UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

INFLUÊNCIA DA MISTURA DE CINCO PRAGUICIDAS EM BAIXAS DOSES SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY, WISTAR E LEWIS

Mestranda : Viviane Mattos Pascotto
Orientadora: Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha
Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Adriene da Silva Franchi

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
2011

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

Pascotto, Viviane Mattos.

Influência da mistura de cinco praguicidas em baixas doses sobre o sistema reprodutor de ratas Sprague-Dawley, Wistar e Lewis / Viviane Mattos Pascotto. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Noeme de Sousa Rocha

Co-orientador: Carla Adriene da Silva Franchi

Capes: 40105008

1. Rato. 2. Reprodução animal. 3. Pesticidas.

Palavras-chave: Desregulação endócrina; Multilinhagens; Mistura de praguicidas; Sistema reprodutivo de fêmeas.

Dedicatória

Aos meus pais Josefina e Valdir que por muitas vezes abriram mão de seus objetivos para lutar pelos meus. Obrigada pelo apoio, encorajamento, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces da minha história.

À minha irmã Juliana, por sempre me ensinar a ser uma pessoa melhor, pelo apoio e incentivo. Obrigada por fazer parte da minha vida e por me aguentar quando estava com um humor tão instável.

Ao Rodrigo, com amor, admiração e gratidão, por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho e durante os dez anos de convivência.

A vocês dedico mais esta conquista e meu amor!!

Agradecimentos especiais

À Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha, obrigada por me aceitar como orientada e por estar disponível, sempre que possível, para me ajudar.

À Profa. Dra. Carla Adriene da Silva Franchi, pelo empenho, pela amizade, paciência e credibilidade, obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo, pela confiança, disponibilidade e por abrir as portas do laboratório TOXICAM (Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental Sobre a Saúde Humana) para que esse trabalho fosse desenvolvido.

Agradecimentos

À Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos e permitir que este trabalho se tornasse possível.

À todos os familiares que de muitas formas me incentivaram para a concretização deste trabalho. Principalmente aos meus avós Vicente, Maria, Joana e "Dona Lourdes" e minha madrinha Jenny. Vocês são exemplos de vida!

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 mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo suporte financeiro que permitiu a realização do projeto. Processo nº 2006/60506-1.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo suporte financeiro que permitiu a realização do projeto. Processo nº 472330/07-1.

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

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

À Mara e ao Paulo, pelo apoio no preparo do material para análise histológica e pela amizade.

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

Aos funcionários do Laboratório de Imunoistoquímica especialmente ao Marcos, 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 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: Iza, Alexandre, Gabrielli, Marize, Meire, Mitscheli e especialmente à Merielen, João Francisco e Tony, pelas sugestões e ajuda na formatação desse trabalho. A todos vocês o meu muito obrigada!

À Ana Paula (E. coli), que compartilhando expectativas, alegrias e ansiedades, soube cultivar uma amizade que com o tempo

amadureceu. Agradeço pelas palavras de apoio, incentivo e pelo seu carinho.

À Bianca que mesmo à distância continua me auxiliando nas correções do inglês e torcendo pela minha conquista, obrigada pela amizade.

À Shadia, pelas sugestões, pela paciência ao clarear minhas dúvidas, disponibilidade e amizade.

À Ana Paula (Buzuza), pela atenção com que sempre me ouve, pelas sugestões, pelo agradável convívio e principalmente pela amizade.

À Marina, pela disponibilidade e ajuda imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e torcida para que minhas ratas entrassem em estro!

Às amigas de longa data, que não esquecerei jamais: Manoela e Maria Teresa, por torcerem pelo meu sucesso e por me oferecerem sempre um abraço carinhoso nos nossos reencontros.

À Luciana, pela convivência, pelo incentivo e desabafos, pelo apoio nos bons e maus momentos e principalmente pela grande amizade.

Á Ana Luisa, pela amizade e pelas boas vibrações.

Á Fátima, pelo incentivo na carreira científica e pela amizade.

À Denise, pelos conselhos, risadas e pela amizade.

Aos amigos de São Manuel: Tony, Cíntia, Amanda, Anderson (Nino), Rafael, Kelly, Cristiano (Mou), Carol, Ariane (Nika) e Marco. Obrigada pela torcida e pelos momentos de descontração!

Enfim, à todos os amigos e colegas de ontem, hoje e sempre, que ficarão guardados do lado esquerdo do peito: Ana Raquel, Kelly, Giseli (Rubinha), Spyke (Marcão), as meninas do Laboratório de Biologia Molecular, Suzane, Aline, Carol, Olívia, e muitos outros, impossíveis de listar aqui.

Finalmente, á todos que de alguma forma contribuíram durante o desenvolvimento do meu mestrado.

Sumário

1. Desreguladores endócrinos 1

2. Praguicidas 5

2.1. Organoclorados 8

2.1.1. Dicofol 8

2.1.2. Dieldrin 9

2.1. 3. Endosulfan 10

2.2. Organofosforados 11

2.2.1. Diclorvos 11

2.3. Piretróides 12

2.3.1. Permetrina 12

3. Modelos experimentais para avaliação de agentes tóxicos sobre o sistema reprodutor feminino 14

4. Referências 15

INFLUÊNCIA DA MISTURA DE CINCO PRAGUICIDAS EM BAIXAS DOSES SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY, WISTAR E LEWIS 24

RESUMO 25

ABSTRACT 26

INTRODUÇÃO 27

MATERIAL E MÉTODOS 31

Praguicidas 31

Animais e condições experimentais 31

Formulação das rações com mistura dos praguicidas 32

Coleta de lavado vaginal e avaliação do ciclo estral 33

Análise hormonal 33

Análise morfométrica do útero 34

Processamento do ovário para marcação imunoistoquímica 34

Análise do ovário 35

Histopatologia 35

Análise estatística 35

RESULTADOS 37

DISCUSSÃO 41

CONCLUSÕES 49

REFERÊNCIAS 50

ANEXOS 64

Lista de Tabelas

Tabela 1. Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso das linhagens SD, Wistar e Lewis**. 58**

Tabela 2. Peso corpóreo final e pesos absoluto (g) e relativo (%) do fígado e pesos absoluto (mg) e relativo (%) dos ovários e útero das linhagens SD, Wistar e Lewis**. 59**

Tabela 3. Pesos absoluto (mg) e relativo (%) do útero e espessura do endométrio (μm) das linhagens SD, Wistar e Lewis**. 60**

Tabela 4. Duração e frequência das fases do ciclo estral da linhagem SD**..... 60**

Tabela 5. Duração e frequência das fases do ciclo estral da linhagem Wistar**. 61**

Tabela 6. Duração e frequência das fases do ciclo estral da linhagem Lewis.**..... 61**

Tabela7. Concentrações plasmáticas (em ng/ml) dos hormônios FSH, LH e progesterona das linhagens SD, Wistar e Lewis**..... 62**

Tabela 8. Folículos ovarianos e corpo lúteo da linhagem SD**. 62**

Tabela 9. Folículos ovarianos e corpo lúteo da linhagem Wistar**..... 63**

Tabela 10. Folículos ovarianos e corpo lúteo da linhagem Lewis**..... 63**

Revisão de Literatura

1. Desreguladores endócrinos

O sistema endócrino é composto por um conjunto de glândulas especializadas a qual fazem parte o hipotálamo, glândulas pituitárias, tireóide e paratireóide, adrenais, pâncreas e gônadas (testículos e ovários) e por mensageiros químicos também designados hormônios que exercem ação nas células alvo, e formam uma complexa rede de sinais e mensagens químicas que controlam funções e reações corporais de forma a responder as necessidades orgânicas e estímulos ambientais (Nogueira, 1999).

Os hormônios são substâncias derivadas de peptídeos/proteínas, lipídios ou aminoácidos que, após sua secreção pelas células onde são produzidos, atuam sobre as células receptoras, assim, cada célula do corpo é de uma maneira ou de outra regulada por hormônios (Guyton, 1997). Os hormônios são fundamentais para a reprodução, sobrevivência e para desempenho biológico normal. Dessa forma, são essenciais para a manutenção das espécies e para lidar diariamente com as influências ambientais (Wuttke et al., 2010). Esta regulação hormonal pode ser adversamente alterada por desreguladores endócrinos (DEs), substâncias ou misturas de substâncias naturais ou sintéticas exógenas que alteram funções do sistema endócrino e consequentemente causam efeitos adversos ao organismo exposto ou a seus descendentes (WHO, 2002). As substâncias que têm atividade desreguladora endócrina potencial são encontradas em cenários muito variados: na agricultura, como inseticidas, herbicidas, fungicidas; em produtos domisanitários, em indústrias, como dioxinas, bifenilas policloradas (PCB), alquifenóis e seus subprodutos, ftalatos, bisfenol A, metais pesados, entre outros; em fármacos, como os estrogênios sintéticos, dietiletilbestrol (DES) e 17α-etinilestradiol e, na natureza, como os fitoestrogênios, genisteína e metaresinol (Bila & Dezotti, 2007). Os praguicidas são o maior grupo de substâncias classificadas como desreguladores endócrinos. Com relação a exposição humana dois tipos podem ser destacados, a exposição da população em geral que podem ter contato com resíduos de praguicidas em alimentos, água potável e corpos hídricos ou a exposição ocupacional, onde o risco para o desenvolvimento de anormalidades do sistema endócrino e reprodutivo é particularmente elevado (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). A exposição humana aos DEs ocorre principalmente por via oral, quando ingeridos com alimentos ou bebidas contaminadas, por via inalatória e com menor frequência por via cutânea (Wuttke et al., 2010).

As alterações no sistema endócrino ocorrem quando um DE interage com os receptores hormonais, modificando sua resposta natural. Dois processos distintos podem ser desencadeados, a substância química pode se ligar ao receptor hormonal e produzir uma resposta, atuando como agonista, ou seja, imitando a ação de determinado hormônio. Se a substância química se ligar ao receptor, mas nenhuma resposta for produzida, ela estará agindo como um bloqueador ou antagonista, ou seja, estará impedindo a interação entre o hormônio natural e seu respectivo receptor (Birkett et al., 2003; Lintelmann et al., 2003). Muitos desreguladores endócrinos competem com o estradiol pelos receptores de estrógeno. Outros competem com a dihidrotestosterona e testosterona pelos receptores de andrógenos. Portanto, estas substâncias exercem efeitos de feminização ou masculinização do sistema endócrino. Substâncias que produzem efeitos de feminização são denominadas estrogênicas, enquanto que as que produzem efeitos de masculinização, são as androgênicas. Assim, se uma substância é considerada anti-androgênica, ela inibirá a ação biológica dos andrógenos, ligando-se e inativando os receptores de andrógenos presentes nos tecidos-alvo. As substâncias anti-estrogênicas, inibem a ação biológica dos estrógenos ligando-se e inativando os receptores de estrógenos presentes nos tecidos-alvo (Ankley et al., 1998; Birkett et al., 2003). Outros modos de ação dos DEs incluem interferência na síntese, armazenamento, liberação e transporte dos hormônios, desregulação da função tireoideana ou do sistema nervoso central (Bretveld et al., 2006). Entre as consequências reprodutivas associadas à exposição aos DEs e aos modos de ação elencados, estão as alterações nos níveis hormonais, comprometimento da fertilidade e alterações no ciclo ovariano (Nicolopoulou-Stamati & Pitsos, 2001).

O ovário tem sido considerado o maior alvo de DEs que afetam a fertilidade feminina (Mattison et al., 1989). Especificamente, os ovários possuem duas estruturas glandulares, o folículo e o corpo lúteo. O folículo é responsável pela gametogênese (oogênese) e produção de hormônio 17β-estradiol (esteroidogênese); o corpo lúteo, derivado do folículo após a ovulação, produz a progesterona, que é necessária se ocorrer a fecundação. Os sítios de ação de agentes químicos que alteram a função ovariana incluem o hipotálamo e a pituitária, onde podem interferir na ação de hormônios esteróides; e os ovários, onde por ação local alteram a ativação hormonal, ou podem causar toxicidade direta com destruição extensiva de folículos. As consequências a estas ações vão desde a perda dos hormônios esteróides ovarianos, eventual insuficiência

ovariana (menopausa) e finalmente, desregulação do *feedback* neuroendócrino, aumentando os níveis de FSH e LH (Hoyer, 2005).

O controle neuroendócrino da função reprodutiva envolve um grupo de neurônios no hipotálamo que sintetiza e libera o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Gore, 2002). O GnRH atua na hipófise anterior estimulando a liberação de gonadotrofinas, que ativam a esteroidogênese e gametogênese (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). O hormônio folículo estimulante (FSH) é crucial para a manutenção da função ovariana. A atuação do FSH é direcionada principalmente às células da granulosa e resulta em uma variedade de reações, tais como a estimulação da proliferação celular, a síntese de esteróides e a expressão de receptores para LH (hormônio luteinizante), necessário para o crescimento folicular final e ovulação. (Martins et al., 2008). Antes da ovulação o LH e o FSH secretados pela hipófise anterior aumentam acentuadamente e atuam sinergicamente para causar a rápida expansão do folículo, observada imediatamente antes da ovulação. O LH também tem efeito específico de converter as células granulosas e tecais em secretoras de progesterona e de menor secreção de estrogênio. Assim, a taxa de estrogênio começa a cair antes da ovulação e pequenas quantidades de progesterona começam a ser secretadas (Guyton, 1997).

Alguns praguicidas podem alterar a função do hipotálamo e da hipófise e influenciar a secreção de GnRH, LH e FSH. Tem sido demonstrado que a exposição a uma baixa dose de Dicloro-Difenil-Tricloroetano (p'p-DDT) e metoxicloro pode resultar em diminuição da função do hipotálamo e da hipófise em roedores (Cooke & Eroschenko, 1990; Palanza et al., 1999). Postula-se que qualquer composto ambiental que atue mimetizando ou antagonizando a ação de um hormônio esteróide presumivelmente altera a glicosilação de LH e FSH, reduzindo a sua atividade biológica, prejudicando a reprodução (Wilson et al., 1990).

Com relação aos agentes tóxicos que causam dano direto aos folículos ovarianos, o estágio de desenvolvimento em que o folículo é destruído determina o impacto que a exposição ao químico terá sobre a reprodução (Hoyer & Sipes, 1996; Hoyer, 1999). Produtos químicos que danificam seletivamente folículos antrais ou em crescimento interrompem a função reprodutiva temporariamente, pois estes folículos podem ser substituídos pelo recrutamento de folículos primordiais de reserva. Esses agentes produzem aciclicidade (amenorréia), causando infertilidade reversível que se

manifesta relativamente pouco tempo após a exposição. Por outro lado, produtos químicos que destroem extensivamente os oócitos contidos em folículos primordiais e primários provocam insuficiência ovariana prematura (menopausa precoce) e infertilidade permanente, pois se um folículo primordial é destruído, não pode ser substituído (Hoyer, 2005).

2. Praguicidas

De acordo com Agência de Proteção Ambiental norte-americana (EPA, 2007) define-se como praguicidas qualquer substância ou mistura de substâncias destinada a prevenir, destruir, repelir ou conter qualquer praga. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde e Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS, 1996), os praguicidas podem ser classificados segundo seu espectro de ação e estrutura química. De acordo com o espectro de ação, são classificados como inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, nematicidas e bactericidas. Os praguicidas também são classificados de acordo com a estrutura química em diversas classes. Entre elas, podem ser citadas as classes dos organoclorados, piretróides, organofosforados, carbamatos, uréias, amidas, triazinas, uracilas e triazóis.

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). Segundo o Sindicato Nacional dos Trabalhadores de Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário (SINPAF, 2009) em 2008, o Brasil assumiu a liderança no consumo mundial de agroquímicos, posição antes ocupada pelos Estados Unidos. Diante deste quadro, a avaliação do perigo dos praguicidas agrícolas tem papel fundamental.

No entanto, além de cumprirem o papel de proteger as culturas agrícolas das pragas, doenças e plantas daninhas, os praguicidas também oferecem riscos à saúde humana e meio ambiente, pela contaminação de alimentos e solos agrícolas, assim como de águas superficiais e subterrâneas. De modo geral, quando os praguicidas são aplicados seguindo as Boas Práticas Agrícolas (BPA), os Limites Máximos de Resíduos (LMR) não são excedidos, porém, a má utilização desses compostos é que se torna preocupante, podendo deixar quantidades significativas de resíduos em alimentos (Thurman et al., 2006; Jardim & Andrade, 2009).

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 que, baseados em

conhecimento toxicológico atualizado sobre cada agente químico, indicam que a ingestão diária a determinada quantidade residual não representa risco à saúde humana, mesmo se ingerido durante toda a vida dos indivíduos. A IDA de determinado praguicida é geralmente obtida a partir do seu NOEL ou NOAEL (*no-observed-effect-level* = nível sem efeito observável, ou *no-observed-adverse-effect-level* = nível sem efeito adverso observável), estimados em estudos de toxicidade com animais de laboratório e corrigido por fatores de segurança que podem variar de 10 a 2.000 vezes (WHO, 1962; Lu, 1988; 1990).

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 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Entre julho de 2001 e dezembro de 2004, o programa pesquisou 4.001 amostras de alimentos (alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate), coletadas em 12 estados da Federação. Do total de amostras analisadas, 2.032 apresentaram resíduos de praguicidas. Nessas amostras foram detectados 3.271 resíduos, o que nos leva à conclusão que várias amostras apresentaram mais de um resíduo. Do total de 3.271 resíduos, 2.340 (71,5%) eram regulares e 931 (28,5%) eram irregulares. Dentre os resíduos que apresentaram irregularidades 776 (83,4%) eram resíduos não autorizados e 155 (16,6 %) eram resíduos acima do LMR.

Em análise detalhada podemos observar que o maior problema dos níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura*, não está na forma de aplicação do produto no alimento, mas sim no uso indiscriminado de agrotóxicos não recomendados para determinados alimentos, visto que, em sua grande maioria, as irregularidades estão representadas pela utilização indiscriminada de agrotóxicos não autorizados para as culturas analisadas. As culturas com maior frequência de irregularidades foram as de tomates, maçãs e morangos. Particularmente com relação aos tomates, foram detectados resíduos de seis praguicidas não-autorizados (dicofol, dieldrin, endosulfan, monocrotofós, clorpirifós e diclorvos), e de cinco praguicidas permitidos, mas cujos níveis de resíduos estavam acima do LMR (metamidofós, permetrina, triazofós, ditiocarbamatos e cialotrina) (ANVISA, 2005). Dentre os praguicidas encontrados pela ANVISA como contaminantes, um era ditiocarbamato, dois piretróides (permetrina e cialotrina), três organoclorados (dicofol, dieldrin e endosulfan) e cinco

organofosforados (diclorvos, monocrotofós, clorpirifós, metamidofós e triazofós). Resultados mais recentes do PARA, obtidos no período 2005 a 2007, mostraram irregularidades reincidentes envolvendo o endosulfan, dicofol, permetrina e diclorvos, não apenas em tomates, mas também em maçãs, alface, cenouras, batatas e morangos (ANVISA, 2007).

O impacto dos praguicidas na saúde humana pode ser abordado por estudos epidemiológicos, ensaios experimentais *in vivo* com animais de laboratório, e os ensaios *in vitro* com culturas celulares e microorganismos. Apesar de constituírem as evidências mais importantes (primárias) sobre o risco humano, os estudos epidemiológicos apresentam dificuldades de delineamento como as de caracterização da exposição, de identificação da exposição mais relevante (exposições múltiplas e sucessivas ao longo da vida), o longo intervalo entre exposição e o aparecimento dos efeitos e a exposição crônica a baixas doses (Chu et al., 1981).

A estimativa do risco da exposição simultânea aos diferentes tipos de praguicidas é complexa. Durante todo o período de vida dos seres humanos, a exposição química à várias substâncias ocorre de forma concomitante (Yang, 1998). Esta circunstância natural difere da situação estabelecida com animais de experimentação, nos quais são testadas substâncias únicas, individuais, com alto nível de pureza, para identificação de seus efeitos tóxicos potenciais (sistêmicos, neurológicos, comportamentais, cancerígenos, reprodutivos, etc.) (Viau, 2002). Como resultado, há relativamente pouca informação experimental sobre se, e como, a exposição a misturas pode afetar a saúde humana e animal (Carpenter et al., 1998). Isto também ocorre em virtude do número significativo de fatores que comprometem a avaliação das misturas químicas. Por exemplo, dois ou mais compostos podem ter efeitos aditivos, sinergísticos ou antagônicos sobre um mesmo órgão ou sistema-alvo, do mesmo modo que podem alterar mutuamente seu metabolismo (Yang, 1997; 1998).

Assim, o estudo de misturas químicas em baixas doses sobre organismos superiores é uma área relevante de pesquisa devido ao seu impacto na avaliação do risco das populações humanas expostas aos múltiplos contaminantes químicos ambientais. A disponibilidade de modelos animais já bem estabelecidos para ensaios de toxicidade, adicionados de técnicas sensíveis para sua avaliação, permite o estudo e a caracterização consistente dos efeitos das misturas químicas sobre determinados órgãos-alvo, tal como é necessário nesta área de avaliação do impacto dos contaminantes ambientais sobre a

saúde humana (Suk et al., 2002).

Os praguicidas estudados neste trabalho pertencem às classes dos inseticidas organoclorados, organofosforados e piretróides. Suas principais características estão apresentadas nos itens a seguir:

2.1. Organoclorados

Os inseticidas organoclorados presentes no ambiente incluem compostos agrícolas e industriais. Quimicamente estáveis e lipofílicos, os compostos organoclorados apresentam taxas lentas de degradação e tendem a se acumular no tecido adiposo ou sistema nervoso central, devido a sua constituição rica em moléculas lipídicas. Estes compostos têm recebido mais atenção por causa da sua persistência no ambiente, com capacidade de concentrar-se na cadeia alimentar e pela sua detecção contínua no fornecimento de alimentos e água potável (Snedeker, 2001). A exposição a organoclorados por contaminação ambiental tem sido apontada como causa de desregulação endócrina em várias espécies animais, associada à anormalidades reprodutivas como alteração no desenvolvimento dos oócitos ou da pré-implantação de embriões (Vos et al., 2000; Walker et al., 2000). Os principais representantes dos praguicidas organoclorados são o dicofol, aldrin, dieldrin, endosulfan, clordano, DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), heptacloro, HCH (lindano), HCB (hexaclorobenzeno) e metoxicloro.

2.1.1. Dicofol

Dicofol é um praguicida organoclorado que apresenta estrutura química similar ao DDT (figura 1). Em diferentes formulações comerciais do dicofol o DDT também pode estar presente como contaminante não intencional gerado no processo de industrialização (Grisolia, 2005). No Brasil, seu principal uso é na cultura de maça, cítrus e algodão (ANVISA, 2010).

Estudos de toxicologia reprodutiva desse praguicida em duas gerações consecutivas indicaram que o dicofol administrado através da dieta nas doses de 0,4; 1,9; 9,5 e 18,9 mg/kg/dia para machos e 0,4; 2,1; 10,5 e 20,5 mg/kg/dia para fêmeas não apresentaram efeitos adversos sobre o sistema reprodutor de ratos e camundongos.

Não foram observadas alterações no número de ninhadas, no número de filhotes por ninhada, na proporção sexual e na viabilidade dos filhotes, etc. Também não ocorreram alterações nos ciclos estrais, quantidades e morfologia de espermatozóides ou nos índices de fertilidade de ambos os sexos (EPA, 1998). No entanto, em estudo no qual o dicofol foi administrado oralmente em ratas, os animais tratados com 30, 40 e 50 mg/Kg apresentaram alterações na duração dos períodos estrais e aumentos no número de folículos ovarianos atrésicos. Esses efeitos foram observados de modo dose-dependente; animais expostos a 20 mg/kg não apresentaram quaisquer alterações (Jadaramkunti & Kaliwal, 1999).

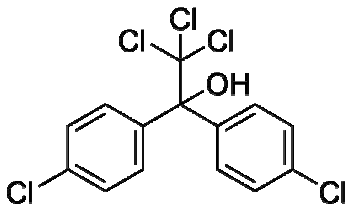


Figura 1. Estrutura química do praguicida dicofol, Nº CAS: 115-32-2

2.1.2. Dieldrin

O dieldrin é um organoclorado sintético e devido às suas propriedades físico-químicas, apresenta características de bioacumulação e biomagnificação no ambiente. Pertence à subclasse dos ciclodienos e possui ação inseticida. Sua estrutura química está demonstrada na figura 2. De 1950 a 1970, o dieldrin foi extensamente utilizado como inseticida, particularmente nas culturas de algodão e milho. A partir da década de 1970 até final de 1987, o uso ficou restrito ao controle de cupins e depois foi banido (CETESB, 2008). No entanto, esses compostos continuam sendo detectados em uma grande variedade de ambientes, especialmente em solos agrícolas em que foram utilizados anteriormente (Manirakiza et al., 2003; Hashimoto, 2005; Wan et al., 2005; Gonçalves & Alpendurada, 2005; Hilber et al., 2008).

Estudos com animais sugerem que o dieldrin atua como desregulador endócrino tanto em machos como em fêmeas, provavelmente por impedir a ligação do 5 α-diidrotestosterona e 17 α-estradiol, respectivamente, com os receptores androgênicos e estrogênicos (ATSDR, 2002).

Em um estudo da EPA, 2002, os níveis hormonais séricos de ratas Sprague-Dawley expostas ao dieldrin do 18° ao 21° dia após o nascimento, não apresentaram qualquer alteração nos níveis de tiroxina, FSH, LH, prolactina e hormônio do crescimento.

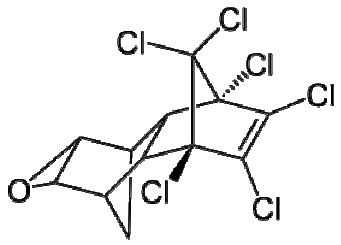


Figura 2. Estrutura química do praguicida dieldrin, Nº CAS: 60-57-1

2.1. 3. Endosulfan

O endosulfan é um praguicida organoclorado, pertencente à subclasse dos ciclodienos é eficaz contra um amplo espectro de insetos. Sua estrutura química está demonstrada na figura 3. No Brasil é usado nas culturas de algodão, café, cana de açúcar e soja (ANVISA, 2010). As principais fontes de exposição da população a esse praguicida são água e alimentos contaminados (FAO/WHO, 1999). Metabólitos desse praguicida foram encontrados em alimentos como leite (Bennett, 1997), pimentões (Pokharkar & Dethe, 1981), frutas e vegetais (Mitchell, 1976; FDA, 1994). O Endosulfan é bem absorvido por ingestão, inalação, e contato com a pele. Estudos sistêmicos experimentais mostraram que sua toxicidade varia de acordo com a via de administração, veículo, espécies e gênero (Dikshith & Raizada, 1988). O endosulfan afeta vários órgãos e sistemas, podendo desencadear distúrbios neurológicos, imunotoxicidade, toxicidade reprodutiva, toxicidade hepática e cardíaca, desordens sanguíneas, além de ser classificado como desregulador endócrino (Quijano, 2000).

Em estudos de toxicologia reprodutiva em três gerações indicaram que ratos expostos ao endosulfan através da dieta na dose de 2,5 mg/kg/dia não apresentaram efeitos sobre o sistema reprodutor. Já, animais expostos ao endosulfan através da dieta na dose de 5,0 mg/Kg/dia, apresentaram aumento na mortalidade e reabsorção da prole (ATSDR, 1990; Smith 1991).

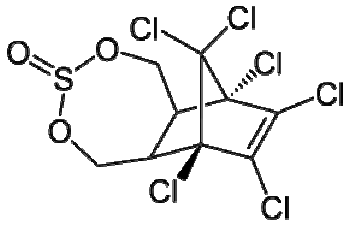


Figura 3. Estrutura química do praguicida endosulfan , Nº CAS CAS 115-29-7

2.2. Organofosforados

Os organofosforados são substâncias lipossolúveis que não apresentam biocumulação. Porém, apresentam efeito tóxico agudo significativo para os seres humanos e outros mamíferos (Baird, 2002). A exposição crônica a alguns organofosforados já foi relacionada ao desenvolvimento de deficiência cognitiva, alterações comportamentais e efeitos neurotóxicos tardios. A relação com o desenvolvimento de neoplasias, teratogenicidade e toxicidade reprodutiva de alguns organoforforados, como o diclorvos, tem sido discutida por vários autores (Ecobichon, 1996).

2.2.1. Diclorvos

O diclorvos tem sido utilizado como inseticida por mais de 40 anos (Ishmael, 2006). É usado em ambiente domiciliar, saúde pública e também para combater pragas de produtos armazenados. É eficaz contra pulgões, ácaros, lagartas e moscas que prejudicam frutas e hortaliças. Seu uso é destinado também para tratar uma variedade de infecções parasitárias em cães e em animais de produção (EXTOXNET, 1996). Sua estrutura química está demonstrada na figura 4.

Não há evidências de que o diclorvos afete a reprodução. Quando ratos machos e fêmeas receberam dieta contendo 5mg/kg/dia de diclorvos pouco antes do acasalamento, e durante a gravidez e lactação em fêmeas, não houve efeitos na reprodução e na sobrevivência ou no crescimento da prole. Os mesmos resultados foram observados em um estudo de três gerações de ratos alimentados com dieta a níveis de 25 mg/kg/dia (Gallo & Lawryk, 1991).

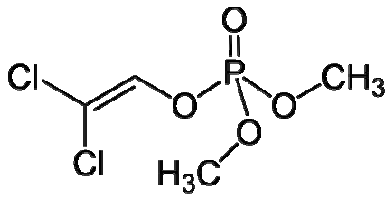


Figura 4. Estrutura química do praguicida diclorvos , Nº CAS 62-73-7

2.3. Piretróides

Os piretróides são derivados das piretrinas, inseticidas naturais de plantas como o *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Esses compostos foram modificados para se tornarem mais fotoestáveis e lipofílicos, melhorando seu espectro de ação. Apresentam menor toxicidade aguda para mamíferos quando comparados a outras classes de inseticidas, como os organoclorados, organofosforados e carbamatos (Pine et al., 2008). Os piretróides sintéticos estão entre os praguicidas mais usados em todo o mundo (Naumann, 1990). O uso generalizado na agricultura e em ambientes domiciliares tem incentivado pesquisas sobre esses compostos, e evidências sugerem que estes são relativamente seguros para humanos (Naumann, 1990). Porém, dados epidemiológicos, relatórios clínicos e outros estudos de laboratório indicam que os piretróides podem provocar uma série de efeitos neurotóxicos e imunotóxicos em humanos e em outros mamíferos; além disso a exposição aos piretróides tem sido associada à efeitos reprodutivos agudos e deficiências no desenvolvimento (He, 1994; Miyamoto et al., 1995; He et al., 1989; Tanenbaum et al., 1998; Landrigan et al., 2000).

Pertencem a esse grupo os inseticidas aletrina, resmetrina, tetrametrina, deltametrina, permertina entre outros.

2.3.1. Permetrina

A Permetrina é um inseticida sintético de amplo espectro, utilizada contra uma variedade de pragas em frutas, vegetais, algodão, plantas ornamentais, batata, cogumelo e cereais. É utilizada em estufas, hortas e para controle de cupins (EXTOXNET, 1996). Sua estrutura química está demonstrada na figura 5.

No Brasil, a permetrina é usada em culturas de algodão, arroz, café, citros, couve, feijão, milho, repolho, soja, tomate, trigo e uva (ANVISA, 2010).

Em um estudo realizado sobre esse praguicida mostra que a fertilidade de ratas foi afetada quando os animais receberam altas doses de 250 mg/Kg/dia de permetrina via oral, durante o 6º ao 15º dia de gestação. (Wauchope et al., 1992).

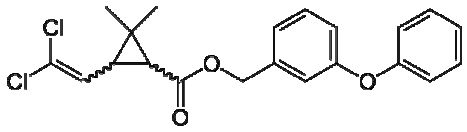


Figura 5. Estrutura química do praguicida permetrina, Nº CAS: 52645-53-1

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

Estudos para detecção da toxicidade reprodutiva em fêmeas consistem na combinação de métodos, como avaliação da duração do ciclo estral, da fertilidade, peso de órgãos, histopatologia e quantificação corpos lúteos e de folículos ovarianos (Regan et al., 2005). A avaliação do ovário é importante ponto em avaliações toxicológicas, pois, desreguladores endócrinos que causam a perda de oogônias, oócitos ou suporte de células somáticas podem causar efeitos adversos na reprodução. Diretrizes da FDA (Food and Drug Administration) da EPA (Agência de Proteção Ambiental norte-americana) e da OECD (Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico), recomendam uma avaliação quantitativa e qualitativa dos folículos primordiais em ovários (EPA, 1998; FDA, 2000; OECD, 2001). A EPA e a OECD recomendam a quantificação de folículos ovarianos em apenas uma geração. Já diretrizes para aditivos alimentares da FDA, recomendam contagem dos folículos em duas gerações. A identificação de folículos é realizada tradicionalmente com a coloração de hematoxilina e eosina (HE), no entanto métodos como a imunoistoquímica para marcação do antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) ou CYP1B1 nuclear em oócitos foram apontados como facilitadores na identificação e contagem dos folículos primordiais (Muskhelishvili et al., 2002). A utilização de técnicas complementares ajuda a garantir avaliação rigorosa minimizando o risco de falsos negativos para agentes tóxicos reprodutivos (Regan et al., 2005).

4. Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Controlando agrotóxicos nos alimentos: O trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, a FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR e ITEP/PE. Relatório de atividades 2004. Brasília, DF, 2005. [Acesso em 26 agosto de 2005]. Disponível em; www.anvisa.gov.br.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos nos Alimentos: Trabalho Desenvolvido pela ANVISA, com as Vigilâncias Sanitárias dos Estados do AC, BA, DF, ES, GO, MS, MG, PA, PR, PE, RJ, RS, SC, SP, SE, TO, E com os Laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED E LACEN/PR. Relatório de Atividades de 2001–2006. Brasília, DF, 2007. [Acesso em 21 de agosto de 2007]. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Agrotóxicos e toxicologia: monografias de produtos de agrotóxicos. [Acesso em 27 de outubro de 2010]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for aldrin/dieldrin. Atlanta. 2002 [Acesso em 11 de janeiro de 2011]. Disponível em: http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/TP.asp?id=317&tid=56

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Endosulfan. Draft Report. Atlanta. 1990. 6-52

Ankley G, Mihaich E, Stahl R, Tillitt D, Colborn T, Mcmaster S, Miller R, Bantle J, Campbell P, Denslow N, Dickerson R, Folmar L, Fry M, Giesy J, Gray LE, Guiney P, Hutchinson, Th, Kennedy S, Kramer V, LeBlanc G, Mayes M, Nimrod A, Patino R, Peterson R, Purdy R, Ringer R, Thomas P, Touart L, van der Kraak G, Zacharewski T. Overview of a workshop on screening

methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. Environ Toxicol Chem. 1998; 17: 68-87.

Baird C. Química Ambiental. 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

Bennett DA, Chung AC, Lee SM. Multiresidue method for analysis of pesticides in liquid whole milk. J AOAC Int. 1997; 80(5):1065–77.

Bila DM, Dezotti M. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente: Efeitos e Conseqüências. Química Nova. 2007; 30: 651-66.

Birkett JW, Lester JN. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. 1 ed. USA: IWA Publishing, Lewis Publishers CRC Press LLC, 2003.

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.

Carpenter DO, Arcaro KF, Bush B, Niemi WD, Pang S, Vakharia DD. Human health and chemical mixtures: an overview. Environ Health Perspect.1998; 106: 1263-70.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Aldrin, Dieldrin e Endrin. São Paulo: Via Lettera Editora e Livraria Ltda; 2008.

Cooke PS, Eroschenko VP. Inhibitory effects of technical grade methoxychlor on development of neonatal male mouse reproductive organs. Biol Reprod. 1990; 42(3):585-96.

Chu KC, Cueto C, Ward JM. Factors in the evaluation of National Cancer Institute carcinogen bioassays. J Toxicol Environ Health. 1981; 8(1-2):251-80.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser Russ, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore, AC. Endocrine-Disrupting Chemicals: Endocrine Society Scientific Statement. Endocrine Reviews. 2009; 30(4):293-342.

Dikshith TSS, Raizada RB, Kumar SN. Effect of repeated dermal application of endosulfan to rats. Vet Hum Toxicol 1988; 30(3):219–24.

Ecobichon DJ. Toxic effects of pesticides. In: Amdur MO, Doull J, Klaassen CD. Casarett and Doll's toxicology: the basic science of poisons. 4 ed. New York: Mc Graw Hill; 1996. p. 565-622.

Environmental Protection Agency (EPA). Pesticides, 2007.[acesso em julho de 2010]. Disponível em: http://www.epa.gov/pesticides/

Environmental Protection Agency (EPA). Health effects support document for aldrin/dieldrin. Washington, 2002. 268p.

Environmental Protection Agency (EPA), Registration Eligibility Decision (RED)-Dicofol, EPA 738-R-98-018. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, US Environmental Protection Agency. Washington, DC. 1998. [acesso em 20 de julho de 2010]. Disponível em: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0021red.pdf.

Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guideline, OPPTS 870.3800, Reproduction and Fertility Effects. EPA 712-C-98-239. U.S. Environmental Protection Agency, Office of prevention, Pesticides and Toxic Substances. (Washington DC, 1998).

Extension Toxicology Network (EXTOXNET). Pesticide Information Profiles; 1996. [acesso em outubro de 2010]. Disponível em: http://extoxnet.orst.edu/pips/dichlorv.htm

Extension Toxicology Network (EXTOXNET). Pesticide Information Profiles; 1996. [acesso em 13 de janeiro de 2011]. Disponível em: http://extoxnet.orst.edu/pips/permethr.htm

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO/WHO). Pesticide residues in food-1998 evaluations. Part II. Toxicological. World Health Organization: [WHO/PCS/99/18]; 1999.

Food and Drug Administration (FDA). Redbook 2000. Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. IV.C.9.a. Guidelines for Reproductive Studies; 2000. [Acesso em 05 de outubro de 2010]. Disponível em http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/Redbook/ucm078396.htm

Food and Drug Administration (FDA). Pesticide analytical manual. 3rd ed. Multiresidue methods, Method 302: method for non-fatty foods: Method II for non-fatty foods, Method 304: method for fatty foods. FDA, US Department of Health and Human Services. 1994.

Gallo MA, Lawryk NJ. Organic phosphorus pesticides. In: Handbook of Pesticide Toxicology. Hayes, W. J., Jr. and Laws, E. R., Jr., editors. New York, NY: Academic Press; 1991; 3-5.

Gonçalves C, Alpendurada MF. Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Talanta. 2005; 65(5):1179–89.

Gore A. GnRH: the master molecule of reproduction. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers; 2002.

Grisolia CK. Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Brasília: Editora Universidade de Brasília; 2005.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 9.ed. Rio de Janeiro: Guannabara Koogan; 1997.

Hashimoto Y. Dieldrin residue in the soil and cucumber from agricultural field in Tokyo. J Pestic Sci. 2005; 30(4):397–402.

He F, Wang S, Liu L, Chen S, Zhang Z, Sun J. Clinical manifestations and diagnosis oacute pyrethroid poisoning. Arch Toxicol. 1989; 63(1):54-8

He F. Synthetic pyrethroids. Toxicology. 1994; 91(1):43-49.

Hilber I, Mäder P, Schulin R, Wyss GS. Survey of organochlorine pesticides in horticultural soils and there grown Cucurbitaceae. Chemosphere. 2008; 73(6):954–61.

Hoyer PB. Damage to ovarian development and function. Cell Tissue Res. 2005; 322(1): 99-106.

Hoyer PB. Ovotoxic environmental chemicals: indirect endocrine disruptors. In: Naz R, editor. Endocrine disruptors: effects on male and female reproductive systems. CRC Press: Boca Raton; 1999; 57–88.

Hoyer PB, Sipes IG. Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1996; 36:307–331.

Ishmael J, MacGregor JA, Manley A. Dichlorvos-A comprehensive review of 11 rodent carcinogenicity studies. Regul Toxicol Pharmacol. 2006; 44(3):238-48.

Jadarmkunti UC, Kaliwal BB. Effect of dicofol formulation on estrous cycle and follicular dynamics in albino rats. J Basi Clin Physiol Pharmacol. 1999;10(4): 305-14.

Jardim ICSF, Andrade JA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global-um enfoque as maças. Química Nova. 2009; 32(4): 996-1012.

Landrigan PJ, Claudio L, McConnell R. In: Lippman, M. ed. Environmental Toxicants: Human Exposures and Their Health Effects. New York: Wiley; 2000; 725–39.

Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A. Endocrine Disrupting Chemicals in the Environment. Pure Appl Chem. 2003; 75(5):631–81.

Lu FC. Basic Toxicology. Fundamentals, target organs and risk assessment. 2 ed. Washington, DC: Hemisphere Publishing Corporation; 1990; 327-44.

Lu FC. Acceptable daily intakes: inception, evolution and application. Reg Toxicol Pharmacol. 1988; 8(1), 45-60.

Manirakiza P, Akinbamijo O, Covaci A, Pitonzo R, Schepens P. Assessment of organochlorine pesticide residues in west Africancity farms: Banjul and Dakar case study. Arch Environ Contam Toxicol. 2003; 44(2):171–9.

Martins FS, Silva JRV, Rodrigues APR, de Figueiredo JR. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. Rev Bras Reprod Anim. 2008; 32(1): 36-49.

Mattison DR, Thomford PJ. The mechanism of action of reproductive toxicants. Toxicol Pathol. 1989; 17(2): 364–76.

Mitchell LR. Collaborative study of the determination of endosulfan, endosulfan sulfate, tetrasul and tetradifon residues in fresh fruits and vegetables. J Assoc Off Anal Chem. 1976; 59(1):209–12.

Miyamoto J, Kaneko H, Tsuiji R, Okuno Y. Pyrethroids, nerve poisons: how their risks to human health should be assessed. Tox Letters. 1995; 82-83: 933-40.

Muskhelishvili L, Freeman LD, Latendresse JR, Bucci TJ. An immunohistochemical label to facilitate counting of ovarian follicles. Toxicol Pathol. 2002; 30(3): 400–2.

Naumann K. Synthetic pyrethroid insecticides: structures and properties. Chemistry of Plant Protection, vol 4. New York: Springer-Verlag; 1990.

Nicolopoulou-Stamati P, Pitsos MA. The impact of endocrine disrupters on the female reproductive system. Hum Repr Update. 2001;7(3):323-30.

Nogueira JMF. Desreguladores Endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. Química: Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, Lisboa. 1999; 88: 65-71.

OPAS/OMS. Manual de vigilância de saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília, 1996. [Acesso em 04 de novembro. 2010]. Disponível em http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/livro2.pdf.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Proposal for updating Guideline 416: Two-generation reproduction toxicity study. In OECD Guideline for Testing of Chemicals. Paris: OECD; 2001: p. 1–13.

Palanza P, Parmigiani S, Liu H, Vom Saal FS. Prenatal exposure to low doses of the estrogenic chemicals diethylstilbestrol and p ,p'-DDT alters aggressive behavior of male and female house mice. Pharmacol Biochem Behav. 1999; 64(4):665-72.

Pine MD, Hiney JK, Lee B, Dees L. The pyrethroid pesticide Esfenvalerate suppresses the afternoon rise of luteinizing hormone and delays puberty in female rats. Environ Health Perspect. 2008; 116 (9): 1243-7.

Pokharkar DS, Dethe MD. Gas–liquid chromatographic studies on residues of endosulfan on chilli fruits. J Environ Sci Health B.1981;16(4):439–51.

Quijano RF. Risk assessment in a third-World reality: na endosulfan case history. Int Occup Environ Health. 2000; 6(4):312-7.

Regan KS, Cline JM, Creasy D, Davis B, Foley GL, Lanning L, Latendresse JR, Makris S, Morton D, Rehm S, Stebbins K. Ovary Evaluation Working Group. STP Position Paper: Ovarian Follicular Counting in the Assessment of Rodent Reproductive Toxicity. Toxicology Pathology. 2005; 33(3):409-12.

Sindicato Nacional dos Trabalhadores de Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário (SINPAF) www.sinpaf.org.br/modules/smartsection/item.php?itemid=644. [Acesso em 17 de setembro de 2009].

Snedeker SM. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. Environ Health Perspect 2001;109:35–47.

Smith AG. Chlorinated Hydrocarbon Insecticides. In: Hayes WJ, Jr. Laws ER, Jr. (eds).Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press Inc, New York, NY; 1991; 6-3.

Suk WA, Olden K., Yang RSH. Chemical Mixtures Research: Significance and Future Perspectives. Environ. Health Perspect. 2002; 110 (6): 891-2.

Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998; 95(11):5998–6003.

Thurman EM, Ferrer I, Malato O, Fernández-Alba AR. Feasibility of LC/TOFMS and elemental database searching as a spectral library for pesticides in food. Food Addit. Contam. 2006; 23(11): 1169-78.

Viau C. Biological monitoring of exposure to mixtures. Toxicol Lett. 2002;134(1-3); 9-16.

Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, et al. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. Crit Rev Toxicol, 2000; 30(1):71–133.

Walker SK, Hartwich KM, Robinson JS. Long-term effects on offspring of exposure of oocytes and embryos to chemical and physical agents. Hum Reprod Update. 2000; 6(6): 564–77.

Wan MT, Kuo J, Pasternak J. Residues of endosulfan and other selected organochlorine pesticides in farm areas of the lower Fraser valley, British Columbia, Canada. J Environ Qual. 2005; 34(4):1186–93.

Wauchope RD, Buttler TM, Hornsby AG, Augustijn-Beckers PWM, Burt JP. SCS/ARS/CES Pesticides properties database for environmental decisionmaking. Rev Environ Contam Toxicol. 1992; 123: 1-157.

Wilson CA, Leigh AJ, Chapman AJ. Gonadotrophin glycosylation and function. J Endocrinol. 1990; 125(1):3-14.

World Health Organization (WHO). Global Assessment of the State-of-the-Science of endocrine Disruptors. In: Damstra T, Brlow S, Bergman A, Kavlock R, Der Kraak Van (ed). WHO, 2002.

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

Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. Hormones. 2010; 9(1):9-15.

Yang RS. Some Critical Issues and Concerns Related to Research Advances on the Toxicology of Chemical Mixtures. Environ Health Perspect. 1998; 106: 1059-63.

Yang RSH. Toxicologic interactions of chemical mixtures. In: Bond J, ed. Comprehensive Toxicology. Vol 1: General Principles, Toxicokinetics, and Mechanisms of Toxicity. Oxford, England: Elsevier; 1997; 189-203.

Artigo Científico

INFLUÊNCIA DA MISTURA DE CINCO PRAGUICIDAS EM BAIXAS DOSES SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY, WISTAR E LEWIS

Viviane M. Pascotto[1], Marina T. Guerra[2], Carla A. S. Franchi[1], João Lauro V. de Camargo[1], Noeme S. Rocha[3]

Viviane M. Pascotto: vpascotto@fmb.unesp.br;

Marina T. Guerra: marinatguerra@hotmail.com;

Carla A. S. Franchi: carlafranchi@fmb.unesp.br;

João Lauro V. de Camargo decam@fmb.unesp.br;

Noeme S. Rocha: rochanoeme@fmvz.unesp.br

[1]Laboratório TOXICAM, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

[2]Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil.

[3]Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Palavras-chaves: Desregulação endócrina, multilinhagens, mistura de praguicidas, sistema reprodutor de fêmeas.

* De acordo com a revista Journal of Toxicology and Environmental Health

RESUMO

O presente projeto objetivou investigar os efeitos da combinação, em baixas doses, de cinco praguicidas (dieldrin, dicofol, endosulfan, diclorvos e permetrina) sobre o sistema reprodutor de ratas Sprague-Dawley, Wistar e Lewis.

Ratas de cada linhagem, com seis semanas de idade, foram randomizadas em três grupos: GI: controle negativo; GII: praguicidas adicionados à ração em doses de NOEL (mg/Kg/dia) - diclorvos (0,23), dicofol (0,5), dieldrin (0,025); endosulfan (0,7), permetrina (5); GIII: praguicidas adicionados à ração em doses de LOEL (mg/Kg/dia) - diclorvos (2,3), dicofol (2,1), dieldrin (0,05), endosulfan (3,8), permetrina (25). A eutanásia foi realizada entre a 10ª e a 12ª semana experimental, na fase de estro. Os parâmetros de avaliação foram: peso de fígado, útero e ovários; análise histológica qualitativa de fígado, útero e ovários; morfometria do endométrio; avaliação do ciclo estral; dosagem de LH, FSH e progesterona; e contagem de folículos ovarianos.

Animais das três linhagens tratados com a LOEL apresentaram toxicidade sistêmica, evidenciada pela diminuição de peso corpóreo e aumento de peso de fígado.

A análise qualitativa de útero e ovários, assim como a avaliação do ciclo estral e níveis hormonais não indicaram sinais de toxicidade reprodutiva exercida pelas misturas. A contagem de folículos ovarianos indicou ausência de resposta dose dependente e alta variabilidade entre os animais de mesmo grupo experimental. Desta forma concluímos que, embora os resultados tenham mostrado diminuição de algumas populações foliculares nas doses de NOEL e LOEL, este parâmetro não pode ser utilizado isoladamente como indicativo de toxicidade reprodutiva. Estes achados remetem à necessidade de maiores estudos para o esclarecimento dos efeitos destes compostos nas populações foliculares.

ABSTRACT

This project aimed to investigate the effects of the combination, in low doses, of five pesticides (dieldrin, dicofol, endosulfan, dichlorvos and permethrin) on the reproductive system of Sprague- Dawley, Wistar and Lewis rats.

Six-weeks-old rats from each strain were randomized into three groups: GI: negative control; GII: pesticides added to the feed at NOEL doses (mg/kg/day) - dichlorvos (0.23), dicofol (0.5), dieldrin (0.025), endosulfan (0.7), permethrin (5), GIII: pesticides added to the feed at LOEL doses (mg / kg / day) – dichlorvos (2.3), dicofol (2.1), dieldrin (0.05), endosulfan (3.8), permethrin (25). Euthanasia was performed between the 10th and 12th experimental week, in the estrous stage. The evaluation parameters were: weight of liver, uterus and ovaries; qualitative histological analysis of liver, uterus and ovaries; endometrium morphometry; estrous cycle assessment; dosage of LH, FSH and progesterone; and counting of ovarian follicles. Animals from all three strains showed systemic LOEL toxicity, as evidenced by decreased body weight and increased liver weight.

Qualitative analysis of the uterus and ovaries, as well as estrous cycle and hormone levels evaluations indicated no signs of reproductive toxicity exerted by the mixtures. Counting of ovarian follicles indicated lack of dose-dependent response and high variability among animals from the same experimental group. Hence, we concluded that, although our results have shown a decrease of some follicular populations at the NOEL and LOEL doses, this parameter can not be used alone as an indicator of reproductive toxicity. These findings underscore the need for more studies to clarify the effects of these compounds on follicular populations.

INTRODUÇÃO

Durante o período de desenvolvimento do organismo, os hormônios desempenham papel crucial na maturação morfológica e funcional dos tecidos, além disso ao longo da vida, diversas funções orgânicas são reguladas pela complexa rede de interações dos hormônios com seus receptores. A fisiologia da regulação hormonal pode ser adversamente alterada por desreguladores endócrinos (DEs), substâncias ou misturas de substâncias naturais ou sintéticas exógenas que alteram funções do sistema endócrino e consequentemente causam efeitos adversos ao organismo exposto ou a seus descendentes (WHO, 2002). Pessoas expostas à essas substâncias estão em risco para o desenvolvimento de alterações do sistema endócrino ou reprodutor (Diamanti-Kandarakis et al, 2009). Os DEs podem interferir com a função hormonal feminina, atuando como agonistas ou antagonistas dos esteróides sexuais, hormônios estrógenos ou andrógenos (Wuttke et al., 2010). Podem ainda comprometer a síntese, o armazenamento, liberação e transporte dos hormônios, interferir na função tireoideana e sistema nervoso central (Bretveld et al., 2006). Entre os danos reprodutivos femininos associados a exposição aos DEs estão, as alterações nos níveis hormonais, comprometimento da fertilidade e alterações no ciclo ovariano (Nicolopoulou-Stamati & Pitsos, 2001). De fato, o ovário tem sido considerado o maior alvo de DEs que afetam a fertilidade feminina (Mattison et al., 1989). Agentes tóxicos para o ovário podem causar falha direta na função ovariana por destruição extensiva de folículos. Isto resulta em perda dos hormônios esteróides ovarianos, eventual insuficiência ovariana (menopausa) e, finalmente, desregulação do *feedback* neuroendócrino, aumentando os níveis de FSH e LH (Hoyer, 2005). Estudos para detecção da toxicidade reprodutiva em fêmeas consistem na combinação de métodos, como avaliação da duração do ciclo estral, da fertilidade, peso de órgãos, histopatologia e quantificação corpos lúteos e de

folículos ovarianos (Regan et al., 2005). A utilização de técnicas complementares ajuda a garantir avaliação rigorosa minimizando o risco de falsos negativos para agentes tóxicos reprodutivos (Regan et al., 2005).

As substâncias que têm atividade desreguladora endócrina potencial são encontradas em cenários muito variados: na agricultura, como inseticidas, herbicidas, fungicidas; em produtos domisanitários, em indústrias, como dioxinas, bifenilas policloradas (PCB), alquifenóis e seus subprodutos, ftalatos, bisfenol A, metais pesados, entre outros; em fármacos, como os estrogênios sintéticos, dietiletilbestrol (DES) e 17α etinilestradiol e, na natureza, como os fitoestrogênios, genisteína e metaresinol (Bila & Dezotti, 2007).

Os praguicidas são o maior grupo de substâncias classificadas como desreguladores endócrinos. Nesse grupo estão inclusos inseticidas, herbicidas e fungicidas, utilizados na agricultura, aquicultura e em domicílios, como consequência seus resíduos vêm sendo encontrados em água potável, corpos hídricos e alimentos (Bila & Dezotti, 2007).

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 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Entre julho de 2001 e dezembro de 2004, o programa pesquisou 4.001 amostras de alimentos (alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate), coletadas em 12 estados da Federação. Do total de amostras analisadas, 2.032 apresentaram resíduos de praguicidas. Nessas amostras foram detectados 3.271 resíduos, onde, 2.340 (71,5%) eram regulares e 931 (28,5%) eram irregulares. Dentre os resíduos que apresentaram irregularidades 776 (83,4%) eram resíduos não autorizados e 155 (16,6 %) eram resíduos acima do LMR.

As culturas com maior frequência de irregularidades foram as de tomates, maçãs e morangos. Particularmente com relação aos tomates analisados entre 2001 e 2004, foram detectados resíduos de seis praguicidas não-autorizados (dicofol, dieldrin, endosulfan, monocrotofós, clorpirifós e diclorvos), e de cinco praguicidas permitidos, mas cujos níveis de resíduos estavam acima dos LMR (metamidofós, permetrina, triazofós, ditiocarbamatos e cialotrina) (ANVISA, 2005).

A estimativa do risco da exposição simultânea aos diferentes tipos de praguicidas é complexa. Durante todo o período de vida dos seres humanos, a exposição química à várias substâncias ocorre de forma concomitante (Yang, 1998). Esta circunstância natural difere da situação estabelecida com animais de experimentação, nos quais são testadas substâncias únicas, individuais, com alto nível de pureza, para identificação de seus efeitos tóxicos potenciais (sistêmicos, neurológicos, comportamentais, cancerígenos, reprodutivos, etc.) (Viau, 2002). Diante desta realidade, há relativamente pouca informação experimental sobre se, e como, a exposição a misturas pode afetar a saúde humana e animal (Carpenter et al., 1998). Isto também ocorre em virtude do número significativo de fatores que comprometem a avaliação das misturas químicas. Por exemplo, dois ou mais compostos podem ter efeitos aditivos, sinergísticos ou antagônicos sobre um mesmo órgão ou sistema-alvo, do mesmo modo que podem alterar mutuamente seu metabolismo (Yang, 1997; 1998). Assim, o estudo de misturas químicas em baixas doses sobre organismos superiores é uma área relevante de pesquisa devido ao seu impacto na avaliação do risco das populações humanas expostas aos múltiplos contaminantes químicos ambientais.

Em estudos experimentais que avaliam a toxicidade de compostos químicos, a variabilidade genética na resposta de roedores aos agentes testados pode ter implicações importantes por duas razões: primeiro, todos os bioensaios atuais em roedores usam

uma única linhagem de camundongos e ou ratos, no entanto, respostas podem variar entre as linhagens, segundo, analisar os mecanismos que geram diferenças de resposta à exposição a agentes pode constituir uma poderosa ferramenta adicional para estudos de modo/mecanismo ação desses agentes e seus órgãos-alvo. Até agora, esta abordagem tem sido pouco utilizada em ensaios toxicológicos (Festing, 1995).

Assim, o presente estudo objetivou avaliar experimentalmente o sistema reprodutor feminino após tratamento com mistura de baixas doses de cinco praguicidas (dicofol, dieldrin, endosulfan, diclorvos e permetrina) e comparar as respostas das diferentes linhagens (Sprague-Dawley, Wistar e Lewis) tratadas com essa mistura.

MATERIAL E MÉTODOS

Praguicidas

Dicofol (C14H9Cl6O), CAS 115-32-2 (doado pela Milenia Agrociências S/A, Londrina (PR), produto analítico 96,5%, lote: 0510624); endosulfan (C9H6Cl6O3S), CAS 115-29-7, mistura de isômeros alfa e beta (2:1) produto analítico 100,0%, (doado pela Bayer CropScience S/A, Belford Roxo, RJ); diclorvos (C4H7Cl2O4P), CAS 62-73-7, produto analítico 99,4%; permetrina, mistura de isômeros cis e trans (C21H20Cl2O3), CAS 52645-53-1, produto analítico 98,0%; dieldrin (C12H8Cl6O), CAS 60-57-1, produto analítico 97,9% (adquiridos da Fluka Chemicals, Sigma-Aldrich, Milwaukee, EUA).

Animais e condições experimentais

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UNESP (protocolo Nº 722). Foram utilizadas 90 ratas de 4 semanas de idade, das linhagens Sprague-Dawley (n= 30), Wistar (n= 30) e Lewis (n=30), fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP, Campinas, SP, Brasil. Para o estudo da linhagem Lewis foram selecionadas as fêmeas nascidas de matrizes adquiridas do CEMIB e pertencentes a um estudo paralelo desenvolvido pelo laboratório TOXICAM (Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental Sobre a Saúde Humana).

Na 6ª semana de idade, 30 ratas de cada linhagem foram randomizadas em 3 grupos de 10 animais. Grupo I- ração basal, controle negativo; Grupo II (praguicidas adicionados à ração em nível de seus respectivos NOELs (acrônimo em inglês, nível sem efeito observável) e Grupo III- praguicidas adicionados à ração em nível de seus

respectivos LOELs (acrônimo em inglês, menor nível com efeito observável). Água e ração foram fornecidos *ad libitum*, o consumo e peso corpóreo foram mensurados três vezes por semana. A partir da 8ª semana de tratamento, foi realizada a coleta de lavados vaginais para avaliação do ciclo estral durante 15 dias consecutivos, e após o término dessa avaliação iniciou-se a eutanásia dos animais. Todos os animais foram eutanasiados na fase de estro, entre a 10ª e 12ª semanas de experimento. Os animais foram eutanasiados após narcose induzida por CO_2 seguida da abertura torácica e punção cardíaca do sangue, que foi utilizado para realização das dosagens hormonais. Os ovários, útero, fígado e rins foram coletados, pesados e fixados em solução de formalina 10% tamponada.

Formulação das rações com mistura dos praguicidas

Os animais receberam ração semipurificada (Dieta AIN-93M) produzida pela nutricionista Nádia Fátima Gibrim Pereira Dias (Campinas, SP). Foram formulados 3 tipos de ração: Ração basal, fornecida ao grupo controle negativo, ração com mistura de praguicidas em doses de NOEL- diclorvos: 0,23 mg/Kg/dia; dicofol: 0,5 mg/Kg/dia; dieldrin: 0,025 mg/Kg/dia; endosulfan: 0,7 mg/Kg/dia; permetrina: 5 mg/Kg/dia - e ração com mistura de praguicidas em doses de LOEL- diclorvos: 2,3 mg/Kg/dia; dicofol: 2,1 mg/Kg/dia; dieldrin: 0,05 mg/Kg/dia; endosulfan: 3,8 mg/Kg/dia; permetrina: 25 mg/Kg/dia.

Para adição dos praguicidas, estes foram solubilizados em álcool etílico absoluto quando necessário e depois incorporados ao óleo de soja constituinte da ração. A seguir, a ração completa permaneceu no misturador por 1 hora, antes de ser peletizada e seca por ventilação a frio. As concentrações dos praguicidas nas rações dependeram das

doses críticas NOEL ou LOEL, tal como determinadas em ensaios crônicos com ratas (EPA, 1990,1992, 1993, 1994; WHO/FAO, 1996).

Coleta de lavado vaginal e avaliação do ciclo estral

A coleta do lavado vaginal para avaliação do ciclo estral foi realizada entre as 8:00 e 9:00 horas da manhã durante 15 dias consecutivos, conforme Marcondes et al., 2002. Com uma ponteira 10µl acoplada a um pipetador automático contendo solução fisiológica (NaCl, 0,9%) os lavados vaginais foram coletados e espalhados sobre lâminas histológicas. As fases do ciclo foram classificadas de acordo com a predominância de tipos celulares observados nos lavados vaginais à microscopia de luz, à saber (Marcondes et al., 2002): predomínio de células epiteliais nucleadas (proestro); predomínio de células queratinizadas anucleadas (estro); células queratinizadas e nucleadas e leucócitos (metaestro); predomínio de leucócitos e muco (diestro). A frequência total de cada fase foi utilizada para calcular a duração do proestro, estro, diestro e metaestro (em dias).

Análise hormonal

Todas as ratas foram sacrificadas durante a fase do estro entre 8:00 e 10:00 horas da manhã. Após a narcose induzida por CO_2, foi realizada abertura da cavidade torácica para punção cardíaca do sangue. Após a coleta, o sangue foi transferido para um tubo *Falcom* seco e centrifugado a 2500 rpm por 20 minutos. As concentrações de LH, FSH e progesterona foram dosadas por radioimunoensaio de duplo-anticorpo, com kits adquiridos pelo National Institute of Arthritis, Diabetes and Kidney Diseases (NIADDK, USA). Todas as amostras foram dosadas no mesmo ensaio para evitar erros entre eles.

Análise morfométrica do útero

O Fragmento do corno uterino foi incluído em parafina em corte transversal. Em seguida, três cortes de 5µm com 50 µm de distância entre eles foram realizados. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e analisados com auxílio de um microscópio de luz com analisador de imagem Leica DM2500, programa Leica Qwin em aumento de 100x, conforme descrito por Guerra et al., 2010. Em cada corte, cinco regiões foram analisadas, resultando em um total de 15 medições por animal.

Processamento do ovário para marcação imunoistoquímica

Para quantificação dos folículos ovarianos e corpos lúteos, três cortes transversais de 5µm com 50 µm de distância entre eles foram obtidos por microtomia para marcação da imunoistoquímica. Os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados com álcoois graduados, em seguida foi realizado bloqueio da peroxidase endógena em água oxigenada a 3%. Os cortes foram submetidos a recuperação antigênica em câmara de pressão (PASCAL) tampão ácido cítrico 0,21% em pH 6,0 a 120ºC por 3 min. Os cortes foram em seguida incubados em sistema *overnight* com anticorpo primário (PCNA - clone PC-10 - DAKO - 1:400). A seguir foi feita incubação com o anticorpo secundário (LSAB - LINK - K0609 - DAKO) por 30 minutos, seguida de incubação com o anticorpo terciário (LSAB - Streptavidina - K0609 - DAKO) por 30 minutos. A revelação foi realizada com 3,3-Diaminobenzidina (K3468 - DAKO) por 5 minutos. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina e eosina. Em seguida, foi feita desidratação em etanol absoluto, diafanização em xilol e montagem das lâminas em resina sintética

.

Análise do ovário

As áreas dos fragmentos dos ovários foram determinadas utilizando-se o programa de análise de imagem KS300 (CARL ZEISS, Alemanha). Os folículos foram classificados de acordo com Borgeest et al., 2002 e Talsness et al., 2005. Folículos primordiais e primários foram enumerados em conjunto; esses folículos foram caracterizados pela presença de uma única camada de células escamosas ou células epiteliais cubóides envolvendo o ovócito. Folículos foram classificados como pré – antrais quando apresentavam de 2-4 camadas de células da granulosa e não possuíam espaço antral. Folículos classificados como antrais apresentavam 3 ou mais camadas de células da granulosa e espaço antral claramente definido. Os folículos atrésicos foram caracterizados pela presença de células da granulosa desorganizadas e picnóticas e apresentando ainda ovócito em degeneração e deslocamento da membrana basal.

Histopatologia

Os fragmentos hepáticos foram processados rotineiramente para análise histológica e corados com hematoxilina e eosina (HE). Para exame ao microscópio de luz, a classificação das lesões hepáticas foi baseada em Goodman et al. 1994.

Análise estatística

Para comparação dos dados de ganho de peso, peso de órgãos, duração do ciclo estral, frequência de cada fase do ciclo e avaliação da espessura do endométrio entre os diferentes grupos experimentais, foi realizado o teste de ANOVA, seguida pelo Teste de Tukey quando $p<0,05$. Para comparação da quantificação de folículos ovarianos e corpos lúteos e dosagens hormonais entre os diferentes grupos experimentais, foi

realizado teste não-paramétrico de Kruskal Wallis e as diferenças significativas ($p<0,05$) foram comparadas pelo teste de Dunn.

RESULTADOS

Ganho de peso corpóreo

Valores referentes a peso corpóreo inicial, final e ganho de peso das linhagens Sprague-Dawley, Wistar e Lewis estão ilustrados na Tabela 1. Na linhagem Sprague-Dawley, animais tratados com mistura na dose LOEL apresentaram menor ganho de peso ao final do experimento quando comparados aos controles negativos e NOEL. Nas linhagens Wistar e Lewis não foi observada diferença no ganho de peso entre os grupos experimentais. Todos os animais dentro das respectivas linhagens, iniciaram o experimento com pesos iniciais semelhantes. Embora sem diferença significativa, os pesos finais dos grupos tratados com as doses de LOEL nas linhagens Wistar e Lewis apresentaram-se menores que os demais grupos.

Peso de órgãos

Fígado

Os pesos absolutos e relativos de fígado das diferentes linhagens estão apresentados na Tabela 2. Animais da linhagem Sprague-Dawley tratados com mistura em doses LOEL apresentaram aumento significativo do peso relativo do fígado em relação ao grupo controle ($p<0,05$). Na linhagem Lewis os pesos relativo e absoluto dos fígados dos animais tratados com a mistura na dose LOEL apresentaram-se significativamente maiores com relação aos animais do grupo controle e tratados com a dose NOEL ($p<0,05$), ($p<0,01$), ($p<0,001$) e ($p<0,001$) respectivamente. Na linhagem Wistar pesos relativos de fígado mostraram-se aumentados no grupo LOEL, no entanto, sem diferença significativa.

Ovários

Os pesos absoluto e relativo dos ovários das três linhagens estão apresentados na Tabela 2. O peso dos ovários dos animais das linhagens Sprague-Dawley e Wistar nos diferentes tratamentos não apresentaram alterações. Na linhagem Lewis, o peso relativo do ovário esquerdo dos animais tratados com mistura de praguicidas na dose LOEL apresentou aumento significativo em relação ao NOEL ($p<0,05$).

Útero

Os pesos absoluto e relativo do útero das três linhagens estão apresentados na Tabela 3. Os pesos absoluto e relativo do útero (com flúido) não apresentaram alterações entre os diferentes tratamentos das três linhagens. As ratas da linhagem Lewis apresentaram peso uterino superior às outras duas, independente do tratamento, o que foi associado ao maior volume de fluido no interior uterino, observado ao exame macroscópico.

Espessura do endométrio

Os valores referentes à morfometria do endométrio estão apresentados na Tabela 3. Não foram observadas diferenças significativas na espessura (μm) do endométrio na fase de estro entre os grupos experimentais das três linhagens.

Análise histológica do fígado

Os animais das três linhagens tratados com a LOEL apresentaram, à análise histológica do fígado, hipertrofia de hepatócitos centrolobulares. Demais alterações não foram observadas.

Avaliação do ciclo estral

A avaliação do ciclo estral das diferentes linhagens estão apresentados nas Tabelas 4 a 6. Na linhagem Sprague-Dawley não foram observadas alterações na duração do ciclo estral e na frequência das fases do ciclo entre os grupos experimentais. Na linhagem Wistar foi observado que fêmeas tratadas com a mistura na dose LOEL apresentaram menor frequência da fase proestro e maior frequência de metaestro com relação aos grupos controle e NOEL ($p<0,01$), ($p<0,05$), ($p<0,01$), ($p<0,01$) respectivamente. Esse mesmo grupo também apresentou menor frequência na fase diestro com relação ao grupo controle ($p<0,05$).

Na linhagem Lewis, a duração do ciclo estral no grupo tratado com mistura na dose NOEL foi menor em relação ao controle. Nessa linhagem a frequência da fase diestro também se mostrou menor no grupo NOEL em comparação aos grupos controle e LOEL. Nas ratas das linhagens Sprague-Dawley e Wistar o estro para realização da eutanásia foi detectado em todos os grupos dentro do período de 11 semanas. Na linhagem Lewis esta detecção ao final do experimento foi mais tardia, por volta do final da 12ª semana para todos os grupos.

Dosagens hormonais (LH, FSH e progesterona)

Os valores das dosagens hormonais dos animais controle e tratados nas diferentes linhagens estão apresentadas na Tabelas 7. Na linhagem Sprague-Dawley o nível sérico de FSH apresentou-se significativamente aumentado no grupo NOEL quando comparado com controle ($p<0,05$). O tratamento dos animais das linhagens Wistar e Lewis com as misturas nas doses NOEL e LOEL não alterou as concentrações séricas (ng/mL) dos hormônios FSH, LH e progesterona.

Análise quantitativa dos folículos e corpos lúteos

Os valores referentes à análise quantitativa dos folículos e corpos lúteos estão ilustradas nas Tabelas 8 a 10. Na linhagem Sprague-Dawley, o número total de folículos dos animais tratados com mistura nas doses NOEL foi significativamente menor em relação ao controle ($p<0,05$). Esta diminuição foi devida a menor quantidade de folículos antrais dos animais tratados com a NOEL significativa em relação ao controle negativo ($p<0,01$). Nesta linhagem foi observado também uma diminuição na quantidade de corpos lúteos dos animais tratados com a mistura nas doses de LOEL em relação ao controle ($p<0,05$).

Na linhagem Wistar a quantidade de folículos pré antrais dos animais controle apresentou-se significativamente diminuída quando comparada aos animais tratados com mistura nas doses de NOEL e LOEL ($p<0,05$). Nesta linhagem o número médio de folículos antrais por cm^2 mostrou-se aumentado nos animais tratados com LOEL em relação ao NOEL ($p<0,05$).

Com relação à linhagem Lewis, o número total de folículos/cm2 dos animais tratados com NOEL apresentou aumento significativo maior quando comparado aos animais tratados com LOEL ($p<0,001$); a quantidade de folículos primordiais e primários dos animais tratados com a mistura em doses de LOEL apresentou-se significativamente diminuída comparada ao grupo tratado com NOEL ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

Uma variedade de compostos químicos, naturais ou sintéticos e de estrutura diversas, classificados como desreguladores endócrinos (DEs) tem sido responsabilizados por interferir com o sistema endócrino e alterar a função normal de diversos tecidos e órgãos (Henley & Korach, 2006). Nos últimos anos, estudos experimentais e epidemiológicos tem apontado que agentes químicos pertencentes às classes dos solventes, poluentes ambientais, praguicidas e outras drogas poderiam mimetizar ou antagonizar efeitos dos hormônios esteróides, como estrógenos e andrógenos, cuja função determina o bom desenvolvimento e funcionamento do sistema reprodutor, entre outros (Massaad et al.,2002; Baker, 2001).

A discrepância entre a alta concentração de agentes químicos estrogênicos que são necessárias para provocar efeitos em ensaios de laboratório e seus baixos níveis encontrados no ambiente respaldaram a crença de que os riscos para a saúde humana ou a vida selvagem podem ser negligenciados (Safe, 1995). Vários artigos científicos atuais procuram alertar que seres humanos e animais não estão expostos a um único agente, mas à uma mistura de vários agentes estrogênicos ao longo da vida. As baixas concentrações das substâncias químicas no ambiente e tecidos humanos têm alimentado a suspeita de que o sinergismo entre os produtos químicos estrogênicos precisam ser melhor explorados para detectar e explicar seus efeitos potenciais à saúde humana (Silva et al., 2002).

Alguns ensaios experimentais *in vivo* foram desenvolvidos para identificação de substâncias químicas causadoras de desregulação endócrina em fêmeas. Destes, os mais utilizados são o teste uterotrófico, e o teste de cornificação vaginal (Baker, 2001). No sentido de otimizar a detecção do potencial desregulador endócrino de substâncias

químicas, Regan et al. (2005), em uma diretriz da Sociedade de Patologia Toxicológica Americana (STP), recomendam que estudos para detecção da toxicidade reprodutiva em fêmeas sejam constituídos de uma combinação de parâmetros e métodos, como avaliação da duração do ciclo estral, da fertilidade, peso de órgãos, histopatologia, quantificação de corpos lúteos e de folículos ovarianos. O presente estudo objetivou avaliar experimentalmente o sistema reprodutor feminino de ratas expostas a mistura de praguicidas em baixas doses NOEL e LOEL. Os parâmetros utilizados foram a avaliação da regularidade do ciclo estral, dosagens hormonais (FSH, LH e progesterona), espessura do endométrio, análise qualitativa do ovário e contagem de folículos ovarianos.

Peso corpóreo e peso de fígado

Com relação à avaliação de pesos corpóreos, as diferenças foram significativas na linhagem Sprague-Dawley, onde os animais tratados com doses de LOEL apresentaram menor ganho de peso corpóreo ao final do experimento. Tal alteração foi atribuída ao tratamento, já que o consumo de ração não apresentou alteração entre os grupos. As demais linhagens, Wistar e Lewis, também mostraram menor ganho de peso das ratas tratadas com as doses LOEL, porém sem significância estatística. O ganho de peso corpóreo reduzido nos grupos tratados com LOEL mostrou a evidência de toxicidade sistêmica da mistura nas três linhagens.

Em estudos experimentais, baseados na exposição a agentes químicos, o fígado, como órgão central de biotrasnformação, deve ser pesado e coletado. A comparação do peso hepático entre grupos tratados e não tratados tem sido utilizada para avaliar o efeito tóxico sistêmico de tais agentes (Peters & Boyd, 1966; Pfeiffer, 1968). Sua avaliação histológica também é crítica em estudos da toxicidade, aos quais este órgão

pode reagir desenvolvendo alterações não-proliferativas e proliferativas (Goodman et al., 1994; Hardisty & Brix, 2005). No presente trabalho, os fígados foram analisados quanto ao peso, exame macroscópico e microscopia à coloração de HE. De forma geral, todas as ratas tratadas com a mistura de praguicidas nas doses de LOEL apresentaram maiores valores de peso relativo do fígado quando comparados aos demais grupos, provavelmente, devido à hipertrofia dos hepatócitos centrolobulares, observada nesses grupos à microscopia de luz.

Walker et al. (1969) observaram que fêmeas expostas ao dieldrin por dois anos, na dose de 0,05 mg/Kg/dia, apresentaram aumento no peso do fígado. Em estudo da EPA (1992), ratos fêmeas e machos da linhagem Long-Evans tratados com 5 mg/Kg/dia de permetrina, durante cento e quatro semanas, apresentaram pequeno aumento no peso do fígado, este aumento foi considerado abaixo do nível de significância toxicológica. Porém, animais tratados na dose de 25mg/Kg/dia apresentaram aumento significativo do peso do fígado. Em estudo realizado em camundongos expostos ao dicofol, pela dieta, nas concentrações de 0; 10; 125; 250; 500 ou 1000 mg/Kg de ração, durante um período de 13 semanas, aqueles expostos à dose de 10mg/Kg, dose correspondente a 2,1 mg/Kg peso corpóreo/dia, apresentaram redução do peso corpóreo e hipertrofia centrolobular do fígado. Em outro estudo, camundongos tratados com dicofol durante o mesmo período e nas doses de 0; 250; 500 ou 750 mg/Kg de ração, apresentaram alterações hepáticas tais como hipertrofia da centrolobular e eosinofilia de hepatócitos em todas as doses de exposição (INCHEM, 1996).

Avaliação do ciclo estral

Para o acompanhamento do ciclo estral, a avaliação das mudanças na estrutura das células epiteliais vaginais por citologia, tem sido empregada como um método

relativamente não-invasivo para documentar os ciclos reprodutivos em animais experimentais. De acordo com a literatura na área, estes dados possibilitam a avaliação do estado funcional do eixo hipotalâmico, hipofisário e reprodutivo. Danos em qualquer um desses locais podem provocar desregulação no ciclo ou bloquear a ovulação. No entanto, tais dados devem ser acompanhados da avaliação dos níveis hormonais, devido às alterações incidentais no ciclo que podem ser causadas pela manipulação dos animais (Goldman et al., 2007). No presente trabalho, avaliação do ciclo estral das fêmeas Wistar apresentou diferenças entre os grupos experimentais. Ratas tratadas com mistura em doses LOEL mostraram menor frequência da fase proestro e maior frequência do metaestro em relação às ratas controle e tratadas com NOEL, no entanto a frequência da fase de estro mostrou-se igual em todos os grupos, sem correlação com os tratamentos.

Na linhagem Lewis a duração do ciclo estral foi menor nas ratas tratadas com NOEL, no entanto, esta alteração não foi acompanhada de alterações nos níveis hormonais. Com relação ao número de animais que apresentaram estro e o período em que este foi detectado para a eutanásia, observamos que nas ratas das linhagens Sprague-Dawley e Wistar, o estro foi detectado em todos os grupos dentro do período de 11 semanas. Na linhagem Lewis, observamos maior dificuldade de detecção de estro ao final do experimento, o que prolongou o período de eutanásia até o final da 12º semana. Este fenômeno foi atribuído à linhagem, pois foi observado em todos os grupos, independentemente do tratamento.

Dosagens hormonais

A única alteração hormonal observada no presente estudo foi o aumento nos níveis de FSH das ratas Sprague-Dawley tratadas com a mistura em doses NOEL e

não apresentou relação com o número ou frequência de ciclo estral, que permaneceram inalterados com relação ao controle negativo. Salientamos que os valores hormonais avaliados limitaram-se àqueles obtidos durante o estro, fase em que as ratas foram eutanasiadas e procedeu-se a coleta de sangue. Para as três linhagens utilizadas no presente trabalho, estas alterações, hormonais ou do ciclo estral, também não apresentaram correlação com a medida da espessura endometrial. Segundo Bretveld et al. (2006), praguicidas podem alterar a função do hipotálamo e da hipófise e, portanto, a secreção de GnRH, LH e FSH. Cooke & Eroschenko (1990) e Palanza et al. (1999), indicaram que ratos expostos à baixas doses dos praguicidas organoclorados como o p' DDT e o metoxicloro podem apresentar diminuição da função hipotalâmica e pituitária, o que pode se refletir nos níveis séricos hormonais.

Análise qualitativa e quantitativa dos ovários

O desenvolvimento dos folículos ovarianos após o nascimento - que corresponde à regulação da proliferação celular, diferenciação e atresia - é resultado de uma complexa interação entre fatores locais, hormônios e fatores de crescimento (Martins et al., 2008). O processo de formação, crescimento e maturação folicular é denominado foliculogênese e é um evento contínuo que se inicia na vida pré natal e após o nascimento compreende o crescimento e desenvolvimento dos folículos primários até o estágio pré ovulatório. Dentre os métodos utilizados para avaliação da toxicidade reprodutiva, o primeiro passo consiste na avaliação histopatológica do ovário de forma qualitativa em colorações de rotina, como Hematoxilina e eosina (HE). De fato, esta primeira análise é considerada uma ferramenta de triagem para avaliação da toxicidade reprodutiva. A exposição a agentes tóxicos que alteram a ovulação durante a fase de maturação sexual, pode causar vários tipos de alterações dos folículos, dentre elas a

ausência de folículos em crescimento, depleção de folículos primordiais, ausência de corpos lúteos, aumento do número de folículos atrésicos, aumento da apoptose e necrose de células foliculares. Essas alterações são prontamente detectadas pela análise morfológica qualitativa dos ovários. (Regan et al., 2005). Com relação à análise quantitativa dos folículos ovarianos, antes de 1998 alguns protocolos de estudos incluíam a contagem de corpos lúteos no ovário, no entanto, estudos com camundongos e ratos mostraram que a contagem de folículos era um método que poderia estimar a extensão da toxicidade em fêmeas expostas a xenobióticos (Toaff et al., 1979; Mattison et al., 1983; Takizawa et al., 1984 Weitzman et al. 1992; Flaws et al., 1994; Perez et al., 1997). Dados de alguns estudos sugeriram que a contagem diferencial dos folículos poderia se tornar um *endpoint* quantificável de danos ovarianos em bioensaios convencionais. Assim, a partir de 1998 houve a inclusão da contagem de folículos ovarianos em protocolos de estudos reprodutivos (EPA, 1998; FDA, 2000; OECD, 2001). No presente trabalho a análise quantitativa dos folículos apresentou-se bastante variável entre os animais de mesmo tratamento assim como entre as linhagens. Tal variabilidade dos resultados prejudicou a interpretação e sua correlação com os níveis hormonais. Na linhagem Sprague-Dawley, os animais tratados com a NOEL apresentaram diminuição dos folículos antrais com relação aos controles, já os animais tratados com a LOEL apresentaram diminuição do número de corpos lúteos com relação ao controle negativo. Essas alterações sugerem que o tratamento com a mistura de praguicidas possa ter alterado a fase final do desenvolvimento folicular, no entanto na comparação entre os grupos tratados com a NOEL e LOEL não houve diferença significativa. A confirmação dessas alterações poderia ser elucidada por estudos de fertilidade.

A quantificação de folículos na linhagem Wistar apresentou-se também com grande variabilidade e a única alteração observada, foi o aumento de folículos antrais dos animais tratados com a LOEL em relação a NOEL apenas. Tal achado foi interpretado como incidental dada a variabilidade de resposta apresentada por estes animais.

Na linhagem Lewis foi observada a diminuição de folículos primordiais e primários nas ratas tratadas com a LOEL, com diferença significativa em relação ao grupo tratado com a NOEL. Esta alteração sugere a possível ação da mistura no recrutamento dos folículos em fase inicial de desenvolvimento, o que remete à necessidade de estudos mais específicos para confirmação de que este fenômeno possa ter sido causado realmente pelo tratamento. Outra alteração observada nessa linhagem foi o menor número de corpos lúteos dos controles negativos em relação as outras duas linhagens.

Os dados gerados na avaliação quantitativa dos folículos do presente estudo corroboram as afirmações de Regan et al. (2005) que ressaltam que as contagens foliculares podem ser altamente variáveis, com grandes desvios padrões tanto entre animais quanto entre grupos, tornando a interpretação difícil. Estes autores indicam que quando a depleção ou outras lesões são claramente identificadas durante a avaliação histológica qualitativa, as contagens de folículos tornam-se desnecessárias. No presente trabalho à análise qualitativa não foram observadas alterações morfológicas ovarianas, conduzindo à análise quantitativa dos folículos.

Modos de ação estrogênicos são atribuídos aos praguicidas dicofol, dieldrin, endosulfan e permetrina. Alguns mecanismos de ação, como do dicofol e da permetrina ainda permanecem desconhecidos. Os mecanismos de ação do dieldrin e endosulfan são similares, incluindo a ligação com receptores de estrógenos e outros receptores e interferência no *clearence* hormonal, por indução enzimática. As consequências destas

ações no crescimento e desenvolvimento de folículos ovarianos, assim como nas taxas de ovulação são variáveis e ainda carecem de estudos (Bretveld et al., 2006).

Alguns estudos foram desenvolvidos no sentido de verificar a associação entre praguicidas desreguladores endócrinos e possívies efeitos sinergisticos ou somatórios. Wade et al. (1997) em estudo *in vitro* verificaram a ação combinada dos praguicidas dieldrin e endosulfan sobre a replicação de células MCF-7 e observaram sinergismo apenas nas doses mais elevadas. (10 e 50μM). Estes mesmos autores não observaram sinergismo no estudo uterotrófico em ratas após a injeção diária de 0,1 mg por animal por dia de cada um dos pesticidas durante três dias. Estudo de Presibella et al. (2005), mostrou que um grupo de fêmeas expostas à combinação de deltametrina (D) e endosulfan (E) durante a gestação e após o desmame nas doses de (D) 2,0 mg /Kg + (E)1,5mg/Kg ou (D)3,0 mg / kg + : (E) 2,0 mg / kg, ou (D): 4,0 mg / kg + (E): 3,0 mg / kg; não apresentaram atividade estrogênica no ensaio uterotrófico. As análises de abertura vaginal, primeiro estro, regularidade de ciclo e pesos do útero e ovários não mostraram alterações. Estes resultados sugeriram que a administração de deltametrina + endosulfan, nas doses citadas, não apresentaram sinergismo quanto aos efeitos estrogênicos em ratas expostas durante períodos críticos de desenvolvimento.

CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento a mistura de praguicidas na dose de NOEL não apresentou efeito sinergístico quanto a toxicidade sistêmica. Tal toxicidade foi evidenciada na mistura das doses de LOEL pela diminuição de ganho de peso corpóreo e aumento de peso de fígado nas três linhagens utilizadas, sendo mais marcante na linhagem Lewis e Sprague-Dawley.

Para ambas as dosagens utilizadas nas misturas não foram observados sinais de toxicidade reprodutiva que se refletissem em peso e morfologia de ovários e útero. A análise do ciclo estral e níveis hormonais não indicaram toxicidade reprodutiva devido às misturas.

A contagem de folículos ovarianos não apresentou resposta dose dependente e a variabilidade observada foi alta entre os animais de mesmo grupo experimental. Desta forma concluímos que embora os resultados tenham mostrado diminuição de algumas populações foliculares nas doses de NOEL e LOEL, este parâmetro não pode ser utilizado isoladamente como indicativo de toxicidade reprodutiva. Estes achados remetem à necessidade de maiores estudos para o esclarecimento sobre o efeito destes compostos nas populações foliculares.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Controlando agrotóxicos nos alimentos: O trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, a FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR e ITEP/PE. Relatório de atividades 2004. Brasília, DF, 2005, <www.anvisa.gov.br> (26 agosto de 2005).

Anderson ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakmi R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik S. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. 1º ed. (São Paulo, Universidade Federal de São Paulo, 2004), p.82-119.

Arnold AP, Gorski RA. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. Ann Ver Neurosci 1984; 7: 413-442.

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

Bila DM, Dezotti M. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente: Efeitos e Conseqüências. Química Nova 2007; 30: 651-666.

Borgeest C, Symonds D, Mayer LP, Hoyer PB, Flaws JA. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. Toxicol Sci 2002; 68:473–478.

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.

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

Chemical Safety Information from Intergovernamental Organizations (INCHEM), data sheets on pesticides. Nº 81. Dicofol. 1996, <http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest81_e.htm> (19 de fevereiro de 2009).

Cooke PS, Eroschenko VP. Inhibitory effects of technical grade methoxychlor on development of neonatal male mouse reproductive organs. Biol Reprod 1990; 42:585-596.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser Russ, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. Endocrine Rev 2009; 30:293-342.

Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guideline, OPPTS 870.3800, Reproduction and Fertility Effects. EPA 712-C-98-239. U.S. Environmental Protection Agency, Office of prevention, Pesticides and Toxic Substances. (Washington DC, 1998).

Environmental Protection Agency (EPA). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD). Endosulfan. Washington: USEPA; 1994. Disponível em http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0235.htm Acessado em 03/junho/2005.

Environmental Protection Agency (EPA). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD). Dichlorvos. Washington: USEPA 1993, <http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0151.htm> (12/dezembro/2005).

Environmental Protection Agency (EPA). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD). Permethrin. Washington: USEPA, 1992, <http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0185.htm> (12/dezembro/2005).

Environmental Protection Agency (EPA). Integrated Risk Information System (IRIS). Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD). Dieldrin. Washington: USEPA, 1990, <http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0225.htm> (16/agosto/2005).

Festing, MF. Use of a multistrain assay could improve the NTP carcinogenesis bioassay. Environ Health Perspect 1995; 103: 44-52.

Flaws JA, Doerr JK, Sipes IG, Hoyer PB. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. Repro Toxicol 1994; 8: 509–514.

Food and Drug Administration (FDA). Redbook 2000. Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. IV.C.9.a. Guidelines for Reproductive Studies; 2000. [Acesso em 05 de outubro de 2010]. Disponível em

http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/Redbook/ucm078396.htm

Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. Birth Defects Res 2007; 80:84-97.

Goodman DG, Maronpot RR, Newberne, JA, Popp RA, Squire RA. Proliferative and Selected other lesions of the liver in rats. GI-5. In: Guides for Toxicologic Pathology. STP/ARP/AFIP. (Washington, DC, 1994), p.2-24.

Guerra MT, Scarano WR, de Toledo FC, Janete AA, Franci JAA, Kempinas, W de G. Reproductive development and function of female rats exposed to di-η-butyl-phthalate (DBP) *in utero* and during lactation. Repr Toxicol 2010; 29: 99-105.

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

Henley DV, Korach KS. Endocrine-Disrupting chemicals use distinct mechanism of action to modulate endocrine system function. Endocrinology 2006; 147: 25-32.

Hoyer PB. Damage to ovarian development and function. Cell Tissue Res 2005; 322: 99-106.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Braz J Biol 2002; 62: 609-614.

Martins FS, Silva, JRV, Rodrigues, APR, Figueiredo JR. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. Ver Bras Reprod Anim 2008; 32: 36-49.

Massaada, C, Entezamia, F, Massadec, L, Benahmedb, M, Olivennesa, F, Baroukic, R, Hamamah, S. How can chemical compounds alter human fertility? Eur J Obstetrics & Ginecology and Repr Biol 2002; 100: 127-137.

Mattison DR, Shiromizu K, Nightingale MS. Oocyte destruction by polycyclic aromatic hydrocarbons. Amer J Indus Med 1983; 4: 191–202.

Mattison DR, Thomford PJ. The mechanism of action of reproductive toxicants. Toxicol Pathol 1989; 17: 364–376.

Morris JA, Jordan CL, Breedlove SM. Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. Nat Neurosci 2004; 7: 1034-1039.

Nicolopoulou-Stamati P, Pitsos MA. The impact of endocrine disrupters on the female reproductive system. Hum Repr Update 2001; 7: 323-330.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Proposal for updating Guideline 416: Two-generation reproduction toxicity study. In OECD Guideline for Testing of Chemicals. Paris: OECD; 2001: p. 1–13.

Palanza P, Parmigiani S, Liu H, vom Saal FS. Prenatal exposure to low doses of the estrogenic chemicals diethylstilbestrol and p ,p'-DDT alters aggressive behavior of male and female house mice. Pharmacol Biochem Behav 1999; 64: 665-672.

Perez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. Nat Med 1997; 3: 1228– 1232.

Peters JM, Boyd EM. Organ weights and water levels of the rat following reduced food intake. J Nutr 1966; 90: 354–360.

Pfeiffer CJ. Amathematical evaluation of the thymic weight parameter. Toxicol Appl Pharmacol 1968; 13: 220–227.

Regan KS, Cline JM, Creasy D, Davis B, Foley GL, Lanning L, Latendresse JR, Makris S, Morton D, Rehm S, Stebbins K, STO Ovary Evaluation Working Group. STP Position Paper: Ovarian Follicular Counting in the Assessment of Rodent Reproductive Toxicity. Toxicol Pathol 2005; 33: 409-412.

Safe SH. Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? Environ Health Perspect 1995; 103: 346-351.

Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A. Something from "Nothing"-Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. Environ Sci Technol 2002; 36: 1751-1756.

Talsness CE, Shakibaei M, Kuriyama SN, Grande SW, Sterner-Kock A, Schnitker P, de Souza C, Grote K, Chahoud I. Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. Toxicol Lett 2005; 157:189–202.

Takizawa K, Yagi H, Jerina DM, Mattison DR. Murine strain differences in ovotoxicity following intraovarian injection with benzo(a)pyrene, (+)-(7R,8S)-oxide, (−)-(7R,8R)-dihydrodiol, or (+)- (7R,8S)-diol-(9S,10R)-epoxide-2. Cancer Res 1994; 44:, 2571–2576.

Toaff ME, Abramovici A, Sporn J, Liban E. Selective oocyte degeneration and impaired fertility in rats treated with the aliphatic monoterpene, citral. J Repro Fertil 1979; 55: 347–352.

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

Wade MG, Desaulniers, D, Leingartner K, Foster, WG. Interactions between endosulfan and dieldrin on estrogen-mediated processes in vitro and in vivo. Reproductive Toxicology. 1997; 11:791-798.

Walker AIT, Stevenson J, Robinson R, Thorpe M. The toxicology and pharmacodynamics of dieldrin (HEOD): Two-year oral exposures of rats and dogs. Toxicol Appl Pharmacol 1969; 15: 345-373.

Weitzman, G. A., Miller, M. M., London, S. N., and Mattison, DR. Morphometric assessment of the murine ovarian toxicity dimethylbenz(A)anthracene. Repro Toxicol 1992; 6: 137–141.

World Health Organization (WHO). Global Assessment of the State-of-the-Science of endocrine Disruptors.In: Damstra T, Brlow S, Bergman A, Kavlock R, Der Kraak Van (ed). WHO 2002.

WHO/FAO. Data sheets on pesticides. Dicofol, n.81. Geneva: WHO/FAO 1996. <http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest81_e.htm#3.8/> (12/abril/2004).

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

Yang RS. Some Critical Issues and Concerns Related to Research Advances on the Toxicology of Chemical Mixtures. Environ Health Perspect 1998; 106: 1059-1063.

Yang RSH. Toxicologic interactions of chemical mixtures. (Oxford, England: Elsevier; 1997) 189-203. In: Bond J, editor. Comprehensive Toxicology Vol 1: General Principles, Toxicokinetics, and Mechanisms of Toxicity.

Tabela 1. Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso das linhagens SD, Wistar e Lewis.

Linhagem	Tratamento	N	Peso Inicial (g)	Peso Final(g)	Ganho de Peso (g)
Sprague-Dawley	Controle	10	205,8±16,1	321,3±25,7	115,5±12,8
	NOEL	9	211,1±21,2	330,2±34,4	119,1±14,4
	LOEL	8	210,2±21,9	296,7±39,0	86,5±28,0*
Linhagem	**Tratamento**	**N**	**Peso Inicial (g)**	**Peso Final(g)**	**Ganho de Peso (g)**
Wistar	Controle	8	170,9±13,4	270,2±22,0	99,4±14,7
	NOEL	9	171,7±12,5	263,3±19,1	91,7±10,4
	LOEL	9	169,0,±10,8	258,0±19,2	89,0±12,5
Linhagem	**Tratamento**	**N**	**Peso Inicial (g)**	**Peso Final(g)**	**Ganho de Peso (g)**
Lewis	Controle	8	136,7± 12,2	231,7 ± 15,7	95,0±10,3
	NOEL	7	134,7 ± 9,10	233,1 ± 9,90	98,4 ± 6,4
	LOEL	5	137,4 ± 9,8	225,8 ± 14,1	88,4 ± 5,3

N: número efetivo de animais. Dados expressos em média ±desvio-padrão.

*Diferença significativa entre o grupo controle NOEL ($p<0,01$). Teste de ANOVA seguido pelo Teste de Tuckey.

[a]ganho de peso= peso final - peso inicial

Tabela 2. Peso corpóreo final e pesos absoluto (g) e relativo (%) do fígado e pesos absoluto (mg) e relativo (%) dos ovários e útero das linhagens SD, Wistar e Lewis.

				Fígado		Ovário Direito		Ovário Esquerdo	
Linhagem	**Tratamento**	**N**	**PC (g)**	**PA (g)**	**PR (%)[b]**	**PA (mg)**	**PR (%)[b]**	**PA (mg)**	**PR (%)[b]**
SD	Controle	10	321,3 ± 25,6	9,53 ± 0,95	2,95 ± 0,12	45,9 ± 7,18	14,3 ± 2,43	44,8 ± 8,05	14,0 ± 2,83
	NOEL	9	329,5 ± 32,5	10,10 ± 1,60	3,12 ± 0,26	50,2 ± 11,56	15,4 ± 2,53	45,8 ± 12,01	14,1 ± 2,98
	LOEL	8	298,2 ± 37,1	9,71 ± 1,30	3,26 ± 0,20*	41,0 ± 9,63	14,2 ± 2,90	35,3 ± 4,43	12,2 ± 1,84
				Fígado		**Ovário Direito**		**Ovário Esquerdo**	
Linhagem	**Tratamento**	**N**	**PC (g)**	**PA (g)**	**PR (%)[b]**	**PA (mg)**	**PR (%)[b]**	**PA (mg)**	**PR (%)[b]**
Wistar	Controle	8	274,1 ± 24,1	8,42 ± 0,90	3,07 ± 0,21	46,3 ± 5,26	17,0 ± 2,77	42,7 ± 6,81	15,6 ± 2,81
	NOEL	9	267,3 ± 20,0	8,50 ± 0,94	3,17 ± 0,26	44,5 ± 8,91	16,7 ± 3,69	40,8 ± 5,98	15,3 ± 2,56
	LOEL	9	258,1 ± 17,6	8,36 ± 0,68	3,24 ± 0,25	47,5 ± 5,91	18,4 ± 1,71	41,5 ± 8,90	16,0 ± 2,85
				Fígado		**Ovário Direito**		**Ovário Esquerdo**	
Linhagem	**Tratamento**	**N**	**PC (g)**	**PA (g)**	**PR (%)[b]**	**PA (mg)**	**PR (%)[b]**	**PA (mg)**	**PR (%)[b]**
Lewis	Controle	8	231,7 ± 15,7	7,24 ± 0,83	3,10 ± 0,20	27,2 ± 5,54	11,6 ± 2,08	26,2 ± 3,91	11,2 ± 1,57
	NOEL	7	233,1 ± 9,80	6.90 ± 0,40	3,00 ± 0,19	25,7 ± 5,37	11,0 ± 1,85	21,4 ± 4,23	9,20 ± 1,63
	LOEL	5	225,8 ± 14,1	8,50 ± 0,71**	3,73 ± 0,18**	28,6 ± 6,95	12,5 ± 2,90	27,8 ± 4,49	12,1 ± 1,73***

N: número efetivo de animais. Dados expressos em média ±desvio-padrão.

*Significativamente diferente do controle ($p<0,05$). Teste de ANOVA seguido pelo Teste de Tuckey.

**Peso absoluto significativamente diferente do controle ($p<0,05$) e NOEL ($p<0,01$), peso relativo significativamente diferente do controle ($p<0,001$) e NOEL ($p<0,001$). Teste de ANOVA seguido pelo Teste de Tuckey.

***Significativamente diferente do NOEL ($p<0,05$). Teste de ANOVA seguido pelo Teste de Tuckey.

[b] Peso relativo= peso do órgão/ peso corpóreo final x 100

Tabela 3. Pesos absoluto (mg) e relativo (%) do útero e espessura do endométrio (µm) das linhagens SD, Wistar e Lewis.

Linhagem	Tratamento	N	PC (g)	Útero + Fluído		Espessura
				PA (mg)	PR (%)[b]	
Sprague-Dawley	Controle	10	321,3 ± 25,6	614,6 ± 219,9	191,1 ± 68,6	452,68 ± 172,58
	NOEL	9	329,5 ± 32,5	508,1± 56,2	158,8 ± 21,8	600,44 ± 99,53
	LOEL	8	298,2 ± 37,1	475,8 ± 64,4	165,4 ± 30,7	554,57 ± 89,13
Linhagem				**Útero + Fluído**		**Espessura**
				PA (mg)	**PR (%)[b]**	
Wistar	Controle	8	274,1 ± 24,1	780,7 ± 304,5	284,9 ± 105,7	454,78 ± 156,67
	NOEL	9	267,3 ± 20,0	1029,8 ± 379,8	388,3 ± 147,8	381,95 ± 205,53
	LOEL	9	258,1 ± 17,6	1077,5 ± 313, 9	421,5 ± 140,1	359,76 ± 126,63
Linhagem				**Útero + Fluído**		**Espessura**
				PA (mg)	**PR (%)[b]**	
Lewis	Controle	8	231,7 ± 15,7	1252 ± 492,9	535,3 ± 194,6	330,99 ± 141,08
	NOEL	7	233,1 ± 9,80	1071 ± 425,7	455,8 ± 168,8	322,61 ± 175,75
	LOEL	5	225,8 ± 14,1	891 ± 266,0	388,4 ± 107,8	419,06 ± 79,95

N: número efetivo de animais. Dados expressos em média ±desvio-padrão. Teste de ANOVA.

[b] Peso relativo= peso do órgão/ peso corpóreo final x 100

Tabela 4. Duração e frequência das fases do ciclo estral da linhagem SD.

Tratamento	Controle (n=10)	NOEL (n=10)	LOEL (n=10)
Ciclo Estral			
Duração do ciclo estral (dias)	5,75 ± 0,82	4,88 ± 2,31	3,88 ± 3,19
Frequência de Proestro (dias)	2,00 ± 0,94	1,80 ± 1,03	2,70 ± 1,16
Frequência de Estro (dias)	2,60 ± 0,84	2,20 ± 1,47	1,90 ± 1,37
Frequência de Metaestro (dias)	6,80 ± 0,78	7,60 ± 2,63	7,20 ± 2,09
Frequência de Diestro (dias)	3,60 ± 1,50	3,40 ± 1,83	3,20 ± 1,61

N: número efetivo de animais. Dados expressos em média ±desvio-padrão. Teste de ANOVA.

Tabela 5. Duração e frequência das fases do ciclo estral da linhagem Wistar.

Tratamento	Controle (n=10)	NOEL (n=10)	LOEL (n=10)
Ciclo Estral			
Duração do ciclo estral (dias)	6,65 ± 3,66	5,83 ± 3,26	5,96 ± 2,55
Frequência de Proestro (dias)	4,00 ± 0,66	3,90 ± 1,59	2,10 ± 1,52*
Frequência de Estro (dias)	2,50 ± 0,70	2,70 ± 1,05	2,60 ± 1,35
Frequência de Metaestro (dias)	5,7 ± 1,82	6,00 ± 2,16	9,20 ± 1,87*
Frequência de Diestro (dias)	2,70 ± 1,56	2,40 ± 1,35	1,10 ± 1,28*

Dados expressos em média ±desvio-padrão.

Frequência de Proestro (dias):*significativamente diferente do controle ($p< 0,01$) e do NOEL ($p<0,05$). Teste de ANOVA seguido pelo Teste de Tuckey.

Frequência de Metaestro (dias):*significativamente diferente do controle ($p< 0,01$) e do NOEL ($p<0,01$). Teste de ANOVA seguido pelo Teste de Tuckey.

Frequência de Diestro (dias):*significativamente diferente do controle ($p< 0,05$). Teste de ANOVA seguido pelo Teste de Tuckey.

Tabela 6. Duração e frequência das fases do ciclo estral da linhagem Lewis.

Tratamento	Controle (n=10)	NOEL (n=10)	LOEL (n=10)
Ciclo Estral			
Duração do ciclo estral (dias)	6,7 ± 2,50	3,43 ± 2,50*	6,28 ± 2,86
Frequência de Proestro (dias)	1,80 ± 0,91	3,11 ± 1,79	2,10 ± 1,28
Frequência de Estro (dias)	0,90 ± 0,87	0,70 ± 0,67	0,60 ± 0,84
Frequência de Metaestro (dias)	7,70 ± 3,80	9,30 ± 2,98	7,80 ± 2,53
Frequência de Diestro (dias)	4,5 ± 2,63	1,70 ± 1,88*	4,5 ± 2,67

Dados expressos em média ±desvio-padrão.

Duração do ciclo estral (dias): *significativamente diferente do controle ($p< 0,05$). Teste de ANOVA seguido pelo Teste de Tuckey.

Frequência de Diestro (dias):*significativamente diferente do controle ($p< 0,05$) e LOEL ($p< 0,05$). Teste de ANOVA seguido pelo Teste de Tuckey.

Tabela 7. Concentrações plasmáticas (em ng/ml) dos hormônios FSH, LH e progesterona das linhagens SD, Wistar e Lewis.

			Concentração sérica		
Linhagem	**Tratamento**	**N**	**FSH**	**LH**	**Progesterona**
Sprague-Dawley	**Controle**	**10**	5,21 (4,40-13,68)	3,90 (2,44-4,82)	7,59 (4,12-10,99)
	NOEL	**9**	17,15 (14,26-19,36)*	1,07 (3,28-4,21)	10,15 (6,76-12,69)
	LOEL	**8**	14,82 (7,88-16,33)	0,90 (3,16-6,04)	5,68 (4,10-8,83)
			Concentração sérica		
Linhagem	**Tratamento**	**N**	**FSH**	**LH**	**Progesterona**
Wistar	**Controle**	**8**	16,08 (13,28-21,86)	4,87 (2,00-12,56)	8,17 (5,88- 10,29)
	NOEL	**9**	13,19 (12,83-19,87)	4,12 (3,33-9,02)	5,62 (4,57-7,57)
	LOEL	**9**	15,24 (14,45-16,60)	2,29 (1,66-3,12)	5,49 (4,76-7,06)
			Concentração sérica		
Linhagem	**Tratamento**	**N**	**FSH**	**LH**	**Progesterona**
Lewis	**Controle**	**8**	4,73 (4,35-8,41)	3,80 (2,44-4,76)	6,58 (5,34-7,25)
	NOEL	**7**	5,20 (4,69-9,13)	3,69 (3,04-4,53)	4,92 (3,61-5,29)
	LOEL	**5**	4,88 (4,27-13,51)	3,07 (2,44-3,22)	4,49 (3,35-5,55)

N: número efetivo de animais. Dados expressos em mediana amplitude semi- interquartílica (Q1-Q3).

*Significativamente diferente do controle ($p<0,05$). Teste de Kruskal–Wallis seguido pelo Teste Dunn.

Tabela 8. Folículos ovarianos e corpo lúteo da linhagem SD.

Estruturas	**N**	**Controle**	**N**	**NOEL**	**N**	**LOEL**
Total de folículos	**30**	112,47 (69,47-152,40)	**26**	61,61 (50,01-99,70)*	**24**	80,90 (49,90-107,27)
Folículo Primordial e Primário	**30**	51,39 (26,00-97,80)	**26**	33,60 (22,38-50,39)	**24**	30,01 (21,51-55,45)
Folículo Pré Antral	**30**	15,61 (7,65-24,03)	**26**	12,14 (5,22-20,20)	**24**	10,80 (4,54-19,46)
Folículo Antral	**30**	21,35 (15,61-35,75)	**26**	11,51 (4,85-17,70)*	**24**	20,60 (9,39-27,80)
Folículo Atrésico	**30**	5,65 (1,11-14,83)	**26**	5,10 (0-8,35)	**24**	6,85 (0-13,02)
Corpo Lúteo	**30**	55,10 (45,67-74,78)	**26**	45,17 (36,12-61,70)	**24**	44,45 (35,96-54,01)*

N: número efetivo de cortes. Dados expressos em mediana amplitude semi- interquartílica (Q1-Q3).

Total de folículos:* significativamente diferente do controle ($p<0,05$). Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Folículo Antral: *significativamente diferente do controle ($p<0,01$). Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Corpo Lúteo: *significativamente diferente do controle ($p<0,05$). Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Tabela 9. Folículos ovarianos e corpo lúteo da linhagem Wistar.

Estruturas	N	Controle	N	NOEL	N	LOEL
Total de folículos	**24**	148,17(96,74-182,72)	**27**	153,23 (105,74-178,00)	**27**	165,70 (110,48-208,04)
Folículo Primordial e Primário	**24**	47,96 (28,94-102,47)	**27**	67,33 (41,36-99,00)	**27**	46,32 (29,72-77,24)
Folículo Pré Antral	**24**	23,60 (15,20-31,23)*	**27**	41,00 (22,86-57,80)	**27**	43,13 (22,18-58,59)
Folículo Antral	**24**	40,59 (29,75-58,52)	**27**	32,26 (18,45-42,84)	**27**	52,39 (35,66-71,67)*
Folículo Atrésico	**24**	7,29 (5,71-13,43)	**27**	6,83 (0-12,53)	**27**	6,59 (0-10,45)
Corpo Lúteo	**24**	67,40 (51,94-79,00)	**27**	57,10 (49,30-68,71)	**27**	54,94 (42,67-72,17)

N: número efetivo de cortes. Dados expressos em mediana amplitude semi- interquartílica (Q1-Q3).

Folículo Pré Antral: *significativamente diferente do NOEL ($p<0,05$) e LOEL ($p<0,05$). Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Folículo Antral: *significativamente diferente do NOEL ($p<0,05$). Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Tabela 10. Folículos ovarianos e corpo lúteo da linhagem Lewis.

Estruturas	N	Controle	N	NOEL	N	LOEL
Total de folículos	**23**	178,24 (126,48-211,71)	**21**	229,47 (165,92-298,26)*	**15**	131,77 (109,09-144,47)
Folículo Primordial e Primário	**23**	60,17 (35,56-99,38)	**21**	72,33 (38,29-58,60)	**15**	22,79 (11,72-68,85)*
Folículo Pré Antral	**23**	21,68 (17,11-39,30)	**21**	51,05 (20,76-66,17)	**15**	35,18 (20,50-40,19)
Folículo Antral	**23**	51,97 (36,51-72,33)	**21**	79,30 (20,50-40,19)	**15**	45,60 (30,62-69,03)
Folículo Atrésico	**23**	9,38 (0-22,08)	**21**	12,47 (0-34,00)	**15**	0,00 (0-11,63)
Corpo Lúteo	**23**	41,58 (34,95-60,87)	**21**	47,85 (33,59-63,82)	**15**	43,84 (35,24-58,42)

N: número efetivo de cortes. Dados expressos em mediana amplitude semi- interquartílica (Q1-Q3).

Total de folículos:* significativamente diferente do LOEL ($p<0,0001$). Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Folículo Primordial e Primário: * significativamente diferente do NOEL ($p<0,05$). Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

Anexos

unesp Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 722 obre o Projeto de Pesquisa "Quantificação de folículos ovarianos e CYP 450 hepática em ratos fêmeas Lewis, Wistar e Sprague-Dawley tratados com mistura de cinco praguicidas em baixas doses", a ser conduzido por Viviane Mattos Pascotto, orientada pela Profª Drª Noeme Sousa Rocha, com a participação dos Pesquisadores Colaboradores: Carla Adriene da Silva Franchi, Deilson Elgui de Oliveira, João Lauro Vianna de Camargo e Suzane Ramos da Silva, 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 provenientes de Biotério convencional sem condições de emitir Atestado de Sanidade.

Tão logo seja apresentado o Certificado do CEMIB-UNICAMP, substituiremos o presente certificado.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 26 de março de 2.009

Prof. Drª Regina Helena G. Martins
Presidente da CEEA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

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

FMB

JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa " Quantificação de folículos ovarianos e CYP 450 hepática em ratos fêmeas Leiws, Wistar e Sprague-Dawley tratados com mistura de cinco praguicidas em baixas doses"

aprovado pelo CEP em 26/03/2009, teve seu título alterado para "Influência da mistura de cinco praguicidas em baixas doses sobre o sistema reprodutor de ratas Sprague-Dawley, Wistar e Lewis", sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Dissertação de Mestrado.

Botucatu, 12/01/2010

Nome/Assinatura do(a) aluno(a) Vanessa Mottin Pancotto

Nome/Assinatura do(a) orientador (a) Ivone Yonekura

Programa de Pós Graduação em Patologia

- Preencher formulário em 2 vias e protocolar no respectivo CEP

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

Viviane Mattos Pascotto
Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP
Depto de Patologia-TOXICAM
Botucatu-SP

Atestado de Saúde Animal

Atestamos que os ratos heterogênicos da linhagem **NTacUnib:SD,** provenientes da Divisão de Expansão de Matrizes 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. No atestado consta a 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: Março/2009.

Campinas, 07 de julho de 2009.

Drª. Delma Pegolo Alves
Diretora - Cemib/Unicamp
E-mail : diretoria@cemib.unicamp.br

Dr. Rovilson Gilioli
Controle de Qualidade Animal
E-mail: sanitario@cemib.unicamp.br

Rua Cinco de Junho, 230 – Cidade Universitária Zeferino Vaz – Barão Geraldo – CEP: 13.083-970 – Campinas - SP
Fone/Fax: (19) 3521-7652 - Universidade Estadual de Campinas – CNPJ 46.068.425/0001-33

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

Viviane Mattos Pascotto
Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP
Depto de Patologia-TOXICAM
Botucatu-SP

Atestado de Saúde Animal

Atestamos que os ratos heterogênicos da linhagem **Unib:WH,** provenientes da Divisão de Produção 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. No atestado consta a 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: Março/2009.

Campinas, 07 de julho de 2009.

Drª. Delma Pegolo Alves
Diretora - Cemib/Unicamp
E-mail : diretoria@cemib.unicamp.br

Dr. Rovilson Gilioli
Controle de Qualidade Animal
E-mail: sanitario@cemib.unicamp.br

Rua Cinco de Junho, 230 – Cidade Universitária Zeferino Vaz – Barão Geraldo – CEP: 13.083-970 – Campinas - SP
Fone/Fax: (19) 3521-7652 - Universidade Estadual de Campinas – CNPJ 46.068.425/0001-33

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

Profª. Drª. Meire França Martinez
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP
Departamento de Patologia – TOXICAM
Botucatu - SP

Atestado de Saúde Animal

Atestamos que os ratos isogênicos da linhagem **Lew/HsdUnib**, provenientes da Divisão de Produção 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. No atestado consta a 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: Março/2009.

Campinas, 11 de maio de 2009.

Drª. Delma Pegolo
Diretora - Cemib/Unicamp
E-mail : diretoria@cemib.unicamp.br

Dr. Rovilson Gilioli
Controle de Qualidade Animal
E-mail: sanitario@cemib.unicamp.br

Rua Cinco de Junho, 230 – Cidade Universitária Zeferino Vaz – Barão Geraldo – CEP: 13.083-970 – Campinas - SP
Fone/Fax: (19) 3521-7652 - Universidade Estadual de Campinas – CNPJ 46.068.425/0001-33