

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

Viviane Mattos Pascotto

**Avaliação do desenvolvimento reprodutivo de
ratas fêmeas expostas *in utero* e durante a
lactação a fungicidas (individuais ou misturados)**

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual
Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus
de Botucatu, para
obtenção do título de
Doutora em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo
Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Adriene da Silva Franchi

Botucatu
2015

Viviane Mattos Pascotto

Avaliação do desenvolvimento reprodutivo de
ratas fêmeas expostas *in utero* e durante a
lactação a fungicidas (individuais ou
misturados)

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual
Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus
de Botucatu, para
obtenção do título de
Doutora em Patologia

Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo
Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Adriene da Silva Franchi

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pascotto, Viviane Mattos.

Avaliação do desenvolvimento reprodutivo de ratas fêmeas expostas in utero e durante a lactação a fungicidas (individual ou misturado) / Viviane Mattos Pascotto. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: João Lauro Viana de Camargo

Coorientador: Carla Adriene da Silva Franchi

Capes: 40105008

1. Fungicidas. 2. Reprodução humana - Efeito dos produtos químicos. 3. Mistura (Química). 4. Lactentes - Desenvolvimento

Palavras-chave: Desenvolvimento; Exposição materna; Fungicidas; Mistura química; Reprodução.

Dedicatória

Aos meus pais Josefina e Valdir que nos momentos de minha ausência dedicados a essa tese, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir de constante dedicação no presente. Obrigada pelos momentos de plenitude e apoio familiar. Amo vocês!

À minha irmã Juliana, por sempre me ensinar a ser uma pessoa melhor, pelo apoio e incentivo. Obrigada por fazer parte da minha vida. Amo você!

Ao meu noivo Rodrigo, que incondicionalmente esteve ao meu lado, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta etapa. Te Amo!

À companheira de quatro patas, minha cachorrinha Cacau

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo, por abrir as portas do laboratório TOXICAM (Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental Sobre a Saúde Humana). Obrigada pelos ensinamentos e paciência durante meu processo de aprendizagem.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Carla Adriene da Silva Franchi, pela amizade, paciência e credibilidade, obrigada por tudo!

Agradecimentos

Agradeço a Deus por estar ao meu lado em todos os momentos e por ter me dado condições de lutar e alcançar os objetivos pretendidos.

A toda minha família, a qual amo muito, que de muitas formas me incentivaram para a concretização deste trabalho. Principalmente ao meu avô Vicente e minha madrinha Jenny. Vocês são exemplos de vida!

As minhas queridas avós Joana (*in memorian*) e Maria (*in memorian*). Que apesar de não estarem fisicamente ao meu lado para acompanhar a conclusão desse trabalho sei que onde estiverem estarão torcendo para que tudo corra bem. Minha eterna saudade

Aos meus sogros, Manoel e Mariza, que sempre me acolheram como filha, obrigada pelo apoio e incentivo.

À Universidade Estadual Paulista, pela estrutura e oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo suporte financeiro que permitiu a realização do projeto. Processo nº 2011/09870-2.

À Coordenadora e Vice-coordenadora do Curso de Pós Graduação em Patologia, Dra Denise e Dra Márcia, pela amizade e apoio em momentos cruciais.

À Cristina por todos os favores gentilmente prestados e pela amizade.

Ao Paulo, pelo apoio no preparo do material para análise histológica e pela amizade.

Ao Paulo César (PC), por cuidar dos animais e por todo auxílio durante o período no biotério.

Aos funcionários do Laboratório de Imunoistoquímica especialmente ao Marcos Franchi, pela ajuda na marcação da imunoistoquímica.

À Dra. Janete e ao Dr. Ruither, pelas dosagens hormonais.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Patologia, pela agradável convivência e apoio durante esse período.

À Vânia e aos funcionários da Seção de Pós-graduação, pela disponibilidade, atenção e pelos auxílios prestados.

Aos colegas e amigos do TOXICAM: Caio, Gabrielli, Iza, Lígia, Merielen, Nathalia, Osvaldo, Rafaela e Thania. Sinto que nós percorremos este caminho juntos, nos complementando e nos fortalecendo. Obrigada pela rica troca e cumplicidade.

Agradeço de forma especial à Ana Paula, amiga fiel que sempre esteve ao meu lado me apoiando nos bons e maus momentos. Você foi simplesmente essencial.

Ao grupo do Laboratório de Endocrinologia e Tumores Hormonodependentes da Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina - pela agradável convivência, pelo incentivo e apoio durante a realização do meu estágio.

À amiga Luciana, por torcer pelo meu sucesso e por me oferecer sempre um abraço carinhoso nos nossos reencontros. O tempo confirma e reafirma a amizade.

Aos amigos de São Manuel: Juliana, Giovane, Tony, Cíntia, Amanda, Anderson (Nino), Rafael, Jordana, Cristiano (Mou), Carol, Marco, Éllen, Adrielli, Davi, Duda e Nathália. Obrigada pela torcida, apoio e pelos momentos de descontração!

A todos os amigos e colegas de ontem, hoje e sempre, que ficarão guardados do lado esquerdo do peito: Ana Paula (Buzuza), Marina (Perdiz), Nathalia Almeida, Carol Vaccari, Marize, Bianca, Shadia, entre outros impossíveis de listar aqui.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

Sumário

Capítulo I	1
Revisão da Literatura	2
1.Desreguladores endócrinos	2
2.O uso do rato em pesquisa reprodutiva toxicológica	6
2.1. Puberdade	6
2.2. Ciclo estral	6
2.3.Gestação	7
3.Modelos experimentais para avaliação de agentes tóxicos sobre o sistema reprodutor feminino	8
4.Praguicidas	9
4.1. Praguicidas utilizados neste estudo e exposição da população pelos alimentos	11
Referências	15
Capítulo II	25
ABSTRACT	27
INTRODUCTION	29
MATERIAL AND METHODS	32
Chemicals	32
Animal husbandry	32
Treatment regimen	33
Analysis of the female offspring	35
<i>Body weights and anogenital distance (AGD) at PND 2</i>	35
<i>External signs of puberty onset</i>	35
<i>Estrus cyclicity</i>	35
<i>Necropsy and sample collection</i>	35
<i>Serum hormone radioimmunoassay</i>	36
<i>Histological and histomorphometric analyses of uterus</i>	37
<i>Ovarian Follicles and Corpora Lutea Counts</i>	37
Statistical analysis	39
RESULTS	39
Feed intake of dams and female F1	39
Pregnancy and litter data	39

Body weights and anogenital distance (AGD) at PND 2	40
Vaginal opening	40
Body and organs weights of female F1	40
Hormone serum levels	40
Histopathology and histomorphometric analyses	41
DISCUSSION	41
CONCLUSIONS	46
ACKNOWLEDGMENTS	46
CONFLICT OF INTERESTS	47
REFERENCES	48
Anexos	65

Lista de figuras e tabelas do manuscrito

Figure 1. Experimental design	57
Figure 2. Age at Vaginal Opening (VO).....	58
Figure 3. Serum levels of FSH, LH, Progesterone (P4), Testosterone and Estradiol (E2) in female Sprague-Dawley rats.....	59
Table 1. Mean amount of feed (g/rat/day) consumed by dams during gestation and lactation.	61
Table 2. Mean doses (mg/kg/day) of conazoles ingested by dams during gestation and lactation.....	62
Table 3. Body weights and anogenital distance (AGD) evaluated at the PND 2 in female controls and treated offsprings.....	63
Table 4. Final body weights (BWf) and relative weights¹ of liver, ovaries and uterus	63
Table 5. Ovarian follicles, corpora lutea counting per unit area (number/mm²) and thickness of uterine endometrium (µm) in female rats from control and treated groups.....	64

Capítulo I

Revisão da Literatura

1. Desreguladores endócrinos

O sistema endócrino é um dos principais sistemas de controle homeostático do organismo e mantém as funções normais e de desenvolvimento em face às constantes mudanças de ambiente. Trabalhando em conjunto com o sistema nervoso, que, sobretudo é responsável por respostas rápidas e imediatas, as cerca de 30 diferentes glândulas que compõem o sistema endócrino tendem a agir de forma lenta e sustentada para regularem diversos processos fisiológicos, entre eles o ciclo reprodutivo feminino (Marty et al., 2011).

Ao longo das últimas décadas, as evidências de que um grande número de produtos químicos existentes no ambiente, naturais ou produzidos pelo homem, poderia alterar a função normal do sistema endócrino, provocaram o interesse da comunidade científica e uma preocupação crescente da população em geral (Colborn et al., 1993; Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

A Agência de Proteção Ambiental norte americana define como desregulador endócrino (DE) “um agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do corpo, que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e comportamento” (U.S. EPA, 1997). O grupo de substâncias identificado como DE é altamente heterogêneo e inclui agentes antropogênicos como produtos e subprodutos industriais, praguicidas agrícolas, metais pesados, fármacos, e, na natureza, fitoestrogênios, como genisteína e metaresinol (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). A exposição humana aos DEs ocorre principalmente por via oral quando ingeridos com alimentos ou bebidas contaminadas, mas também por via inalatória e, ocasionalmente, por via cutânea (Wuttke et al., 2010).

O ser humano está sujeito à ação dos DEs durante toda a vida, mas o período de exposição será o principal fator determinante de seus efeitos. Existem períodos com maior suscetibilidade, denominados de “janelas de exposição”, principalmente o período pré-natal, que reforçam a tese da programação intra-uterina para doenças da vida adulta, ou Hipótese de Barker, que propõe que o risco para desenvolver doenças é função não apenas da carga genética ou dos hábitos de vida do adulto, como também da atuação de fatores ambientais em períodos críticos do desenvolvimento (Barker, 2004; Fontenele et al., 2010; Schug et al., 2011).

A maior suscetibilidade de embriões, fetos e bebês pode ser explicada pelo amadurecimento incompleto dos mecanismos de proteção presentes em adultos, como o sistema de reparo do DNA e enzimas detoxificantes eficientes, que permitem o fígado e outros tecidos habilitados depurar compostos químicos do sangue, e, particularmente, pelo fato de a barreira hematoencefálica não ser completamente funcional em fetos e em recém-nascidos (Newbold et al., 2007).

A capacidade dos DEs alterarem a função reprodutiva feminina foi claramente demonstrada pelas consequências fetais do uso do potente estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES) por mulheres grávidas entre os anos de 1948 a 1970. Este fármaco era prescrito para evitar abortos e promover o crescimento fetal. Mais tarde, descobriu-se que, quando atingiam a puberdade, as crianças nascidas de mulheres que fizeram uso desse medicamento, apresentavam disfunção no sistema reprodutivo, alta taxa de gravidez anormal, redução na fertilidade, desordem do sistema imunológico e, com frequência, câncer vaginal (Colborn et al., 1993; Birkett & Lester, 2003). Essas observações indicaram que substâncias estrogênicas como o DES podem provocar efeitos tardios no sistema reprodutivo em humanos expostos *in utero* (U. S.

EPA, 1997).

No sistema endócrino, as alterações ocorrem quando o DE interage com receptores celulares, amplificando ou modificando sua resposta aos hormônios naturais. Assim, dois processos distintos podem ser desencadeados: a ligação com o receptor pode produzir uma resposta que imita a ação de determinado hormônio, e assim atua como agonista ou, se nenhuma resposta for produzida, a substância estará impedindo a interação entre o hormônio natural e seu respectivo receptor, agindo como um bloqueador ou antagonista (Birkett & Lester, 2003; Lintelmann et al., 2003). Por exemplo, alguns DEs competem com o estradiol pelos receptores de estrógeno (RE); outros competem com a dihidrotestosterona (DHT) e testosterona (TT) pelos receptores de andrógenos (RA). Portanto, essas substâncias podem exercer efeitos de feminização (ação estrogênica) ou de masculinização (ação androgênica) do organismo alvo (Ankley et al., 1998; Birkett & Lester, 2003). Outros possíveis modos de ação dos DEs incluem interferência na síntese, armazenamento, liberação e transporte dos hormônios tireoidianos ou do sistema nervoso central (Bretveld et al., 2006).

O desenvolvimento e as funções do sistema reprodutivo feminino dependem do equilíbrio e das concentrações dos hormônios; assim, uma disfunção no sistema endócrino pode resultar em anomalias como irregularidades no ciclo menstrual, prejuízos na fertilidade, endometriose e ovários policísticos (Nicolopoulou-Stamati & Pitsos, 2001).

O desenvolvimento apropriado dos folículos ovarianos no feto é dependente de exposição de estrogênio durante períodos críticos de desenvolvimento. Por exemplo, camundongos tratados com DES nos dias pós-natal (DPN) 1-5 desenvolveram folículos multiovocitários, tal como encontrados em adultos (Kipp et al., 2007). Portanto, a manutenção do equilíbrio entre hormônios locais e sistêmicos é

necessária para o desenvolvimento folicular normal e qualidade de células germinativas, evitando disfunções ovarianas e declínio das taxas de concepção em populações humanas (Crain et al., 2008; Braw-Tal, 2010). Embora não sejam completamente compreendidos os mecanismos pelos quais DEs alteram o desenvolvimento do folículo, existem evidências de que a exposição a agentes químicos DEs estão contribuindo para o aumento na incidência da síndrome do ovário policístico, falência ovariana (Knochenhauer et al., 1998; Yildiz et al., 2008) e ciclicidade e fecundidade alteradas (Markey et al., 2003; Bonassi et al., 2004; Jefferson et al., 2005; Munoz-de-Toro et al., 2005; Rubin et al., 2006). Por exemplo, a exposição pré-natal ao bisfenol A causa ciclos irregulares em camundongos, que provavelmente resultam de alterações do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal induzidas por aquele agente químico (Rubin et al., 2001; Markey et al., 2003). Farr et al. (2004) analisaram a associação da exposição a pesticidas e ciclicidade alterada em mulheres expostas a essas substâncias. Irregularidades no ciclo têm sido observadas em mulheres expostas ao DES no útero (Titus-Ernstoff et al., 2008).

Em resumo, evidências em animais e humanos mostram que os DEs podem alterar o desenvolvimento reprodutivo feminino. Dados experimentais mostram que a exposição aos DEs durante períodos críticos de desenvolvimento, tanto pré-natal como neonatal, pode induzir mudanças funcionais que aparecem mais tarde na vida daquele organismo. Existem lacunas para compreender os mecanismos pelos quais os DEs agem, mas é claro que, para reduzir o risco de distúrbios reprodutivos, temos que conhecer o verdadeiro potencial destas substâncias, desta forma gerar maior quantidade de dados toxicológicos possíveis para diminuir o risco dos danos causados.

2. O uso do rato em pesquisa reprodutiva toxicológica

O uso de ratos na pesquisa toxicológica deve-se ao fato de ser um mamífero de pequeno tamanho e fácil manipulação, por suportar diferentes rotas de administração de substâncias testes (ração, aplicações [intravenosas, subcutâneas e peritoneais] e gavagem) e ainda pela sua prolificidade ao longo de toda vida – fato que propicia não somente facilidade na obtenção destes animais, mas também para avaliação de compostos químicos sobre o desempenho reprodutivo (Mutai, 2000).

Em estudos sobre a fisiologia reprodutiva, o rato ainda é um animal muito utilizado, pois apresenta ciclos reprodutivos curtos e estágios definidos, como puberdade, ciclo estral, além de duração da gestação e lactação menores quando comparado a outros animais utilizados em pesquisa (Mutai, 2000; Ojeda & Skinner, 2006).

2.1. Puberdade

Na puberdade, o padrão de secreção de GnRH (hormônio liberador da gonadotrofina) passa de tônico para pulsátil, resultando na liberação de LH (hormônio luteinizante) após a quarta semana pós-natal (aproximadamente aos 30 dias de idade), o que leva à maturação do ovário (Andrews & Ojeda, 1981). A puberdade em fêmeas é associada à abertura da vagina; o primeiro proestro ocorre normalmente 33 a 42 dias após o nascimento e o ciclo estral regular tem início aproximadamente uma semana após a abertura vaginal (Andersen et al., 2004).

2.2. Ciclo estral

O ciclo reprodutivo de ratos fêmea é chamado ciclo estral e tem duração média de quatro ou cinco dias. É caracterizado por quatro fases, proestro, estro, metaestro e diestro, as quais podem ser determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal.

O proestro se caracteriza pela predominância de células epiteliais nucleadas; o estro é indicado pela presença de células epiteliais queratinizadas abundantes; o metaestro apresenta proporções equivalentes de leucócitos, células epiteliais nucleadas e queratinizadas, enquanto o diestro é caracterizado pela predominância de leucócitos (Long & Evans, 1922; Mandl, 1951; Freeman, 1988).

O proestro dura de 12 a 14 horas, associado à maturação de um ou mais folículos e precede o estro (25 a 27 horas), único período em que a fêmea é receptiva ao macho. Se não há concepção, após o estro há um período de recuperação denominado metaestro, cuja duração é de 24 a 48 horas, seguido pelo diestro, que dura cerca de 24 horas, quando a secreção de hormônios ovarianos é reiniciada para o próximo ciclo (Aires, 1999).

Durante o ciclo, o LH e o hormônio folículo estimulante (FSH) permanecem baixos, aumentando no proestro. Os níveis de estradiol começam a aumentar no metaestro, alcançando níveis extremos durante o proestro e retornando à linha de base no estro. A secreção de progesterona aumenta também durante o metaestro e diestro, com diminuição mais tardia. Então, o valor da progesterona eleva-se para alcançar seu segundo pico no fim do proestro (Smith et al., 1975; Sportnitz et al., 1999). Em razão da curta duração do ciclo estral, ratas constituem bom modelo para o estudo das alterações que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (Marcondes et al., 2002).

2.3.Gestação

A gestação do rato dura aproximadamente de 20 a 23 dias, podendo ser dividida em três períodos: o período de pré-implantação, que abrange do 1º ao 5º dia gestacional (DG1 a DG5), corresponde à implantação e desenvolvimento inicial do embrião, o período organogênico, em que os órgãos são formados,

compreendido entre os DG6 e DG15, e o período fetal, do DG 16 ao DG21, no qual o feto, já com os órgãos desenvolvidos, inicia seu crescimento intra-uterino, com crescimento ponderal e funcional dos órgãos. O desmame dos filhotes acontece aproximadamente no 21º dias pós natal (DP21) (Andersen et al., 2004), com diminuição da síntese da prolactina nas mães e substituição da sucção mamária pela alimentação sólida dos filhotes.

3. Modelos experimentais para avaliação de agentes tóxicos sobre o sistema reprodutor feminino

Para esclarecer, desenvolver estratégias e solucionar problemas relacionados à exposição a substâncias químicas presentes no meio ambiente, agências governamentais como as norte-americanas Agência de Proteção Ambiental (U.S.EPA) e Administração de Alimentos e Fármacos (U.S.FDA), e transnacionais, como a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), desenvolveram ações para identificar agentes químicos que têm potencial de desregulação endócrina (Marty et al., 2011). Dentre essas ações está o “*Endocrine Disruptor Screening Program*” (EDSP), programa constituído de duas etapas, elaborado pela U.S.EPA com o objetivo de identificar substâncias químicas que têm potencial de desregulação hormonal. A primeira etapa (*Tier I*) consiste de uma bateria de 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 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) (EDSP, 2011). Se os resultados desses ensaios iniciais sugerirem que a substância tem potencial de interferência hormonal, deverão ser desenvolvidos outros testes *in*

vivo. Essa segunda bateria de testes (*Tier II*) é mais abrangente, envolvendo mamíferos, aves, anfíbios, peixes e invertebrados. Ela objetiva estabelecer relações de dose-resposta em um contexto de maior toxicidade, além de identificar potenciais adversidades relacionadas à reprodução e desenvolvimento, tanto do sistema endócrino quanto de sistemas não endócrinos (por exemplo: neurológicos, hepáticos, imunológicos e renais) (EDSP, 2011).

Outros parâmetros também são utilizados, como a avaliação da distância anogenital (DAG) - proposta em *guidelines* da U.S.EPA e OECD –, uma vez que este *endpoint* é sensível a efeitos hormonais induzidos quimicamente (Gallavan et al., 1999), avaliação da duração do ciclo estral, peso e histologia de órgãos determinados (Regan et al., 2005). Um órgão alvo importante em ensaios harmonizados adotados pela U.S.EPA, U.S.FDA e OECD para identificação dos DEs em roedores é o ovário, onde esses agentes podem agir sobre folículos maduros e imaturos, levando à infertilidade temporária ou permanente; por isso, a quantificação de folículos ovarianos e corpos lúteos é recomendada como uma das formas de avaliação estrutura e funcional desse órgão (U.S.EPA, 2007; FDA, 2000; OECD, 2002).

4. Praguicidas

Define-se como praguicida qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenir, destruir, repelir ou conter pragas. Eles podem ser classificados segundo seu espectro de ação como inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, nematocidas e bactericidas, ou segundo sua estrutura química, ex., organoclorados, piretróides, organofosforados, carbamatos, ácidos, uréias, amidas, triazinas, uracilas e azóis (OPAS/OMS, 1996; U.S.EPA, 2007).

As capacidades atuais, principalmente dos países desenvolvidos, de produzir e colher grandes quantidades de alimentos em áreas

relativamente pequenas e com participação reduzida de trabalho humano, têm sido possíveis especialmente com o uso de praguicidas. Assim como em todo mundo, as classes mais utilizadas no Brasil são as dos inseticidas, herbicidas e fungicidas. Em conjunto, essas três categorias representam bilhões de quilogramas de praguicidas usados anualmente, principalmente na agricultura (Jardim & Andrade, 2009).

Uma vez que vários praguicidas são aplicados individualmente ou combinados nas culturas, seus resíduos podem ser encontrados em alimentos e água potável (Laetz et al., 2009). Assim, a exposição a vários resíduos de pesticidas pode ocorrer simultaneamente através de múltiplos veículos (por exemplo, alimentos, água potável, em ambientes domiciliar e ocupacional) e vias de absorção (oral, inalatória, cutânea) (Hernández et al., 2013). Os efeitos resultantes da exposição combinada nos sistemas endócrino, reprodutivo e imunológico não são completamente compreendidos, mas do ponto de vista toxicológico, podem apresentar interações, resultando em efeito tóxico menor ou maior do que seria esperado para compostos individuais (Wade et al., 2002; Larsen et al., 2003). Assim, o estudo de misturas químicas é uma área relevante de pesquisa devido à sua contribuição potencial à avaliação do risco das populações humanas que são expostas a múltiplos contaminantes químicos ambientais.

A disponibilidade de modelos animais validados para ensaios de toxicidade, adicionados de técnicas sensíveis para sua avaliação, permite o estudo e a caracterização dos efeitos potenciais das misturas químicas sobre determinados órgãos-alvo, tal como é necessário na área de avaliação do impacto dos contaminantes ambientais sobre a saúde humana (Suk et al., 2002).

4.1. Praguicidas utilizados neste estudo e exposição da população pelos alimentos

Com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de praguicidas nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor, foi iniciado em 2001 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Nesse programa, os resíduos encontrados em cada produto foram considerados em relação às normas técnicas daquela Agência sobre quais produtos estavam autorizados para cada cultura, e quais os seus limites máximos aceitos em cada tipo de produto (Limite Máximo de Resíduos, LMR). Em 2009, o PARA monitorou 20 alimentos (abacaxi, alface, arroz, banana, batata, cebola, cenoura, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pimentão, repolho, tomate, uva, couve, beterraba e pepino); das 3.130 amostras analisadas, 907 (29,0%) foram consideradas insatisfatórias. As principais irregularidades encontradas foram a presença de praguicidas em níveis acima do LMR em 88 amostras (2,8%), utilização de pesticidas não-autorizados (NA) para aquela cultura em 744 amostras, representando 23,8% do total, e resíduos acima do LMR e NA na mesma amostra em 75 (2,4%) das amostras. Entre outros praguicidas que se apresentaram irregulares, resíduos de fungicidas não-autorizados foram encontrados em alguns tipos de culturas como o procloraz nas culturas de alface, arroz, couve, pepino e uva e o propiconazol em cultura de morango (ANVISA, 2009).

Neste contexto, o objetivo de nosso trabalho foi avaliar possíveis efeitos em fêmeas expostas *in utero* e durante a lactação aos fungicidas procloraz e propiconazol (individual ou misturados) a fim de melhorar o entendimento dos efeitos dessas substâncias sobre o desenvolvimento do sistema reprodutivo feminino. As doses selecionadas e incorporadas à ração nos estudos foram baseadas

em dados de toxicologia reprodutiva do procloraz (U.S.EPA, 1989) ou propiconazol (U.S.EPA, 1988).

No presente estudo foram utilizados os fungicidas procloraz (Figura 1) e propiconazol (Figura 2), pertencentes à classe dos azóis. Os azóis são antifúngicos amplamente usados na agricultura e na terapia antimicótica humana e veterinária (Zarn et al., 2003). Mais de 20 diferentes compostos ativos estão no mercado para uso médico contra micoses superficiais e profundas, por vias oral, tópica, vaginal ou sistêmica (Jeu et al., 2003; Kale & Johnson, 2005; King et al., 1998). Cerca de 40 diferentes fungicidas azóis são vendidos em todo o mundo contra o oídio e a “ferrugem”, doenças fúngicas que comprometem vários milhares de toneladas por ano de produtos de culturas de cereais, frutas, hortaliças e plantas ornamentais (Giavini & Menegola, 2010). De acordo com sua estrutura química, os azóis são classificados como triazóis (ex., propiconazol) ou imidazóis (ex., procloraz). Independente da estrutura química, todos os azóis possuem atividade antifúngica pelo mesmo mecanismo de ação, que se faz por bloqueio da lanosterol 14 α -demetilase (CYP51), enzima responsável pela síntese do ergosterol, um componente essencial da membrana de fungos e leveduras. Em mamíferos, o ergosterol é expresso em diferentes tecidos (Raucy et al., 1991), sendo a CYP 51 responsável por parte da via que leva à biossíntese de colesterol, um esterol primário da membrana das células de mamíferos, necessário para a formação dos hormônios sexuais (Payne & Hales, 2004).

Outra enzima alvo dos azóis é a aromatase (CYP19), expressa principalmente no cérebro e gônadas, mas também encontrada na placenta e nos tecidos adiposo e ósseo (Conley & Hinshelwood, 2001). A aromatase cataliza as etapas finais da biossíntese de estrógenos, convertendo androstenediona em estrona (E1), e testosterona em estradiol (E2). Dessa forma, distúrbios na expressão da aromatase e/ou alterações na sua atividade catalítica exercem

efeitos negativos, como hipoestrogenismo, virilização, puberdade precoce e ou câncer mama em mulheres e ginecomastia em homens (Zarn et al., 2003).

Além da CYP19, as CYPs-1A1, 17A1, HSD17B, entre outras, responsáveis pela síntese e metabolismo dos hormônios esteróides sexuais ovarianos, também podem ter expressão e atividade catalíticas alteradas por agentes químicos (Craig et al., 2011).

Dessa forma, os azóis podem potencialmente produzir efeitos endócrinos e aumentar o risco de efeitos adversos durante a gravidez (Narotsky & Kavlock, 1995; Gray et al., 1999; Menegola et al., 2005).

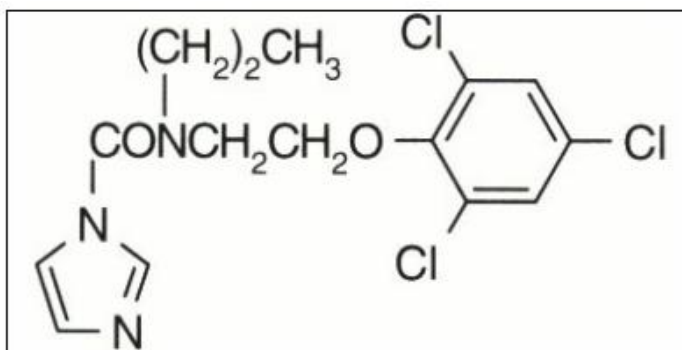


Figura 1. Estrutura química do fungicida procloraz (CAS N° 67747-09-5)

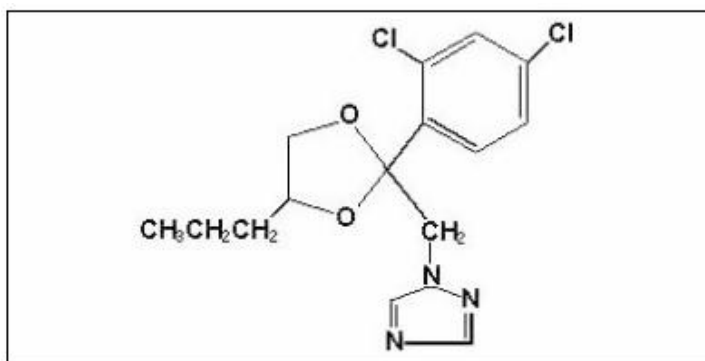


Figura 2. Estrutura química do fungicida propiconazol (CAS N° 60207-90-1)

Com este estudo pretendemos contribuir para a discussão dos efeitos potenciais sobre o sistema reprodutivo por fungicidas agrícolas detectados pela ANVISA em alimentos frescos disponíveis para a população brasileira.

Referências

1. Aires MM. Fisiologia. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1999.
2. Ankley GT, Mihaich E, Stahl R, Tillitt D, Colborn T, McMaster S, et al. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. Environ Toxicol Chem. 1998; 17:68-87.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos alimentos. Relatório de atividades 2009 [Internet]. Brasília, DF; 2010 [acesso 10 abr 2011]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>
4. Andersen ML. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: Cromoste; 2004. p. 89-104.
5. Andrews WW, Ojeda SR. A detailed analysis of the serum luteinizing hormone secretory profile in conscious, free moving female rats during the time of puberty. Endocrinology. 1981; 190(6):2031-9.
6. Barker DJ. The developmental origins of adult disease. J Am Coll Nutr. 2004; 23(6):588-95.
7. Birkett JW, Lester JN. Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes. Boca Raton: CRC Press; 2003.
8. Bonassi S, Znaor A, Norppa H, Hagmar L. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. Cytogenet Genome Res. 2004; 104:376-82.

9. Braw-Tal R. Endocrine disruptors and timing of human exposure. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2010; 8:41-6.
10. Bretveld RW, Thomas CMG, Scheepers PTJ, Zielhuis AG, Roeleveld N. Pesticides exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reprod Biol Endocrinol.* 2006; 4:30.
11. Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect.* 1993; 101(5):378-84.
12. Conley A, Hinshelwood M. Mammalian aromatases. *Reproduction.* 2001; 121(5):685-95.
13. Craig ZR, Wang W, Flaws JA. Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction.* 2011; 142(5):633-46.
14. Crain DA, Janssen SJ, Edwards TM, Heindel J, Ho SM, Hunt P, et al. Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril.* 2008; 90:911-40.
15. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser Russ, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev.* 2009; 30(4):293-342.
16. 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. Washington, DC: Office of Chemical Safety and Pollution Prevention; 2011. p. 1-47.

17. Farr SL, Cooper GS, Cai J, Savitz DA, Sandler DP. Pesticide use and menstrual cycle characteristics among premenopausal women in the Agricultural Health Study. *Am J Epidemiol.* 2004; 160:1194-1204.
18. Fontenele EGP, Martins MRA, Quidute ARP, Montenegro Jr RM. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010; 54(1):6-16.
19. Food and Drug Administration. Redbook 2000. Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. Guidelines for Reproductive Studies. Wasngton, DC; 2000 [access 2010 Out 5]. Available from: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/Redbook/ucm078396.htm>
20. Freeman ME. The ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, Neil J, editors. *Physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1988. p. 1893-928.
21. Gallavan Jr RH, Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod Toxicol.* 1999; 13:383-90.
22. Giavini E, Menegola E. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? *Toxicol Letter.* 2010; 198:106-11.
23. Gray Jr LE, Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, et al. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, pp- DDE, and Ketoconazole) and

- toxic substances (dibutyl-and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol Ind Health*. 1999; 15:94-118.
24. Hernández AF, Parrón T, Tsatsakis AM, Requena M, Alarcón R, López-Guarnido O. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicology*. 2013; 307:136-45.
25. Jardim ICSF, Andrade JA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global-um enfoque as maçãs. *Quím Nova*. 2009; 32(4):996-1012.
26. Jefferson WN, Padilla-Banks E, Newbold RR. Adverse effects on female development and reproduction in CD-1 mice following neonatal exposure to the phytoestrogen genistein at environmentally relevant doses. *Biol Reprod*. 2005; 73:798-806.
27. Jeu L, Piacenti FJ, Lyaakhoteskij AG, Fung HB. Voriconazole. *Clin Ther*. 2003; 25:1321-81.
28. Kale P, Johnson LB. Second generation azole antifungal agents. *Drugs Today*. 2005; 41:91-105.
29. King CT, Rogers PD, Cleary JD, Champman SW. Antifungal therapy during pregnancy. *Clin Inf Dis*. 1998; 27:1151-60.
30. Kipp JL, Kilen SM, Bristol-Gould S, Woodruff TK, Mayo KE. Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2007; 148:1968-76.

31. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 3078-82.
32. Laetz CA, Baldwin DH, Collier TK, Hebert V, Stark JD, Scholz NL. The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon. *Environ Health Perspect.* 2009; 117:348-53.
33. Larsen JC, Binderup ML, Dalgaard M, Dragsted LO, Hossaini A, Ladefoged O, et al. Combined actions and interactions of chemicals in mixtures. The toxicological effects of exposure to mixtures of industrial and environmental chemicals. In: Larsen JC, editor. Danish veterinary and food administration. Soborg; 2003. Fodevare Rapport 12.
34. Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A. Endocrine disrupting chemicals in the environment. *Pure Appl Chem.* 2003; 75(5):631-81.
35. Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem Univ Calif.* 1922; 6:1-148.
36. Mandl AM. The phases of the estrous cycle in the adult white rat. *J Exp Biol.* 1951; 28: 576-84.
37. Marcondes FK, Bianchi FB, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002; 62:609-14.

38. Markey CM, Coombs MA, Sonnenschein C, Soto AM. Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol Dev.* 2003; 5:67-75.
39. Marty MS, Carney EW, Rowlands J. Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol Sci.* 2011; 120:93-108.
40. Menegola E, Broccia ML, Di Renzo F, Massa V, Giavini E. Study on the common teratogenic pathway elicited by the fungicides triazole-derivates. *Toxicol In Vitro.* 2005; 19:737-48.
41. Munoz-de-Toro M, Markey CM, Wadia PR, Luque EH, Rubin BS, Sonnenschein C, et al. Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology.* 2005; 146:4138-47.
42. Mutai M. National and international guidelines for the conduct of chemical safety studies: choice of strains. In: Krinke GJ, editor. *The laboratory rat - the handbook of experimental animals.* San Diego: Academic Press; 2000. p. 17-8.
43. Narotsky MG, Kavlock RJ. A multidisciplinary approach to toxicological screening. II. Developmental toxicity. *J Toxicol Environ Health.* 1995; 45:145-71.
44. Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Phillips TM, Jefferson WN. Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Reprod Toxicol.* 2007; 23(3):290-6.

45. Nicolopoulou-Stamati P, Pitsos MA. The impact of endocrine disrupters on the female reproductive system. Hum Reprod Update. 2001; 7(3):323-30.
46. Ojeda SR, Skinner MK. Puberty in the rat. In: Knobil E, Neil JD, editores. The physiology of reproduction. New York: Elsevier; 2006. p. 2061-126.
47. OPAS. OMS. Manual de vigilância de saúde de populações expostas a agrotóxicos [Internet]. Brasília; 1996 [acesso 4 Nov 2010]. Disponível em: <http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/livro2.pdf>.
48. Organization 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) [access 2014 Out 20]. Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/seriesontestingandassessmenttestingforendocrinedisrupters.htm>
49. Payne AH, Hales DB. Overview of estrogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. Endocr Rev. 2004; 25:947-70.
50. Raucy JL, Carpenter SJ, Trzaskos JM. Identification of lanosterol 14 alpha-methyl demethylase in human tissues. Biochem Biophys Res Commun. 1991; 177:497-503.
51. Regan KS, Cline JM, Creasy D, Davis B, Foley GL, Lanning L, et al. Ovary Evaluation Working Group. STP Position Paper: ovarian follicular counting in the assessment of rodent reproductive toxicity. Toxicol Pathol. 2005; 33(3):409-12.

52. Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology*. 2006; 147:3681-91.
53. Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect*. 2001; 109:675-80.
54. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011; 127(3-5):204-15.
55. Smith MS, Freman ME, Neil JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*. 1975; 96:219-26.
56. Spornitz UM, Socin CD, David AA. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *Anat Rec*. 1999; 254:116-26.
57. Suk WA, Olden K, Yang RSH. Chemical mixtures research: significance and future perspectives. *Environ Health Perspect*. 2002; 110(6):891-2.
58. Titus-Ernstoff L, Troisi R, Hatch EE, Hyer M, Wise LA, Palmer JR, et al. Offspring of women exposed in utero to diethylstilbestrol (DES): a

- preliminary report of benign and malignant pathology in the third generation. *Epidemiology*. 2008; 19:251-7.
59. United States Environmental Protection Agency. Validation of screening and testing assays proposed for the EDSP. Washington, DC: US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances; 2007.
60. United States Environmental Protection Agency. Special Report on Environmental Endocrine Disruption: an effects assessment and analysis. Washington, DC: U. S. Environmental Protection Agency; 1997. Report No. EPA/630/R-96/012.
61. United States Environmental Protection Agency. Prochloraz (CASRN 67747-09-5) [Internet] 1989 [access 2010 Nov 4]. Disponível em: <http://www.epa.gov/iris/subst/0378.htm>.
62. United States Environmental Protection Agency. Propiconazole (CASRN 60207-90-1) [Internet] 1988 [access 2010 Nov 4]. Disponível em: <http://www.epa.gov/iris/subst/0282.htm>
63. Zarn AJ, Brüschweiler BJ, Schlatter JR. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase. *Environ Health Perspect*. 2003; 111(3):255-62.
64. Wade MG, Foster WG, Younglai EV, McMahon A, Leingartner K, Yagminas A, et al. Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. *Toxicol Sci*. 2002; 67(1):131-43.

65. Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones*. 2010; 9(1):9-15.
66. Yildiz BO, Knochelhauer ES, Azziz R. Impact of obesity on the risk for polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93:162-8.

Capítulo II

**REPRODUCTIVE DEVELOPMENT OF FEMALE RATS EXPOSED
TO SINGLE OR MIXED FUNGICIDES *IN UTERO* AND DURING
LACTATION**

**Viviane M. Pascotto^a, Carla A. S. Franchi^a, João Lauro V. de
Camargo^a**

^a UNESP- São Paulo State University, Botucatu Medical School, Department of Pathology, Center for the Evaluation of the Environmental Impact on Humans Health (TOXICAM), Botucatu, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Viviane Mattos Pascotto, Ph.D. vipascotto@gmail.com. Center for Evaluation of the Environmental Impact on Human Health (TOXICAM), São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School, SP, Brazil.

* De acordo com as normas do *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* (ISSN 1528-7394 (Print), 1087-2620 (Online). Fator de Impacto (2013):1,834.

ABSTRACT

The Brazilian federal government Agency for Health Surveillance has detected pesticide residues in fresh food available for consumers all over the country. The current study investigated the effects of prochloraz and propiconazole (individually or as mixture) subsequent to *in utero* and lactation exposures in order to improve the understanding of their reproductive and developmental effects. The azoles are of concern because the population may be exposed to a mixture of these compounds as residues in the diet and or by using them as pharmaceuticals. The concerns are especially directed toward fetuses and infants as they are particularly susceptible to exogenous chemicals. Groups (G) of pregnant rats were alternatively fed four different experimental diets: G1: control diet, G2: 150 ppm prochloraz, G3: 500 ppm propiconazole and G4: mixture of both mixtures at the same doses. Dams were exposed from the 9th gestational day (DG9) to the end of lactation (post-natal day 22, PND22); after weaning, female offspring were selected and kept into 4 groups each one corresponding to the experimental diet provided to their respective dams and received basal diet until the end of the experiment (DPN 140), when they were euthanized in metaestrus. Body weights (BW) and anogenital distances (AGD) were registered at PND 2, vaginal opening assessment beginning on PND 29, hormone levels and body and organ weights were measured at the

necropsy day. Neonates did not show any physical signs of toxicity. No gross malformations were found. There were no significant differences among experimental groups regarding body weights at the PND 2. Significant delay of VO were registered in the female offspring that had been exposed to prochloraz ($p < 0.01$) or to propiconazole ($p < 0.05$); each of these same groups also showed significant delay ($p < 0.01$) when compared with animals exposed to the fungicide mixture. Final body weights and relative weights of liver, uterus and ovaries also did not differ significantly among the experimental groups. Testosterone, estradiol and progesterone levels were not affected by the different treatments but the LH levels were significantly increased in the groups fed with prochloraz ($p < 0.001$) or propiconazole or their mixture ($p < 0.01$) when compared to the control. Also, FSH levels were significantly higher ($p < 0.001$) in the fungicide mixture-treated group than in the other groups. Exposure *in utero* and during lactation to prochloraz and propiconazole fungicides, individually or to their mixture, negatively affected the adult (15th week) reproductive system of female offspring particularly delaying the vaginal opening and increasing LH and FSH levels.

Keywords: Maternal exposure, Prochloraz, Propiconazole, Chemical mixture; Reproduction; Development; Female Rat

INTRODUCTION

A wide range of substances found in many everyday products, both natural and man-made – including plastic bottles, detergents, flame retardants, food additives, toys, cosmetics, and pesticides residues are thought to cause endocrine disruption (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

A large number of pesticides have been identified as endocrine disruptors (Mnif et al., 2011), defined as exogenous agents that interfere with synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of natural hormones in the body that are responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction, development, and or behavior (U.S.EPA, 1997).

Humans are exposed to these chemicals either concurrently or sequentially from multiple sources (e.g. food, drinking water, residential and occupational activities) and through varied routes (oral, inhalatory, cutaneous) (Wuttke et al., 2010). Chemical exposures during early stages of life can disrupt normal patterns of development and thus dramatically alter disease susceptibility later in life (Barker, 2004; Fontenele et al., 2010; Schug et al., 2011).

Particularly, because of their intrinsic toxicity and limited species selectivity, pesticides exhibit undesirable harmful effects on sensitive non-target organisms such as humans and wildlife populations. The toxicological effects of pesticide mixtures on the human health are

largely unknown, although there are growing concerns about their safety (Hernández et al., 2011; Hernández et al., 2013).

The Brazilian Federal Agency for Health Surveillance (ANVISA) conducted a survey that indicated the presence of several pesticides residues in fresh food and vegetables that were available for purchase by the general populace (Oliva et al., 2003; ANVISA, 2006). Since ANVISA's primary goal is to protect and promote human public health, the results of its survey raised concerns among the public and scientific communities. Particularly, residues of azoles fungicides (prochloraz and propiconazol) were found in fresh food and vegetables (ANVISA, 2009).

Azoles are synthetic antifungal compounds derived from triazole or imidazole molecules. Azole derivatives are used for control of fungal pathogens both in humans and in plants (Menegola et al., 2013). All azoles, irrespective of their different chemical structure and variable properties, interact and target the same active site in CYP51 - a conserved gene in fungi, protists, mammals, and plants – required for sterol biosynthesis in all eukaryotic systems (Goetz and Dix, 2009). Disruption in ergosterol biosynthesis leads to a buildup of toxic intermediate sterols in the fungal cell membrane, increasing membrane permeability and inhibiting fungal growth (Vanden Bossche et al., 1990). This ability makes this class of compounds an effective tool in controlling many species and strains of fungi

(Ghannoum and Rice, 1999). In mammals, the CYP51 or lanosterol-14 α -demethylase-modulated reaction is part of the pathway leading to the biosynthesis of cholesterol. Cholesterol is the primary sterol in the cell membrane of mammalian cells, and is also required to make sex steroid hormones (Payne and Hales, 2004). Aromatase (CYP19) is another target enzyme of azole compounds. In steroidogenesis, it converts androgens into corresponding estrogens (Zarn et al., 2003).

At high doses, azole compounds affect reproductive organs, fertility, and development of several species (Zarn et al., 2003). Common features for azole fungicides are the lengthening of the gestational period, virilization of female pups, and alteration of steroid hormone levels in rat fetuses and/or dams (Taxvig et al., 2007). Among the azoles, prochloraz has demonstrated conspicuous endocrine disrupting properties. In rats this fungicide demasculinized male offspring and virilized female offspring (Noriega et al., 2005; Vinggaard et al., 2005; Laier et al., 2006). Also, it caused reproductive malformations in androgen-dependent tissues of male offspring of exposed rats (Noriega et al., 2005).

In addition, exposure to propiconazole, adversely impacted reproductive development of female rats. Inhibition of the CYP19 (aromatase) may be responsible in whole or part for the observed adverse reproductive effects (Rockett et al., 2006). Despite their widespread usage and a general tendency towards the inhibition of

CYP function, the amount of *in vivo* azole data available in the scientific literature is rather limited.

Thus, the purpose of this study was to investigate the adult detrimental impact of azoles (prochloraz and propiconazole, individually or mixture) subsequent to exposures during specific periods (*in utero* and lactation) in order to improve the understanding of their reproductive and developmental adverse effects.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Propiconazole (CAS No. 60207-90-1; 98.4% pure) and prochloraz (CAS No. 67747-09-5; 99.1% pure) were obtained from Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany.

Animal husbandry

Adult female (60 days of age) and male (90 days of age) Sprague-Dawley rats were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigations (CEMIB UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil) (Appendix 1). Animals were housed in polypropylene cages with sterile white-pine shavings, and maintained in rooms under controlled environmental conditions (temperature 22 ± 2 °C, relative humidity $55\pm 20\%$, a 12/12 h light-dark cycle and 4 daily exhaustion periods). All animals were given a semipurified diet (Reeves, 1997) and water *ad libitum*. Two non-gravid female rats were mated with

one male, during the dark portion of the lighting cycle, and the day of sperm detection in the vaginal smear was considered day 0 of gestation (GD 0). Four gravid females were allocated to each experimental group and housed individually in cages. Experimental protocols were conducted according to the guidelines of animal experimentation adopted by COBEA and approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Botucatu Medical School, São Paulo, Brazil (Protocol number no. 923/2012) (Appendix 2).

Treatment regimen

At the GD 9 embryos are already in place and therefore exogenous chemicals do not interfere with the development process. On the other hand, at this stage the organogenesis of most organs starts (especially those tissues and organs that are hormone-dependent (breast, gonads, brain, genital tract, etc.) demonstrating that the chemical could change the processes of differentiation and cell division, which are very important at this early stage of embryonic development (Markey et al., 2001). Starting on GD 9, four pregnant dams were given unrestricted access to water and either control feed (Group 1) or feed containing prochloraz (150 ppm – Group 2), propiconazole (500 ppm - Group 3), or a mixture of both fungicides (150 and 500 ppm respectively – Group 4). With the adoption of GD9

aimed to expose embryos in an early stage of development and low risk of inducing abortions.

The azoles were dissolved in acetone prior to homogenization with the powdered semi-purified basal AIN93M diet (HN&C Consulting, Campinas, SP, Brazil). This diet is an improvement of the AIN-76A diet and provides the necessary amounts of macro and micronutrients for development and maturity of rats (Reeves, 1997). High-performance liquid chromatography (HPLC/UV, Varian LC920) analyses indicated that the levels of the isoflavones genistein and daidzein in that semipurified diet were below those found in commercial feed. Control feed was prepared by mixing acetone with the feed. Acetone was allowed to evaporate fully from the feed prior to use. The exposure levels of the fungicides were chosen from the literature on the reproductive toxicology of prochloraz and propiconazole, the prochloraz level being a NOEL (U.S.EPA, 1989), and the propiconazole level a NOAEL (U.S.EPA, 1988).

Dams continued on their assigned diet through gestation, parturition, and lactation. They were allowed to deliver naturally, with the day of delivery designated as postnatal day (PND 0) for the F1 offspring. Pups were weighed on PND 2. Litters were culled to eight pups on PND 2 using blinded random selection, 3 to 4 animals from each litter was used and the pups weaned on PND 22, after the end of lactation the respective mothers were euthanized by CO₂

inhalation. Female weanlings were distributed on the same group as their dams but received a diet without addition of until termination. The experimental design is shown in Figure 1.

Analysis of the female offspring

Body weights and anogenital distance (AGD) at PND 2

On PND 2 (considering the day of birth as PND 0), the anogenital distance (AGD, distance between the anus and the genital tubercle) was measured in female pups using a digital caliper; results were expressed as absolute (mm).

External signs of puberty onset

Beginning on PND 29, female pups were monitoring for vaginal opening (VO). Animals were examined once daily early in the morning (approximately at 07:00 a.m.).

Estrus cyclicity

Analyses of the estrous cycle were not performed due to a technical lighting problem in the animal facility

Necropsy and sample collection

On the first metaestrus after PND 140, the animals were euthanized between 8:00 and 10:00 a.m. by carbon dioxide

asphyxiation followed by exsanguination via heart puncture. The liver, uterus, hypophysis and each ovary were collected, blotted dry, weighed, fixed in 10% formalin and embedded in paraffin.

Serum hormone radioimmunoassay

Serum was prepared using the blood collected before necropsy and stored frozen at -20°C. Concentrations of testosterone (T), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), progesterone (P₄) and estradiol (E₂) were measured using a double-antibody radioimmunoassay (RIA) kit (National Institute of Arthritis, Diabetes and Kidney Diseases, NIADDK, USA), according to the manufacturer's instructions.

Serum LH and FSH concentrations were determined by double antibody radioimmunoassay using specific kits provided by the National Program of Pituitary Hormones (Harbor-CA, USA). The antiserum and reference preparation for LH were the anti-rat LH-S10 and LH-RP3 and for FSH, anti-rat FSH-S11 and FSH-RP2, respectively. Primary antibodies were anti-rat FSH-S11 and LH-S10 and the Standards FSH-RP2, LH-RP3. Concentrations of plasma progesterone and estradiol were determined by double antibody radioimmunoassay using kits provided by MP Biomedicals (Orangeburg, NY, EUA). The lower limits of detection were 0.17 ng/mL for LH, 0.2 ng/mL for FSH, 5.0 pg/mL for estradiol and 0.02

ng/mL for progesterone. Intra-assay coefficients of variation were 4%, 3%, 4.7%, and 3.7% respectively for LH, FSH, estradiol and progesterone. All samples were measured in duplicate, and at different dilutions when needed. All the samples were analyzed at the same assay to avoid inter-assay variability.

Histological and histomorphometric analyses of uterus

Three 50 μm apart histological sections from the paraffin-embedded uterus were obtained per animal. These 5 μm thick sections were mounted in glass slides and stained with hematoxylin and eosin (HE). The slides were photographed with an Olympus (Q Color 5) camera, captured with the Q-Capture program and analyzed with the Capture-Pro program. Thicknesses were measured in each of the 3 sections per animal; five randomly different areas were measured, amounting to 15 measurements per animal, from which the mean and standard deviation were obtained (Guerra et al., 2010).

Ovarian Follicles and Corpora Lutea Counts

Three 50 μm apart 5 μm thick sections, were obtained from the left ovaries from each animal and mounted on glass slides. To ease the counting procedure, the visibility of primordial and primary follicles was enhanced immunohistochemically by staining them for the proliferating cell nuclear antigens (PCNA) (Picut et al., 2008). Briefly,

the sections were incubated overnight with primary anti-PCNA antibody at 1:400 (clone PC-10, Dako Corporation, Carpinteria, California, USA), and then incubated with the secondary antibody (LSAB- LINK, K0609, Dako Corporation, Carpinteria, California, EUA); staining was developed by 3.3 diaminobenzidine (K3468, Dako Corporation, Carpinteria, California, EUA). Control and treated groups were kept in the same immunohistochemistry staining run. Ovarian follicles and corpora lutea were counted and expressed as number per area unit (cm^2), the area of each ovarian fragment was determined using an image analyzer KS-300 Kontron-Zeiss. Follicles were classified according to Borgeest et al. (2002) and Talsness et al. (2005). Primordial and primary follicles were enumerated together; oocytes surrounded by a single layer of either squamous or cuboidal epithelial cells were also counted. Follicles were classified as pre-antral when containing 2–4 layers of granulosa cells with no antral space. Antral follicles were classified when containing three or more layers of granulosa cells and a clearly defined antral space. Characteristics considered to discriminate atresic follicles were the presence of pyknotic granulosa cells, disorganized granulosa cells, degenerating oocyte and detachment of the granulosa from the basement membrane.

Statistical analysis

Values are expressed as mean $\pm$ SD. Data were analyzed using one-way ANOVA for multiple comparisons of the groups with Tukey's test as a *post hoc* test. For all analyses, calculations were performed using GraphPadInStat (v.3.02, La Jolla, CA). Significant difference was assumed when $p < 0.05$.

RESULTS

Feed intake of dams and female F1

The average daily dams feed intake during weeks 2 and 3 of gestation, and 1–3 of lactation, are shown in Table 1. Table 2 shows the estimated average daily dose of chemical during these same periods. There were no significant differences in food intake among groups. Respect to F1 females feed consumption, variation in intake was observed, but on average remained in the range 15-20g / mouse (data not shown).

Pregnancy and litter data

There was no evidence of maternal toxicity. Gestational duration lengths showed no alteration, regardless of the fungicide treatment (data not shown).

Body weights and anogenital distance (AGD) at PND 2

There were no significant differences among litters from control and treated groups regarding pups body weights. Also, the absolute AGDs did not differ among the groups (Table 3).

Vaginal opening

Figure 2 shows average age at VO for each of the groups. Female offspring exposed to prochloraz or to propiconazole individually showed delayed vaginal opening ($p < 0.01$ or $p < 0.05$, respectively) when compared to the control or to animals treated with the fungicide mixture ($p < 0.01$). These two latter groups did not differ significantly regarding the age of vaginal opening.

Body and organs weights of female F1

No significant differences were found in body weights among the groups at the end of the experiment. No significant differences were found in mean relative weights of liver, ovaries, hypophysis and uterus (Table 4).

Hormone serum levels

Testosterone, estradiol and progesterone levels were not affected by the different treatments but the LH levels were significantly increased to the groups fed prochloraz ($p < 0.001$) or propiconazole or

their mixture ($p < 0.01$) when compared to the control. Also, FSH levels were significantly higher ($p < 0.001$) in the groups fed the fungicide mixture than in the other groups (Figure 3).

Histopathology and histomorphometric analyses

All ovaries contained follicles at all stages of development and had normal appearing corpora lutea (CL). Quantification of ovarian follicles was not affected in animals of the different experimental groups. There were no significant signs of edema and cystic follicles. No apparent histological changes were observed in uterus (data not shown). No significant differences were found among experimental groups regarding endometrial thickness (Table 5).

DISCUSSION

Prochloraz and Propiconazole did not exert any significant effects on the body weights of female offsprings at the PND 2 and PND 140, which may be related to the fact that their levels were respectively the NOEL (150ppm) and NOAEL (500ppm), as reported in the literature (U.S.EPA, 1988; U.S. EPA, 1989).

Anogenital distance in female and male rats is sensitive to hormonal effects of endocrine disruptors (U.S.EPA, 1998; Gallavan et al., 1999). In general *in vivo* exposure to androgens or substances that inhibit estrogen production increases female AGDs making the

pups more “masculine”, whereas exposure to estrogens or antiandrogens decreases male AGDs, making the pups more “feminine” (Rockett et al., 2006). In the present study there was no significant effect on DAG when this parameter was expressed absolutely, as it is usually reported in the literature (Rockett et al., 2006; Guerra et al., 2010).

Vaginal opening marks the completion of sexual maturation for female rats, and is an estrogen-dependent event. Prepubertal exposure to compounds with estrogenic activity like methoxychlor can accelerate VO (Gray et al., 1989; Laws et al., 2000), whereas exposure to antiestrogens as lindane (Chadwick et al., 1988) or androgens (e.g., testosterone) (Rhees et al., 1997) can delay the age for VO. In the current study, prochloraz and propiconazole both caused a significant delay in VO. High dietary doses of the triazoles myclobutanil and triadimefon caused a significant delay in VO (Rockett et al., 2006). Also, rats exposed during 14 days to an anastrozole fungicide starting from PND 25, also showed a delay in VO (Ashby et al., 2002). Like propiconazole, triadimefon, myclobutanil and anastrozole are triazole-based conazoles. Therefore, there are evidences indicating that these chemicals exert either androgenic or antiestrogenic effect. The antiestrogenic influence of these compounds have been attributed to their activity as aromatase inhibitors (i.e., inhibits conversion of testosterone to

estrogen) (Rockett et al., 2006).

However, the mixture of prochloraz and propiconazole at their respective levels, 150ppm and 500ppm respectively, was not effective in delaying the vaginal opening, suggesting an interaction between the fungicides possibly inhibiting the antiestrogenic potential of each compound. Interaction of pesticides does not occur at doses at or below their NOAEL in a mixture; however, when exposures are sufficiently high, exceeding their respective NOAELs, both toxicodynamic and toxicokinetic interactions resulting in synergy or antagonism can occur (Moser et al., 2006; Hernández et al., 2013).

Antagonism occurs when two pesticides interfere with each other's effect. The result is a reduction in the effect predicted for individual compounds which do not need to be structurally similar (Zeliger, 2011). One chemical may stimulate the metabolism of a second one or somehow interfere with its absorption (Hernández et al., 2013). As an example, prochloraz inhibits aromatase (CYP19) (Vinggaard et al., 2000; Vinggaard et al., 2005), whereas triazine stimulate this enzyme activity involved in the conversion of testosterone to estradiol (Sanderson et al., 2000). Therefore, concurrent exposure to these two pesticides (triazines and prochloraz) might neutralize their respective effects on aromatase (Hernández et al., 2013).

The normal reproductive function requires the coordinated operation of the hypothalamus, pituitary and ovaries. The

hypothalamus secretes gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in a pulsatile manner to stimulate the pituitary gland to secrete luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH). These gonadotropins stimulate folliculogenesis and secretion of various hormones from the ovary, including oestradiol, progesterone, and inhibin A and B. Increasing levels of estradiol and progesterone, as well as inhibin A and B, all secreted by the ovaries have a negative feedback, consequently, there is a decrease of FSH secretion and, to a lesser extent, LH. The suppression of FSH secretion limits the number of follicles that develop and mature, and the number of ovulated ova to be eventually. Estradiol levels reach a critical threshold, signaling to occur preovulatory gonadotropin surge (Hall, 2009).

Some pesticides may interfere with the female hormonal function, which may lead to negative effects on the reproductive system through disruption of the hormonal balance necessary for its proper functioning (Bretveld et al., 2006). Thus, monitoring LH and FSH levels should be useful in understanding azole effects on steroidogenesis (Goetz et al., 2007). Pesticides, such as fenarimol, prochloraz, and other imidazole fungicides possess the ability to inhibit estrogen biosynthesis through CYP19 aromatase inhibition *in vitro* (Hirsch et al., 1987; Mason et al., 1987; Vinggaard et al., 2000), prevent the conversion of androgens to estrogens. Also, fluconazole,

propiconazole and triadimefon are examples of triazoles that inhibit aromatase activity (Paulus et al., 1994; Vinggaard et al., 2000). Compounds which can inhibit aromatase activity *in vitro* may be able to cause local changes in estrogen and androgen concentrations *in vivo* Vinggaard et al. (2000). Imbalance in steroidogenic enzymes will cause fluctuations in hormone levels, disrupting the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG).

In the present study, testosterone, estradiol and the progesterone levels were not affected in the different groups. However, LH levels were significantly increased to the groups fed prochloraz or propiconazole or their mixture when compared to the control. Also, FSH levels were significantly higher in the groups fed the fungicide mixture than in the other groups. It is possible that the hormonal changes observed in LH and FSH levels in the groups fed the mixture or the single azoles were due to an absence of inhibitory effect of estrogen production on FSH and LH liberation, altering the hypothalamic-pituitary axis. However, these changes in hormone levels were not enough to cause morphologic alterations or change the number of ovarian follicles in the different experimental groups.

Some members of azoles have been shown to be hepatotoxic and induce mouse hepatocellular tumors (Wolf et al., 2006). Previously reported studies of mice fed diets containing propiconazole at 0, 100, 500, and 2500 ppm feed levels. Propiconazole at 2500 ppm induced

statistically significant increases in liver weights, liver/body weights ratios and liver cell hypertrophy compared with control mice and liver cell hypertrophy was also increased at 500 ppm (Allen et al., 2006).

Prochloraz has previously been reported to increase liver weights after administration of doses of 25 mg/kg in treated rats (Birkhøj et al., 2004; Vinggaard et al., 2002). This effect on liver weight may be a result of hypertrophy of liver cells, which may be caused by induction of CYP 450 activities. In the present study no significant differences were found in the mean relative liver weights between treated and control groups.

CONCLUSIONS

In utero and during lactation exposures to the azoles prochloraz and propiconazole fungicides, individually or to their mixture, impacted negatively on the reproductive system of the adult (15th week of age) female offspring, particularly delaying the vaginal opening and increasing the LH and FSH levels.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Grant No. 2011/09870-2) and by the Center for Evaluation of the Environmental Impact on Human Health (TOXICAM), São Paulo State University (UNESP) Botucatu

Medical School, SP, Brazil. Paulo Roberto Cardoso, Paulo Cesar Georgete, Cristina Aparecida Alquati Dorico and Marcos Franchi provided helpful technical assistance. Janete Aparecida Anselmo Franci and Ruither de Oliveira Gomes Carolino provided assistance in determining hormone levels.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2010. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos alimentos. Relatório de atividades 2009. Brasília: ANVISA. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home> (accessed april 10, 2011).
- Allen, J. W., Wolf, D.C., George, M.H., Hester, S.D., Sun, G., Thai, S.F., Delker, D.A., Moore, T., Jones, C., Nelson, G., Roop, B.C., Leavitt, S., Winkfield, E., Ward, O.W. and Nesnow, S. 2006. Toxicity profiles in mice treated with hepatotumorigenic and non-hepatotumorigenic triazole conazole fungicides: Propiconazole, triadimefon, and myclobutanil. *Toxicol. Pathol.* 34: 853-862.
- Ashby, J., Owens, W., Deghenghi, R. and Odum, J. 2002. Concept evaluation: an assay for receptor-mediated and biochemical antiestrogens using pubertal rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 35: 393-397.
- Barker, D.J. 2004. The developmental origins of adult disease. *J. Am. Coll. Nutr.* 23: 588-595.
- Birkhøj M, Nellemann C, Jarfelt, K., Jacobsen, H., Andersen, H. R., and Vinggaard, A. M. 2004. The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201: 10-20.

- Bretveld, R. W., Thomas, C. M. G., Scheepers, P. T. J., Zielhuis, A. G. and Roeleveld, N. 2006. Pesticides exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4: 1-14.
- Chadwick, R.W., Cooper, R.L., Chang, J., Rehnberg, G.L. and McElroy, W.K. 1988. Possible antiestrogenic activity of lindane in female rats. *J. Biochem. Toxicol.* 3: 147-158.
- Clark, R.L. 1999. Endpoints of reproductive system development. In: *An evaluation and interpretation of reproductive endpoints for human health risk assessment*, pp. 10-27. Washington DC: ILSI Press.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T. and Gore, AC. 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* 30: 293-342.
- Fontenele, E.G.P., Martins, M.R.A., Quidute, A.R.P. and Montenegro Jr, R.M. 2010. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 54: 6-16.
- Gallavan Jr, R.H., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F. and Reynolds, V.L. 1999. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.* 13: 383-390.

- Ghannoum, M.A. and Rice, L.B. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 501-517.
- Goetz, A.K. and Dix, D.J. 2009. Toxicogenomic effects common to triazole antifungals and conserved between rats and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238: 80-89.
- Goetz, A.K., Ren, H., Schmid, J.E., Blystone, C.R., Thillainadarajah, I., Best, D.S., Nichlos, H.P., Strader, L.F., Wolf, D.C., Narotsky, M.G., Rockett, J.C. and Dix, D.J. 2007. Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat. *Toxicol Sci.*(1): 227-39.
- Gray Jr, L.E., Ostby, J., Ferrell, J., Rehnberg, G., Linder, R., Cooper, R., Goldman, J., Slott, V. and Laskey, J. 1989. A dose response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development and function in the rat. *Fundam. Appl. Toxicol.*; 12: 92-108.
- Guerra, M.T., Scarano, W.R., de Toledo, F.C., Franci, J.A.A. and Kempinas, W.G. 2010. Reproductive development and function of female rats exposed to di- η -butyl-phthalate (DBP) in utero and during lactation. *Reprod. Toxicol.* 29: 99-105.

- Hall, J.E. 2009. Neuroendocrine control of the menstrual cycle. In: Strauss, J.F. III, Barbieri, R., editors. *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology*, 6th ed. pp. 139-54. Philadelphia: Elsevier.
- Hernández, A.F., Parrón, T., Tsatsakis, A.M., Requena, M., Alarcón, R. and López-Guarnido, O. 2013. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology*. 10(307): 136-45.
- Hernández, A.F., Gil, F., Pla, A., Gómez, A., Lozano, D., Parrón, T., Requena, M. and Alarcón, R. 2011. Emerging human health concerns from chronic exposure to pesticide mixtures. *Toxicol. Lett.* 205: S4–S5.
- Hirsch, K.S., Weaver, D.E., Black, L.J., Falcone, J.F. and MacLusky, N.J. 1987. Inhibition of central nervous system aromatase activity: a mechanism for fenarimol-induced infertility in the male rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 91: 235-245.
- Laier, P., Metzдорff, S.B., Borch, J., Hagen, M.L., Hass, U., Christiansen S, Axelstad, M., Kledal, T., Dalgaard, M., McKinnell, C., Brokken, L.J. and Vinggaard, A. 2006. Mechanisms of action underlying the antiandrogenic effects of the fungicide prochloraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 213: 160-171.
- Laws, S.C., Carey, S.A., Ferrell, J.M., Bodman, G.J. and Cooper, R.L. 2000. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol. Sci.* 54: 154-167.

- Markey, M.C., Luque, E.H., del Toro, M.M., Sonnenschein, C. and Soto, A.M. 2001. In utero exposure to bisphenol a alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol. Reprod.* 65: 1215-1223.
- Mason, J.I., Carr, B.R. and Murry, B.A. 1987. Imidazole antimycotics: selective inhibitors of steroid aromatization and progesterone hydroxylation. *Steroids.* 50: 179-189.
- Menegola, E., Di Renzo, F., Metruccio, F., Moretto, A. and Giavini, E. 2013. Effects of mixtures of azole fungicides in postimplantation rat whole-embryo cultures. *Arch. Toxicol.* 87: 1989-1997.
- Moser, V.C., Simmons, J.E. and Gennings, C. 2006. Neurotoxicological interactions of a five-pesticide mixture in preweanling rats. *Toxicol. Sci.* 92: 235-245.
- Noriega, N.C., Ostby, J., Lambright, C., Wilson, V.S. and Gray Jr, L.E. 2005. Late gestational exposure to the fungicide prochloraz delays the onset of parturition and causes reproductive malformations in male but not female rat offspring. *Biol. Reprod.* 72: 1324-1335.
- Paulus, G., Longeart, L. and Monro, A.M. 1994. Human carcinogenic risk assessment based on hormonal effects in a carcinogenicity study in rats with the antifungal agent, fluconazole. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 14: 251-257.

- Payne, A.H. and Hales, D.B. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* 25: 947-970.
- Reeves, P.G. 1997. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 127: 838-841.
- Rhees, R.W., Kirk, B.A., Sephton, S. and Lephart, E.D. 1997. Effects of prenatal testosterone on sexual behavior, reproductive morphology and LH secretion in the female rat. *Dev. Neurosci.* 19: 430-437.
- Rockett, J.C., Narotsky, M.G., Thompson, K.E., Thillainadarajah, I., Blystone, C.R., Goetz, A.K., Ren, H., Best, D.S., Murrell, R.N., Nichlos, H.P., Schimd, J.E., Wolf, D.C. and Dix, D.J. 2006. Effect of conazole fungicides on reproductive development in the female rat. *Reprod. Toxicol.* 22: 647-658.
- Sanderson, J.T., Seinen, W., Giesy, J.P. and van den Berg, M. 2000. 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol. Sci.* 54: 121-127.
- Schug, T.T., Janesick, A., Blumberg, B. and Heindel, J.J. 2011. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127(3-5): 204-215.

- Taxvig, C., Hass, U., Axelstad, M., Dalgaard, M., Andersen, H.R. and Vinggaard, A.M. 2007. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol Sci.* 100: 464-473.
- United State Environmental Protection Agency - USEPA. 1988. <http://www.epa.gov/iris/subst/0282.htm> (acessed September 15, 2010).
- United State Environmental Protection Agency- USEPA. 1989. <http://www.epa.gov/iris/subst/0378.htm>. (acessed September 23, 2010).
- United State Environmental Protection Agency. 1998. *Health effects testing guidelines. OPPTS870.3800. Reproduction and fertility effects*. Document No. EPA 712-C-98-208. Washington, DC: EPA - Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
- Vanden Bossche, H., Marichal, P., Gorrens, J. and Coene, M.C. 1990. Biochemical basis for the activity and selectivity of oral antifungal drugs. *Br. J. Clin. Pract.* 71: 41-46.
- Vinggaard, A.M., Christiansen, S., Laier, P., Poulsen, M.E., Breinholt, V., Jarfelt, K., Jacobsen H., Dalgaard, M., Nellemann, C. and Hass, U. 2005. Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring. *Toxicol. Sci.* 85: 886-897.

- Vinggaard, A.M., Nellemann, C., Dalgaard, M., Jorgensen, E.B. and Andersen, H.R. 2002. Antiandrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide prochloraz. *Toxicol. Sci.* 69: 344-353.
- Vinggaard, A.M., Hnida, C., Breinholt, V. and Larsen, J.C. 2000. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol In Vitro*. 2000; 14: 227-234.
- Zarn, J.A., Bruschweiler, B.J. and Schlatter, J.R. 2003. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alphas demethylase and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 111: 255-261.
- Zeliger, H.I. 2011. Human toxicology of chemical mixtures. In: Toxic Consequences Beyond the Impact of One-component Product and Environmental Exposures, 2nd ed. Oxford: Elsevier.
- Wise, L.D., Vetter, C.M., Anderson, C.A., Antonello, J.M. and Clark, R.L. 1991. Reversible effects of triamcinolone and lack of effects with aspirin or L-656,224 on external genitalia of male Sprague-Dawley rats exposed in utero. *Teratology*. 44: 507-520.
- Wolf, D.C., George, M.H., Hester, S.D., Sun, G., Moore, T., Thai, S.F., Delker, D., Winkfield, E., Leavitt, S., Nelson, G., Roop, B.C., Jones, C., Thibodeaux, J. and Nesnow, S. 2006. Toxicity profiles in rats treated with tumorigenic and nontumorigenic triazole conazole fungicides: Propiconazole, triadimefon, and myclobutanil. *Toxicol Pathol.* 34: 895-902.

Wuttke, W., Jarry, H. and Seidlova-Wuttke, D. 2010. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones*. 9: 9-15.

FIGURES

Figure 1.

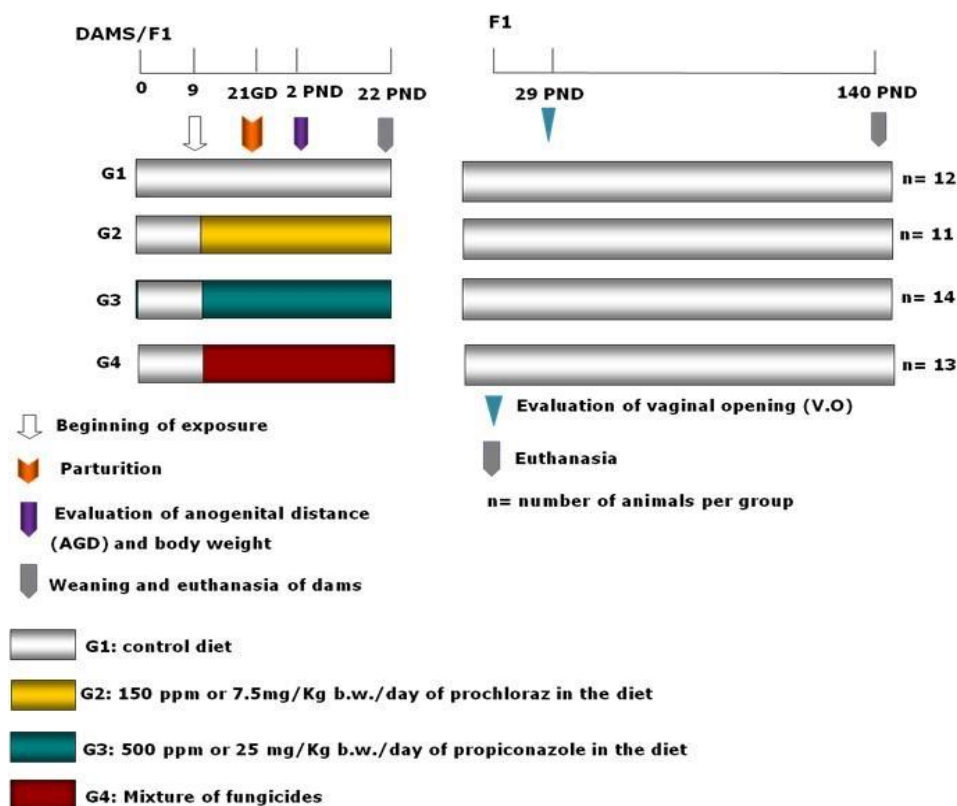


Figure 1. Experimental design:

Pregnant rats were allocated to four different groups (four dams/group) that were respectively fed each one of the experimental diets from the 9th gestational day (GD 9) to the end of lactation (postnatal day 22, PND 22): G1- control, G2- 150ppm prochloraz, G3- 500ppm propiconazole and G4- mixture of both pesticides at their respective levels. After weaning, female offspring received plain diet until PND140 when they were sacrificed in the metaestrus.

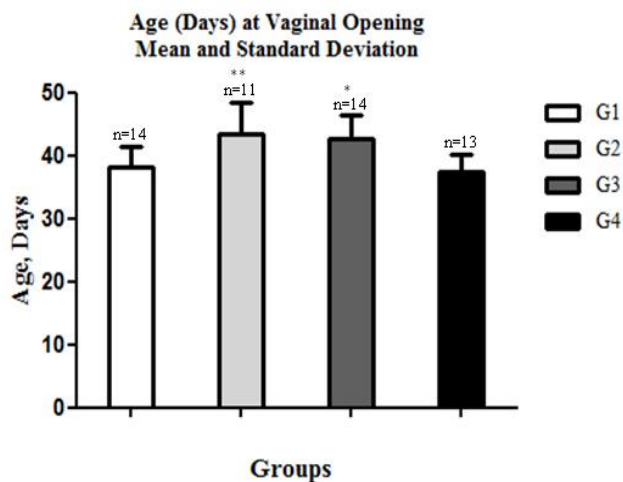
Figure 2.

Figure 2. Age at Vaginal Opening (VO):

n:number of animals.One Way ANOVA, Tukey test. Values are expressed as mean $\pm$ SD. Female offsprings exposed to prochloraz and propiconazole presented significant delays in the mean age at VO (43.45 days, $p < 0.01$; 42.71 days, $p < 0.05$, respectively) compared to the control animals (38.21 days) or to animals treated with the fungicide mixture (37.38 days, $p < 0.01$).

Figures 3A-3E

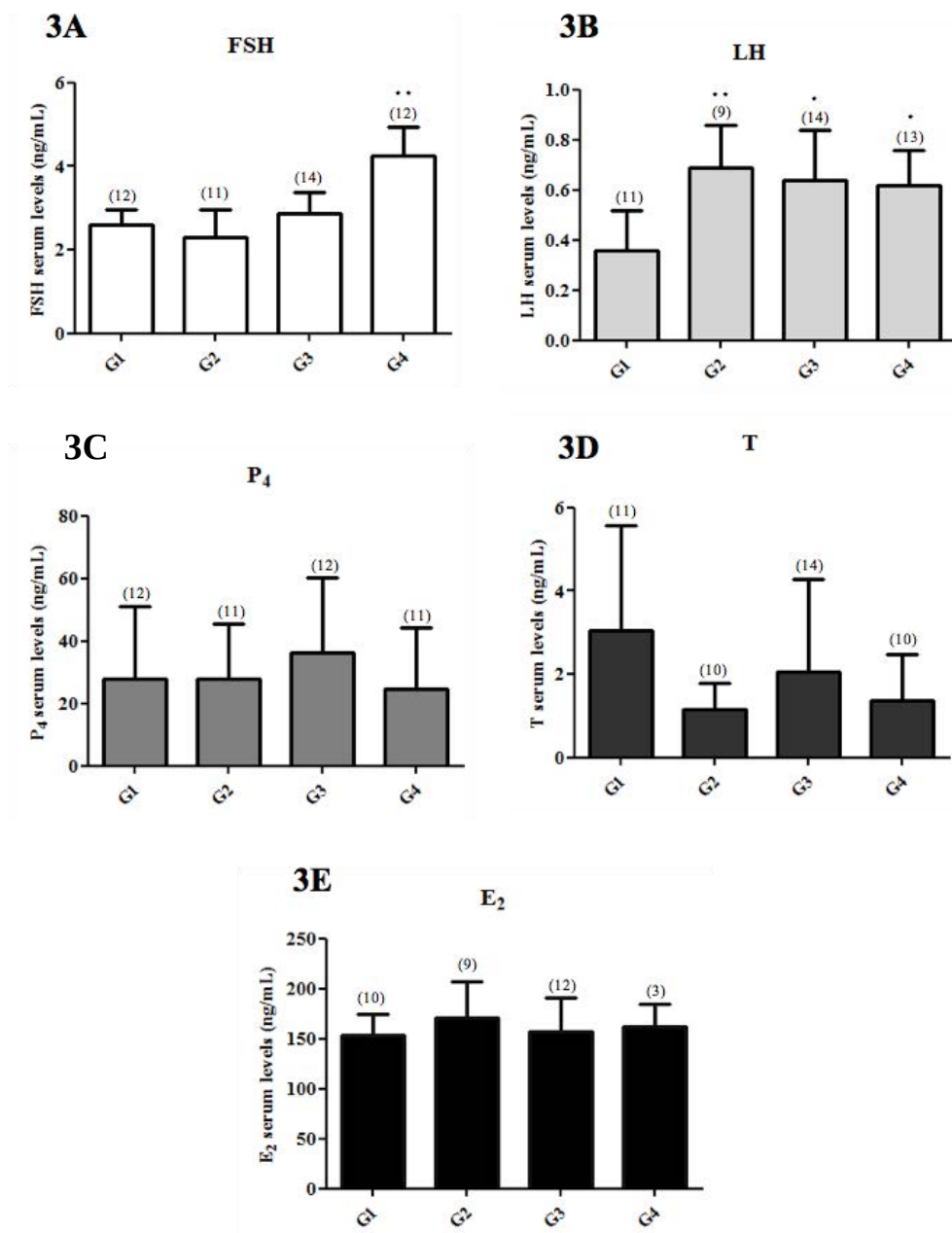


Figure 3. Serum levels of FSH, LH, Progesterone (P₄), Testosterone and Estradiol (E₂) in female Sprague-Dawley rats:

G1 (Control - plain semipurified diet); G2: 150ppm prochloraz; G3: 500ppm propiconazole and G4: mixture of both pesticides at their respective levels. (): number of animals; ANOVA followed by the Tukey test. FSH levels were significantly elevated ($p < 0.001^{**}$) in the mixture-exposed group when compared to the control or to the groups treated with individual fungicides. LH levels were higher in the fungicide-treated groups (prochloraz, $p < 0.001^{**}$; propiconazole, $p < 0.01^{*}$; fungicide mixture, $p < 0.01^{*}$) when compared to the control.

TABLES

Table 1. Mean amount of feed (g/rat/day) consumed by dams during gestation and lactation.

Groups (n=4)	Gestation		Lactation		
	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3
G1: Control (0 ppm)	18.30 ± 3.33	21.80 ± 2.30	26.30 ± 12.27	33.82 ± 4.13	34.30 ± 8.20
G2: Prochloraz (150ppm)	19.20 ± 1.83	18.25 ± 2.40	19.60 ± 3.70	27.80 ± 7.51	22.80 ± 12.30
G3: Propiconazole (500ppm)	21.10 ± 3.90	17.70 ± 2.00	19.90 ± 4.25	35.60 ± 8.70	30.00 ± 5.00
G4: Mixture	19.40 ± 1.40	20.21 ± 2.30	29.80 ± 13.20	40.50 ± 18.60	23.00 ± 16.00

N: number of animals. ANOVA, Tukey test. Values are expressed as mean±SD.

Table 2. Mean doses (mg/kg/day) of conazoles ingested by dams during gestation and lactation.

Groups	Gestation			Lactation	
	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3
G1: Control (0 ppm)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
G2: Prochloraz (150ppm)	8.2	6.1	6.1	8.0	6.7
G3: Propiconazole (500ppm)	24.0	20.0	22.0	36.0	30.0
G4: Mixture					
Prochloraz (150ppm)	7.0	7.0	9.9	13.0	7.4
Propiconazole (500ppm)	23.0	23.0	33.0	43.8	24.6

mg conazole intake estimated from formulation + feed consumption in Table 1 per kg body weight, measured weekly.

Table 3. Body weights and anogenital distance (AGD) evaluated at the PND 2 in female controls and treated offsprings.

	Experimental groups			
	Group 1 (n=14)	Group 2 (n=17)	Group 3 (n=17)	Group 4 (n=20)
Body weight (g)	6.20±1.30	7.00±0.90	6.64±0.78	6.80±1.05
Absolute AGD (mm)	2.38±0.34	2.31±0.31	2.35±0.24	2.17±0.29

N: number of animals. ANOVA, Tukey test. Values are expressed as mean ± SD.

Table 4. Final body weights (BWf) and relative weights¹ of liver, ovaries and uterus (mean ± SD).

	Experimental groups			
	Group 1 (n=11)	Group 2 (n=11)	Group 3 (n=14)	Group 4 (n=12)
BWf (g)	337.45±30.10	323.72±45.93	320.64±22.70	320.75±23.76
Liver (g)	3.15±0.26	3.17±0.22	2.97±0.27	3.07±0.16
Ovaries (g)	0.024±0.004	0.026±0.003	0.024±0.005	0.025±0.004
Hypophysis (g)	0.0037±0.0006	0.0037±0.0010	0.0039±0.0009	0.0039±0.0009
Uterus (g)	0.15±0.05	0.14±0.03	0.13±0.02	0.15±0.03

¹RW: organ weight / final body weight x 100. N: number of animals. ANOVA, Tukey test.

Table 5. Ovarian follicles, corpora lutea counting per unit area (number/mm²) and thickness of uterine endometrium (μm) in female rats from control and treated groups.

Estructures	G1 (n=12)	G2 (n=11)	G3 (n=14)	G4 (n=12)
Primordial and primary follicles	0.79±0.47	1.02±0.80	0.90±0.53	1.12±0.38
Pre-antral follicles	0.22±0.09	0.21±0.14	0.19±0.09	0.18±0.05
Antral follicles	0.51±0.19	0.40±0.10	0.43±0.05	0.40±0.11
Atretic follicles	0.13±0.08	0.11±0.05	0.07±0.04	0.09±0.03
Corpora lutea	0.67±0.15	0.67±0.18	0.68±0.14	0.67±0.19
Endometrial thickness of (μm)	273.01±60.0	279.56±63.7	253.98±38.09	261.10±63.25

N: number of animals. ANOVA, Tukey test. Values are expressed as mean ± SD.

Anexos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

Comissão de Ética em Experimentação Animal
Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99

Certificado

Certificamos que o (Protocolo CEEA 923/2012) Avaliação dos efeitos individuais e de misturas dos fungicidas procloraz, propiconazol e miclobutanil sobre o sistema reprodutor feminino de ratas Sprague- Dawley, a ser conduzido por Viviane Mattos Pascotto, orientada pelo Prof. Titular João Lauro Vianna de Camargo, Co-orientada por Carla Adriene da Silva Franchi, com a colaboração de Marina Trevisan Guerra e Wilma de Grava Kempinas e Apoio Técnico de Paulo César Georgete e Paulo Roberto Cardoso, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 29/03/2012.


Profª Drª Maria Rosa Bet Moraes Silva
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

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



Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
 Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na
 Área da Ciência em Animais de Laboratório - CEMIB
 International Council For Laboratory Animal Science
 ICLAS Network Member for Promotion of Animal Quality in Research
www.cemib.unicamp.br



Prof. João Lauro Viana de Camargo

CPF 513.355.738-87

Distrito Rubião Jr, s/n - RUBIÃO JUNIOR

BOTUCATU - SP

Atestado de Saúde Animal

Atestamos que os Ratos (30 machos e 50 fêmeas) da linhagem **NTacUnib:SD**, provenientes da Divisão de Produção de Animais S.P.F. (Specific Pathogen Free) deste Centro, pertencem à categoria sanitária S.P.F. e apresentam-se isentos dos agentes patogênicos pesquisados pelo laboratório de controle de qualidade sanitária. Informamos que os mesmos encontram-se livres de outros agentes infecciosos capazes de causarem riscos à saúde humana. A validade deste Atestado consta da data dos últimos testes do programa de monitorização sanitária, rotineiramente realizados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Animal - C.Q.S.(*).

Observação - O estado sanitário dos animais retirados do CEMIB nesta data será mantido se os mesmos forem acondicionados em equipamento adequado e o mesmo não for violado durante o transporte. A Instituição receptora deverá oferecer infra-estrutura e condições adequadas para a manutenção de animais da Categoria Sanitária livres de agentes patogênicos especificados (S.P.F.), alojando os animais em equipamentos e/ou salas dotadas de sistema de barreiras de proteção sanitária. Torna-se necessário manejo correto e a esterilização de todo material utilizado na rotina como: ração, maravalha/cama, bebedouros, água, gaiolas, tampas, e outros.

(*) Data dos últimos testes de monitorização sanitária realizados em Abril de 2012.

Campinas, 04 de junho de 2012.

Dr^a. Sônia Cano Montebelo Rachel
 CRMV-SP: 4462 - Médica Veterinária
 E-mail : soniacmr@cemib.unicamp.br

Prof.Dr.Rovilson Gilioli
 Diretor do Centro Multidisciplinar para
 Investigação Biológica
 CEMIB/UNICAMP
 E-mail: diretoria@cemib.unicamp.br