

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

**MISTURA DE PRAGUICIDAS EM BAIXAS DOSES: VERIFICAÇÃO
DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM RATOS LEWIS MACHOS**

MEIRE FRANÇA MARTINEZ

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

BOTUCATU – SP

2008

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

**MISTURA DE PRAGUICIDAS EM BAIXAS DOSES: VERIFICAÇÃO
DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM RATOS LEWIS MACHOS**

MESTRANDA: MEIRE FRANÇA MARTINEZ

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO LAURO VIANA DE CAMARGO

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

BOTUCATU – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Martinez, Meire França.

Mistura de praguicidas em baixas doses: verificação de desregulação endócrina em ratos Lewis Machos / Meire França Martinez. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008.

Orientador: João Lauro Viana de Camargo

Assunto CAPES: 40101061

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

CDD 616.43

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)

Aos meus pais Mara e Edson,

Hoje, neste momento especial, envolto em clima de encantamento e sonho, procuro seus olhos na platéia... Os mesmos olhos que, ansiosos, acompanharam os meus primeiros passos. Olhos que me viram crescer e passaram noites velando meu sono agitado. Olhos preocupados ao ver que já não sou mais criança e, aos poucos, ganhei o mundo. Olhos íntensos, ternos, que transmitiram a força necessária nos momentos críticos. E, quando encontro estes olhos na platéia, eles estão orgulhosos, e conseguem ler no meu rosto as palavras que a emoção me impede de dizer. OBRIGADA!

*À minha família, em especial aos meus irmãos Edson e
Edmary, e ao meu cunhado Romeu,*

Família...

O que dizer de algo que é tão importante para nós, é o alicerce de tudo, é a base que nos sustenta. São aqueles que agüentam nossas reclamações, nos amparam nos momentos de tristezas, vibram com as nossas conquistas. A família sempre está ali, pronta para o que der e vier, não espera nada em troca. Obrigada por serem MINHA FAMÍLIA.

À minha amada sobrinha Nathalie,

Meu “Bízão” querido, que sempre me esperou de braços abertos e um sorriso maravilhoso no rosto e que quando a “titia Mêle” não aparecia, fazia bico. Obrigada por me fazer esquecer de todos os problemas e enxergar como a vida pode ser simples e bonita como você a faz ser!

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 trago 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.

À Milenia Agrociências S/A na pessoa de Andréa Nhoato, pela doação do praguicida Dicofol.

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 Ardanaz (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 imunoistoquímico.

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

À Bianca Ferruccio pela ajuda com as fotos deste trabalho nos momentos de desespero.

Ao Tony Fernando Grassi pela ajuda na formatação deste trabalho.

Aos amigos, companheiros, colegas e pós-graduandos do Toxicam, Shadia Muhammad Ihlaseh, Maria Luíza Cotrim Sartor de

Oliveira, Alexandre Domingues, Bruno Ribeiro Darros, Glenda Nícioli da Silva, João Francisco Lozano Luvízutto, João Paulo de Castro Marcondes, Líane Ziliotto, Mariana Gobbo Braz, Marize de Lourdes Marzo Solano, Merielen Garcia Nascimento, Mitschelli Sanches da Rocha, Paula Regina Pereira Silva, Renato Paschoal Prado, pela pronta ajuda, risos e conselhos.

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

Ao Grupo de Apoio a Pesquisa (GAP) na pessoa de Hélio Rubéns de Carvalho Nunes pela realização dos testes estatísticos.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES pelo auxílio financeiro (Bolsa).

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro das seguintes instituições pertencentes a Faculdade de Medicina -UNESP, Botucatu/SP:

- *Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana - TOXICAM, Departamento de Patologia;*
- *Programa de Pós-Graduação em Patologia.*

Aos animais

Foste um instrumento de nosso aprendizado?

Foste apenas um objeto de experiência?

NÃO!!!

*Foste para nós, vítimas solicitadas pela ciência, para benefício da 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 Geral

Índice de Figuras.....	iii
-------------------------------	------------

Índice de Tabelas.....	vi
-------------------------------	-----------

Capítulo I

Revisão da Literatura.....	1
-----------------------------------	----------

Praguicidas como contaminantes ambientais.....	1
--	---

Desreguladores endócrinos e praguicidas agrícolas.....	3
--	---

Exposição a compostos bioacumulativos e às misturas químicas.....	6
---	---

Referências.....	9
-------------------------	----------

Capítulo II

Manuscrito

Resumo.....	14
--------------------	-----------

Abstract.....	15
----------------------	-----------

Introdução.....	16
------------------------	-----------

Materiais e Métodos.....	20
---------------------------------	-----------

1. Praguicidas Agrícolas.....	20
-------------------------------	----

2. Ração semipurificada.....	20
------------------------------	----

3. Reagentes imunohistoquímica.....	20
-------------------------------------	----

4. Animais e ambiente de experimentação.....	21
5. Delineamento experimental.....	22
6. Preparo das rações.....	24
7. Eutanásia e coleta de material.....	24
8. Dosagens hormonais.....	25
9. Processamento histológico.....	25
10. Detecção imunohistoquímica de núcleos Caspase-3 e PCNA positivos..	26
11. Análise Estatística.....	26
Resultados	28
1. Peso corpóreo dos animais.....	28
2. Consumo de água e ração.....	30
3. Pesos absoluto e relativo dos órgãos.....	32
4. Dosagens Hormonais.....	35
5. Achados macroscópicos.....	36
6. Achados histopatológicos.....	36
7. Proliferação epitelial na próstata.....	41
Discussão	43
Referências	49

Índice de Figuras

Figura 1 – Delineamento Experimental.....	23
Figura 2 - Evolução de peso corpóreo médio dos grupos experimentais ao longo do experimento.....	30
Figura 3 - Consumo médio de água dos animais dos diferentes grupos ao longo do experimento.....	31
Figura 4 – Consumo médio de ração dos animais dos diferentes grupos ao longo do experimento.....	32
Figura 5 - Fígado com hiperplasia focal de ductos biliares (HE, 400x).....	37
Figura 6 – a) Fígado com hipertrofia de hepatócitos centrolobulares (HE, 50x). b) HE, 400x.....	37
Figura 7 - a) Túbulo seminífero com discreto “debulhamento” de células germinativas (HE, 400x). b) Túbulos seminíferos com desaparecimento da camada germinativa (azoospermia intratubular). (HE, 100x). <i>Insert:</i> Detalhe do túbulo seminífero com desaparecimento da camada germinativa. (HE, 400x).....	38
Figura 8 – Próstata; número médio de células epiteliais PCNA+/campo/grupo.....	42
Figura 9 - Próstata com células epiteliais positivas para PCNA. Reação imunoistoquímica com anti-PCNA.....	42

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso ao longo do experimento....	29
Tabela 2 - Consumo estimado de água e ração pelos animais.....	31
Tabela 3 - Pesos absolutos (g) de órgãos coletados ao final do experimento dos diferentes grupos experimentais.....	33
Tabela 4 - Pesos relativos (%) de órgãos coletados ao final do experimento dos diferentes grupos experimentais.....	34
Tabela 5 - Concentrações plasmáticas (em ng/ml) dos hormônios FSH, LF e testosterona.....	35
Tabela 6 - Incidência (%) de alterações histológicas no fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	39
Tabela 7 - Incidência (%) de alterações histológicas dos testículos e epidídimos dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	40
Tabela 8 - Número médio de células epiteliais PCNA+ por grupo.....	41

Capítulo I

Revisão da Literatura



Praguicidas como contaminantes ambientais

Os praguicidas merecem particular atenção como possíveis agentes tóxicos e cancerígenos ambientais. Não são apenas os trabalhadores agrícolas e industriais que estão constantemente expostos a estes compostos, mas também a população em geral está sob risco de exposição crônica via ar, água e alimentos (Cocco, 2002). Nesta área, a Organização Mundial de Saúde (WHO) e a Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO) estabeleceram índices de ingestão diária aceitável (IDAs) de resíduos de praguicidas. 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 ¹NOEL, ²NOAEL, ³LOAEL e ⁴LOEL, 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, recentemente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária indicou que a população brasileira também está exposta a resíduos de praguicidas (ANVISA, 2005). 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*

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

(alface, banana, 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%) estavam 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, um era ditiocarbamato, dois eram do grupo dos 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; devido à sua característica lipofilicidade e acumulação no organismo, 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 ainda 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).

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. Neste sentido, estes agentes podem ser considerados como “*desreguladores endócrinos*”, que são substâncias exógenas capazes de interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais, que são os responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e comportamentos normais do organismo (Mendes, 2002). Como é sabido, hormônios são potentes moduladores de funções fisiológicas variadas, havendo sugestões de que as atuais incidências dos cânceres de mama, testículo e próstata, além de algumas disfunções reprodutivas, possam ser influenciadas pela alteração dos níveis de hormônios esteróides ou de substâncias que os mimetizam funcionalmente (Massaad et al., 2002).

Estudos epidemiológicos indicam que 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 frequência de malformações (criptorquidismo e hipospádia) e de tumores testiculares (Cooper e Kavlock, 1997; Nunes e Tajara, 1998; Toppari et al., 2002). 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). Neste quadro, fato relevante e de nosso interesse particular é o crescimento do mercado de defensivos agrícolas no mundo. O Brasil se destaca como terceiro maior mercado global destes produtos, que movimentou 4,5 bilhões de dólares no ano de 2004 (Marchiori, 2005). A utilização desta enorme quantidade de praguicidas provavelmente resultou em contaminação difusa do meio ambiente e o seu impacto potencial sobre a saúde humana não pode ser ignorado.

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 agrupados sob a denominação de poluentes orgânicos persistentes (POPs). Esta persistência é resultante de características como lipossolubilidade e estabilidade, que os torna 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, peixes 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. No entanto, devido suas propriedades bioacumulativas, resíduos de organoclorados podem ser detectados no ambiente e em tecidos humanos e animais em várias regiões do planeta (Guillette et al., 1994; D'Amato et al., 2002; Delgado et al., 2002; Windhan et

al., 2005). Apesar disto, muitos praguicidas organoclorados continuam em utilização, seja de forma adequada ou não, em diversas culturas agrícolas.

Os xenobióticos que têm ação estrogênica são também denominados xenoestrógenos e, mesmo possuindo mecanismos de ação variados em organismos superiores, todos aparentemente influenciam na redução da fertilidade, malformações genito-reprodutivas (hipospadia e criptorquidismo) e desenvolvimento de neoplasias masculinas (Rittler et al, 2002; Toppari et al., 2002). Os mais descritos 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 anti-androgênico, 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 (Massaad et al., 2002; Toppari et al., 2002).

Outro mecanismo de ação dos desreguladores endócrinos em machos é o aumento do *clearance* metabólico da testosterona. 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). Em animais de experimentação, o dieldrin foi considerado anti-androgênico fraco, enquanto outros compostos, como o metoxicloro, atuam causando atrofia testicular, decréscimo da produção espermática, diminuição dos níveis de testosterona e diminuição de fertilidade em ratos e camundongos (Cocco, 2002). Outros praguicidas organoclorados, como o dicofol, não possuem caráter acumulativo e por isso são utilizados em substituição aos que possuem esta característica. No entanto, em virtude de sua estrutura química muito semelhante ao DDT, o dicofol se enquadra no grupo suspeito de atuar como desregulador endócrino. Além disso,

concentrações de 0,63% a 23,9% de resíduos de DDT já foram observadas como contaminantes em diferentes formulações comerciais de dicofol (Di Muccio et al., 1988).

Apesar dos relatos sobre queda de motilidade espermática, malformações do aparelho reprodutor masculino e feminino e aumento na incidência de alguns tipos de neoplasias (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 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.

Exposição a compostos bioacumulativos e as misturas químicas

Diferente dos estudos experimentais e padronizados com animais de laboratório, nos quais os agravos provocados por substâncias químicas 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 na vida cotidiana na 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 raros trabalhos que estudam o efeito das misturas sobre os órgãos reprodutivos, cabe citar os de Heindel et al. (1997) e Chapin e Gulati (1997). Estes autores forneceram a camundongos machos Swiss CD-1, misturas semelhantes àsquelas encontradas em águas contaminadas nos estados norte-americanos de Iowa (alaclor, atrazina, cianazina, metolaclo, 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).

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 estabelecer um modelo experimental para avaliar a desregulação endócrina decorrente da exposição a uma mistura real de praguicidas, isto é, existente na alimentação humana brasileira, tal como documentado pelo Programa de Avaliação de Resíduos nos Alimentos (ANVISA, 2005).

Referências



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/. Acessado em 26/ago/2005.

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.

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

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.

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.

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.

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

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.

Marchiori B. Um período de dificuldades. *Revista Exame* 2005; 849:46-7.

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

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

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

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.

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.

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.

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

Manuscrito



**Mistura de praguicidas em baixas doses: verificação de
desregulação endócrina em ratos Lewis machos***

**Pesticides mixed at low-doses: evaluation of endocrine disruption in male
Lewis rats**

Meire França Martinez, Carla Adriene da Silva Franchi, João Lauro Viana de
Camargo

Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM) -
Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Universidade Estadual Paulista

Autor Correspondente: João Lauro Viana de Camargo

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: decam@fmb.unesp.br

*De acordo com as normas da Revista Brasileira de Toxicologia

Resumo

O presente estudo objetivou avaliar o potencial de desregulação endócrina de uma mistura de cinco praguicidas, fornecidos a ratos Lewis macho via ração em nível de seus NOELs. Os praguicidas estudados foram encontrados pela ANVISA em tomates à disposição do consumidor brasileiro. Os animais foram distribuídos em 8 grupos de acordo com a ração experimental, da seguinte maneira: Grupo 1 - ração basal, sem contaminantes; Grupo 2 (“Baixas doses”, praguicidas adicionados à ração em nível de seus respectivos NOELs) - 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”, correspondentes aos respectivos LOEL/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 (controles positivo) - rações contendo cada praguicida separadamente, em concentrações correspondentes aos seus respectivos LOEL/LOAEL. Os animais foram sacrificados no final da 8ª. semana de tratamento. O modelo utilizado permitiu verificar que os praguicidas estudados, individualmente ou em misturas em “doses baixas” e em “doses efetivas”, provocam alterações variadas na próstata, testículos e fígado. No entanto, a mistura “baixas doses”, constituída com os praguicidas em nível de seus NOELs, não diferiu, *grosso modo*, dos efeitos verificados com a mistura “doses efetivas”, em que os praguicidas foram adicionados em níveis de LOEL/LOAELs. Questões de delineamento, como idade dos animais e duração do experimento, podem ter influenciado os resultados, reduzindo a magnitude e significância das alterações encontradas.

Palavras-chave: Desregulação endócrina, praguicidas, misturas, ratos Lewis, ANVISA.

Abstract

The present study aimed to evaluate the potential for endocrine disruption of a mixture of five pesticides at their NOELs levels given to Lewis rats through the feed. The pesticides studied were found by ANVISA in tomatoes available at the counter to Brazilian customers. The animals were allocated to 8 groups according to the experimental feed: Group 1 - basal feed, without contaminants; Group 2 ("Low doses"; pesticides were added to the feed at their respective NOEL levels) – dichlorvos 0,23 mg/kg; dicofol 0,22 mg/kg, endosulfan 0,6 mg/kg, dieldrin 0,025 mg/kg, permethrin 5,0 mg/kg; Group 3 ("Effective doses"; corresponding to their respective LOEL/LOAELs) – dichlorvos 2,3 mg/kg, dicofol 2,5 mg/kg, endosulfan 2,9 mg/kg, dieldrin 0,05 mg/kg, permethrin 25,0 mg/kg and Groups 4 to 8 (positive controls) – feed containing each pesticide separately, at concentrations corresponding to their respective LOEL/LOAELs. The animals were sacrificed at the end of the eighth week of treatment. The model used allowed to verify that the pesticides studied, separated or at "low" or "effective doses" induce a variety of alterations in the prostate, testes and liver. However, the effects verified at the "low doses" did not differ from those registered at the "effective doses". Questions of experiment design, animal's age at the beginning of the experiment and experiment length might have influenced the results, reducing the magnitude and meaning of the alterations found.

Key-Words: Endocrine Disruption, Pesticides, Mixtures, Lewis Rats, ANVISA.

INTRODUÇÃO

A exposição advertida ou inadvertida 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. (1). Esta situação difere daquelas estabelecidas nos estudos com animais de experimentação, que são executados com uma substância única, com alto nível de pureza, e que objetivam a identificação de seus efeitos tóxicos potenciais (sistêmicos, neurológicos, comportamentais, cancerígenos, reprodutivos, etc.) (2). Nestas circunstâncias, há relativamente pouca informação experimental sobre se, e como, a exposição a misturas pode afetar a saúde animal e humana (3, 4). Isto também ocorre em virtude do número significativo de fatores que complicam a avaliação das misturas químicas. Por exemplo, dois ou mais compostos podem ter efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos sobre um mesmo órgão ou sistema-alvo, do mesmo modo que podem alterar mutuamente seu metabolismo, eventualmente gerando novos metabólitos tóxicos (1, 5).

Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (6) indicou que a população brasileira está exposta a resíduos de praguicidas. 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 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 de resíduos estavam acima do LMR (metamidofós, permetrina, triazofós, ditiocarbamatos e cialotrina) (6). Dentre os praguicidas encontrados pela ANVISA como contaminantes, um era ditiocarbamato, dois eram piretróides (permetrina e cialotrina), três organoclorados (dicofol, dieldrin e endossulfan) e cinco organofosforados (diclorvós, monocrotofós, clorpirifós, metamidofós e triazofós). O impacto potencial à saúde do consumidor destes tomates contaminados não é conhecido. Além disso, a estimativa do risco da exposição humana aos praguicidas em geral é complexa devido às particularidades químicas de cada praguicida, seus mecanismos de ação e acumulação no organismo e a possibilidade de ocorrerem efeitos aditivos, somatórios ou sinérgicos quando há exposição concomitante e ou prolongada a dois ou mais destes agentes (3).

Nos últimos anos, muitos estudos apontaram para o fato de que alguns poluentes ambientais podem mimetizar ou antagonizar os efeitos dos hormônios esteróides, como estrógenos e andrógenos, provocando o que é denominado desregulação endócrina (DE) (7). É considerado *desregulador endócrino* todo agente exógeno capaz de interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais, que são os responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e comportamentos normais do organismo (8). Investigações epidemiológicas indicam aumento de incidência de malformações no trato genito-reprodutivo e decréscimo da fertilidade masculina, possivelmente pela ação de substâncias desreguladoras endócrinas, bem como o

aumento da incidência de certas neoplasias de testículos e próstata no homem e da mama e vagina em mulheres (9, 10)

Para avaliação do potencial desregulador endócrino de substâncias químicas existem ensaios de curta e longa duração com animais de experimentação, associados a testes *in vitro* a fim de identificar seus modos e mecanismos de ação em órgãos alvo específicos (11, 12). Por exemplo, o teste uterotrófico (13), bem como o ensaio com roedores fêmeas púberes (14, 15), têm como objetivo a detecção de ação estrogênica de determinada substância, enquanto o teste de Hershberger (16), juntamente com o ensaio em roedores machos púberes (14, 17), detectam se a substância tem efeito androgênico. Todos estes sendo considerados de curta duração, variando de 5 dias a 7 semanas. Existem também testes com animais *knockout* para determinação do mecanismo de ação e interação das substâncias potencialmente desreguladoras com receptores hormonais (10), este sendo de longa duração (18 meses). É importante salientar que a questão de ensaios validados para identificação de substâncias desreguladoras endócrinas ainda não está encerrada (18). Entre os ensaios atualmente disponíveis não há um só que aborde todos os parâmetros teoricamente necessários para conhecimento dos fenômenos sistêmicos envolvidos na DE. Observações realizadas em ensaios com duração relativamente mais longa e abordagem mais sistêmica podem auxiliar na escolha de parâmetros mais específicos que permitam o refinamento e padronização de novos ensaios para caracterizar o perigo potencial das substâncias químicas induzirem DE, com elucidação de seu modo e mecanismo de ação, farmacocinética e farmacodinâmica e ação sobre a expressão gênica. Neste caso, deve-se levar em conta que o agravo pode se dar indiretamente em tecidos

diferentes dos tecidos alvo, muito tempo após a exposição ou até mesmo em geração futura, dependendo também da intensidade e frequência da exposição (3).

O presente estudo objetivou avaliar morfolologicamente possíveis efeitos de desregulação endócrina provocados por uma mistura de 5 praguicidas fornecidos em baixas doses a ratos machos adultos jovens da linhagem Lewis durante oito semanas. A verificação de eventuais agravos permitirá o delineamento e a execução de ensaios mais detalhados para explorar modos e mecanismos de ação da mistura estudada.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. *Praguicidas Agrícolas*

Dicofol ($C_{14}H_9Cl_6O$), CAS 115-32-2 (gentilmente cedido pela Milenia Agrociências S/A, Londrina (PR), produto analítico 96,5%, lote: 0510624); diclorvós ($C_4H_7Cl_2O_4P$), CAS 62-73-7, produto analítico 99,4%; permetrina, mistura de isômeros *cis* e *trans* ($C_{21}H_{20}Cl_2O_3$), CAS 52645-53-1, produto analítico 98,0%; endosulfan, mistura de isômeros *alfa* e *beta* (2:1) ($C_9H_6Cl_6O_3S$), CAS 115-29-7, produto analítico 100,0%; dieldrin ($C_{12}H_8Cl_6O$), CAS 60-57-1, produto analítico 97,9%. Os praguicidas diclorvós, permetrina, endosulfan e dieldrin foram adquiridos da Fluka Chemicals, Sigma-Aldrich, Milwaukee, EUA.

2. *Ração semipurificada*

Dieta AIN-93M em pó, fornecida pela Rhoster Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, SP, Brasil). Composição básica do produto: amido de milho, amido dextrinizado (90-94% de tetrassacarídeos), bitartarato de colina, caseína, fibra, L-cistina, óleo de soja, Pré-Mix vitamínico, sacarose, tert-butilhidroquinona. A ração foi preparada de modo a assegurar o uso, em sua formulação, de constituintes livres de resíduos de quaisquer praguicidas. Será denominada de agora em diante de ração basal.

3. *Reagentes imunoistoquímicos*

Kit ABC Peroxidase, Vectastain (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA); 3-3', tetrahidrocloro de diaminobenzidine (DAB; Sigma, St. Louis, MO);

anticorpo PCNA (DAKO A/S, Dinamarca); anticorpo anti-caspase-3 clivada (Cell Signaling Technology, Beverly, MA).

4. Animais e ambiente de experimentação

Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (CEEA, protocolo nº 498).

Foram utilizados 62 ratos machos isogênicos da linhagem Lewis, com 6 semanas de idade, adquiridos do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP (Campinas, SP). O uso de animais isogênicos foi devido à perspectiva de se obter respostas as mais homogêneas possíveis dentro de cada grupo experimental. Foram recebidos dois lotes sucessivos de animais, com pesos médios iniciais de 185,51g e 143,45g. Durante o experimento, os animais foram mantidos em biotério em condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($55\pm 10\%$), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão contínua do ar.

A ração basal produzida na forma de pó foi peletizada pelos pesquisadores e a ela foram misturados os praguicidas agrícolas, conforme indicado nos itens a seguir. Água filtrada e ração foram fornecidas aos animais “*ad libitum*”, e suas ingestões foram registradas semanalmente. Também semanalmente, os ratos passaram por avaliação clínica e pesagem.

5. Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 8 grupos de 6 a 12 animais cada, que receberam a ração basal peletizada adicionada das misturas dos praguicidas ou de cada um deles (Figura 1). As concentrações dos praguicidas nas rações dependeram das doses críticas NOEL (acrônimo em inglês, nível sem efeito observável) ou LOEL/LOAEL (acrônimo em inglês, menor nível com efeito observável/ menor nível com efeito adverso observável), tal como determinadas em ensaios crônicos com ratos (19-25). Estas doses críticas foram transformadas em concentrações, baseadas em estimativas de consumo diário pelo rato, para serem adicionadas à ração. Durante o período experimental os grupos receberam as diferentes rações, como segue:

Grupo 1: Grupo Controle negativo. Ração basal;

Grupo 2: Grupo “Baixas Doses” - praguicidas adicionados à ração em nível de seus respectivos NOELs. 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;

Grupo 3: Grupo de “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 para ratos dos praguicidas dieldrin e endosulfan; para o dicofol, diclorvós e permetrina foi utilizado o LOEL;

Grupo 4: Ração basal peletizada contendo 2,5 mg/kg de dicofol (LOEL);

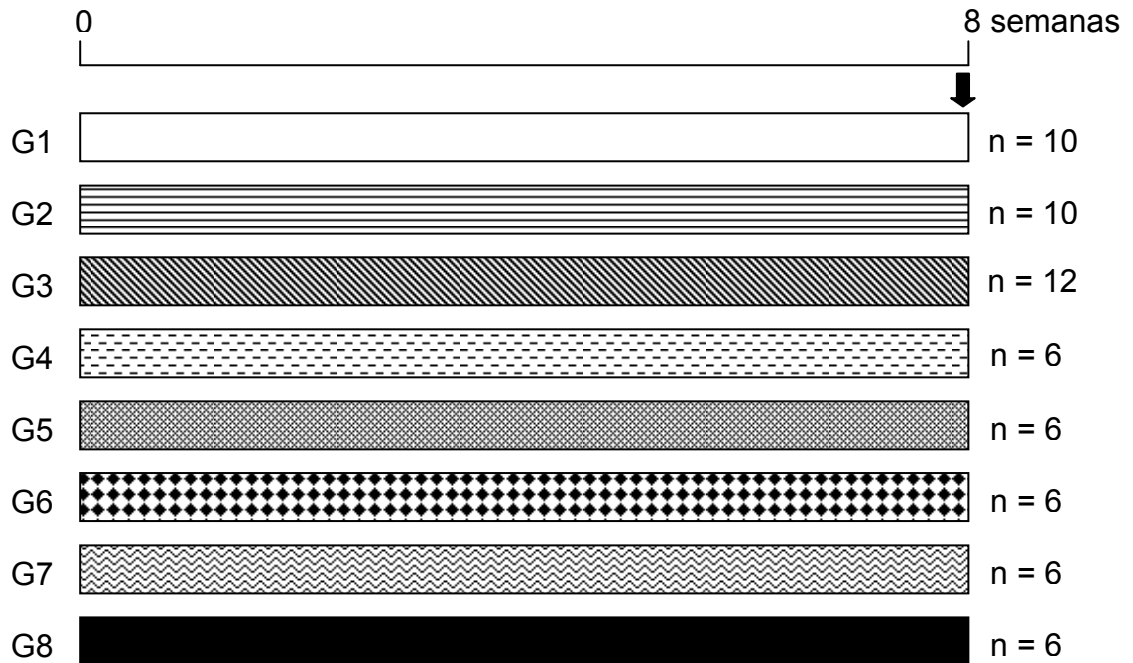
Grupo 5: Ração basal peletizada contendo 2,3 mg/kg de diclorvós (LOEL);

Grupo 6: Ração basal peletizada contendo 25,0 mg/kg de permetrina (LOEL);

Grupo 7: Ração basal peletizada contendo 2,9 mg/kg de endosulfan (LOAEL);

Grupo 8: Ração basal peletizada contendo 0,05 mg/kg de dieldrin (LOAEL).

Ao final da 8ª semana de tratamento os animais foram submetidos à eutanásia, como descrito abaixo.



n total = 62 ratos Lewis machos,
6 semanas de idade

↓ Sacrifício (todos os grupos)

n = nº efetivo de animais

□ Ração basal. Controle

▤ Ração contendo 2,5 mg/kg de dicofol

▥ Ração contendo 25,0 mg/kg de permetrina

▦ Ração contendo 2,3 mg/kg de diclorvós

▧ Ração contendo 0,05 mg/kg de dieldrin

■ Ração contendo 2,9 mg/kg de endosulfan

▨ Ração "Baixas Doses" contendo: diclorvós 0,23 mg/kg, dicofol 0,22mg/kg, endosulfan 0,6mg/kg, dieldrin 0,025mg/kg, permetrina 5,0 mg/kg.

▩ Ração "Doses Efetivas" contendo: diclorvós 2,3 mg/kg, dicofol 2,5mg/kg, endosulfan 2,9mg/kg, dieldrin 0,05mg/kg, permetrina 25,0 mg/kg.

Figura 1 – Delineamento Experimental

6. Preparo das rações

A ração basal em pó e o óleo de soja componente da formulação (4%) foram misturados e *peletizados* no Dietário Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Inicialmente, foi feita solução dos praguicidas em etanol e, em seguida, homogeneização com a ração basal em pó; esta mistura foi posteriormente acrescida do óleo. Os diferentes tipos de ração foram identificados, embalados e conservados sob refrigeração a -20°C.

7. Eutanásia e coleta de material

A eutanásia foi realizada ao final da 8ª semana de tratamento (56º dia) por secção dos vasos da base do coração, após narcose induzida em câmara de CO₂. Procedeu-se imediatamente à coleta de sangue em tubo heparinizado para dosagens hormonais.

Foram coletados para análise histológica os seguintes órgãos: fígado, próstata, testículos esquerdos e epidídimos esquerdos. Os órgãos foram secados em papel filtro e pesados. Os órgãos contralaterais foram submetidos à análise funcional (morfologia, contagem, produção diária, motilidade e tempo de trânsito espermático) no Laboratório de Biologia e Toxicologia da Reprodução e do Desenvolvimento – ReproTox, coordenado pela Profa. Dra. Wilma de Grava Kempinas, no Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP. O fígado e a próstata foram imersos em formalina 10% tamponada por 48 horas; os testículos e epidídimos foram fixados em fluido de Davidson modificado (26), para processamento histológico de rotina.

As lesões morfológicas foram classificadas segundo normas específicas para estudos toxicológicos do fígado (27, 28), próstata (29, 30) e testículos e epidídimos (31, 32).

8. Dosagens hormonais

O sangue colhido foi centrifugado a 2400 rpm por 20 minutos a 3,5°C, para separação do plasma, que foi congelado até o momento dos ensaios hormonais (testosterona, hormônio luteinizante, hormônio folículo-estimulante). As dosagens foram realizadas pela técnica de radioimunoensaio no Laboratório de Neuroendocrinologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, serviço da Professora Dra. Janete Aparecida Anselmo Franci.

9. Processamento histológico

O processamento histológico dos fragmentos dos órgãos coletados foi realizado em processador automático de tecidos (LEICA EG1160-Alemanha). Os tecidos foram incluídos em parafina à 60°C no autoinclusor (LEICA EG 1160, Alemanha). Os cortes histológicos foram obtidos com espessura de 5µm, utilizando o micrótomo semi-automático (LEICA RM 2145-Alemanha).

Após os cortes histológicos serem aderidos às lâminas, estas foram identificadas e levadas à estufa a 60°C. A seguir, seguiram para o processo de coloração com hematoxilina e eosina (HE) em sistema automático (AUTO STAINER LEICA XL – Alemanha). Depois de coradas, as lâminas receberam lamínula de vidro (24x48 mm) no Montador Automático de Lâminas (LEICA CV5000- Alemanha).

As lâminas foram avaliadas no sistema duplo-cego. Após o término da avaliação e classificação das lesões, as lâminas foram decodificadas e as lesões quantificadas e agrupadas dentro dos respectivos grupos experimentais.

10. Detecção imunoistoquímica de núcleos PCNA e caspase-3 positivos

A expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e da caspase 3 positivas foram detectadas em cortes histológicos de próstata de 3µm de espessura por técnica de imunoistoquímica convencional apoiada no complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC) (33).

A quantificação das células epiteliais em proliferação foi avaliada pela expressão do antígeno PCNA. Todos os núcleos PCNA positivos (células em fase G1, S, G2 e M) foram contados em 12 campos microscópicos semi-sucessivos no fragmento prostático de cada animal, utilizando-se objetiva de 40x.

A quantificação das células positivas para caspase 3 na próstata acabou não sendo realizada, pois as células marcadas eram muito raras em todos os grupos experimentais.

11. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP), da Faculdade de Medicina – UNESP, por Hélio Rubéns de Carvalho Nunes. Foi utilizada ANOVA para amostras independentes ao nível de significância $\alpha = 0,05$ para comparar os grupos com relação aos pesos finais da próstata e número médio de células epiteliais PCNA positivas, seguidos do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Também, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-

Wallis para amostras independentes, seguido pelo teste de Dunn para comparar os grupos com relação aos pesos finais do fígado, testículos e epidídimos esquerdo. As lesões histológicas foram comparadas entre os grupos pelo teste exato de Fisher. A pressuposição de normalidade foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade foi testada utilizando o teste de Levene. Todos os testes foram realizados considerando-se nível de significância para $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

1. Peso corpóreo dos animais

A Tabela 1 indica os valores do peso corpóreo inicial e final, e o ganho de peso corpóreo dos animais durante o período experimental. A Figura 2 mostra a evolução do peso corpóreo durante o estudo. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao peso corpóreo no final do experimento. Durante todo o experimento todos os grupos apresentaram ganho progressivo de peso, sendo que ao final os grupos G5, G6 e G8 apresentaram ganho de peso maior que o grupo G1, provavelmente devido ao fato de estes animais terem começado o estudo com menor peso médio.

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

Grupos	Peso Inicial¹(g)	Peso Final¹ (g)	Ganho de peso (g) entre a semana 8 e momento inicial²*
G1 Controle	193,0 ± 16,36 (n=10)	392,0 ± 21,46 (n=10)	93,20 (89,75 ; 99,50)
G2 Baixas Doses	191,9 ± 34,46 (n=10)	381,8 ± 49,42 (n=10)	91,05 (74,70 ; 107,40)
G3 Doses Efetivas	176,6 ± 46,09 (n=12)	361,0 ± 64,36 (n=12)	102,2 (82,05 ; 115,3)
G4 Dicofol	180,3 ± 30,97 (n=6)	375,4 ± 31,57 (n=6)	97,40 (90,40 ; 131,8)
G5 Diclorvós	142,7 ± 4,34 (n=6)	365,3 ± 23,36 (n=6)	163,0 (128,0 ; 177,6)
G6 Permetrina	143,4 ± 16,22 (n=6)	364,4 ± 9,62 (n=6)	163,0 (134,6 ; 171,9)
G7 Endosulfan	144,0 ± 9,92 (n=6)	342,0 ± 29,97 (n=6)	139,2 (109,9 ; 167,0)
G8 Dieldrin	143,7 ± 13,57 (n=6)	349,7 ± 18,97 (n=6)	140,2 (128,3 ; 164,9)

¹Dados estão expressos na forma de média ± desvio-padrão; ²Valores expressos em mediana e quartís; *p < 0,001 (Teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes); G1 < G5, G6, G8, p < 0,05 (Teste de Dunn); G2 < G5, G6, G8, p < 0,05 (Teste de Dunn); G3 < G5, G6, p < 0,05 (Teste de Dunn).

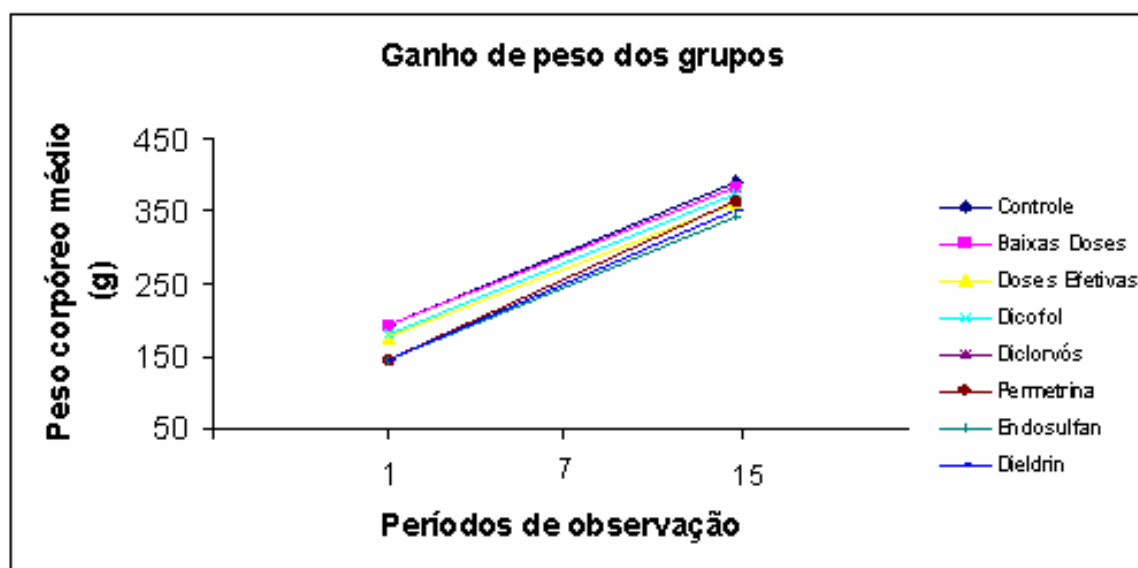


Figura 2 - Evolução de peso corpóreo médio dos grupos experimentais ao longo do experimento.

2. Consumo de água e ração

A Tabela 2 e as Figuras 3 e 4 indicam os valores do consumo estimado de água (ml/rato/dia) e ração (g/rato/dia) pelos diferentes grupos durante o experimento.

Os animais dos grupos G2 e G3 apresentaram consumo médio estimado de água menor, quando comparados aos do grupo G1, enquanto os demais grupos tratados com os praguicidas individuais apresentaram consumo que não diferiram do grupo G1 (Tabela 2).

O consumo médio estimado de ração dos animais dos grupos G3 e G7 foi menor quando comparado aos dos animais do grupo G1, enquanto os animais do grupo G6 tiveram o consumo acima dos animais do grupo G1 (Tabela2).

Tanto para o consumo de água como o de ração, a magnitude das diferenças observadas sugere que os tratamentos com as diferentes rações não influenciaram de modo significativo estes parâmetros.

Tabela 2 - Consumo diário estimado de água e ração pelos animais ao longo do estudo¹.

Grupos	Número efetivo de animais	Consumo de água (ml/rato/dia)	Consumo de ração (g/rato/dia)
G1 Controle	10	18,65 ± 1,21	18,03 ± 0,27
G2 Baixas Doses	10	17,31 ± 0,34	18,29 ± 0,50
G3 Doses Efetivas	12	16,33 ± 2,73	16,75 ± 2,05
G4 Dicofol	6	18,53 ± 1,18	17,69 ± 0,10
G5 Diclorvós	6	18,29 ± 0,37	17,81 ± 0,68
G6 Permetrina	6	18,86 ± 0,39	20,19 ± 0,43
G7 Endosulfan	6	18,66 ± 1,02	15,83 ± 0,14
G8 Dieldrin	6	17,98 ± 1,05	18,45 ± 0,16

¹Dados expressos na forma de média ± desvio-padrão

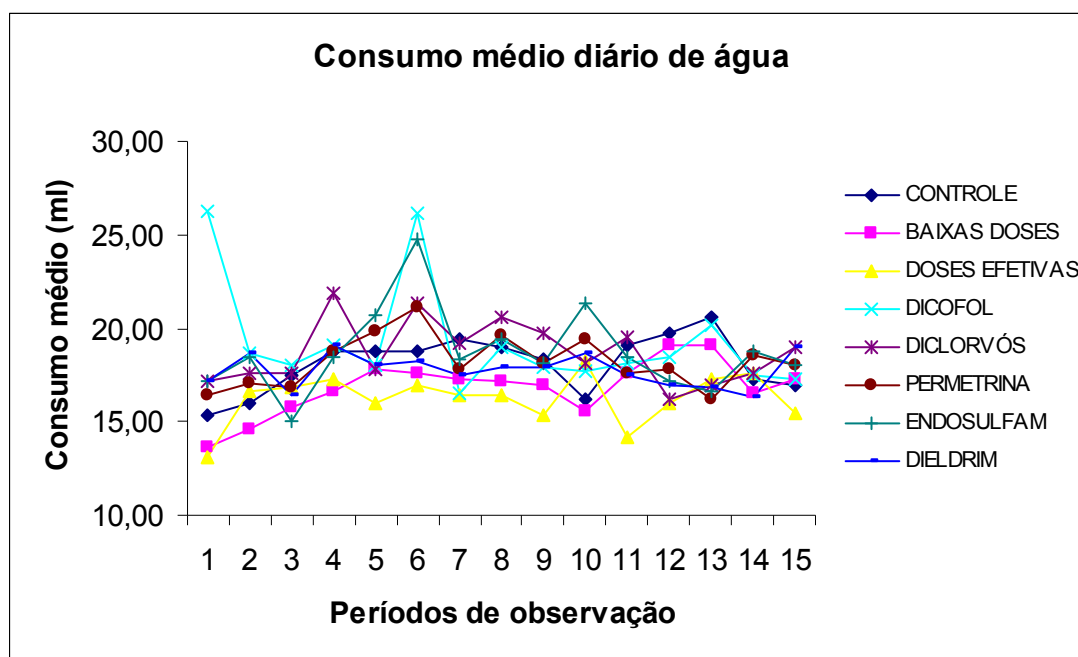


Figura 3 - Consumo médio de água dos animais dos diferentes grupos ao longo do experimento.

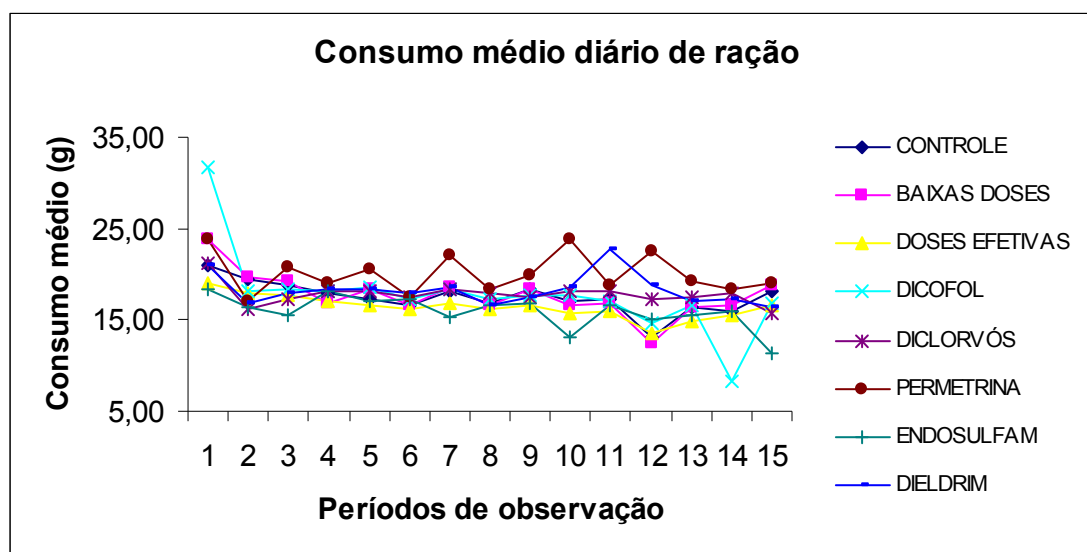


Figura 4 – Consumo médio de ração dos animais dos diferentes grupos ao longo do experimento.

3. Pesos absoluto e relativo dos órgãos

As Tabelas 3 e 4 mostram os valores médios dos pesos absoluto e relativo dos órgãos coletados dos diferentes grupos experimentais ao final do experimento.

Os pesos médios absoluto e relativo das próstatas dos grupos G5, G6, G7 e G8 apresentaram-se significativamente maiores que os do grupo G1. Os pesos médios dos outros órgãos não se mostraram alterados nos diferentes grupos experimentais quando comparados ao grupo G1 (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Pesos absolutos (g) de órgãos coletados ao final do experimento dos diferentes grupos experimentais.

Órgãos	G1	G2		G3		G4	G5	G6	G7	G8
	CONTROLE	BAIXAS DOSES		DOSES EFETIVAS		DICOFOL	DICLORVÓS	PERMETRINA	ENDOSULFAN	DIELDRIN
Próstata ^(*)	0,34 ± 0,13	0,43 ± 0,84		0,41 ± 0,14		0,45 ± 0,07	0,54 ± 0,04	0,54 ± 0,06	0,59 ± 0,05	0,55 ± 0,07
Epidídimo Esquerdo ^(**)	0,48 (0,04)	0,47 (0,05)		0,45 (0,10)		0,46 (0,04)	0,45 (0,07)	0,47 (0,09)	0,43 (0,12)	0,42 (0,05)
Testículo Esquerdo ^(**)	1,31 (0,14)	1,32 (0,12)		1,24 (0,34)		1,28 (0,11)	1,28 (0,31)	1,31 (0,16)	1,26 (0,54)	1,27 (0,17)
Fígado ^(**)	13,75 (1,84)	13,29 (1,59)		14,19 (3,80)		14,95 (2,94)	13,48 (0,83)	12,37 (2,92)	13,61 (2,10)	10,83 (1,62)
										0,001⁽¹⁾
										0,186
										0,581
										0,041⁽²⁾

(*) ANOVA ($\alpha = 0,05$). Valores expressos em média e desvio-padrão; (**) Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$) Valores expressos em mediana e intervalo interquartil; (1) G1 < G5, G6, G7, G8 (p < 0,05 – teste de Bonferroni); (2) G3 > G8; G4 > G8 (p < 0,05 – teste de Dunn).

Tabela 4 – Pesos relativos (%)* de órgãos coletados ao final do experimento dos diferentes grupos experimentais.

ÓRGÃOS	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	P<
	CONTROLE	BAIXAS DOSES	DOSES EFETIVAS	DICOFOL	DICLORVÓS	PERMETRINA	ENDOSULFAN	DIELDRIN	
Próstata	8,77 ± 3,53	11,24 ± 1,33	11,07 ± 2,69	12,36 ± 2,90	14,97 ± 1,92	14,91 ± 1,40	17,39 ± 2,10	15,86 ± 2,65	0,001^{(1)(a)}
Epidídimo Esquerdo	12 (12;13)	12 (12;13)	13 (13;13)	13 (12;13)	13 (13;14)	12 (11;13)	12 (11;13)	13 (12;13)	0,818 ⁽²⁾
Testículo Esquerdo	34 (33;35)	34 (34;37)	35 (33;36)	35 (34;36)	35 (35;36)	35 (32;36)	34 (26;37)	37 (35;39)	0,862 ⁽²⁾
Fígado	354 (337;368)	351 (345;357)	385 (363;404)	384 (375;401)	351 (318;392)	373 (363;381)	390 (360;425)	318 (307;323)	0,001^{(2)(b)}

*Valores de peso relativo de órgãos x10⁻⁴; (1) ANOVA, $\alpha = 0,05$. Valores expressos em média e desvio-padrão; (2) Kruskal-Wallis, $\alpha = 0,05$. Valores expressos em mediana e quartis; (a) G1<G5,G6,G7,G8 ; G2<G7,G8; G3<G7,G8; G4<G7,G8; G5<G7,G8; G6<G7,G8; G7<G8; G8<G7,G8; (b) G3,G4,G7 > G8 (Teste de Dunn, $\alpha = 0,05$).

4. Dosagens Hormonais

Os níveis plasmáticos de FSH, LH e testosterona não apresentaram diferenças significativas entre os oito grupos experimentais estudados (Tabela 5).

Tabela 5 – Concentrações plasmáticas (em ng/ml) dos hormônios FSH, LH e testosterona.

Grupos Experimentais	Concentração Plasmática de Testosterona (ng/ml)*		
	FSH	LH	Testosterona
G1 Controle	6,32±1,13 (n=8)	6,59±1,59 (n=7)	0,46±0,08 (n=8)
G2 Baixas Doses	5,58±0,37 (n=10)	5,63±0,51 (n=10)	1,18±0,55 (n=10)
G3 Doses Efetivas	6,88±1,02 (n=12)	3,51±0,50 (n=11)	1,21±0,26 (n=12)
G4 Dicofol	4,76±0,52 (n=6)	4,28±0,46 (n=6)	0,63±0,18 (n=6)
G5 Diclorvós	5,98±0,36 (n=5)	2,96±0,77 (n=5)	0,79±0,69 (n=5)
G6 Permetrina	5,91±0,70 (n=6)	5,73±0,79 (n=5)	0,40±0,18 (n=6)
G7 Endosulfan	6,98±0,45 (n=6)	3,98±1,09 (n=4)	0,92±0,27 (n=6)
G8 Dieldrin	8,56±1,27 (n=5)	4,89±0,07 (n=4)	0,68±0,18 (n=5)

*Valores expressos em média ± EPM. Teste ANOVA, com teste *a posteriori* de Bonferroni.

5. Achados macroscópicos

Nenhuma alteração macroscópica relevante foi observada durante a remoção dos órgãos eleitos.

6. Achados histopatológicos

Os principais achados histopatológicos nos fígados, testículos e epidídimos dos animais dos diferentes grupos experimentais estão apresentados respectivamente nas Tabelas 6 e 7.

No fígado foram observadas hiperplasia de ductos biliares (Figura 5), hipertrofia centrolobular (Figura 6.a e 6.b) e esteatose. A Tabela 6 apresenta as incidências destas alterações. A hiperplasia de ductos biliares e a hipertrofia centrolobular não foram registradas no grupo controle, mas ocorreram em incidências significativamente aumentadas em quase todos os grupos tratados. A apoptose, evidenciada morfológicamente por “corpos apoptóticos”, foi um fenômeno raro. A esteatose ocorreu em todos os grupos, com incidência variável e não significativa.

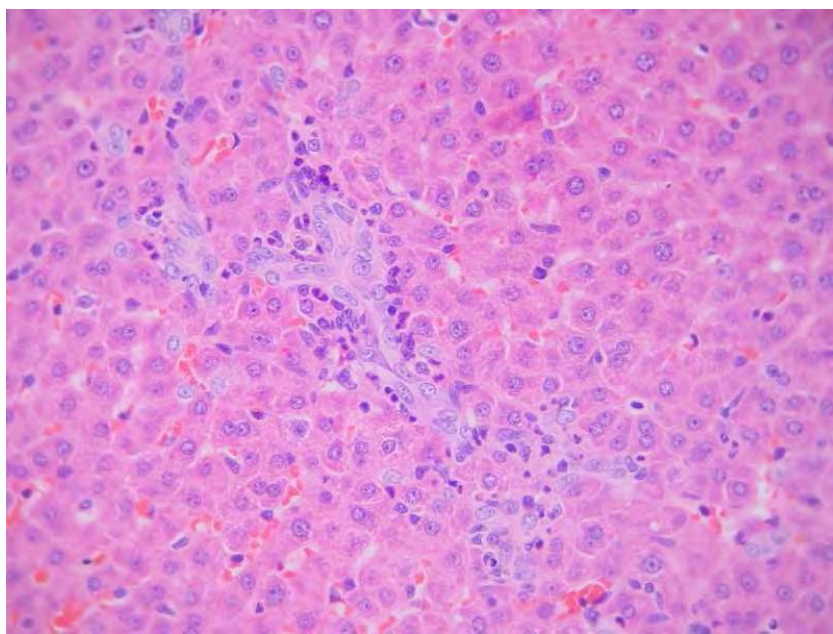


Figura 5 - Fígado com hiperplasia focal de ductos biliares (HE, 400x).

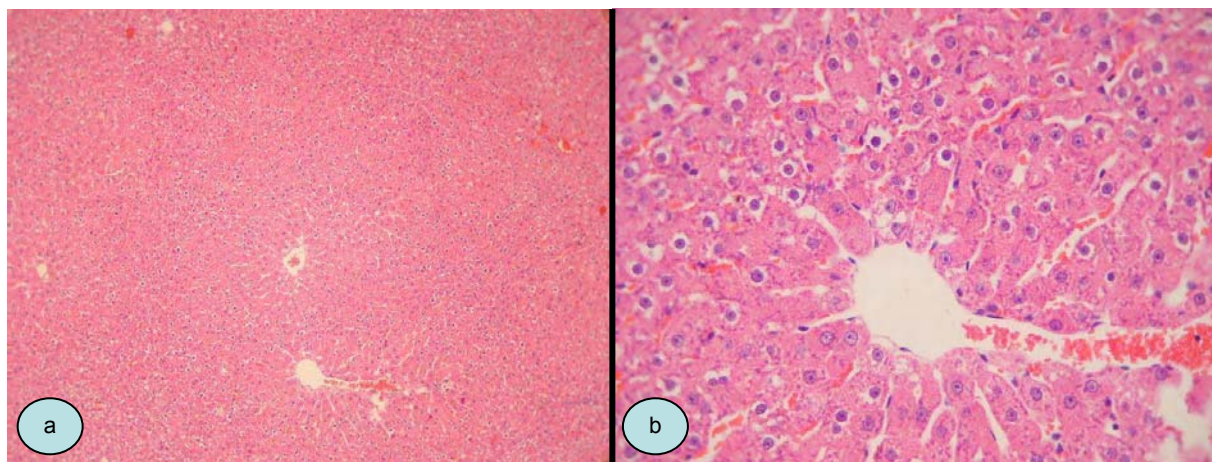


Figura 6 – a) Fígado com hipertrofia de hepatócitos centrolobulares (HE, 50x). b) HE, 400x.

Nos testículos ocorreram orquite inflamatória, debulhamento de células germinativas (Figura 7.a), hipoplasia tubular (Figura 7.b) e aplasia testicular com conseqüente azoospermia (Figura 8). Embora a incidência destas alterações estivesse relativamente aumentada em alguns grupos tratados, em nenhum deles

este aumento foi significativo. A orquite granulomatosa ocorreu em um animal do grupo controle, provavelmente devido a trauma por queda durante procedimento de pesagem. As múltiplas comparações entre os grupos não detectaram diferenças significativas entre eles. A análise do interstício testicular e do epidídimo não revelou alterações em nenhum dos grupos.

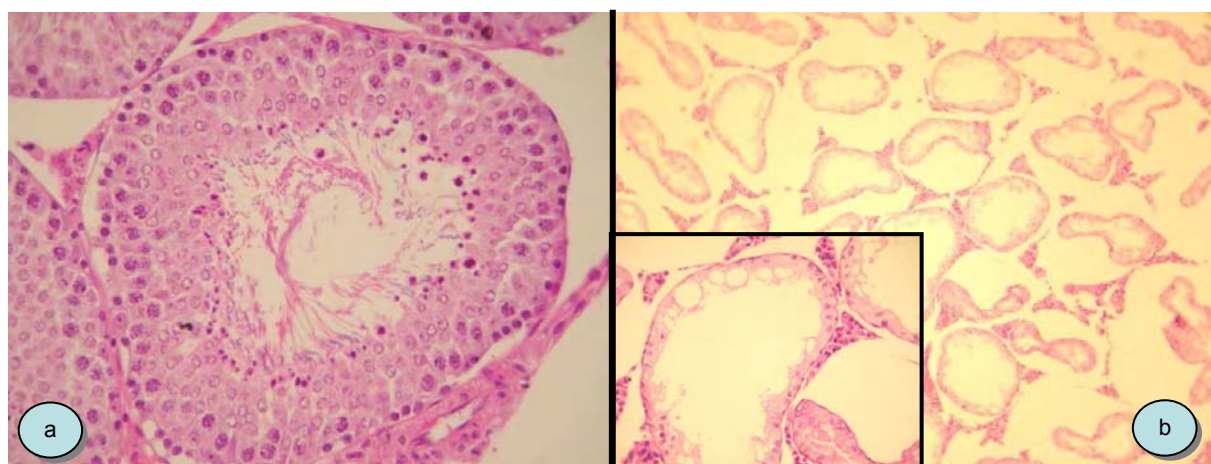


Figura 7 - a) Túbulo seminífero com discreto “debulhamento” de células germinativas (HE, 400x). b) Túbulos seminíferos com desaparecimento da camada germinativa (azoospermia intratubular). (HE, 100x). *Insert*: Detalhe do túbulo seminífero com desaparecimento da camada germinativa. (HE, 400x).

Os demais órgãos coletados não apresentaram alterações histológicas relevantes.

Tabela 6 – Incidência (%) de alterações histológicas no fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Número efetivo de animais	Hipertrofia centrolobular	Hiperplasia de ductos biliares	Apoptose	Esteatose
G1 Controle	10	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (20)
G2 Baixas Doses	10	8 (80)**	5 (50)*	0 (0)	7 (70)
G3 Doses Efetivas	12	12 (100)**	7 (58)**	0 (0)	6 (50)
G4 Dicofol	6	6 (100)**	3 (50)**	1 (17)	4 (67)
G5 Diclorvós	6	6 (100)**	4 (67)	0 (0)	4 (67)
G6 Permetrina	6	6 (100)**	3 (50)**	0 (0)	3 (50)
G7 Endosulfan	6	5 (83)	3 (50)**	0 (0)	2 (33)
G8 Dieltrin	6	5 (83)	4 (67)	2 (33)	2 (33)

* p<0,05; **p< 0,005

Tabela 7 – Incidência (%) de alterações histológicas dos testículos e epidídimos dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Número efetivo de animais	Testículos					Epidídimos
		Hipoplasia tubular	Aplasia testicular	Azoospermia	Debulhamento de células germinativas	Orquite granulomatosa	
G1 Controle	10	1 (0)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1 (10)	Azoospermia
G2 Baixas Doses	10	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (100)	0 (0)	
G3 Doses Efetivas	12	4 (33,3)	1 (8,3)	1 (8,3)	11 (91,7)	0 (0)	
G4 Dicofol	6	4 (66,7)	0 (0)	0 (0)	4 (66,7)	0 (0)	
G5 Diclórvos	6	4 (66,7)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	0 (0)	
G6 Permetrina	6	3 (50)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	0 (0)	
G7 Endosulfan	6	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	4 (66,7)	0 (0)	
G8 Dieldrin	6	1 (16,7)	0 (0)	0 (0)	4 (66,7)	0 (0)	

(a) Aplasia acompanhada de azoospermia e debris celulares.

7. Proliferação epitelial na próstata

A Tabela 8 e a Figura 8 mostram o número médio de células epiteliais PCNA positivas/campo (Figura 9) em cada grupo experimental. Apenas o grupo tratado com a mistura das doses efetivas (G3), apresentou aumento significativo em relação ao grupo controle.

Tabela 8 - Número médio de células epiteliais PCNA+ por campo e por grupo.

Grupos	n	Média ± Desvio padrão	Teste de Bonferroni ($\alpha = 0,05$)
G1 Controle	9	14,36 ± 5,83	b
G2 Baixas Doses	10	20,19 ± 8,14	ab
G3 Doses Efetivas	12	29,02 ± 12,00	a
G4 Dicofol	6	20,53 ± 8,28	ab
G5 Diclorvós	6	12,21 ± 9,55	b
G6 Permetrina	6	20,83 ± 5,85	ab
G7 Endosulfan	6	21,96 ± 7,20	ab
G8 Dieldrin	6	23,68 ± 12,62	ab

p = 0,013 (ANOVA para amostras independentes); Graus de liberdade residual = 53.

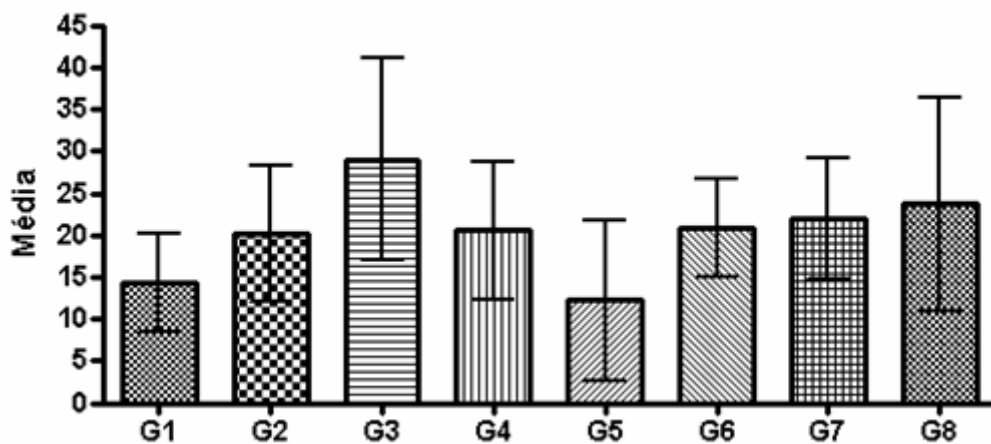


Figura 8 – Próstata; número médio de células epiteliais PCNA+/campo/grupo.

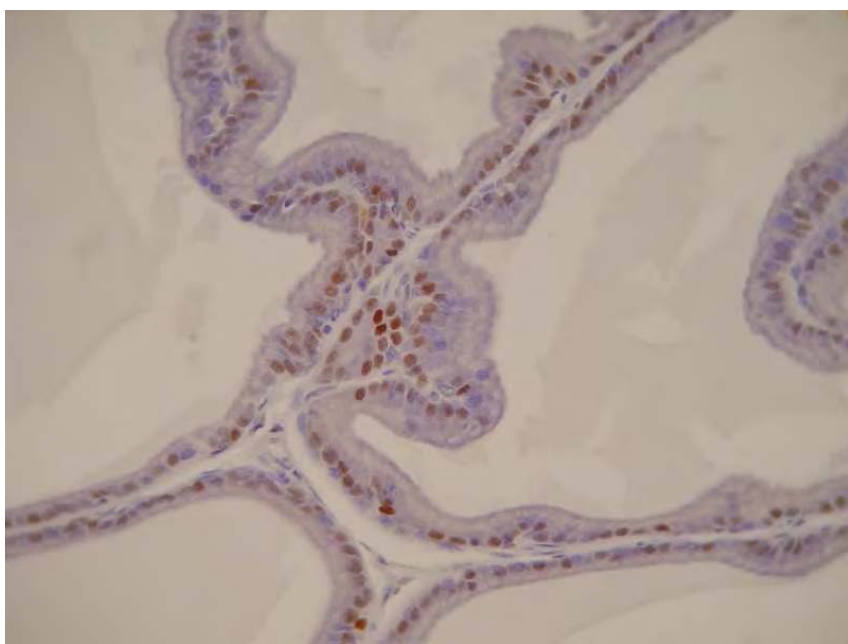


Figura 9 – Próstata com células epiteliais positivas para PCNA. Reação imunoistoquímica com anti-PCNA. (400x).

DISCUSSÃO

De modo geral, o presente estudo mostra que a exposição via ração durante 8 semanas de ratos Lewis adultos jovens à misturas de praguicidas, ou a cada um dos mesmos praguicidas em separado, leva à alterações do peso da próstata e de sua cinética epitelial, à perturbação da espermatogênese e à algumas alterações morfológicas no fígado.

Não ocorreu comprometimento do ganho de peso corpóreo e de ingestão de água e ração pelos diferentes grupos durante todo o período experimental, mostrando que nem as misturas (grupos G2 e G3), nem os praguicidas individuais, exerceram impacto sobre esses parâmetros que poderiam traduzir comprometimento sistêmico das exposições químicas estabelecidas. Embora os animais dos grupos G5, G6 e G8 tenham apresentado ganho significativamente maior de peso em relação ao grupo controle G1, afastamos a possibilidade de comparação entre eles, pois, esses animais iniciaram o período experimental com peso inferior aos demais grupos e estavam em fase de crescimento rápido.

O aumento do peso da próstata ocorreu de modo significativo nos grupos expostos separadamente aos praguicidas diclorvós (G5), permetrina (G6) e endosulfan (G7) e dieldrin (G8). Embora os animais tratados com cada mistura (G2 e G3) ou com o dicofol isoladamente (grupo G4) não tenham apresentado aumento estatisticamente detectável do peso da próstata, como pode ser observado nas Tabelas 3 e 4, seus valores médios se aproximaram muito dos valores dos grupos que apresentam diferença significativa. Os desvios padrão das médias desses grupos foram altos, sugerindo que a resposta desses animais foi muito heterogênea, aproximando-os mais dos grupos com aumento dos pesos do que do grupo controle

(G1). Esta variabilidade de respostas pode ser dependente dos tratamentos, mas pode ser levantada a hipótese de que o delineamento experimental tenha modulado os presentes resultados. Assim, existe a possibilidade de a duração do experimento ter sido demasiadamente curta, de modo que as alterações dependentes dos tratamentos não se manifestaram de forma homogênea e significativa, ou seu início ocorreu relativamente tarde, com os animais já adultos jovens e com a maturação sexual já definida. De fato, essas possibilidades não são mutuamente exclusivas, devendo ser consideradas na análise de todos os fenômenos registrados neste estudo.

Levando-se em conta que a toxicidade de determinadas substâncias é facilmente indicada por modificações dos pesos de órgãos (34-36), a verificação do aumento do peso prostático registrado neste estudo é de extrema importância, pois sugere que as substâncias testadas exerceram ação agonista androgênica, já que potencializaram o crescimento de um órgão andrógeno-dependente.

Aumento do peso de órgãos pode resultar de edema, inflamação, acúmulo de substâncias anômalas, tumores, e, já que nenhuma dessas alterações foi verificada no presente caso, de proliferação celular contínua. A atividade proliferativa prostática foi avaliada utilizando-se a expressão do PCNA (*proliferating cell nuclear antigen* = antígeno nuclear de células proliferantes), que é uma proteína que atua como co-fator da DNA polimerase- γ , importante para o processo de síntese de DNA (37-39). A síntese dessa proteína tem início no final da fase G1 e seu pico na fase S do ciclo celular, mas também pode ser observada nas fases G2 e M. A quantificação de células expressando o PCNA permite estimar a fração de crescimento (células comprometidas com a mitose) de determinado tecido (40).

Apenas o grupo tratado com a mistura das doses efetivas (G3) demonstrou aumento significativo do número de células PCNA+ em relação aos outros grupos (Tabela 8 e Figura 9). No entanto, com exceção do grupo exposto ao diclorvós (G5), todos os outros apresentaram número médio bem acima do grupo controle, sugerindo que todos os praguicidas, e mesmo a mistura “em baixas doses”, exerceram estímulo sobre a proliferação celular na próstata. Estas observações estão de acordo com as observações sobre o aumento do peso médios deste órgão nos diferentes grupos, discutido atrás. Além disso, justificam a dificuldade de encontro de células expressando a caspase-3 clivada, que é uma marcadora da apoptose, pois o efeito biológico marcante foi o da proliferação celular contínua, sem oportunidade, pelo menos durante os tratamentos, de ocorrer a morte celular programada.

Nos machos, o principal hormônio envolvido no controle das funções reprodutivas é a testosterona. As secreções endócrinas do hipotálamo, hipófise anterior e gônadas controlam o sistema reprodutor masculino. 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 espermatozóides no epidídimo e, conseqüentemente, para a fertilidade (41).

Os resultados deste experimento não mostraram qualquer diferença significativa entre os grupos quanto aos níveis plasmáticos de LH, FSH e

testosterona. Wade et al. (42) não observaram alterações nos níveis de LH e FSH de ratos adultos submetidos a 70 dias de tratamento com uma mistura de organoclorados e metais. Foster et al. (43) também não observaram alterações nos níveis séricos de LH e de testosterona, em ratos Sprague-Dawley adultos expostos por 28 dias ao TCPM-OH ou Tris(4-chlorophenyl)methanol, um contaminante ambiental cuja estrutura molecular é semelhante a dos praguicidas dicofol e DDT (40).

Nos testículos, as incidências de “debulhamento” de células germinativas em todos os grupos tratados foram consideravelmente altas, embora não de modo significativo e pode estar sugerindo que os praguicidas testados interferem no processo de maturação dos gametas. Traina et al (44), observaram a mesma situação de esfoliação das células germinativas para a luz do túbulo em animais tratados com o antitumoral lonidamine. Nesta linha, vários animais dos diferentes grupos apresentaram focos de hipoplasia tubular isolada, sendo que dois deles, de diferentes grupos (G3 e G7) apresentaram degeneração da camada germinativa, acompanhada de azoospermia e *debris* celulares na luz de todos os túbulos seminíferos e do epidídimo. A incidência destas lesões não diferiu de modo significativo entre os grupos, o que limita quaisquer conclusões sobre o papel dos praguicidas na sua instalação.

De qualquer modo, deve ser referido que a análise funcional da espermatogênese desses animais, desenvolvida por pesquisadores colaboradores deste estudo, revelou prejuízo significativo da motilidade dos espermatozóides nos grupos tratados com as misturas em doses baixas (G2) e efetivas (G3), bem como nos grupos expostos ao dicofol (G4) e dieldrin (G8). Isto sugere efeito estressor dos

agentes químicos estudados sobre o epidídimo, que é o órgão envolvido com a aquisição de motilidade e capacidade fértil dos gametas masculinos (45).

O fígado tem como uma de suas funções principais a manutenção da homeostasia metabólica incluindo, por exemplo, síntese de proteínas séricas, hormônios e biotransformação de substâncias endógenas e xenobióticas com posterior liberação de metabólitos na corrente sanguínea (46). Assim, sua avaliação é crítica em estudos da toxicidade de xenobióticos, aos quais este órgão pode reagir desenvolvendo alterações não-proliferativas e proliferativas (28, 47). Nossos resultados histológicos mostram incidência elevada de alterações hepáticas, como a hipertrofia centrolobular e a hiperplasia de ductos biliares em animais de todos os grupos tratados, seja com as misturas ou com os praguicidas individuais. A hipertrofia centrolobular traduz a capacidade de indução enzimática hepática pelos tratamentos efetuados, já que os hepatócitos desta região são responsáveis por maior parte das reações de biotransformação levada a efeito pelo fígado (48, 49). A alta incidência de hiperplasia dos ductos biliares encontrada em todos os grupos tratados pode ter sido causada pela administração dos praguicidas, confirmando a descrição de Casarett e Doull's (50), que observaram o aparecimento de hiperplasia, fibrose ou destruição dos ductos biliares após administração crônica de substâncias tóxicas, colestase extra-hepática por cálculos, cirurgia e vermes.

Em resumo, o modelo utilizado permitiu verificar que os praguicidas estudados, individualmente ou em misturas em “doses baixas” e em “doses efetivas”, provocam alterações variadas na próstata, testículos e fígado. Assim, a mistura “baixas doses”, constituída com os praguicidas em nível de seus NOEL, não diferiu, *grosso modo*, dos efeitos verificados com a mistura “doses efetivas”, em que os praguicidas foram adicionados em níveis de LOEL/LOAEL. Como referido atrás,

questões de delineamento, como idade dos animais e duração do experimento, podem ter influenciado os resultados, reduzindo a magnitude e significância das alterações encontradas. A partir dessas observações novos ensaios poderão ser adequadamente delineados e desenvolvidos para explorar os modos e mecanismos da ação interferente que se estabeleceu nas condições do experimento desenvolvido.

REFERÊNCIAS

1. Yang RAS. Some critical issues and concerns related to research advances on the toxicology of chemical mixtures. *Environ Health Perspec* 1998; 106:1059-1063.
2. Viau C. Biological monitoring of exposure to mixtures. *Toxicol Lett* 2002; 134:9-16.
3. Mantovani A. Risk assessment of endocrine disrupters: the role of toxicological studies. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1076:239-252.
4. 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.
5. Yang RAS. Toxicologic interactions of chemical mixtures. In: Bond J. (editor) *Comprehensive Toxicology*. Oxford: Elsevier; 1997. v.1, p.189-203.
6. 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/. Acessado em 26/ago/2005.
7. Massaad C, et al. How can chemical compounds alter human fertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 100:127-137.
8. Mendes JJA. The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food Chem Toxicol* 2003; 40:65-71.

9. 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.
10. Heley DV, Korach KS. Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. *Endocrinology* 2006; 147:25-32.
11. 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.
12. USEPA (United States Environmental Protection Agency). EPA/600/R-98/087: Research Plan for Endocrine Disruptors. Washington: USEPA; 1998.
13. EDSTA (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee). EPA/743/R-98/003: Final Report. Washington: USEPA; 1998.
14. Gray LE, et al. Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing. Filling key data gaps. *Toxicology* 2002; 27:371-382.
15. Marty MS, Crissman JW, Carney EW. Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17 β -estradiol, steroid biosynthesis inhibitors, and a thyroid inhibitor. *Toxicol Sci* 1999; 52:269-277.
16. 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.
17. 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.
18. Clode AS. Assessment of in vivo assays for endocrine disruption. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20:35-43.

- 19.FAO/WHO. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex maximum limits for pesticide residues. 2nd ed. Rome: FAO/WHO; 1986. v.13.
- 20.WHO/FAO.INCHEM. Evaluation of some pesticides residues in food. Dieldrin. WHO/Food ADD/71.42. Geneva:WHO/FAO; 1970. p.1-32. Disponível em www.inchen.org/documents/. Acessado em 12/jun/2005.
- 21.WHO/FAO. Data sheets on pesticides. Endosulfan, n. 92. Geneva: WHO/FAO; 1989. p. 1-15. Disponível em www.inchen.org/documents/. Acessado 12/abr/2004.
- 22.WHO/FAO. Data sheets on pesticides. Dicofol, n.81. Geneva: WHO/FAO; 1996. p. 1-13. Disponível em www.inchen.org/documents/. Acessado em 12/abr/2004.
- 23.USEPA (United States Environmental Protection Agency). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD). Dichlorvos. Washington: USEPA; 1993. Disponível em www.epa.gov/iris. Acessado em 12/dez/2005.
- 24.USEPA (United States Environmental Protection Agency). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD). Permethrin. Washington: USEPA; 1992. Disponível em www.epa.gov/iris. Acessado em 12/dez/2005.
- 25.WHO ([World Health Organization](http://www.who.org)). Principles in governing consumer safety in relation to pesticides residues. WHO Tech Rep Ser 1962; 240:1-18.
- 26.Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes an eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's Fluid. Toxicol Pathol 2002; 30:524-533.

27. Maronpot RR, Montgomery CAJ, Boorman GA, McConnell EE. National toxicology program nomenclature for hepatoproliferative lesions of rats. *Toxicol Pathol* 1986; 14:263-273.
28. Goodman DG, Maronpot RR, Newberne PM, Popp JA, Squire RA. Proliferative and selected other lesions of the liver of rats. GI-5. In: *Guides for Toxicologic Pathology*. Washington: STP/ARP/AFIP; 1994. p.2-24.
29. Bosland MC, Tuomari DL, Elwell MR, Shirai T, Ward JM, McConnell RF. Proliferative lesions of the prostate and other accessory sex glands in male rats, URG-4. In: *Guides for Toxicologic Pathology*. Washington: STP/ARP/AFIP; 1998. p.2-20.
30. Suwa T, et al. A retrospective analysis of background lesions and tissue accountability for male accessory sex organs in Fischer-344 rats. *Toxicol Pathol* 2001; 29:467-478.
31. Foley GL. Overview of male reproductive pathology. *Toxicol Pathol* 2001; 29:49-63.
32. Creasy DM. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol Pathol* 2001; 29:64-76.
33. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981; 29:577-580.
34. Metzдорff 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.
35. Rani S, et al. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicol Pathol* 2007; 35:751-755.

36. Michael B, et al. Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicol Pathol* 2007; 35:742-750.
37. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- γ . *Nature* 1887; 326:515-517.
38. Prelich G, et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase- γ auxiliary protein. *Nature* 1887; 326:517-520.
39. McCormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 1992; 21:591-594.
40. Foley JF, Ton T, Maronpot R, Butterworth B, Goldsworthy TL. Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats. *Environ Health Perspec* 1993; 101:199-206.
41. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. O sistema reprodutor. In: *Farmacologia*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2001; p 130-131.
42. Wade MG, et. al. Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune and reproductive effects. *Toxicol Sci* 2002; 67:131-143.
43. Foster W, Desaulniers D, Leingartner K, Wade MG, Poon R, Chu I. Reproductive effects of tris(4-chlorophenyl)methanol in the rat. *Chemosphere* 1999; 39:709-724.
44. Traina ME, Guarino M, Romeo A, Urbani E. Lonidamine affects testicular steroid hormones in immature mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 221:95-101.
45. Perobelli JE. Monografia: Mistura de praguicidas em baixas doses: avaliação da toxicidade reprodutiva em ratos Lewis machos. [Monografia] Botucatu: Instituto de Biociências, UNESP; 2007.

46. Robbins SL, Cotran RS. Pathologic bases of disease. 7th ed. São Paulo: Elsevier; 2005. 1552p.
47. Hardisty JF, Brix AE. Comparative hepatic toxicity: prechronic/chronic liver toxicity in rodents. *Toxicol Pathol* 2005; 33:35-40.
48. Hodgson E. Induction and inhibition of pesticide-metabolizing enzymes: role in synergism of pesticides and pesticide action. *Toxicol Ind Health* 1999; 15:6-11.
49. Hodgson E, Rose RL, Ryu DY, Falls G, Blake PL, Levi PE. Pesticide-metabolizing enzymes. *Toxicol Lett* 1995; 82/83:73-81.
50. Casarett LJ, J Doull's. Toxicology - The basic science of poisons. Edited by: Klaassen, CD. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. 1236p.