <sup>4</sup>	PRÓSTATA	VES.SEM. <sup>5</sup>	EPIDÍDIMO <sup>6</sup>
G1 Controle	3,46±0,20a	0,39±0,05	0,66±0,24a,b	0,37±0,04a	0,09±0,02	26,28±6,20	0,13±0,01ab
G2 Baixas Doses	3,78±0,20b	0,42±0,05	0,77±0,16a	0,42±0,03b	0,10±0,01	26,97±2,87	0,13±0,01a
G3 Doses Efetivas	3,91±0,29b	0,39±0,02	0,58±0,13b	0,36±0,07a	0,10±0,01	23,33±2,01	0,12±0,01b
G4 Dicofol	3,45±0,10	0,38±0,03	0,62±0,13	0,37±0,03	0,11±0,01	27,00 ± 3,22	0,12±0,01
G5 Permetrina	3,62±0,25	0,36±0,03	0,58±0,14	0,37±0,04	0,10±0,01	25,11 ±2,02	0,12±0,01
G6 Diclórvoś	3,56±0,19	0,40±0,03	0,86±0,25	0,43±0,03*	0,09±0,01	31,42± 5,37	0,14±0,02*
G7 Dieldrin	3,69±0,22	0,39±0,04	0,68±0,23	0,38±0,04	0,10±0,01	25,52±3,79	0,13±0,01
G8 Endosulfan	3,58±0,21	0,42±0,03*	0,60±0,13	0,41±0,05	0,10±0,01	25,42±3,77	0,13±0,01

Resumo em média e desvio padrão apesar de algumas variáveis não apresentarem distribuição simétrica. Valores das adrenais  $\times 10^{-2}$ . 2,3,5: Comparação entre os grupos com o controle por Mann-Whitney. 1,4,6: Comparação entre grupos com o controle por Tukey. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o controle e o grupo comparado.

**Dosagens Hormonais (Tabela 3)**

O nível sérico do hormônio luteinizante (LH) do grupo “baixas doses” (G2) não diferiu de modo significativo dos grupos controle (G1) e “doses efetivas” (G3). No entanto, o nível sérico de LH do grupo G3 apresentou-se significativamente maior quando comparado ao grupo Controle (G1).

Os níveis séricos de hormônio folículo estimulante (FSH) de todos os grupos não diferiram significativamente.

Os níveis séricos de testosterona dos grupos G2 e G3 não diferiram significativamente do grupo Controle G1.

O grupo G8 (Endosulfan) apresentou níveis séricos de LH e de testosterona respectivamente aumentados e reduzidos em relação ao controle.

Tabela 3 – Concentrações plasmáticas (em ng/ml) de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona.

Grupos	Concentração de hormônios (ng/ml)*		
	LH <sup>1</sup>	FSH <sup>2</sup>	Testosterona <sup>3</sup>
G1 Controle (n=8)	1,65±0,88 a	6,71±1,10	0,82±0,08
G2 Baixas Doses (n=8)	3,22±1,48 a,b	8,12±0,99	0,86±0,08
G3 Doses Efetivas (n=8)	3,61±1,39 b	8,61±1,20	1,10±0,65
G4 Dicofol (n=8)	1,58±0,42	6,23±1,03	1,26±0,34
G5 Permetrina (n=8)	2,82±0,82	7,03±0,92	0,77±0,41
G6 Diclorvós (n=8)	2,89±1,19	8,26±1,67	0,93±0,09
G7 Dieldrin (n=8)	3,00±1,04	8,37±1,49	1,03±0,32
G8 Endosulfan (n=8)	3,34±0,75*	8,33±1,45	0,36±0,14*

Resumo em média e desvio padrão apesar de algumas variáveis não apresentarem distribuição simétrica.

\* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o controle e o grupo comparado por Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa por Tukey

### **Análises histológicas**

Todos os animais expostos ao grupo “doses efetivas” (G3) e 40% do grupo “baixas doses” (G2) apresentaram hipertrofia hepatocítica centrolobular, que não ocorreu nos animais do grupo controle (G1) (Tabela 4, Figura 2b). Os grupos dieldrin (G7) e endosulfan (G8) foram os seguintes em incidência elevada de hipertrofia (90%). Outros aspectos histológicos, como corpos apoptóticos (Figura 2c), mitoses (Figura 2d), esteatose e esclerose/hiperplasia de ductos biliares ocorreram em incidências variáveis, relativamente elevadas, mas sem particularidades. Os demais órgãos coletados (rim, adrenais e próstata) não apresentaram alterações relevantes.

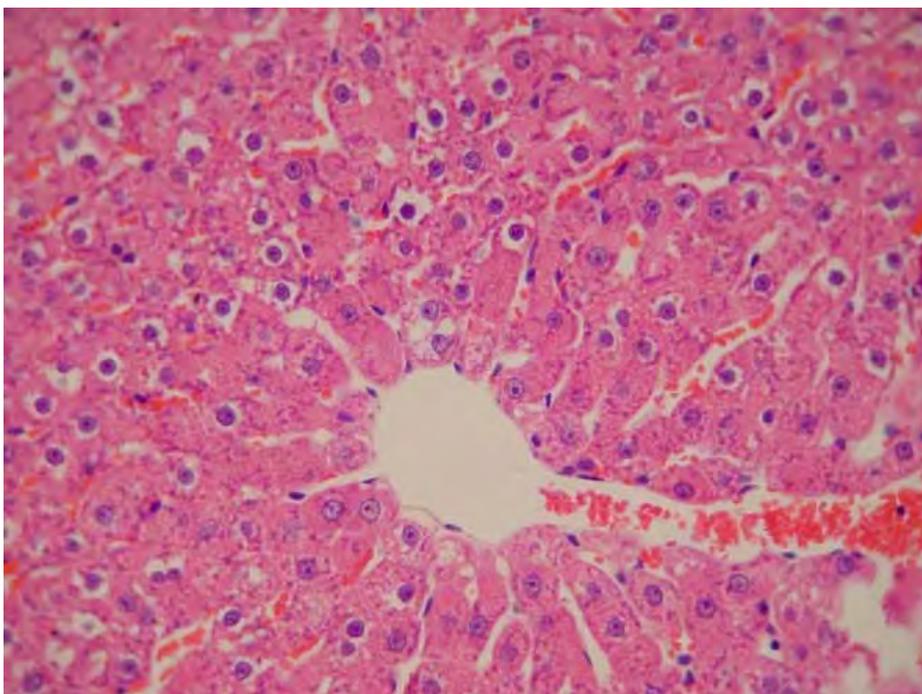


Figura 2 – Hipertrofia de hepatócitos centrolobulares no grupo G3 “Doses efetivas” (Hematoxilina e eosina, 400X).

Tabela 4 – Incidência (%) de eventos histológicos no fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Hepatócitos				Ductos Biliares	
	Apoptose	Mitose	Hipertrofia	Esteatose	Esclerose	Hiperplasia
G1 Controle (n=10)	0 (0) a	0 (0) b	2 (20) c	2 (20) b	0 (0)	0 (0)
G2 Baixas Doses (n=10)	5 (50) b	6 (60) a	4 (40) b,c	5 (50) a,b	0 (0)	0 (0)
G3 Doses Efetivas (n=10)	7 (70) b	7 (70) a	<b>10 (100) a</b>	7 (70) a,b	1 (10)	1 (10)
G4 Dicofol (n=10)	<b>9 (90) b</b>	5 (50) a	7 (70) a,b,c	6 (60) a,b	0 (0)	3 (30)
G5 Permetrina (n=10)	4 (40) b	5 (50) a	7 (70) a,b,c	9 (90) a	1 (10)	3 (30)
G6 Diclorvós (n=10)	6 (60) b	4 (40) a,b	7 (70) a,b,c	8 (80) a	0 (0)	0 (0)
G7 Dieldrin (n=10)	6 (60) b	5 (50) a	<b>9 (90) a,b</b>	7 (70) a,b	0 (0)	0 (0)
G8 Endosulfan (n=10)	1 (10) a	3 (30) a,b	<b>9 (90) a,b</b>	9 (90) a	0 (0)	0 (0)

Letras diferentes indicam diferença significativa por Tukey

### ***Índice de proliferação celular no fígado***

Os grupos “baixas doses” (G2) e “doses efetivas” (G3) apresentaram índices significativamente maiores de proliferação hepática em relação ao grupo controle (G1), mas não diferiram entre si. Os dados não se comportaram de maneira paramétrica, mas as respectivas média±s.d. foram G1 = 0,77±0,60, G2 = 2,31±0,92 e G3 = 2,81±0,79 núcleos marcados/4.000 hepatócitos.

### ***Análise Histomorfométrica e Avaliação da Espermatogênese (Tabela 6)***

A porcentagem de túbulos seminíferos normais e a dinâmica da espermatogênese nos grupos tratados com a mistura dos praguicidas ou com os praguicidas individuais não diferiram significativamente do grupo Controle (G1). Da mesma forma, as alturas do epitélio germinativo, a área da luz tubular e número de células de Sertoli dos grupos tratados não apresentaram diferenças em relação ao grupo Controle (G1).

Tabela 5: Análise histológica, dinâmica do processo espermatogênico e morfometria de testículo dos animais nos diferentes grupos experimentais.

	G1 Controle	G2 Baixas Doses	G3 Doses Efetivas	G4 Dicofol	G5 Permetrina	G6 Diclorvós	G7 Dieldrin	G8 Endosulfan
<b>% túbulos seminíferos normais<sup>(1)</sup></b>	92,00 (89,50-93,50)	92,50 (89,00-95,00)	91,50 (90,00-94,00)	93,00 (89,00-95,00)	91,50 (89,00-95,00)	86,50 (81,00-88,00)	92,50 (92,00-95,00)	90,00 (87,00-91,25)
<b>Dinâmica da espermatogênese</b>								
<b>Estádio I-IV<sup>(2)</sup></b>	44,00 (40,50-48,50)	47,50 (46,00-53,00)	47,00 (44,50-51,50)	45,00 (40,50-46,00)	46,00 (41,00-49,00)	40,00 (39,00-42,00)	43,50 (42,00-49,00)	46,50 (46,00-48,00)
<b>Estádio VII-VIII<sup>(3)</sup></b>	23,00 (18,75-25,00)	20,00 (17,00-23,00)	16,00 (15,00-20,75)	22,00 (19,00-23,00)	22,00 (21,00-22,00)	20,50 (19,00-21,00)	20,00 (18,00-21,00)	21,00 (18,00-22,00)
<b>Estádio IX-XIII<sup>(4)</sup></b>	29,00 (26,75-31,25)	28,50 (26,00-31,00)	28,00 (25,75-32,50)	32,00 (27,50-34,00)	29,00 (27,00-31,00)	34,00 (32,00-39,00)	34,00 (25,00-36,00)	29,00 (26,00-32,00)
<b>Estádio XIV<sup>(5)</sup></b>	3,00 (2,50-5,00)	3,50 (3,00-4,00)	5,00 (3,00-5,25)	4,00 (2,50-5,00)	4,00 (3,00-4,00)	3,50 (3,00-5,00)	4,00 (3,00-6,00)	3,00 (2,00-6,00)
<b>Morfometria Testicular</b>								
<b>Altura do epitélio germinativo (<math>\mu\text{m}</math>)<sup>(6)</sup></b>	60,61 $\pm$ 11,11	55,36 $\pm$ 10,13	64,87 $\pm$ 16,54	58,33 $\pm$ 10,97	59,79 $\pm$ 12,19	56,12 $\pm$ 9,50	66,53 $\pm$ 11,72	58,74 $\pm$ 11,00
<b>Área da luz tubular (<math>\mu\text{m}^2</math>)<sup>(7)</sup></b>	59885,28 $\pm$ 19916,17	61164,77 $\pm$ 22332,87	49917,87 $\pm$ 17827,46	72245,81 $\pm$ 23166,06	52290,32 $\pm$ 18870,40	45801,48 $\pm$ 14574,83	60749,28 $\pm$ 18551,25	53065,51 $\pm$ 19224,01
<b>Número de células de Sertoli<sup>(8)</sup></b>	14,67 $\pm$ 0,36	14,93 $\pm$ 0,30	14,44 $\pm$ 0,26	15,34 $\pm$ 0,43	14,69 $\pm$ 0,43	13,11 $\pm$ 0,26	14,21 $\pm$ 0,52	12,81 $\pm$ 0,30

1,2,3,4,5 Mediana e intervalo interquartilico; 6,7 Média  $\pm$  desvio-padrão por Mann Whitney contra Controle; 8 Média  $\pm$  erro padrão da média por Bonferroni,  $\alpha = 0,05$ . 1,2,3,4,5 n varia entre 8 e 10; 6 e 7 n=6.

#### **4. Discussão**

De modo geral, o presente estudo mostra que a exposição de ratos Lewis adultos jovens à uma mistura de praguicidas via ração durante 8 semanas leva à alterações morfológicas no fígado, mas não no rim, adrenal, próstata, vesícula seminal, testículo e epidídimo.

Nosso estudo mostrou ganho de peso significativamente menor do grupo G6 em relação a todos os outros grupos tratados, mas afastamos a possibilidade de comparação, pois, esses animais iniciaram o período experimental com peso inferior aos demais, fato ocasionado pela entrega de diferentes lotes de animais + ingestão baixa. Em relação os demais grupos não houve comprometimento do ganho de peso corpóreo pelos diferentes grupos experimentais, embora tenha sido detectada diminuição de ingestão de ração pelos animais que compunham os grupos de misturas (G2 e G3) e diminuição de consumo de água do grupo G3 em relação ao grupo Controle (G1), coincidente com observações prévias de nosso grupo de pesquisa (Perobelli et al., 2010) e de Wade et al. (2002) que avaliaram ratos machos adultos expostos a uma mistura em baixas doses de contaminantes ambientais persistentes (organoclorados e metais) por 70 dias, quando também não foram observadas diferenças acentuadas; a alteração deste parâmetro poderia traduzir comprometimento sistêmico pelas exposições químicas (EPA, 1996), o que não ocorreu em nosso estudo.

Nossos resultados mostram ausência de diferenças significativas nos pesos de rim, adrenal, próstata, vesícula seminal e epidídimo de todos os grupos em relação ao grupo controle (G1), da mesma forma que Perobelli et al. (2010) demonstrou ausência de diferença significativa nos pesos de testículo e epidídimo de animais tratados com a mesma mistura deste estudo. Embora tenha havido aumento significativo do peso relativo do testículo do grupo “baixas doses” (G2) em relação ao controle (G1), não foram observadas alterações histológicas que justificasse essa variação, nem ela seguiu dose-resposta, sugerindo que a diferença observada não é biologicamente relevante.

O fígado tem como uma de suas funções principais a manutenção da homeostasia metabólica incluindo a biotransformação de substâncias endógenas e xenobióticas com posterior liberação de metabólitos na corrente sanguínea. Assim, sua avaliação é crítica em estudos de toxicidade, nos quais

este órgão pode apresentar alterações adaptativas e adversas não-proliferativas e proliferativas (Hardisty, 2005; Maronpot, 2010). Nossos resultados mostram aumento de peso relativo do fígado dos animais de ambos os grupos “baixas doses” e “doses efetivas” em relação ao controle. Considerando a incidência elevada de hipertrofia hepatocítica nas regiões centrolobulares dos animais expostos aos praguicidas, em especial o grupo G3 (“Doses Efetivas”), pode-se sugerir que as misturas provocaram aumento da atividade metabólica. De fato, hipertrofia hepatocítica resulta de indução enzimática hepática contínua por xenobióticos, já que os hepatócitos desta região são responsáveis pela maior parte das reações de biotransformação levada a efeito pelo fígado (Hodgson, 1999; Maronpot, 2010). Da mesma forma, estudo de expressão das CYPs (2b1/2b2) realizado em cooperação com Dra. Suzane Ramos da Silva e Dra. Carla Adriene da Silva Franchi, com os fígados em questão mostrou aumento da atividade metabólica dos grupos “baixas doses” e “doses efetivas”. O paper com esses resultados está em fase de redação para publicação.

Acompanhando a hipertrofia resultante da indução enzimática, muitas vezes também é relatada a hiperplasia em fígado de roedores; esta é a situação clássica da resposta do fígado ao fenobarbital, um clássico indutor enzimático neste órgão. A hiperplasia contribui para o aumento do volume e da capacidade funcional do fígado através do aumento do número de hepatócitos; esses eventos podem ocorrer em conjunto em resposta a indutores enzimáticos e podem corresponder às alterações mais precoces do desenvolvimento de tumores hepatocelulares (Maronpot, 2010). Reafirmando isso, nossos resultados mostraram aumento na taxa de proliferação celular nos grupos tratados com a mistura nas suas duas formas, “baixas doses” e “doses efetivas”.

As secreções do hipotálamo, hipófise anterior e gônadas controlam o sistema reprodutor masculino. Nos machos, o principal hormônio envolvido no controle das funções reprodutivas é a testosterona. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH/LHRH), produzido pelo hipotálamo, controla a secreção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) pela hipófise anterior. O FSH é responsável pela integridade dos túbulos seminíferos e, após a puberdade, é importante na gametogênese através de sua ação nas células

de Sertoli. O LH estimula as células de Leydig a secretarem androgênios – em particular a testosterona. A testosterona é importante para a manutenção dos órgãos reprodutores, desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários masculinos, manutenção da espermatogênese, incluindo a maturação dos espermatozoides no epidídimo e, conseqüentemente, para a fertilidade (Rang, et al., 2001).

Os resultados do presente estudo não mostraram qualquer diferença significativa entre os grupos tratados *versus* grupo controle (G1) quanto aos níveis séricos de FSH e testosterona; apenas o grupo tratado com a mistura em “doses efetivas” (G3) apresentou nível de LH aumentado em relação ao controle (G1), embora essa variação não tenha sido associada a nenhuma outra dentre os parâmetros analisados. Perobelli et al. (2010) não observaram alterações nos níveis de LH, FSH e testosterona de animais tratados com misturas semelhantes a estas. Loeffler e Peterson (1999), também não observaram alterações nos níveis séricos de LH e de testosterona em ratos Sprague-Dawley adultos expostos por 28 dias ao Tris(4-chlorophenyl)methanol (TCPM-OH), um contaminante ambiental cuja estrutura molecular é semelhante à dos praguicidas dicofol e DDT, sugerindo que a exposição da forma apresentada neste estudo não causou alterações toxicologicamente relevantes.

Alterações histológicas são conhecidas como um dos parâmetros mais sensíveis para detecção de toxicidade testicular (Lanning et al., 2002). A vacuolização das células de Sertoli, esfoliação da camada germinativa, presença de células acidófilas e formação de células gigantes multinucleadas apresentaram-se de forma difusa e em pequena quantidade em todos os grupos tratados, fato este que não afetou a dinâmica da espermatogênese e a função testicular em todos os grupos de forma semelhante aos achados de Perobelli et al. (2010). Além disso, a altura da camada germinativa e área da luz tubular, juntamente com o número de células de Sertoli dos grupos tratados com os praguicidas não sofreram alterações em relação ao grupo controle (G1).

Assim, nossos resultados indicam que a mistura em níveis de NOEL/NOAELs pode alterar os pesos relativos de testículos e epididímos, mas não causa alterações morfométricas nesses órgãos, nem altera a dinâmica da espermatogênese e função testicular, além disso, as alterações observadas

não ocorrem de maneira dose-resposta, não sendo relevante biológica e toxicologicamente. De qualquer modo, deve ser referido que a análise funcional em estudo prévio de nosso grupo revelou prejuízo significativo da motilidade dos espermatozóides nos grupos tratados com a mistura em doses “baixas” e “efetivas”, bem como em animais expostos ao dicofol e dieldrin (Perobelli et al., 2010). No presente estudo, o epidídimo não apresentou alterações morfológicas. Isto sugere que o efeito estressor potencial dos agentes se faz inicialmente sobre o aspecto funcional do epidídimo que é o órgão envolvido com a aquisição de motilidade e capacidade fértil dos gametas masculinos.

Em conclusão, a exposição aos praguicidas da maneira apresentada não causou alterações toxicologicamente relevantes quanto ao ganho de peso e consumo de água e ração e dosagens hormonais dos animais tratados, embora possa causar aumento da atividade metabólica hepática, além de alterações funcionais reprodutivas.

## 5. Referências

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Controlando agrotóxicos nos alimentos: O trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, a FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR e ITEP/PE. Relatório de atividades 2004. Brasília. ANVISA, 2005. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em 28/abr/2008.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Monitoramento de resíduos de agrotóxicos pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, BA, DF, ES, GO, MS, MG, PA, PR, PE, RJ, RS, SC, SP, SE, TO, e com os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED e LACEN/PR. Relatório de atividades de 2001-2007. Brasília. ANVISA, 2007. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em 04/jan/2012.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos Alimentos: trabalho desenvolvido pela anvisa, com as Vigilâncias sanitárias dos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Santa Catarina, Sergipe e Tocantins, e com os laboratórios Instituto Octávio Magalhães (IOM/FUNED/MG), laboratório Central do Paraná (LACEN/PR) e Eurofins (São Paulo/Sp). Relatório de atividades de 2009. Brasília. ANVISA, 2010. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em 04/jan/2012.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Relatório de atividades de 2010. Brasília. ANVISA, 2011. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em 04/jan/2012.

Baker VA. Endocrine disrupters – testing strategies to assess human hazard. *Toxicology in vitro* 2001; 15:413-419.

Carvalho TL, Guimarães MA, Kempinas WG, Petenusci SO, Rosa e Silva AA. Effects of guanethidine-induced sympathectomy on the spermatogenic and steroidogenic testicular functions of prepubertal to mature rats. *Andrologia*, 1996 Mar-Apr;28(2):117-22.

Carpenter DO, Arcaro KF, Bush B, Niemi WD, Pang S, Vakhariad D. Human health and chemical mixtures: an overview. *Environ Health Perspec* 1998; 106:1263-1270.

Gamet-Payrastre L. Physiological impact of pesticides mixtures. *Cahiers de nutrition et de diététique* (2011) 46, 82—85

Gray LE, et al. Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing. Filling key data gaps. *Toxicology* 2002; 27:371-382.

Hardisty JF, Brix AE. Comparative hepatic toxicity: prechronic/chronic liver toxicity in rodents. *Toxicol Pathol* 2005; 33:35-40.

Heley DV, Korach KS. Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. *Endocrinology* 2006; 147:25-32.

Hershberger LG, Shipley EG, Meyer RK. Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator and muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 83:175-180.

Hodgson E, Rose RL, Ryu DY, Falls G, Blake PL, Levi PE. Pesticidemetabolizing enzymes. *Toxicol Lett* 1995; 82/83:73-81.

Hodgson E. Induction and inhibition of pesticide-metabolizing enzymes: role in synergism of pesticides and pesticide action. *Toxicol Ind Health* 1999; 15:6-11.

Lanning LL et al. Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicol Path* 2002; 30(4);507–520.

Loeffler, I. K., and Peterson, R. E. 1999. Interactive effects of TCDD and *p,p'*-DDE on male reproductive tract development in *in utero* and lactationally exposed rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154:28–39.

Mantovani A. Risk assessment of endocrine disrupters: the role of toxicological studies. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1076:239-252.

Maronpot RR.; Yoshizawa K.; Nyska A.; Harada T.; Flake G.; Mueller G.; Singh B.; Ward JM. Hepatic Enzyme Induction: Histopathology. *Toxicologic Pathology*, 38: 776-795, 2010.

Marty MS, Crissman JW, Carney EW. Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17 $\beta$ -estradiol, steroid biosynthesis inhibitors, and a thyreoid inhibitor. *Toxicol Sci* 1999; 52:269-277.

Marty MS, Crissman JW, Carney EW. Evaluation of the male pubertal onset assay to detect testosterone and steroid biosynthesis inhibitors in CD rats. *Toxicol Sci* 2001; 60:285-295.

Massaad C, et al. How can chemical compounds alter human fertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 100:127-137.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guidance Document on the Assessment of Chemicals for Endocrine Disruption Version 9 ( with changes to V8 accepted, 17 November 2010). Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/63/8/46436593.pdf>. Acesso em 12/dez/2011.

Perobelli JE, Martinez MF, Franchi CAS, Fernandez CDF, Camargo JLV, Kempinas WG. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 73:991–1002, 2010

Toledo FC, Perobelli JE, Pedrosa FP, Anselmo-Franci JA, Kempinas WD. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011 Jun 24;9:94.

Toppari J, Haavisto AM, Alanen M. Changes in male reproductive health and effects of endocrine disruptors in Scandinavian countries. *Cad Saúde Pública* 2002; 18:413-420.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD), Dichlorvos, 1993. Disponível em [www.epa.gov/iris](http://www.epa.gov/iris). Acesso em 14/jan/2012.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD), Permethrin, 1992. Disponível em [www.epa.gov/iris](http://www.epa.gov/iris). Acesso em 14/jan/2012.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). EPA/630/R-96/012: Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Washington: USEPA; 1997.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). EPA/600/R-98/087: Research Plan for Endocrine Disruptors. Washington: USEPA; 1998.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Validation of screening and testing assays proposed for the EDSP. Washington: USEPA; 2007.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP). <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/index.htm>. Acesso em 11/jun/2008.

Viau C. Biological monitoring of exposure to mixtures. *Toxicol Lett* 2002; 134:9-16.

Yang RAS. Toxicologic interactions of chemical mixtures. In: Bond J. (editor) *Comprehensive Toxicology*. Oxford: Elsevier; 1997; 1:189-203.

Yang RAS. Some critical issues and concerns related to research advances on the toxicology of chemical mixtures. *Environ Health Perspec* 1998; 106:1059-1063.

Wade, M. G., Foster, W. G., Younglai, E. V., McMahon, A., Leingartner, K., Yagminas, A. L., Blakey, D., Fournier, M., Desaulniers, D., and Hughes, C. L. 2002. Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: Systemic, immune and reproductive effects. *Toxicol. Sci.* 67:131–143.

WHO/FAO.INCHEM. Data sheets on pesticides, Dicofol, n.81, p. 1-13, 1996. Disponível em [www.inchen.org/documents/](http://www.inchen.org/documents/) Acesso em 14/jan/2012.

WHO/FAO.INCHEM. Data sheets on pesticides, Endosulfan, n. 92, p. 1-15, 1989. Disponível em [www.inchen.org/documents/](http://www.inchen.org/documents/) Acesso em 14/jan/2012.

WHO/FAO.INCHEM. Evaluation of some pesticides residues in food. Dieldrin. WHO/Food ADD/71.42, p.1-32, 1970. Disponível em: [www.inchen.org/documents/](http://www.inchen.org/documents/). Acesso em 14/jan/2012.

*Capítulo III*

*Artigo Científico 2*



## **Efeitos (anti)androgênicos de uma mistura de praguicidas em ratos recém-desmamados**

Meire França Martinez<sup>1</sup>, João Francisco Lozano Luvizutto<sup>1</sup>, Juliana Elaine Perobelli<sup>2</sup>, Carla Adriane da Silva Franchi<sup>1</sup>, Antonio Francisco Godinho<sup>3</sup>, Alberto Mantovani<sup>4</sup>, João Lauro Viana de Camargo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana - TOXICAM, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto de Biociências, CEATOX, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil;

<sup>4</sup>Departamento de Toxicologia Alimentar e Veterinária, Instituto Superior de Saúde, Roma, Itália.

Autor Correspondente: Meire França Martinez

Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Departamento de Patologia

Distrito de Rubião Junior, S/N

Botucatu/SP – CEP: 18.618-000

Telefone (14) 3882-8255 - Fax (14) 3815-2348

e-mail: meirefm@fmb.unesp.br

NOTA - Apresentação do manuscrito de forma genérica, uma vez que não foi decidido o periódico a que será submetido.

**Resumo**

O presente estudo objetivou avaliar, em ratos recém desmamados e estimulados com propionato de testosterona (TP), os possíveis efeitos androgênicos ou antiandrogênicos provocados por uma mistura de 5 praguicidas fornecidos a ratos machos recém-desmamados da linhagem Lewis. Esses praguicidas foram escolhidos porque foram detectados em 2004 pela Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (ANVISA) como resíduos em tomates frescos à disposição da população. Os animais foram separados em cinco grupos: Grupo 1: Controle; Grupo 2: TP, 1 mg/kg/dia por injeção s.c. (controle positivo para ação androgênica); Grupo 3: TP + flutamida (FLU), 3 mg/kg/dia por gavagem (controle positivo para ação antiandrogênica); Grupo 4: TP + Mistura em “baixas doses”, praguicidas em nível de seus respectivos NOEL/NOAELs (diclorvós 0,23 mg/kg, dicofol 0,22 mg/kg, endosulfan 0,6 mg/kg, dieldrin 0,025 mg/kg, permetrina 5,0 mg/kg); Grupo 5: TP + Mistura em “doses efetivas”, praguicidas adicionados em seus respectivos LOEL/LEL/LOAEL (diclorvós 2,3 mg/kg, dicofol 2,5 mg/kg, endosulfan 2,9 mg/kg, dieldrin 0,05 mg/kg, permetrina 25,0 mg/kg). Os animais foram sacrificados ao final do 10º dia do estudo por narcose induzida em câmara de CO<sub>2</sub>. Os pesos relativos dos testículos dos grupos G2, G3, G4 e G5 apresentaram-se menores ( $p < 0,05$ ) que o grupo controle. No entanto, os pesos da vesícula seminal, próstata e epidídimos dos grupos G2, G4 e G5 apresentaram-se aumentados ( $p < 0,05$ ). A altura do epitélio germinativo dos testículos dos grupos G2, G3 e G4 apresentou-se menor que a altura do epitélio controle (G1). A área da luz tubular dos testículos dos grupos G2 e G3 apresentaram-se diminuídas em relação a do G1. Nossos dados sugerem que a mistura específica de praguicidas usada para a exposição a curto prazo de ratos recém desmamados e estimulados com TP não possui ação (anti)androgênica.

## **1. Introdução**

A Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem realizado monitoramentos periódicos para detectar resíduos de agrotóxicos em frutas, legumes e verduras frescas disponíveis para compra e consumo pela população. Entre julho de 2001 e dezembro de 2004, o Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA) pesquisou 4.001 amostras de alimentos *in natura* (alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate), coletadas em 12 estados da Federação. Do total de amostras analisadas, 3.271 (81,7%) apresentaram resíduos de praguicidas, sendo que 931 (28,5%) delas continham níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) (16,6%) ou continham resíduos de produtos não-autorizados para aquele tipo de cultura (83,4%). As culturas com maior frequência de irregularidades foram as de tomates, maçãs e morangos. Particularmente com relação aos tomates, foram detectados resíduos de seis praguicidas não-autorizados (dicofol, dieldrin, endosulfan, monocrotofós, clorpirifós e diclorvós), e de cinco praguicidas permitidos, mas cujos níveis estavam acima do LMR (metamidofós, permetrina, triazofós, ditiocarbamatos e cialotrina) (ANVISA, 2004). Esses praguicidas pertencem a diferentes classes: um ditiocarbamato, dois piretróides (permetrina e cialotrina), três organoclorados (dicofol, dieldrin e endosulfan) e cinco organofosforados (diclorvós, monocrotofós, clorpirifós, metamidofós e triazofós). O impacto potencial destes tomates contaminados à saúde do consumidor não é conhecido.

Com relação às evidências experimentais e observacionais em animais de vida selvagem, um dos primeiros praguicidas identificados como desregulador endócrino foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), seguido por outros organoclorados como o dieldrin, clordane, heptaclor, endosulfan, hexaclorobenzeno, metoxicloro e clordecone (Massaad et al., 2002). Devido sua persistência no meio ambiente, estes produtos também têm sido incluídos na denominação de poluentes orgânicos persistentes (POPs). Esta persistência é resultante de características como lipossolubilidade e estabilidade, que os tornam resistentes à degradação biótica ou abiótica, podendo ser detectados em diferentes regiões do planeta décadas após sua liberação. Em virtude de sua baixa solubilidade em água e alta solubilidade em gorduras, estes compostos podem ser encontrados também em alimentos de origem animal

(leite, carnes e seus derivados), o que perpetua a contaminação da cadeia alimentar. Por estas razões, muitos destes praguicidas tiveram seu uso proibido ou controlado em diversos países, incluindo no Brasil. Apesar disto, muitos praguicidas organoclorados continuam sendo utilizados em culturas agrícolas, ou para outros fins. Devido suas propriedades bioacumulativas, resíduos de organoclorados podem ser detectados no ambiente e em tecidos animais em várias regiões do planeta (Guillette et al., 1994; D'Amato et al., 2002; Delgado et al., 2002; Windhan et al., 2005).

Os xenobióticos que têm ação estrogênica são também denominados xenoestrógenos e, mesmo possuindo modos de ação variados em organismos superiores, têm sido hipoteticamente associados à redução da fertilidade, malformações genito-reprodutivas (hipospadia e criptorquidismo) e desenvolvimento de neoplasias masculinas (Skakkebaek et al., 2001; Rittler et al., 2002; Toppari et al., 2002; Metzdorff et al., 2007). Os mais referidos são os que agem sobre os receptores nucleares de estrógeno (RE) e de andrógenos (RA). Alguns compostos, como o *o,p'*-DDT e seu metabólito o *p,p'*-DDE, têm efeito antiandrogênico, ligando-se e bloqueando a função dos RA. A exposição humana a estes compostos durante a puberdade ou vida adulta pode causar retardo do aparecimento de características sexuais masculinas e ou diminuição da produção espermática, respectivamente (Skakkebaek et al., 2001; Massaad et al., 2002; Toppari et al., 2002).

Os ensaios toxicológicos convencionais de curta ou longa duração com animais de experimentação podem indicar o potencial desregulador endócrino de substâncias químicas quando registram efeitos adversos sobre órgãos reprodutivos e ou endócrinos, ou especificamente sobre os processos de reprodução e desenvolvimento. Além desses, há ensaios *in vivo* e *in vitro* mais curtos, que permitem identificar modos e mecanismos de ação em órgãos e células alvo específicas (USEPA, 1997; 1998). Por exemplo, o teste uterotrófico (EDSTA, 1998), bem como o ensaio com roedores fêmeas púberes (Gray et al., 2002; Marty et al., 1999), têm como objetivo a detecção de ação estrogênica de determinada substância, enquanto o teste de Hershberger (Baker, 2001; OECD, 2010; EPA 2011), juntamente com o ensaio com roedores machos púberes (Gray et al., 2002; Marty et al., 1999), detectam se a substância tem efeito androgênico ou antiandrogênico. Todos estes ensaios são considerados

de curta duração, variando de 5 dias a 7 semanas. Existem também ensaios com animais *knockout* para determinação do mecanismo de ação e interação das substâncias potencialmente desreguladoras com receptores hormonais (Heley e Korach, 2006), estes sendo de duração relativamente longa (18 meses). É importante salientar que a maioria desses ensaios para identificação de substâncias desreguladoras endócrinas ainda não está validada (Clode, 2006; USEPA, 2007; OECD, 2008). Entre os ensaios atualmente disponíveis não há um só que aborde todos os parâmetros teoricamente necessários para conhecimento dos fenômenos sistêmicos envolvidos na desregulação endócrina.

O ensaio de Hershberger em ratos machos, avalia *in vivo* o potencial (anti)androgênico de uma substância pela alterações dos pesos de cinco órgãos/tecidos sexuais sensíveis ao andrógeno: glândulas de Cowper, músculo elevador do ânus, músculo bulbo cavernoso, vesículas seminais, glândulas de coagulação e próstata dorsolateral e ventral (OECD, 2010; EDSTA, 2011). Este ensaio pode ser realizado por dois métodos; o primeiro é o ensaio clássico que impõe a castração de animais adultos jovens; o segundo utiliza animais recém desmamados não castrados. A sensibilidade dos dois métodos está no fato do uso de animais com mínima produção endógena de andrógeno. Como os níveis de andrógenos circulantes são muito baixos, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal não é capaz de compensar o *feedback* sobre os mecanismos internos, a habilidade de resposta dos tecidos é maximizada e a variabilidade do peso inicial dos tecidos e órgãos alvo é minimizada (OECD, 2010). O presente estudo objetivou avaliar os possíveis efeitos (anti)androgênicos provocados por uma mistura de 5 praguicidas fornecidos em baixas doses a ratos machos recém desmamados da linhagem Lewis, baseando-se no segundo método do teste. Esses praguicidas foram escolhidos porque foram alguns dos envolvidos nas irregularidades detectadas pelo PARA no monitoramento da ANVISA em 2004.

## 2. Material e métodos

### Reagentes

Propionato de testosterona (TP) ( $C_{22}H_{32}O_3$ ), CAS 57-85-2, 97% puro. Flutamida (FLU) ( $C_{11}H_{11}F_3N_2O_3$ ), CAS 13311-84-7, 95% puro. Dicofol ( $C_{14}H_9Cl_6O$ ), CAS 115-32-2 (gentilmente cedido pela Milenia Agrociências S/A, Londrina (PR), 96,5% puro; endosulfan, mistura de isômeros *alfa* e *beta* (2:1) ( $C_9H_6Cl_6O_3S$ ), CAS 115-29-7 (gentilmente cedido pela Bayer CropScience S/A, Belford Roxo, RJ), 100% puro; diclorvós ( $C_4H_7Cl_2O_4P$ ), CAS 62-73-7, 99,4% puro; permetrina, mistura de isômeros *cis* e *trans* ( $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$ ), CAS 52645-53-1, 98,0% puro; dieldrin ( $C_{12}H_8Cl_6O$ ), CAS 60-57-1, 97,9% puro. Os praguicidas diclorvós, permetrina e dieldrin foram adquiridos da Fluka Chemicals, Sigma-Aldrich, Milwaukee, EUA. Anticorpo Receptor de Andrógeno - AR (SC-816, Santa Cruz Biotechnology, USA).

### Animais e ambiente

Matrizes da linhagem Lewis (4 machos e 10 fêmeas) foram adquiridas do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da UNICAMP (CEMIB-UNICAMP, Campinas-SP), afim de se reproduzir em nosso biotério e possibilitar o início do tratamento logo após o desmame. Todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP em gaiolas de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade, e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada (cinco animais por gaiola, duas gaiolas por grupo), sendo as trocas das gaiolas e da maravalha realizadas três vezes por semana.

Durante toda a fase experimental foram controladas as condições ambientais do biotério como temperatura ( $22 \pm 2^\circ C$ ), umidade relativa do ar ( $55 \pm 10\%$ ), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e mantida exaustão contínua do ar. Todos os animais receberam ração específica de acordo com o grupo pertencente, e água filtrada em bebedouros de vidro com tampa de borracha e bico metálico (500 ml). A água e a ração foram fornecidas *ad libitum*.

O protocolo respeitou os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (CEEA), protocolo nº 670.

### ***Delimitação Experimental (Figura 1)***

Os praguicidas e o óleo comestível componente da formulação (8%) foram incorporados à ração [AIN93-M (Reeves et al.,1993)] em pó produzida pela Nutri Experimental (Campinas, SP), assegurando-se o uso, em sua formulação, de constituintes livres de resíduos de quaisquer praguicidas.

Filhotes desmamados ao 28º dia após o nascimento foram distribuídos em grupos conforme o número disponível dentro de cada ninhada até que completassem a quantidade de 10 por grupo. Os grupos foram tratados em momentos diferentes, pois o nascimento dos filhotes foi variável e, por se tratar de linhagem isogênica, normalmente em número pequeno.

Todos os animais foram eutanasiados no 11º dia após o início do tratamento por narcose induzida em câmara de CO<sub>2</sub>. Durante o experimento, os animais passaram por avaliação clínica diária que constituía de observações na alteração da pelagem, mucosas, fezes, ocorrência de atividade autônoma (lacrimação, piloereção, variação do tamanho da pupila, padrão respiratório, etc.), alterações no modo de andar, postura, orientação, ocorrência de movimentos espasmódicos ou tônicos ou comportamento anormal (automutilação).

A constituição dos 5 grupos foi a seguinte:

**Grupo 1:** ração basal, sem contaminantes;

**Grupo 2:** Controle positivo. Propionato de Testosterona (TP) 1 mg/Kg/dia + Ração basal;

**Grupo 3:** TP (1 mg/Kg/ dia) + Flutamida (FLU) 3 mg/Kg/dia;

**Grupo 4:** TP (1 mg/Kg/dia) + “Baixas Doses” - praguicidas adicionados à ração em concentrações que permitam ingestões finais correspondentes a seus respectivos NOELs (*no observed effect level*). Ração basal contendo diclorvós 0,23 mg/kg, dicofol 0,22 mg/kg, endosulfan 0,6 mg/kg, dieldrin 0,025 mg/kg,

permetrina 5,0 mg/kg; (FAO/WHO, 1986; WHO/FAO, 1970; 1989; 1996, EPA, 1992; 1993).

**Grupo 5:** TP (1 mg/Kg/dia) + “Doses Efetivas” - ração basal contendo diclorvós 2,3 mg/kg, dicofol 2,5 mg/kg, endosulfan 2,9 mg/kg, dieldrin 0,05 mg/kg, permetrina 25,0 mg/kg. Estas doses correspondem aos LOAELs (*lowest observed level adverse effect* = menor nível de efeito adverso observável) para ratos dos praguicidas dieldrin e endosulfan; para o dicofol será utilizado o LOEL (*lowest observed effect level*), e para o diclorvós e permetrina o LEL (*lowest effect level*); (FAO/WHO, 1986; WHO/FAO, 1970; 1989; 1996, EPA, 1992; 1993).

A dose de TP (1 mg/kg/dia; s.c.) foi a utilizada por Ashby et al. (2004) e Tinwell et al. (2007) conforme recomendação do EDTA Validation Management Group, da OECD (Ashby et al., 2004).

A FLU é composto não-esteróide conhecido por sua atividade antiandrogênica por bloquear a ação da testosterona ao competir pelos receptores de andrógenos (AR). A dose de FLU (3 mg/kg/dia; gavagem) foi originalmente recomendado pela OCDE para a validação do ensaio clássico de Hershberger e também foi a mesma utilizada por Ashby et al. (2004) nas investigações iniciais no ensaio de estimulação por TP em ratos recém desmamados (Tinwell et al., 2007).

Para todas as injeções s.c. utilizou-se o volume de 2 ml/kg de peso corpóreo e para as administrações orais (gavagem) foi utilizado o volume de 5 ml/kg de peso corpóreo (Tinwell et al., 2007).

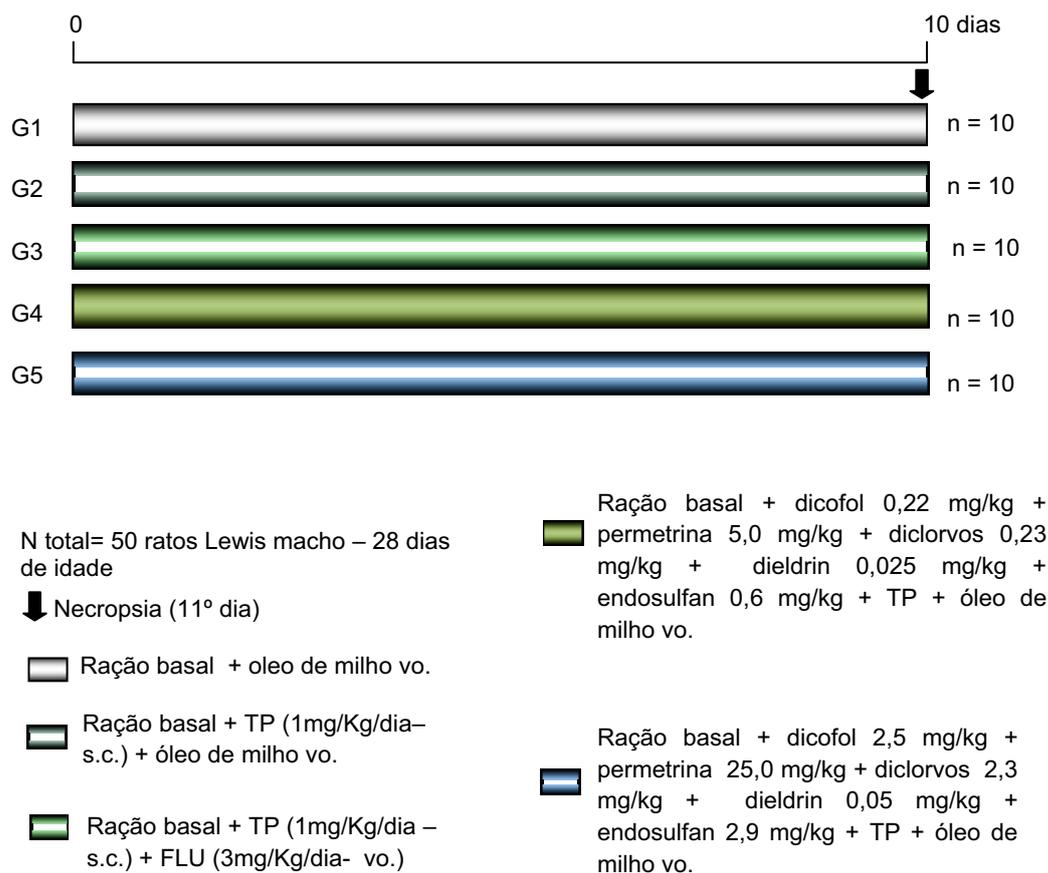


Figura 1: Delineamento Experimental

### **Análises histológicas**

Foram coletados para análise histológica o fígado, testículos, epidídimos, próstata, vesículas seminais e glândulas de coagulação. Estes foram secos em papel filtro e pesados. A seguir foram imersos em formalina 10% tamponada por 48 horas, exceto os testículos e epidídimos, que foram fixados em ALFAC (5% de ácido acético, 10% de formol 100%, 85% de álcool 80%) por 24 horas. Cortes histológicos de 5µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina (H.E.) e analisados qualitativamente em microscópio de luz.

### **Análise histológica dos epidídimos**

Os epidídimos foram coletados, limpos e imersos em solução fixadora de ALFAC. Após pré-fixação de 4 horas os órgãos foram recortados,

retornando em seguida ao fixador. Após 24 horas de fixação, a solução foi substituída por álcool 80°, onde as peças permaneceram até o processamento histológico que consistiu na inclusão do material em paraplast, obtenção de cortes com 5µm de espessura e coloração com hematoxilina e eosina.

### **Análise dos testículos**

#### **Grau de maturação do epitélio germinativo**

Os testículos foram coletados e processados da mesma forma que os epidídimos.

Para avaliar o grau de germinação do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos, 100 túbulos por animal nas fases I, II e III foram avaliados aleatoriamente, utilizando método de atribuições de valores de acordo com o tipo de célula germinativa mais numerosa no epitélio tubular (Carvalho et AL., 1996): grau 1 - espermatócitos I ou II; grau 2 - espermátides jovens com núcleo arredondado (estádio 1 a 8 da espermatogênese); grau 3 - espermátides em fase de maturação, com núcleo ovóide ou alongado (etapa 9 a 14); grau 4 - espermátides em fase de maturação com núcleo alongado (etapa 15 a 18); grau 5 - espermátides maduras em pequena quantidade (estádio 19); grau 6 - espermátides maduras em quantidade média (estádio 19); grau 7 - espermátides maduras em maior quantidade (estádio 19). O número de túbulos seminíferos em cada grau foi multiplicado pelo seu grau, e em seguida os valores foram somados e divididos por 100, resultando no “grau médio”.

### **Morfometria**

Utilizando o programa para análise de imagem NIS-ELEMENT (NIKON Instruments Inc., EUA) foram avaliadas a altura do epitélio germinativo e área da luz tubular de 6 (seis) animais por grupo. Para mensurar a altura do epitélio, foram contados 20 túbulos aleatórios, sendo feita 4 (quatro) medidas em diferentes regiões do epitélio de cada túbulo. A seguir, extraiu-se a média dos valores registrados. Para a medida da área, foram utilizados os mesmos túbulos utilizados para a medida da altura epitelial; foram colocados 5 (cinco) pontos ao redor da luz tubular, formando uma circunferência da qual se extraiu a medida da área correspondente.

### ***Análise estereológica da próstata***

Utilizando o sistema de análise de imagem Image-Pro<sup>®</sup> (versão Plus 4.5 for Windows<sup>™</sup> software), 103 campos histológicos de próstata por grupo experimental foram analisados por método estereológico (Weibel, 1963), no qual se utiliza um sistema teste graticulado com 120 pontos e 60 linhas. Assim, obteve-se a proporção média ocupada em cada grupo, pelos seguintes componentes: lumén, epitélio e estroma. As proporções médias obtidas para cada componente foram comparadas entre os grupos.

### ***Análises imunohistoquímica (IHC) da próstata***

O anticorpo primário AR na concentração 1:50 (SC-816, Santa Cruz Biotechnology, EUA) foi utilizado para IHC. A reação foi realizada utilizando o kit Avidina-biotina (ABC) (Santa Cruz Biotechnology, EUA). Foram selecionados fragmentos distais da próstata ventral de 6 animais por grupo, fixados em formaldeído (10%), desidratados em álcool e incorporados em paraplast. As seções (5µm) foram desparafinadas e depois reidratadas em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato em 3 ciclos de 5 minutos em microondas na potência máxima. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 0,3% por 45 minutos, seguido por rápido enxágüe em água destilada e tampão fosfato (PBS), em seguida incubadas em 1% de soro bovino em PBS por 1h, para bloquear proteínas de ligação inespecíficas. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário AR a 4°C durante a noite. Os cortes foram incubados com anticorpo secundário (1:500) a 37°C, seguido por ABC e diaminobenzina (DAB). Os cortes foram então contracorados com hematoxilina de Harris e classificados qualitativamente seguindo o critério: (+) leve, (++) moderado e (+++) intenso, conforme o padrão de marcação nuclear das células epiteliais.

### 3. Resultados

#### Peso corpóreo (Tabela 1)

O grupo TP+Doses Efetivas (G5) apresentou significativa redução do ganho de peso corpóreo em relação ao grupo controle (G1) e ao grupo TP (G2). O ganho de peso de todos os outros grupos não diferiu significativamente do controle (G1). O grupo TP+FLU (G3) apresentou ganho de peso maior em relação aos grupos TP+Baixas Doses (G4) e TP+Doses Efetivas (G5).

Tabela 1 - Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso ao longo do tratamento.

Grupos	Peso Inicial <sup>1</sup>	Peso Final <sup>1</sup>	Ganho de peso entre momento inicial e final <sup>1</sup>	
	(g) (n=10)	(g) (n=10)	%	g*
G1 Controle	72,83±6,26	112,75±10,18	39,92±6,19	72,83±6,26 a,b
G2 TP	71,10±10,94	110,40±17,96	39,30±7,67	71,10±10,94 a,b
G3 TP + FLU	74,10±3,07	117,40±6,72	43,30±6,24	74,10±3,07 a
G4 TP + Baixas Doses	71,20±6,20	106,40±7,23	35,20±4,96	71,20±6,20 b,c
G5TP + Doses efetivas	70,90±5,26	101,10±9,34	30,20±5,88	70,90±5,26 c

<sup>1</sup>Média ± desvio-padrão; n = número efetivo de animais; em G1 n =11. Letras diferentes indicam diferenças significativas por Tukey - p<0,05

#### Consumos médios de ração e água

O consumo estimado de ração variou entre 11,54±0,75 (TP+FLU) e 9,55±1,30 (TP+Doses Efetivas) e o de água entre 17,15± 1,78 (TP+FLU) e 12,28±2,09 (TP+Doses Efetivas), no entanto, não foram observadas diferenças significativas (*dados não mostrados*).

#### Peso médio relativo dos órgãos (Tabela 2)

O peso do fígado do grupo G5 foi significativamente maior quando comparado os outros grupos G1 e G2.

O peso médio relativo do rim do grupo G5 foi significativamente maior quando comparado aos grupos G1, G2 e G3. O peso médio do rim do grupo G4 foi significativamente maior que o do grupo G3.

Os pesos das adrenais não diferiram significativamente entre os grupos.

Os pesos dos testículos de todos os grupos experimentais (G2, G3, G4 e G5) apresentaram-se significativamente menores que o controle G1.

Os pesos da próstata, vesícula seminal e epidídimos dos grupos G2, G4 e G5 apresentaram-se significativamente maiores quando comparados ao grupo G1 e G3.

Tabela 2 – Pesos relativos (%)\* de órgãos coletados ao final do experimento dos diferentes grupos experimentais

Grupos	FÍGADO <sup>1</sup> (n=10)	RIM <sup>2</sup> (n=20)	ADRENAL <sup>3</sup> (n=20)	TESTÍCULO <sup>4</sup> (n=20)	PRÓSTATA <sup>5</sup> (n=10)	VES.SEMI <sup>6</sup> (n=10)	EPIDÍDIMO <sup>7</sup> (n=20)
G1 Controle (n=12)	5,07±0,36 b	0,52±0,02 bc	0,97±0,19	0,48±0,04 a	4,20±0,49 c	0,03±0,01 c	5,53±0,65 b
G2 TP (n=10)	5,00±0,49 b	0,52±0,03 bc	0,94±0,11	0,28±0,07 b	8,67±1,92 a	0,18±0,06 a	7,78±1,24 a
G3 TP + FLU (n=10)	5,64±0,74 ab	0,49±0,04 c	0,94±0,08	0,28±0,07 b	5,24±0,43 bc	0,07±0,01 bc	4,86±0,39 b
G4TP + Baixas Doses (n=10)	5,60±0,59 ab	0,53±0,03ab	0,87±0,20	0,26±0,05 b	7,86±1,15 ab	0,17±0,05 ab	7,61±0,59 a
G5 TP + Doses Efetivas (n=10)	5,90±0,59 a	0,56±0,05 ab	0,98±0,21	0,29±0,04 b	8,63±1,18 a	0,19±0,05 a	7,96±0,73 a

\*Média e desvio padrão; Valores de adrenais, próstata e epidídimos  $\times 10^{-2}$ . 1,2 Teste de Tukey (p < 0,05); 3,4,5,6,7 Teste de Dunn (p<0,05); Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

### ***Análises histológicas***

As vesículas seminais e próstatas dos animais do grupo controle apresentaram morfologia normal para a idade (39 dias), ou seja, pequenas estruturas glandulares, ao contrário dos animais tratados com TP (G2) e TP + misturas (G4, G5) que apresentaram aspecto glandular mais desenvolvido. O tratamento com FLU inibiu o amadurecimento das vesículas seminais e próstata, como esperado. Os fígados, rins e adrenais não apresentaram alterações relevantes.

### ***Análise dos testículos (Tabela 3)***

#### ***Grau de maturação do epitélio germinativo***

Os graus de maturação do epitélio germinativo apresentaram-se diminuídos nos grupos tratados com TP (G2), TP+FLU (G3), TP+mistura dos praguicidas (“baixas doses”, G4; “doses efetivas”, G5) quando comparados ao controle (G1); isto é, houve atraso na maturação do epitélio germinativo nos grupos tratados com TP.

#### ***Morfometria dos testículos***

A altura média do epitélio germinativo dos grupos G2, G3 e G4 apresentou-se menor do que a altura epitelial do grupo G1.

A área média da luz dos túbulos dos grupos G2 e G4 apresentou-se menor quando comparada ao grupo G1.

### ***Análise estereológica da próstata (Tabela 4)***

Os grupos G2, G4 e G5 apresentaram diminuição significativa na proporção do epitélio em relação ao lúmen quando comparados ao grupo Controle G1, sugerindo aumento da secreção. O grupo G3, com flutamida, não diferiu do G1, controle. apresentou proporção epitelial significativamente maior quando comparado ao grupo G4.

Os grupos G1 e G2 apresentaram aumento significativo na proporção do lume quando comparados ao grupo G5. O grupo G4 apresentou proporção significativamente maior do lume quando comparado ao grupo G1.

O grupo G2 apresentou proporção significativamente maior do estroma em relação ao grupo G5.

Tabela 3 - Grau de maturação do epitélio germinativo, morfometria e incidências histológicas dos testículos de ratos aos 39 dias de idade.

Grupos	Grau de maturação <sup>(1)</sup>	Altura do epitélio germinativo (µm) <sup>(2)</sup>	Área da luz tubular (µm <sup>2</sup> ) <sup>(3)</sup>
G1 Controle	2,43±0,04 A	62,40 ± 4,30	24142,80 ± 4837,80
G2 TP	1,77±0,06 B	54,50 ± 6,60*	15589,60 ± 3800,70*
G3 TP + FLU	1,89±0,09 B	49,70 ± 7,60*	14421,60 ± 3691,90*
G4TP + Baixas Doses	1,74±0,02 B	46,30 ± 6,70*	16858,60 ± 6149,10
G5 TP + Doses Efetivas	1,88±0,05 B	55,50 ± 9,10	18299,00 ± 4748,30

Média ± erro padrão da média. <sup>1</sup>Teste de Bonferroni, p=0,05, n=10 a 8. <sup>2,3</sup> Teste de Mann Whitney contra Controle, n=6.

Tabela 4– Estereologia\* da próstata

Grupos	N	Epitélio <sup>1</sup> (%)	Lumen <sup>2</sup> (%)	Estroma <sup>3</sup> (%)
G1 Controle	103	35,34±8,29 A	34,44±11,23 C	30,22±9,95 A
G2 Testosterona	103	30,51±7,47 B	35,12±11,20 BC	34,37±11,09 A
G3 TP + FLU	103	33,41±6,99 A	36,04±12,61 ABC	30,54±11,71 A
G4 TP + Baixas Doses	103	29,58±6,93 B	38,79±11,54 AB	31,63±11,12 A
G5 TP + Doses Efetivas	103	31,26±8,81 B	39,74±10,99 A	28,99±11,45 B

\*Média ± desvio-padrão. N = número de campos histológicos analisados. 1 Letras diferentes indicam diferença significativa por Teste de Tukey. 2,3 Letras diferentes indica diferença significativa por Teste de Dunn

### **Análise de receptores androgênicos (AR) na próstata**

O padrão de marcação nuclear para AR, revelada por IHC mostrou intensidade moderada (++) ou intensa (+++) em todos os grupos tratados com testosterona (G2 a G5) quando comparados ao grupo controle (Figura 2a e 2b).

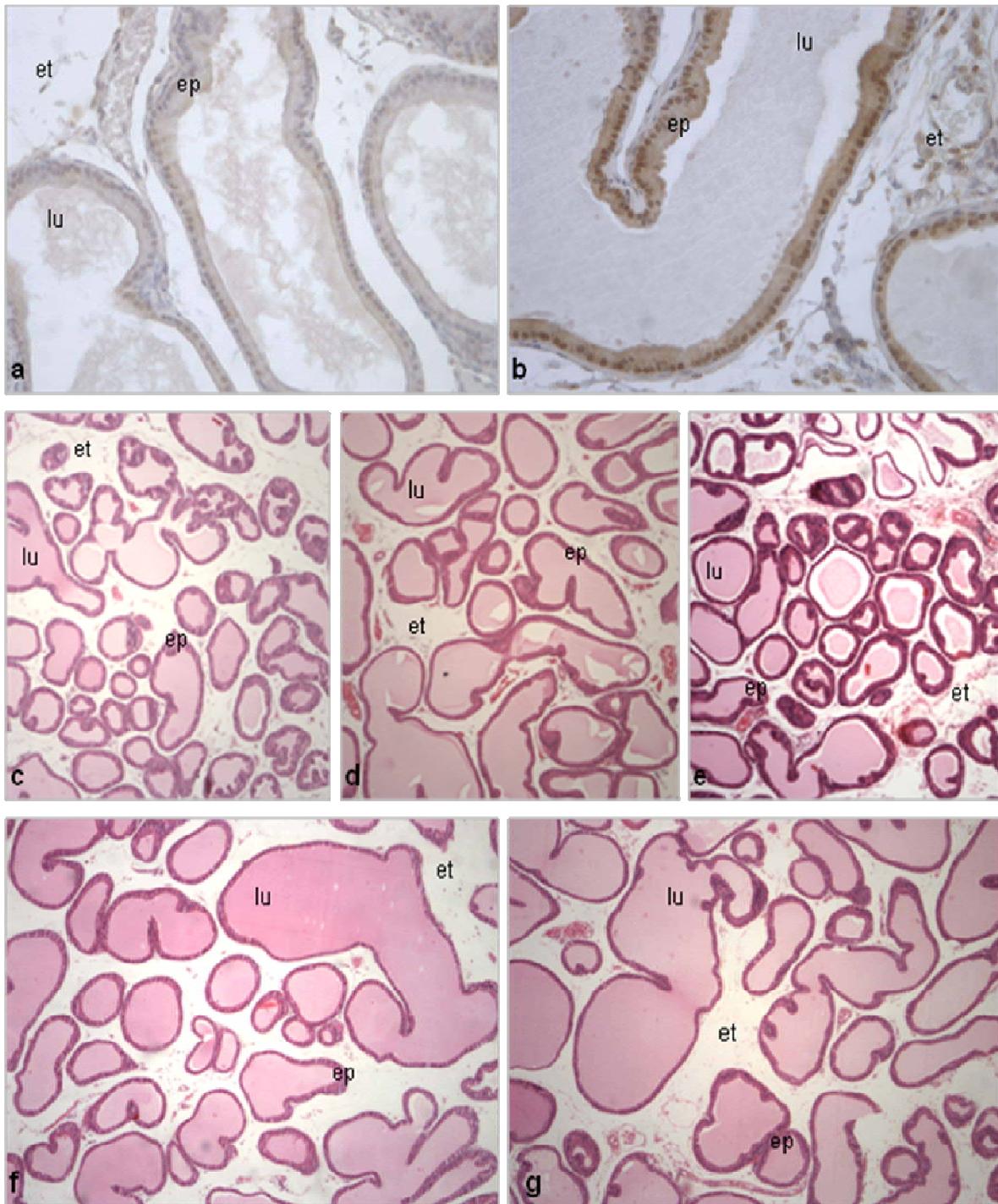


Figura 2 – Cortes histológicas de próstata. (a) grupo Controle; (b) grupo TP + “Baixas Doses” submetidos à IHC de AR (400X). (c) grupo Controle; (d) grupo TP; (e) grupo TP + FLU; (f) grupo TP + Baixas Doses; (g) grupo TP + Doses Efetivas. (100X). Abreviaturas: (ep) epitélio; (et) estroma; (lu) lúmen.

#### **4. Discussão**

A ocorrência de redução de ganho de peso ou mesmo emagrecimento associado à exposições químicas podem sugerir comprometimento sistêmico de animais tratados (EPA, 1996). Em nosso estudo, embora o grupo TP+Doses Efetivas (G5) tenha apresentado significativa redução do ganho de peso corpóreo em relação ao grupo controle (G1) e ao grupo TP (G2), não foram observadas diferenças acentuadas em relação ao consumo de água e ração, mostrando que o tratamento não causou toxicidade sistêmica.

As respostas morfológicas da indução da enzima P450 no fígado ao tratamento de xenobióticos podem variar muito, apresentando de nenhuma alteração até necrose, sob microscopia óptica. A hipertrofia no caso do fígado, pode ser o aumento do volume dos hepatócitos (citoplasma e núcleo), mas não de seu número, e normalmente está associado ao aumento de síntese protéica, aumento de organelas citoplasmáticas ou acúmulo de componentes intracelulares (Maronpot et al., 2010). Neste estudo, o aumento significativo do peso relativo do fígado no grupo tratado com TP+Doses Efetivas pode estar traduzindo indução de enzimas de biotransformação, embora não tenham sido observadas alterações morfológicas, como relatado por Nims & Lubet (1995) em animais expostos a praguicidas como o DDT, dieldrin e clordano.

A diminuição dos pesos dos testículos e aumento dos pesos dos epidídimos, vesículas seminais e próstata dos grupos tratados com TP neste estudo sugerem que o ensaio com animais recém desmamados estimulados por TP, tal como utilizado neste estudo, possui boa reprodutibilidade, pois esses parâmetros, em órgãos sensíveis a estimulação pela testosterona, mostram modificações no mesmo sentido das registradas por Ashby et al. (2004) e Tinwell et al. (2007) em ensaios semelhantes a este. Além disso, nossos resultados também se ajustam aos dados do programa de validação do teste clássico de Hershberger pela OECD com ratos adultos castrados (Owens et al. , 2006; 2007).

A próstata dos animais tratados com TP e TP+tratamentos associados apresentaram padrão de marcação nuclear para o receptor de AR mais intenso no revestimento epitelial das glândulas em relação ao controle, indicando efeito do tratamento e resposta daquele tecido. Da mesma forma, os animais tratados com TP e TP+misturas apresentaram diferenças de proporção de epitélio e lumen da próstata em relação ao controle; além disso nossos resultados histológicos deste

mesmo órgão e também da vesícula seminal dos animais tratados com TP e TP+ misturas se correlacionam com as alterações de peso deste órgão.

A próstata e a vesícula seminal, estimuladas pelo TP apresentaram características de amadurecimento mais rápido em relação as dos animais controle, traduzidas histologicamente por ácinos grandes e com muita secreção; o tratamento com FLU inibiu os efeitos do TP, fato indicado pela redução de peso dos órgãos e pelos ácinos pequenos e com pouca secreção. No estudo de Tinwell et al. (2007) alterações histológicas e de peso dos órgãos dos grupos tratados com TP e TP + FLU também foram observadas no mesmo sentido das observadas neste estudo.

Da mesma forma, o epidídimo também se mostrou sensível à ação do TP, mas quando este tratamento foi associado à FLU, esta inibiu os efeitos androgênicos, assemelhando-se ao grupo controle (G1). Os grupos tratados com TP+misturas comportaram-se da mesma forma que o grupo tratado com TP, indicando que a mistura em ambos os níveis (“baixas doses” e “doses efetivas”) não exerceram efeitos sobre o epidídimo.

Por outro lado, os testículos de todos os animais tratados com TP e TP+tratamentos associados apresentaram-se reduzidos no final do experimento e atraso na maturação do epitélio germinativo, sem que esses tratamentos (TP, TP+FLU e TP+misturas”) diferissem entre si. Ao contrário dessas nossas observações, Yamasaki et al. (2000) e Tinwell et al. (2007) observaram, respectivamente, alterações dose-dependentes em animais tratados com 17-metiltestosterona ou com a mesma dose de TP utilizada neste estudo, mas associada a outros xenobióticos em altas doses. Esses efeitos nos testículos podem ser explicados pela exposição ao TP que leva à redução de LH circulante, que por sua vez reduz a produção de testosterona pelas células de Leydig, resultando em redução na concentração da testosterona intratesticular (Steinberger, 1971).

A idade em que os animais se encontravam no momento do sacrifício não favoreceu a análise histológica dos testículos, pois o epitélio germinativo ainda estava em fase de organização e maturação; nesta idade, a esfoliação do epitélio germinativo é normal e causa conseqüências diretas na altura do mesmo, bem como altera o diâmetro da luz tubular e, portanto, da área da luz.

Estudos como o de Ashby et al. (2004) revelam dados conflitantes acerca dos testículos, por exemplo, alta variabilidade de peso interanimal e da gravidade das lesões, sugerindo que o testículo não é um bom órgão para identificação de

substâncias desreguladoras endócrinas no teste de animais recém desmamados estimulados por TP (Tinwell et al., 2007). Da mesma forma, nossos resultados demonstraram resultados conflitantes em relação a morfometria deste órgão. A altura do epitélio germinativo dos testículos dos animais tratados com TP, TP+FLU e TP+Doses Baixas apresentou-se diminuída em relação ao grupo controle (G1), embora apenas os grupos tratados com TP e TP+FLU tenham apresentado a área da luz tubular diminuída em relação ao mesmo controle.

Dentre os componentes da mistura de nosso estudo, estão 3 poluentes orgânicos persistentes (POPs; dicofol, dieldrin e endosulfan), um organofosforado (diclorvos) e um piretróide (permetrina) que são considerados desreguladores endócrinos com efeitos variados como inibição de síntese de andrógenos, competição por receptores estrogênicos ou androgênicos, inibição de proliferação de células sensíveis ao estrógeno (Mnif et al., 2011), entre outros. Embora estes efeitos possam ocorrer individualmente ou em associação, nossos resultados apontam que a mistura desses agentes, nas concentrações utilizadas, não apresentaram ação de desregulação hormonal evidente.

Nossos dados sugerem que a mistura específica de praguicidas usada para a exposição a curto prazo de ratos recém desmamados e estimulados com TP não possui ação (anti)androgênica.

## 5. Referências (de acordo com a ABNT)

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Controlando agrotóxicos nos alimentos: O trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, a FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR e ITEP/PE. Relatório de atividades 2004. Brasília. ANVISA, 2005. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em 28/abr/2008.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Monitoramento de resíduos de agrotóxicos pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, BA, DF, ES, GO, MS, MG, PA, PR, PE, RJ, RS, SC, SP, SE, TO, e com os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED e LACEN/PR. Relatório de atividades de 2001-2007. Brasília. ANVISA, 2007. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em 04/jan/2012.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos Alimentos: trabalho desenvolvido pela anvisa, com as Vigilâncias sanitárias dos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Santa Catarina, Sergipe e Tocantins, e com os laboratórios Instituto Octávio Magalhães (IOM/FUNED/MG), laboratório Central do Paraná (LACEN/PR) e Eurofins (São Paulo/Sp). Relatório de atividades de 2009. Brasília. ANVISA, 2010. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em 04/jan/2012.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). Relatório de atividades de 2010. Brasília. ANVISA, 2011. Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acessado em 04/jan/2012.

Ashby J, Lefevre PA, Tinwell H, Odum J, Owensb W. Testosterone-stimulated weanlings as an alternative to castrated male rats in the Hershberger anti-androgen assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2004; 39:229–238.

Baker VA. Endocrine disrupters – testing strategies to assess human hazard. *Toxicology in vitro* 2001; 15:413-419.

Carvalho TL, Guimarães MA, Kempinas WG, Petenusci SO, Rosa e Silva AA. Effects of guanethidine-induced sympathectomy on the spermatogenic and

steroidogenic testicular functions of prepubertal to mature rats. *Andrologia*, 1996 Mar-Apr;28(2):117-22.

Clode AS. Assessment of in vivo assays for endocrine disruption. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20:35-43.

D'Amato C, Torres JPM, Malm O. DDT (dicloro-difenil-tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental – Uma Revisão. *Quím Nova* 2002; 25:995-1002.

Delgado IF, Barretto HHC, Kussumi TA, Alleluia IB, Baggio CA, Paumgarten FJR. Serum levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls among inhabitants of greater metropolitan Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Pública* 2002; 18:519-524.

EDSTA (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee). EPA/743/R-98/003: Final Report. Washington: USEPA; 1998.

EDSP/USEPA Endocrine Disruptor Screening Program. (United States Environmental Protection Agency). Weight-of-Evidence: Evaluating Results of EDSP Tier 1 Screening to Identify the Need for Tier 2 Testing. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention Washington DC 20460 September 14, 2011. p.1-47.

Gray LE, et al. Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing. Filling key data gaps. *Toxicology* 2002; 27:371-382.

Guillette Jr LJ, Cross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspec* 1994; 102:680-688.

Heley DV, Korach KS. Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. *Endocrinology* 2006; 147:25-32.

Marty MS, Crissman JW, Carney EW. Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17 $\beta$ -estradiol, steroid biosynthesis inhibitors, and a thyroid inhibitor. *Toxicol Sci* 1999; 52:269-277.

Maronpot RR.; Yoshizawa K.; Nyska A.; Harada T.; Flake G.; Mueller G.; Singh B.; Ward JM. Hepatic Enzyme Induction: Histopathology. *Toxicologic Pathology*, 38: 776-795, 2010.

Massaad C, et al. How can chemical compounds alter human fertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 100:127-137.

Metzdorff SB, et al. Dysgenesis and histological changes of genitals and perturbations of gene expression in male rats after in utero exposure to antiandrogen mixtures. *Toxicol Sci* 2007; 98:87-98.

Mnif W; Hassine AIH; Bouaziz A; Bartegi A; Thomas O; Roig B. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2011, 8, 2265-2303.

Nims, R. W., and Lubet, R. A. (1995). Induction of cytochrome P-450 in the Norway rat, *Rattus norvegicus*, following exposure to potential environmental contaminants. *J. Toxicol. Environ. Health* 46, 271–292.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guidance Document on the Assessment of Chemicals for Endocrine Disruption Version 9 (with changes to V8 accepted, 17 November 2010). Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/63/8/46436593.pdf>. Acesso em 12/dez/2011.

Owens, W., Gray, L. E., Jr, Zeiger, E., Walker, M., Yamasaki, K., Ashby, J., and Jacob, E. (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 2: Dose response studies. *Environ. Health Perspect.* 115, 671–678.

Owens, W., Zeiger, E., Walker, M., Ashby, J., Onyon, L., and Gray, L. E., Jr. (2006). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Environ. Health Perspect.* 114, 1259–1265.

Reeves PG et al. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr.* 1993 Nov;123(11):1939-51.

Rittler M, Castilla EE. Endocrine disruptors and congenital anomalies. *Cad Saúde Pública* 2002; 18:421-428.

Skakkebaek NE, Rajpert-DeMeyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reprod* 2001; 16:972-978.

Steinberger, E. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol. Rev.* 1971; 51, 1–22.

Tinwell H, Friry-Santini C, Rouquie D, Belluco S, Elies L, Pallen C, Bars R. Evaluation of the antiandrogenic effects of flutamide, DDE, and linuron in the weanling rat assay using organ weight, histopathological, and proteomic approaches. *Toxicol Sci* 2007; 100(1):54–65.

Toppari J, Haavisto AM, Alanen M. Changes in male reproductive health and effects of endocrine disruptors in Scandinavian countries. *Cad Saúde Pública* 2002; 18:413-420.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). EPA/630/R-96/012: Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Washington: USEPA; 1997.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). EPA/600/R-98/087: Research Plan for Endocrine Disruptors. Washington: USEPA; 1998.

Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory Investigation* 1963; 12:131-155.

Windham GC, Lee D, Mitchell P, Anderson M, Petreas M, Lasley B. Exposure to organochlorine compounds and effects on ovarian function. *Epidemiology* 2005; 16:182-190.

Yamasaki, K., Ashby, J., Lefevre, P. A., and Sawaki, M. (2000). Comparison of reproductive tissue weights in the enhanced Hershberger assay of 17 $\alpha$ -methyltestosterone between prepubertal and castrated rats. *J. Toxicol. Pathol.* 13, 173–178.

WHO/FAO.INCHEM. Data sheets on pesticides, Dicofol, n.81, p. 1-13, 1996. Disponível em [www.inchen.org/documents/](http://www.inchen.org/documents/) Acesso em 14 de janeiro de 2012.

WHO/FAO.INCHEM. Evaluation of some pesticides residues in food. Dieldrin. WHO/Food ADD/71.42, p.1-32, 1970. Disponível em: [www.inchen.org/documents/](http://www.inchen.org/documents/). Acesso em 14 de janeiro de 2012.

WHO/FAO.INCHEM. Data sheets on pesticides, Endosulfan, n. 92, p. 1-15, 1989. Disponível em [www.inchen.org/documents/](http://www.inchen.org/documents/) Acesso em 14 de janeiro de 2012.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD), Dichlorvos, 1993. Disponível em [www.epa.gov/iris](http://www.epa.gov/iris). Acesso em 14 de janeiro de 2012.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD), Permethrin, 1992. Disponível em [www.epa.gov/iris](http://www.epa.gov/iris). Acesso em 14 de janeiro de 2012.

*Anexos*





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



Fis. ....

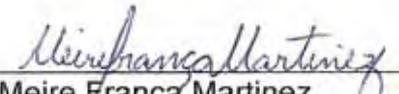
Proc. ....

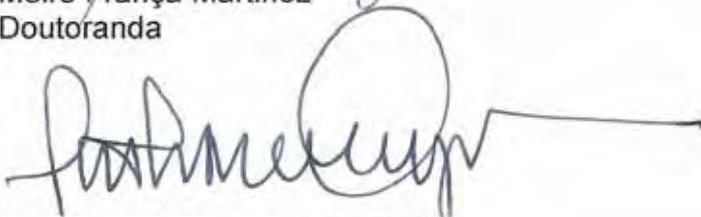
### JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa "Estudo da ação de mistura de praguicidas em baixas doses no sistema reprodutor de ratos Lewis machos", aprovado pelo CEP em 29/05/2008, teve seu título alterado para "Ação de mistura de praguicidas no sistema reprodutor de ratos Lewis machos", sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

*A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Tese de Doutorado.*

Botucatu, 30/01/2012

  
Meire França Martinez  
Doutoranda

  
João Lauro Viana de Camargo  
Orientador

16:23 30/01/2012 08:00:00 UTC - 25:10:34 25/01/2012 - 10:00:00

Programa de Pós Graduação em Patologia



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



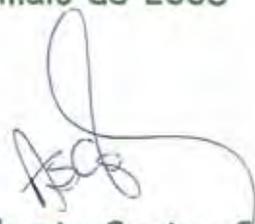
Comissão de Ética em Experimentação Animal

## CERTIFICADO

**CERTIFICAMOS** que o Protocolo n.º 670 sobre o projeto de pesquisa "Estudo ação de mistura de praguicidas em baixas doses no sistema reprodutor de ratos Lewis machos", a ser conduzido por Meire França Martinez, orientado pelo Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo, com a participação dos Professores associados: Deilson Elgui de Oliveira, Wilma de Grava Kempinas, Mary Rosa Rodrigues de Marchi, e dos Pós Doutorandos: Carla Adriene da Silva Franchi e Wellerson Rodrigo Scarano, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) com a ressalva que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de certificar a sanidade dos mesmos.

**Projeto de Pesquisa Aprovado em 29 de maio de 2008**

  
Profª Drª Regina Helena G. Martins  
Presidente da CEEA

  
Alberto Santos Capelluppi  
Secretário da CEEA